

### Diskussion

Die Mikrolitermethode hat gegenüber der Millilitermethode folgende Vorzüge:

1. Sie ist zuverlässiger; die Standardabweichung beträgt 1,6 gegenüber 2,7  $\mu\text{g}/100\text{ ml}$  bei der Millilitermethode.
2. Die Probemenge beträgt ein Zehntel der Millilitermethode.
3. Sie ist billiger, weil die hohen Reinigungskosten für

die Glasgeräte entfallen; man kann fabrikneue Kunststoff-Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen verwenden.

4. Die Infektionsgefährdung ist wesentlich geringer als bei der Millilitermethode, weil die Versuchung, Proben mit dem Mund in die Pipetten anzusaugen, entfällt und die infizierten Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen sofort weggeworfen werden.

Frau I. HOFMEISTER danken wir für die sorgfältige Durchführung der Bestimmungen.

### Literatur

1. GOVANELLO, T. J. und T. PETERS in: D. SELIGSON, Standard Methods of Clinical Chemistry, Bd. IV, S. 139—150, Academic Press, New York-London (1963). — 2. DEGGAU, E., F. KRÖHNKE, K. E. SCHMALKE, HJ. STAUDINGER und W. WEIS, diese Z. 3, 102 (1965). — 3. BÜTTNER, H., Dtsch. med. Wschr. 88, 910 (1963). — 4. GLADTKE, E., H. BÜTTNER und D. STAMM, diese Z. 3, 61 (1965).

— 5. BÜTTNER, H., Mikroliteranalysen, in: Handbuch der Kinderheilkunde Bd. 2, 1. Teil, S. 860—874, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1966). 6. HENRY, R. I. und R. L. DRYER in: D. SELIGSON, Standard Methods of Clinical Chemistry Bd. IV, S. 205—237, Academic Press, New York-London (1963).

Dr. med. Dr. rer. nat. D. Stamm  
Klin.-chem. Abteilung  
an der Chirurg. Universitätsklinik  
63 Gießen, Klinikstr. 37

## Die enzymatische Blutzucker-Bestimmung *in vitro* und *in vivo* mit dem Auto-Analyzer

Von E. KAWERAU

*Aus dem Department of Chemical Pathology, St. James' Hospital, London*

(Eingegangen am 28. Februar 1966)

Im ersten Abschnitt wird die Bestimmung von Glukose in Blut- und Liquorproben mit dem Glukose-Oxydase-Peroxydase System beschrieben; o-Tolidin dient als Farbreagenz. Die Technik und die Grundprinzipien, die der Anlage des Schlauch-Verteilersystems zugrunde liegen, werden eingehend besprochen. Die Methode erlaubt es, 40 Bestimmungen in der Std. zu machen; von der Blutentnahme bis zum ausgewerteten Resultat werden nur 8 Min. benötigt. Im zweiten Abschnitt wird die Glukose im Blut laufend am Patienten bestimmt, der durch einen intravenösen Katheter direkt mit dem „Technicon“ Auto-Analyzer verbunden ist. Die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit beider Methoden sind dargestellt und statistisch gesichert.

A rapid method is described for the determination of blood and c. s. f. glucose with the glucose-oxydase-peroxidase system employing o-tolidine as the colour reagent. Some of the fundamental principles underlying the construction of the manifold are discussed. The method allows 40 determinations per hour to be made and no more than 8 minutes need elapse after bleeding the patient and the readout of the result. In the *in vivo* technique, the patient is connected directly to the „Technicon“ Auto-Analyzer by indwelling catheter in an ante-cubital vein, but basically, it is the same method. The accuracy and reproducibility of the method has been tested and the results have been submitted to the usual statistical check.

Eine schnelle, spezifische und störungsfreie Bestimmung der Glukose im Blut ist für die Klinik von größter Bedeutung. Unsere Methode, die in den letzten Jahren entwickelt wurde, hat sich als einfach und zuverlässig erwiesen, und da sie anderen Methoden gegenüber gewisse Vorzüge hat und vor allen Dingen schneller arbeitet, soll sie hier eingehend beschrieben werden. Außerdem soll die Methode mir hier als Modell zur Erläuterung einiger Grundprinzipien der Konstruktion neuer Verteiler-Schlauchsysteme für den Auto-Analyzer dienen. In manchen Publikationen, zu diesem Thema fehlen die elementarsten Angaben, so daß es oft unmöglich ist, danach zu arbeiten. Diesem Zustand versucht ein Sonderausschuß der „British Association of Clinical Biochemists“ abzuhelpfen, indem er in einer Arbeitsgemeinschaft die

Instrumente der „Technicon Company“ geprüft hat und zu dem Schluß gekommen ist (1), daß jede neu veröffentlichte Methode, die mit dem Auto-Analyzer arbeitet, folgende Angaben enthalten muß:

- a) Photographie einer Serie von Eichkurven aus der der Bereich und die Reproduzierbarkeit der Methode zu erkennen ist;
- b) Angabe der gemessenen Geschwindigkeit mit der der Probennehmer arbeitet;
- c) Angabe der gemessenen Geschwindigkeit des Schreibers;
- d) Angabe der wirklichen Umdrehungszahl der Walzenpumpe;
- e) Förderleistung der Pumpenschläuche bei 15 Sek./Umdrehung der Walzenpumpe;
- f) Temperatur des Dialysators und anderer Heizbäder;
- g) Volumen der Heizschlangen, falls solche Verwendung finden;
- h) Raumtemperatur.

Der Arbeitsausschuß gibt auch an, wie diese Messungen vorzunehmen sind; sie erfordern keine sonderlichen Instrumente. Man fragt sich nur, gehen diese Forderungen weit genug oder zu weit? Es ist hier nicht am Platze, das „Für“ und „Wider“ der einzelnen Punkte zu diskutieren; auf jeden Fall ist es begrüßenswert, daß ein Anfang in dieser Richtung gemacht worden ist und so weit es geht, sollte man sich an diese Vorschläge vorläufig halten.

**In vitro-Methode**

**Konstruktion des Verteilers**

Die Trennung der Glukose von Serumeiweiß und Blutzellen erfolgt im Dialysator; nach Diffusion auf die andere Seite der Membran nimmt der Enzymstrom sie in Empfang, doch wird das durch die Oxydase-Peroxydase freiwerdende Wasserstoffperoxyd erst nach Austritt aus dem Dialysator an das o-Tolidin weitergegeben. Der so entstehende blaue Farbstoff wird durch Zugabe von Schwefelsäure in einen beständigeren gelben Farbstoff umgewandelt, der zur Küvette des Kolorimeters weiterfließt.

Es ist wichtig, daß man bei der Konstruktion des Verteilers darauf achtet, daß die *Strommenge*, die den beiden Seiten der Dialysator-Membran zugeführt wird, *gleich* ist. Ist das nicht der Fall, dann gibt es eine unscharfe Trennung, die aber nicht immer gleich am ersten Kurvenbild zu erkennen ist (Verschleppung durch Segmentverschiebung). Die zweite Grundbedingung für den Dialysator ist, daß auf beiden Seiten der Membran *gleicher Druck* herrscht. Bei den meisten Verteilern regelt sich das von selbst, solange die Eintrittsvolumina gleich sind und an den Austrittsstellen keine Hindernisse entstehen. In vielen Fällen ist es aber so, daß Reagenzien erst nach der Dialyse dem Empfangsstrom zugegeben werden und vielleicht dann noch durch eine Heizschlange laufen — eine Anordnung, die auf jeden Fall Gegendruck auf die Membran ausübt. Eine einfache Skizze (Abb. 1) erläutert die Verhältnisse. In der Mitte ist die einfache Diffusions-Dialyse dargestellt; hier sind Druck und Volumina auf beiden Seiten der Membran gleich. „Gegendruck-Dialyse“ ist unerwünscht, da hier Wasser in zur Diffusion entgegengesetzter Richtung wandert. Den links abgebildeten Zustand nennen wir „Überdruck-Dialyse“; hier wandert das Wasser in der Diffusionsrichtung. Über- und Gegendruck-Dialyse können durch Zufall entstehen (Ausdehnung der Luftbläschen in einer Heizschlange, Ansammlung von Fibringerinnsel oder Erythrozytenmembran-Niederschlag an Schlauch-Kupp-

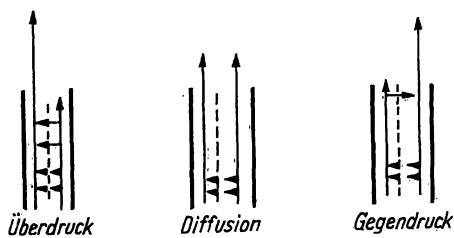


Abb. 1  
Formen der Dialyse

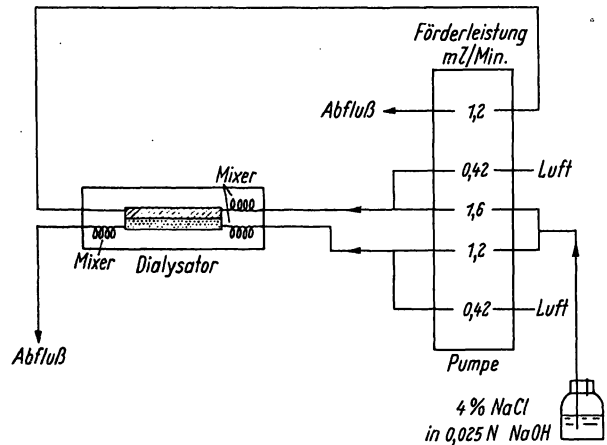


Abb. 2

Überdruck-Verteiler zur Standardisierung der Membranporosität

lungen). Überdruck-Dialyse kann aber auch bewußt eingeschaltet werden, wenn schwer diffundierende Substanzen zu messen sind. Sie ist mit Erfolg vom Autor zur Bestimmung des Bromsulphaleins benutzt worden (2) und sie wird auch hier zur Standardisierung der Membran-Porosität vorgeschlagen. Zu diesem Zweck wird folgender einfacher Verteiler, der im Fließ-Schema (Abb. 2) abgebildet ist, empfohlen. Er arbeitet mit einem Überdruck von 0,4 ml/Min. und benutzt eine schwach alkalische Natriumchlorid Lösung (4% NaCl in 0,025 N NaOH). Viele Membranen geben kein unterschiedliches Resultat nach Überdruckbehandlung, andere zeigen einen erheblichen Anstieg der Porosität. Die Überdruckbehandlung braucht nur dann angewandt zu werden, wenn die schwächste Eichlösung keinen befriedigenden Ausschlag gibt; bereits nach einer halben Std. hinterläßt sie eine permanent veränderte Membran. Man sollte eigentlich annehmen, daß für eine so kleinemolekulare Substanz wie die Glukose die Membranen immer ausreichen, um ein Diffusions-Gleichgewicht während der Dialysendauer zu gewährleisten. Es kommt aber auf die Zeit an; bei unserem Verteiler sind es 1,5 Minuten und es scheint so als ob diese Zeit für ganz geringe

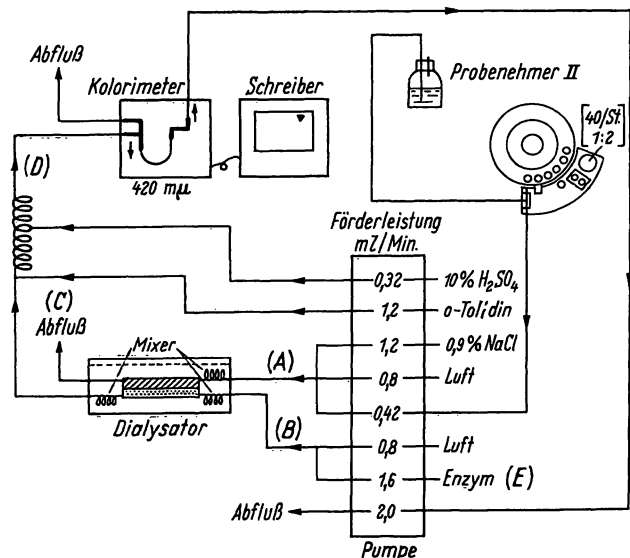


Abb. 3

Verteiler und Fließ-Schema für die *in vitro*-Glukosebestimmung

Tab. 1

(A)	(C)	(B)	(D) <sup>1)</sup>	(E)		
1,80	2,06	1,60	1,35	1,60	gemessener Wert Soll-Wert	Alter Verteiler Alte Membran
1,62	1,62	1,60	1,60	1,60		
1,61	1,62	1,61	1,59	1,61	gemessener Wert Soll-Wert	Neuer Verteiler Neue Membran
1,62	1,62	1,60	1,60	1,60		

<sup>1)</sup> Für diese Messung laufen die Leitungen Schwefelsäure und o-Tolidin auf Luft.

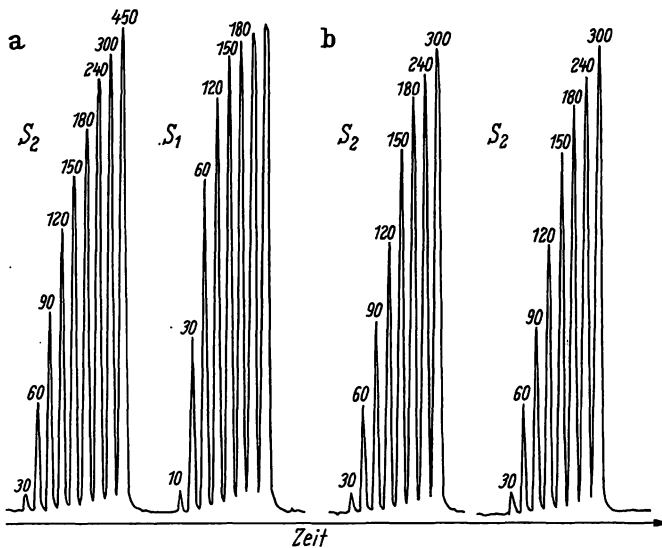


Abb. 4

a) Eichlösungen mit Verteiler System 1 und 2.

b) Eichlösungen des Verteiler System 2 vor und nach 3-stdg. Laufzeit

Glukose-Mengen manchmal nicht ausreicht. Meistens kann die Membran so benutzt werden, wie sie aus der Packung kommt; sollten sich aber Schwierigkeiten einstellen, so ist es empfehlenswert, diese Methode anzuwenden.

Für die Glukose-Bestimmung genügt ein Verteiler, der mit einfacher Diffusionsdialyse arbeitet. Das Fließ-Schema ist in Abbildung 3 wiedergegeben. Die Forderung der „Association of Clinical Biochemists“, die Förderleistung der Pumpenschläuche an den Stellen (A) und (B) zu prüfen, schien uns nicht ausreichend, denn wenn man außerdem Auskunft über die Druck-Verhältnisse im Dialysator haben will, so muß man wenigstens noch an den Stellen (C) und (D) prüfen — und unter Umständen auch bei (E). An einem Verteiler, der 6 Monate gearbeitet hatte, ließ sich der praktische Wert dieser Messungen prüfen (Tab. 1).

Die gemessenen Werte zeigen eindeutig, daß bei einer neuen Membran das Durchlaufen von einer Doppel-Mischschlange nach Austritt aus dem Dialysator keinen Gegendruck auf die Membran ausübt, während bei einer alten Membran ein ganz erheblicher Gegendruck zu beobachten ist. Auch ist aus den Daten zu ersehen, daß die Pumpenschläuche, die am Nächsten zum Scharnier der Walzenpumpe liegen, am meisten gelitten hatten; das gemeinsame Fördervolumen von 1,8 ml/Min. liegt außerhalb der von der Firma zuerkannten Grenzen (3)

für diese Schläuche und ist nur durch Überbenutzung zu erklären.

Um den anderen Forderungen der „British Association of Clinical Biochemists“ Genüge zu tun, seien hier noch folgende Messungen angegeben:

- Eichkurven (Abb. 4a und 4b);
- Geschwindigkeit des Probennehmers — Soll-Wert 40/Std. davon in der Probe 0,5 Min., in der Waschflüssigkeit 1,0 Min. — gemessen: 89 Sek./Zyklus;
- Schreiber 4 mm/Min.
- Pumpe 15 Sek./Umdrehung
- Temperatur des Dialysators: 36,8°
- Zimmertemperatur: 19—23°.

Zur Konstruktion des *in vitro* Systems ist ferner zu erwähnen, daß auf die richtige Position der Mischschlangen im Dialysator geachtet werden muß. Im Enzymstrom dient die erste Schlange der Vorwärmung der Enzymlösung, was besonders wichtig ist, wenn man mit im Kühlschrank aufbewahrten Lösungen arbeitet. Die Mischschlange für die dem Strom zugeführte Schwefelsäure und o-Tolidin-Lösung ist von derselben Konstruktion wie in Abbildung 3. Die Waschflüssigkeit für den Probennehmer II wird aus einem hochgestellten Behälter dem Reservoir zugeführt. Ferner ist zu beachten, daß die Nocke im Probennehmer II das Verhältnis 1:2 hat und nicht das gewöhnliche 2:1.

#### Reagenzien

(Puffer und Enzymlösungen nach WINCEY und MARKS (4)).

**Puffer:** 0,5M Acetat-Puffer: 30 ml Eisessig werden zu 800 ml dest. Wasser gegeben und durch langsames Hinzufügen von 40-proz. NaOH auf pH 5 gebracht; die Lösung wird auf einen Liter mit dest. Wasser verdünnt und der pH Wert noch einmal nachgeprüft.

**o-Tolidin:** 1-proz. in Äthanol abs. (im Kühlschrank gut haltbar).

**Peroxydase:** Salzfrees, lyophilisiertes Präparat aus Meerrettich, von dem eine Lösung von 20 mg/100 ml in 0,9-proz. NaCl hergestellt wird. Das Enzym ist gegen Spurenelemente und Temperatur empfindlich; das Trockenpräparat muß unter Feuchtigkeitsschutz im Kühlschrank aufbewahrt werden.

**Glukose-Oxydase:** „Fermcozyme 653A“ (750 E/ml) als Lösung geliefert, 1—2 Jahre bei 4° haltbar.

Beide Enzyme sind amerikanischer Herkunft und in Europa nur durch die Londoner Fa „Hughes & Hughes, Ltd.“, 10, Stratton Street, London W., 1. erhältlich. Das technische Produkt Glukose-Oxydase der Fa. Boehringer, Mannheim hat in unseren Händen keine brauchbaren Ergebnisse geliefert; gereinigte Präparate dieser Firma kamen des Preises wegen hier nicht in Frage.

**o-Tolidin-Puffer:** 1,0 ml in 100 ml der Acetat-Pufferlösung (braune Flasche).

**Enzym-Puffer:** 5,0 ml Peroxydase und 1,0 ml Fermcozyme in 100 ml der Acetat-Pufferlösung; dazu gibt man 2 Tropfen „Tween 20“ (braune Flasche).

**Schwefelsäure:** 1:10 (V/V).

**NaCl-Lösung:** Zu jedem Liter 0,9-proz. NaCl-Lösung werden 20 Tropfen „Tween 20“ hinzugegeben (Verdünnungslösung, auch Waschlösung für den Probennehmer).

**Glukose-Eichlösungen:** Glukose wird mehrere Wochen über Silicagel getrocknet; 2 g werden ausgewogen und in 1 Liter gesättigter Benzoesäure gelöst. Weitere Verdünnungen werden mit der Blutpräservierungsflüssigkeit gemacht, damit Blutproben und Eichlösungen eine ungefähr gleiche Fluorid-Oxalat Konzentration aufweisen. Für die *in vitro* Methode wird eine Verdünnungsreihe von 1,0 mg/100 ml—45 mg/100 ml hergestellt, für die *in vivo* Methode eine von 10 mg/100 ml—500 mg/100 ml.

**Blut-Präservierungslösung:** 1,0 g Kaliumoxalat und 0,3 g Natriumfluorid/l aqua dest. Diese Lösung hat dreierlei Verwendung: 1. wird sie für die Glukose-Eichlösung benutzt; 2. dient sie zur Vorverdünnung der Blut- und Liquorproben und 3. zur Beschickung der Behälter, in denen Kapillarblut gesammelt wird. Für Kapillarblut wird die Lösung direkt in die Becher des Probennehmers gegeben und sie werden mit Kappen versehen (0,9 ml zu dem 0,1 ml Kapillarblut zupipettiert wird).

## Diskussion

Es ist grundsätzlich nicht notwendig eine in fließendem Strom ablaufende Enzymreaktion der statischen Handmethodik nachzuahmen. Die Verzögerungsschlangen im Schlauchsystem anderer Autoren (4—7), die alle aus dem Bedürfnis der Anpassung an die Handmethoden stammen, sind überflüssig. Unsere Gesamtzeit für die Enzymreaktion beträgt knappe 4 Min. bei 37°. Für die statische Methode gäbe das nur einen kleinen Bruchteil der Gesamtreaktion (8) und es ließe sich nicht die Linearität über die Konzentrationsweite erreichen, die wir erzielen. Die Ergebnisse scheinen die Zeitbeschränkung zu rechtfertigen. Ferner müssen wir die Verwendung von Fluorid-Oxalat-Lösung rechtfertigen. Nach unserer Erfahrung sind die Enzyme gegen diese Fluorid-Oxalat-Konzentrationen *nicht* empfindlich, wahrscheinlich spielt dabei die Verdünnung ( $\times 16$ ) eine Rolle.

Am heftigsten wird aber wohl die Vorverdünnung der Blutproben (Liquor) kritisiert werden. Der Fehler, der dadurch entsteht, kommt in Abbildung 5 und in den Tabellen 3 und 4 zum Ausdruck, er läßt sich aber gut tragen. Wenn es nicht absolute Regel im Krankenhaus ist, daß alle Blutproben *venöses* Blut sind, dann hat die Aufarbeitung von *Kapillarblut* große Vorteile, z. B. in der Paediatric, der Diabetiker-Klinik, und der Unfall-Station. Mit *Vollblut* arbeiten heißt die Probe bis zum Ansaugen gut gemischt halten und unserer Erfahrung nach ist die Rührvorrichtung, die dem Probennehmer II eingebaut ist, nicht robust genug für Dauerbetrieb. Mit aus diesem technischen Grund machen wir die Vor-

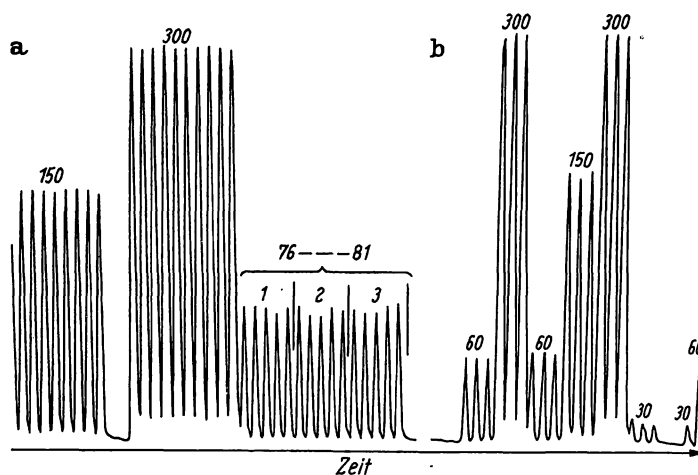


Abb. 5

- a) Reproduzierbarkeit der Eichlösungen (links) und fünfzehnmalige Vorverdünnung derselben Blutprobe (rechts)  
(1, 2, 3: Je 5 Pipetten 3 verschiedener Firmen).
- b) Übertragungs-Test

verdünnung. Wir hämolysieren sogar das Blut dabei und werden von den Störfaktoren, die dabei auftreten, nicht allzusehr geplagt. Den Hauptstörfaktor, die Harnsäure, habe ich gründlich untersucht. Aus Tabelle 2 ersieht man, daß diese bei normaler Arbeitsweise nicht ins Gewicht fällt.

Erst bei Harnsäurekonzentrationen ab 20 mg/100 ml müsste man mit einer geringen Störung rechnen. Dieser Wert wird aber nur höchst selten erreicht. Die endgültige Blutverdünnung im Dialysator ist 1:160. Man kann aber auch gut den Probennehmer-Pumpenschlauch von der Förderleistung 0,42 ml/Min. auf 0,32 ml/Min. herabsetzen, dann ist der Verdünnungsfaktor 1:200. Also alle Proben, auch die venösen Blutes, werden vorverdünnt. Das hat den weiteren Vorzug, daß die Probeentnahme vollkommen störungsfrei verläuft und man der Analyse wirklich den Rücken kehren kann. Beim Arbeiten mit Vollblut kann es vorkommen, daß das Blut trotz Antikoagulantien kleine Gerinnsel aufweist, und wenn der Probennehmer erst einmal solch ein kleines Gerinnsel ansaugt, muß eine ganze Serie Blutanalysen wiederholt werden.

Unsere Methode unterscheidet sich von vielen anderen auch dadurch, daß wir mit unseren Eichlösungen in der Routine nur auf 300 mg (oder 450 mg/100 ml) heraufgehen. Wir haben gefunden, daß die Linearität der Reaktion beschränkt ist und daß man sie nur innerhalb der zehnfachen Konzentration ausnutzen kann; praktisch heißt das, daß man in der Konstruktion des Verteilers die Pumpenschläuche in der Förderleistung so

Tab. 2  
Einfluß der Harnsäure (Werte in mg/100 ml)

Glukose aktuell	Blut		Pufferlösung		
	Harnsäure aktuell	Glukose gefunden	Glukose aktuell	Harnsäure aktuell	Glukose gefunden
120	4,5	120	140	—	139
120	14,5	120	140	10	140
120	24,5	105 (12,5%)	140	20	111 (20,3%)

Tab. 3  
Reproduzierbarkeit der Eichlösungen *niedriger* Konzentration<sup>1)</sup>

mg Glukose / 100 ml Blut		30	60	90	120	150	180	240	300
1. Woche	1	0,020	0,100	0,205	0,330	0,540	0,710	0,85	1,05
	1a	0,020	0,108	0,200	0,328	0,529	0,700	0,83	1,05
	2	0,018	0,107	0,217	0,350	0,470	0,610	0,81	1,00
2. Woche	3	0,007	0,080	0,170	0,292	—	0,510	0,71	1,18
	4	0,008	0,070	0,160	0,262	0,348	0,489	0,665	0,81
3. Woche	4a	0,008	0,067	0,147	0,262	0,350	0,485	0,680	0,81
	4b	0,011	0,074	0,152	0,261	0,349	0,465	0,700	0,80

Angegeben sind die Extinktionswerte bei 420 m $\mu$ ; Analysen gleicher Nummer sind am selben Tag gemacht worden (morgens und abends)

<sup>1)</sup> Die wirkliche Konzentration der Eichlösungen ist nur ein Zehntel der angegebenen,

Tab. 4  
Statistische Analyse der Reproduzierbarkeit

Gehalt der Eichlösung (mg/100 ml)	60	90	150	300	Blut
Gefundener Durchschnittswert (mg/100 ml)	60,0	88,8	152,3	304,1	78,2
X (mg/100 ml)	1,5	2,0	1,9	3,6	1,7
Variationskoeffizient (%)	2,5	2,3	1,2	1,2	2,2
Anzahl der Analysen	10	20	10	11	15

wählen kann, daß die Linearität über die zehnfache Konzentration erhalten bleibt; ich kann also entweder von 30—300 mg/100 ml gehen oder von 60—600; darüber oder darunter büßt die Methode an Genauigkeit ein (Abb. 5). Dies läßt sich auch nicht durch Verstärkung der Enzymkonzentration verbessern; dreifache Konzentration der Glukose-Oxydase-Peroxydase-Lösung hat keinen nennenswerten Erfolg. Da uns auch bei Kapillarblut nach Verdünnung gewöhnlich 1,0 ml zur Verfügung steht und der Probennehmer nur 0,21 ml aufsaugt, lassen sich höhere Konzentrationen an derselben Probe durch weitere Verdünnung leicht bestimmen. Es ist besser die tief liegenden Werte gut gesichert zu haben, als die hoch liegenden, weil z. B. beim Liquor oft nur sehr geringe Mengen vorhanden sind und die Glukosewerte verschwindend gering sein können. Aus demselben Grund ist der Verteiler so konstruiert, daß wir von einer Probe zur anderen keine Verschleppung oder Übertragung haben. Ein Wert von 30 mg/100 ml, der einem von 300 mg/100 ml folgte gab einen Analysenwert von 32 mg/100 ml (Abb. 5b); das liegt innerhalb der Fehlergrenze der Reproduzierbarkeit. In den meisten bisher publizierten Methoden ist das nur dadurch erreicht worden, daß man nach jeder Probe einen Becher mit Waschflüssigkeit eingeschaltet hat (z. B. (6)).

Reproduzierbarkeit, Genauigkeit und Meßbereich

Der Meßbereich läßt sich nach oben nur auf Kosten der Linearität oder Verschlechterung der Zwischenwäsche erweitern, nach unten hin einfach dadurch, daß man die beiden Pumpenschläuche, die den Probenstrom bilden, mit Teflon-Kupplungsgliedern versieht und dann nach Belieben umschaltet, und für den Bereich unter 10 mg/100 ml Glukose den 0,42 Probennehmer-Schlauch mit dem 1,2 Verdünnungsschlauch auswechselt; auf diese Weise also das dreifache der Probe ansaugt. Der Effekt ist in der Eichserie S1 in Abbildung 4a zu sehen.

Mir ist keine Arbeit bekannt in der die Reproduzierbarkeit der Eichlösungen über mehrere Wochen hin angegeben ist; aus Tabelle 3 läßt sich ohne weitere statistische Behandlung sehen, daß die Eichlösungen, die am selben Tag gelaufen sind, gute Reproduzierbarkeit der Werte aufweisen, daß aber die Eichlösungen im Verlauf von Wochen Verluste zeigen, die in der dritten Woche bei rund 20% liegen. Die *niedrigen* Eichlösungen müssen also jede Woche frisch zubereitet werden.

Bei den Eichlösungen höherer Konzentration scheinen bei zweckmäßiger Aufbewahrung innerhalb eines Monats keine Veränderungen aufzutreten.

Die Reproduzierbarkeit von aufeinander folgenden Lösungen gleicher Glukosekonzentration ist aus Tabelle 4 und Abbildung 5a zu ersehen.

Tabelle 4 zeigt weiterhin, daß mit dem Vorpipettieren der Blutproben die Reproduzierbarkeit keinen Schaden leidet. Die 15 Blutverdünnungen wurden mit je 5 Pipetten drei verschiedener Firmen gemacht; die Einzelwerte sind in Tabelle 5 wiedergegeben.

Tab. 5  
Einfluß der Vorverdünnung mit Pipetten verschiedener Firmen  
Verdünnung desselben Blutes (1:10) mit 0,1 ml Blutpipetten

Typ I	Typ II mg/100 ml	Typ III
79	81	78
81	77	77
78	76	76
76	79	78
78	78	81

Eine der Pipettensorten war westdeutscher, die anderen beiden englischer Herkunft, (entsprechend „British Standard Specification 1428“).

Es wäre noch zu zeigen mit welcher Genauigkeit dem Blut hinzugefügte Glukose wiedergefunden wird. Die Resultate sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Tab. 6  
Wiederfindung dem Blute hinzugefügter Glukose  
(Werte in mg/100 ml)

Ursprünglicher Glukosegehalt	Hinzugefügte Glukose	Wieder-gefundene Glukose	Differenz
70	72	71	- 1
75	120	110	-10
62	15	14	- 1
68	22,5	19	- 4
73	45	41	- 4
52	24	20	- 4
90	180	183	+ 3
42	24	30	+ 6
163	58	59	+ 1
58	90	73	-17
59	18	17	- 1
95	21	20	- 1

Standardabweichung der Differenzen = 4,6

Die Resultate sind, was die Reproduzierbarkeit angeht, denen der Handmethoden überlegen, selbst mit der Vorverdünnung. DISCOMBE gibt für seine automatische Methode z. B. für eine Eichlösung von 100 mg/100 ml einen mittleren Durchschnittswert von 103,8 mg/100 ml an und einen Variationskoeffizienten von 5,2 (%). Er hat aber nur 5 Bestimmungen in der Serie und daraus kann man kaum einen Variationskoeffizienten berechnen. Variationskoeffizienten und Mittelwerte gleicher Größenordnung sind auch für andere Konzentrationen von ihm berechnet worden. Es scheint uns also, daß unsere Methode der *Vollblutanalyse* in keinem Fall an Reproduzierbarkeit und Genauigkeit nachsteht. In diesem Sinne decken sich unsere Ergebnisse mit denen von STOWE (9), der die Vorverdünnung mit Unopettenröhrchen macht; seine statistischen Werte gleichen den unsrigen.

Für die Routine genügt die Auswertungsmethode mit durchsichtiger Schablone, die von der Fa. Technicon empfohlen wird. Die ganze Schablone sollte für diesen Zweck benutzt werden. Wir halten es für wichtig, daß jeder Publikation einer neuen Methode, die Photographie einer derartigen Kurve beigelegt wird; sie ist in Abbildung 6 wiedergegeben. Eine exaktere Methode ist es natürlich, die Extinktionswerte der Gipfel von halblogarithmischem Papier abzulesen und zu sehen wie weit sie dem *Lambert-Beer'schen* Gesetz entsprechen. Aus

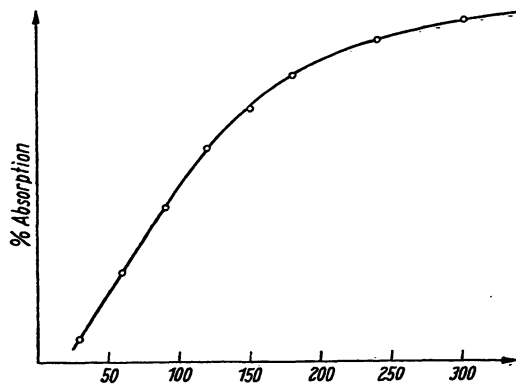


Abb. 6

Prozent Absorption-Eichkurve auf durchsichtige Schablone aufgetragen

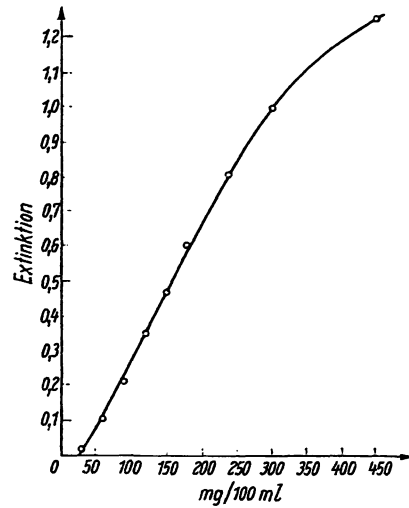


Abb. 7

Dieselben Werte wie in Abbildung 6 als Extinktionswerte aufgetragen

Abbildung 7 ist zu sehen, daß die Kurve bis 300 mg/100 ml linear verläuft, aber über diesen Wert hinaus leicht gekrümmt ist; auch geht sie nicht durch den Nullpunkt. BERGMAYER (11) erwähnt, daß es hierfür noch keine Erklärung gibt. An der graphischen Darstellung der Extinktionswerte ist leicht zu überprüfen, wann es an der Zeit ist, die Eichlösungen zu erneuern und diese Kontrolle sollte ab und zu gemacht werden.

### In vivo-Methode

#### Konstruktion des Verteilers

Die benötigten Apparaturen und ihre Anordnung gehen aus Abbildung 8 hervor. Im Prinzip ist der Verteiler dem der *in vitro*-Methode gleich, einige besondere Punkte benötigen aber noch ausführlicher Erläuterung. Die Anordnung der Pumpenschläuche ist besonders wichtig, wenn die Doppel-End-Blöcke benutzt werden. Es ist allgemeine Regel für ihre Benutzung, daß die dünnsten Schläuche oben liegen müssen; selbst dann kann es notwendig sein, ein paar extra Federn unter den Pumpentisch zu setzen. In der Abbildung muß man sich das Scharnier der Pumpe oben denken und die Schläuche dann in der hier wiedergegebenen Anordnung einsetzen; die Reihenfolge ist nicht willkürlich. Im oberen Teil der Abbildung 8 haben wir funktionsmäßig dasselbe Bild wie in der *in vitro*-Methode. Der untere Teil ist einzig dazu da, die Vorverdünnung des Blutes und den Anschluß mit dem Patienten herzustellen. Zu diesem Anschluß gehört eine Heparin-Zuleitung, die auch dann benutzt wird, wenn der Patient selber heparinisiert worden ist. Der Pfeil zeigt an wo der Patient angeschlossen wird; dieses Stück Schlauch ist entweder der intravenöse Katheter, der in der Vene des Patienten liegt oder der Probennehmer-Schlauch. Die mit einem Sternchen versehene „T“ Verbindung ist aus „Tygon“-Schlauch (0,32 ml/Min. schwarz-schwarz) und muß im Labor selber hergestellt werden. Die Art wie das gemacht wird, ist in Abbildung 9 dargestellt, „T. C.“ heißt dabei Tygon-Zement. Dieser wird hergestellt, indem man ausgediente Pumpenschläuche in kleine Stücke zerschneidet und in Cyclohexanon zu einem dicken Brei auflöst. Es ist

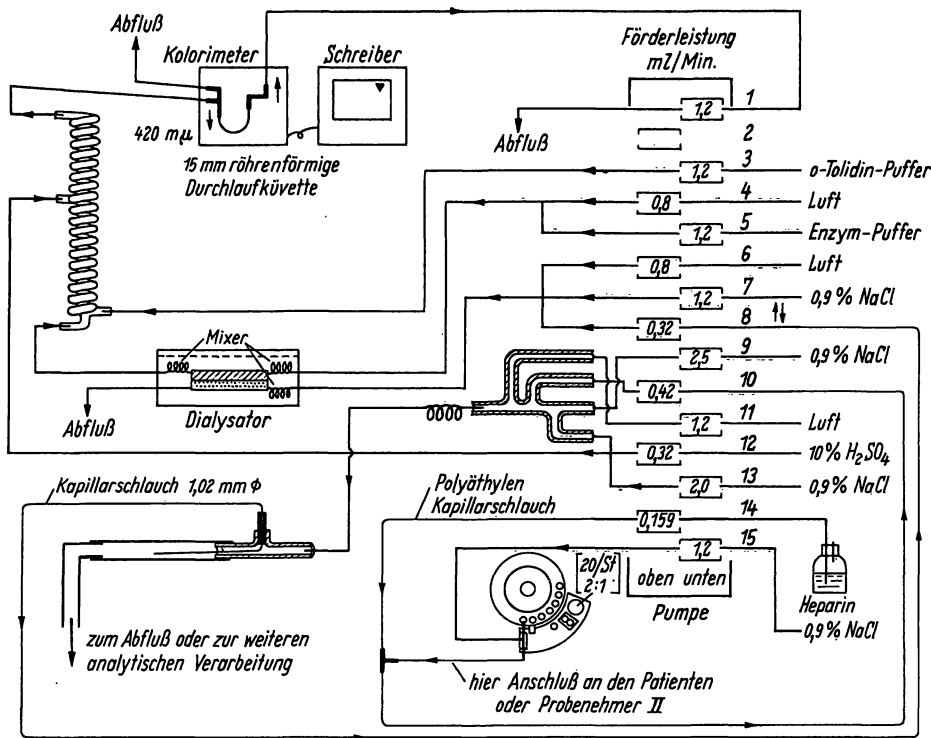


Abb. 8 Verteiler und Fließ-Schema für die *in vivo*-Glukosebestimmung

aufsteigender Linie liegen. Wir haben lange an dieser Stelle ein „Y“ förmiges Entlüfter-Stück gehabt; das gibt aber lange nicht die Trennschärfe wie die „T“ Probenentnahme. Die Entnahme wird hier gewöhnlich mit Pumpenschlauch Nr. 8 gemacht. Wie auch im *in vitro*-Verteiler läßt sich hier Nr. 8 mit Nr. 7 auswechseln, so daß man mit zwei verschiedenen Empfindlichkeitsgraden und Bereichen arbeiten kann. Mit Teflon-Kuppelungsstücken versehen, läßt sich die Umschaltung ohne große Unterbrechung und ohne Wechsel der Reagenzien bewerkstelligen. Diese Umschaltung wird benutzt, wenn wir von dem intravenösen Glukose-Test auf den intravenösen Sulfonylharnstoff-Test umschalten (10). Das Schriftbild eines kontinuierlich registrierten Blutzuckerspiegels haben wir als „Glukogramm“ bezeichnet.

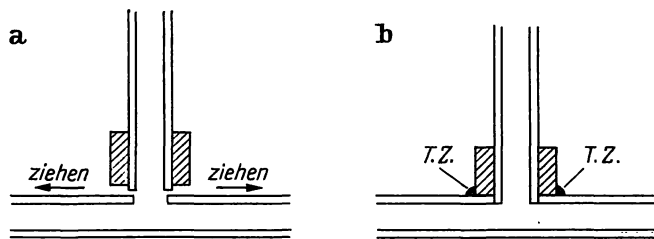


Abb. 9 Herstellung der „T“-Verbindung aus Tygon-Schlauch

wichtig, daß das Blut nicht mit Glas in Berührung kommt bis es ausreichend verdünnt worden ist. Der Heparin-Blutstrom wird hinter der Pumpe sofort weiter verdünnt, läuft durch eine Mischschlange und dann zu einer umgekehrten „T“-Verbindung, wo aus diesem Strom eine kleine Menge entnommen und wieder zur Pumpe zurückgeleitet wird. Die exakte Konstruktion dieses Teiles ist wichtig. Es ist das gewöhnliche weitlumige „T“ Stück, das von der Fa. Technicon geliefert wird. Das Bein vom „T“ wird kurz abgeschnitten und in die Öffnung ein kurzes Stück schwarz-schwarz Schlauch (0,32 ml/Min.) geschoben, dem vorher der dünne Kapillarschlauch (Katheterschlauch 1,02 mm  $\varnothing$ ) eingeführt worden ist. Dieser Kapillarschlauch wird in Fließrichtung nach vorne geschoben, so daß er 2—3 cm vor die „T“ Mündung reicht, wie es in Abbildung 8 gezeigt ist. Es ist auch wichtig, daß das an das „T“-Stück anschließende Schlauchstück im inneren Durchmesser so weit ist wie der äußere Durchmesser des „T“-Stücks. Durch diese Erweiterung der Fließbahn werden die Luftblasen nach oben gedrängt und man kann so aus dem Strom Flüssigkeit absaugen ohne Luft mitzunehmen, allerdings muß dabei dieses weite Schlauchstück in etwas

Reagenzien

Es werden dieselben Lösungen benutzt, die für die *in vitro*-Methode beschrieben worden sind; von Enzym-Puffer und o-Tolidin-Puffer sollten je 500 ml Lösung hergestellt werden; das reicht für eine 5—6 stdg. Untersuchung am Patienten einschließlich der Eichkurven am Anfang und Ende der Arbeitszeit.

Anschluß des Patienten

Wir benutzen meistens eine geeignete Antecubital-Vene, in die wir einen mit Gamma-Strahlung vorsterilisierten Katheter Intracath (Bardic) Nr. 17 von 8 Zoll Länge (20 cm) einführen. Die Kanüle dient nur zur Einführung des Katheters und wird danach entfernt. Das Ende des Katheters, ( $\varnothing$  rund 1,0 mm) paßt direkt in das selbst angefertigte „Tygon“-T-Stück. Sowie der Katheter eingeführt worden ist, werden dem Patienten durch diesen 2 ml Heparinlösung (10000 E) injiziert. Der Rest des Heparins aus der Ampulle (3 ml) wird der Kochsalzlösung zugefügt, die die Anfangsverdünnung am „T“-Stück bewerkstelligt. Bei Patienten, die nicht heparinisiert werden können, wird die ganze Heparinmenge der Salzlösung (100 ml) zugefügt. Auf diese Weise haben wir vergleichende Glukose-Belastungs-Teste mit und ohne Heparinisierung des Patienten durchführen können, über die an anderer Stelle berichtet wird (10). Es muß hier aber erwähnt werden, daß — wenn der Patient nicht heparinisiert ist — man dauernd auf die Tygon-„T“-Verbindung aufpassen muß, denn an dieser Stelle tritt zuerst Blutgerinnsel auf. Merkwürdigerweise bildet sich Fibrin gerade an der Stelle, wo man meinen sollte, es könnte sich nicht bilden, nämlich dort wo es dem Heparin begegnet. Es ist aber die einzige Stelle an der diese

Gefahr droht; wenn man aufpaßt ist das nicht tragisch. Man macht nur kurz und schnell an dieser Verbindung auf, zieht das Gerinnsel heraus und stöpselt sofort wieder zusammen — Dauer höchstens eine Minute. Das verursacht eine kleine Delle im Glukogramm, die sich aber leicht überbrücken läßt. Meistens passiert das nach den ersten 10—15 Min., danach noch einmal nach ungefähr 20 Min. und danach oft überhaupt nicht mehr. Vielleicht lagern sich allmählich Blutelemente im Schlauch ab, die die Gerinnung verhindern. Auf diese Weise lassen sich befriedigende Glukogramme erzielen, ohne daß der Patient Heparin erhält. Die Dosis Heparin, die unsere Patienten meist erhalten, hat nur eine Wirkungsdauer von 5—6 Stdn., und vorsichtigerweise kann man noch am Ende des Tests Protaminsulfat injizieren.

### Reproduzierbarkeit

Wie schon erwähnt, haben wir auch hier ein Doppelsystem, was Empfindlichkeit und Reichweite betrifft (Abb. 10). Daß die Eichkurven wirklich den kontinuierlich gemessenen Werten entsprechen geht aus Abbildung 11 hervor, wo die 20/Std. automatisch aspirierten Lösungen mit den manuell aspirierten, 6 Minuten dauernden, verglichen werden. Bis auf einen einzigen Wert liegen alle auf der absolut gleichen Höhe. Die Güte der Reproduzierbarkeit geht aus Abbildung 12 hervor, welche zeigt, daß sich hier eine statistische Analyse erübrigt.

### Das Glukogramm

In der Abbildung 13 ist ein normales Glukogramm wiedergegeben, das mit dem beschriebenen Verteiler gemacht worden ist. Der Patient litt an niedrigem Blutdruck und frequenter Syncope. Bei der Einführung des Katheters wurde er prompt ohnmächtig, obwohl er im Bett lag. Der Effekt ist noch klar an dem leicht ansteigenden Nüchtern-Blutzuckerspiegel zu sehen, obwohl wir eine Viertelstunde gewartet hatten. Auf das Resultat der Glukosebelastung hat sich das dann nicht mehr aus-

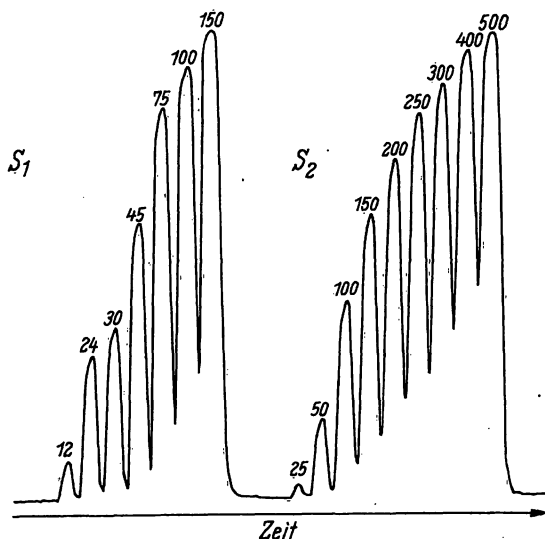


Abb. 10

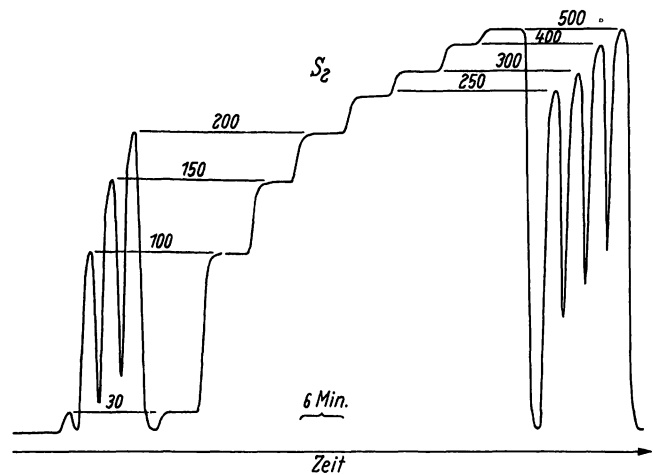
Eichkurven mit System 1 und 2 des *in vivo*-Verteilers

Abb. 11

Vergleich der Eichlösungen bei automatischer 2 Minuten Aspiration der Probe mit manueller 6 Min. Aspiration

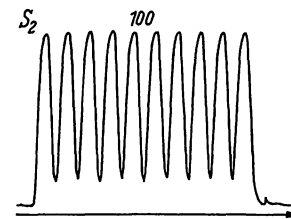


Abb. 12

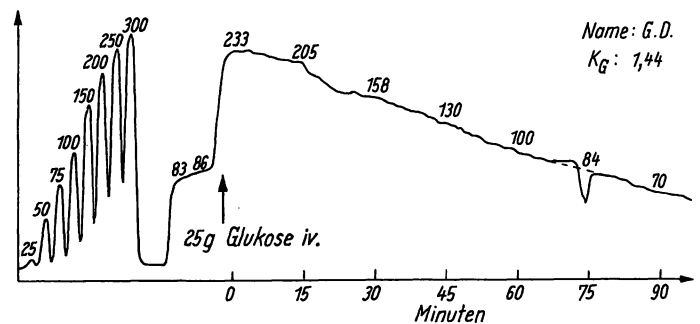
Reproduzierbarkeit der *in vivo*-Methode

Abb. 13

Ein normales Glukogramm.

Der Knick in der Kurve entstand dadurch, daß der Patient seinen Arm plötzlich scharf beugte

gewirkt. Der Kg-Wert ist normal und die glatte Linienführung der Kurve spricht auch für Normalität. Weitere Glukogramme sind in einer Arbeit von KAWERAU und SURTEES besprochen (10).

### Kosten der Analyse

Der letzte Punkt dieser Ausführungen wird oft vergessen; er ist aber wohl nicht unwichtig, wenn man bedenkt, daß die Reagenzien der chemischen Glukose-Bestimmung, die keine Enzyme verwendet, sehr billig sind. DISCOMBE (6), berechnete 1963, daß ihn die enzymatische (Fermcozym) Glukose-Analyse in England 2 pennies pro Analyse kostete, also 5 Pfennige. Für den hier beschriebenen Verteiler habe ich die Enzymkosten



(Glukose-Oxydase und Peroxydase) auf 0,25 d berechnet, das wäre weniger als ein Pfennig (8 Analysen 5 Pfennig). Das ist ein Betrag, der sich von den meisten Laboratorien tragen läßt.

Die Arbeit kann nicht abgeschlossen werden ohne daß ich meinem technischen Assistenten Mr. J. B. WOOD für seine sorgsame Arbeit und Mithilfe danke; besonderen Dank schulde ich auch der Photographischen Abteilung des St. James-Krankenhauses für die graphischen Reproduktionen.

#### Literatur

1. Association of Clinical Biochemists, Technical Bulletin No. 7, August 1965. — 2. KAWERAU, E., Veröffentlichung vorgesehen. — 3. Technicon Instrument Company Research Bulletin No. 5a (1964). — 4. WINCEY, C. und V. MARKS, J. Clin. Path., London 14, 558 (1961). — 5. HILL, J. B. und G. KESSLER, J. Laborat. Clin. Med., S. Louis 57, 970 (1961). — 6. DISCOMBE, G., J. Clin. Path., London 16, 170 (1963). — 7. FAULKNER, D. E., Technicon Symposium

Publication (Abstract) (1965). — 8. HUGGETT, A. St. G. und D. A. NIXON, Lancet II, 368 (1957). — 9. STOWE, H. W., Automation in der Analytischen Chemie, S. 361, Technicon Publikation, Frankfurt (1964). — 10. KAWERAU, E. und S. J. SURTEES, diese Z. im Druck. — 11. BERGMAYER, H.-U., Methoden der enzymatischen Analyse, S. 129, Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstr. (1962).

Dr. E. Kawerau, M. B., M. Sc., F. R. I. C.  
St. James Hospital  
Balham  
London S.W. 12/England

## KURZMITTEILUNGEN

### Die Isoenzyme der Lactat-Dehydrogenase in der Rattenniere

Von K. G. THIELE und H. MATTENHEIMER

*Aus den Departments of Medicine and Biochemistry, Presbyterian-St. Luke's Hospital, Chicago, und University of Illinois, College of Medicine, Chicago, Illinois, USA.*

(Eingegangen am 12. März 1966)

Die Verteilungsmuster der 5 Isoenzyme der Lactat-Dehydrogenase („LDH“) wurden in Homogenaten aus Rinde, äußerer Markzone, innerer Markzone und Papille der Rattenniere untersucht. In der Rinde überwog LDH-1, papillenwärts verschob sich das Muster zur LDH-5 hin. Aus gefriergetrockneten Nierenschnitten mikroseziierte Zellgruppen zeigten ein identisches Bild. Mikroseziierte Glomerula enthielten alle 5 LDH-Isoenzyme, wobei der Anteil an LDH-1 etwa doppelt so groß war wie an LDH-5. In feucht isolierten Glomerula wurde nur LDH-5 gefunden, die anderen Isoenzyme gingen bei der Aufarbeitung verloren.

The distribution of the 5 isoenzymes of LDH has been investigated in homogenates from cortex, outer zone of the medulla, inner zone of the medulla and papilla of the rat kidney. LDH-1 was predominant in the cortex; towards the papilla the pattern shifted to LDH-5. Cellgroups dissected from frozen dried sections of the kidney showed an identical pattern. Dissected glomeruli contained all 5 LDH-isoenzymes, with LDH-1 being approximately twice as high as LDH-5. Only LDH-5 was found in wet prepared glomeruli, the other isoenzymes were lost during the preparation.

Auch in der Rattenniere ist die Lactat-Dehydrogenase („LDH“) elektrophoretisch in fünf Isoenzyme auf-trennbar. Dies wurde bisher in Homogenaten der ganzen Niere, Homogenaten von Nierenrinde und Nierenmark (1—7), sowie in feucht präparierten Fraktionen von Glomerula und corticalen Tubuli (8) nachgewiesen. Bei der morphologischen Heterogenität der Niere interessierten uns die LDH-Isozymogramme in den verschiedenen anatomischen und funktionellen Einheiten des Nephrons, die mit der in unserem Laboratorium entwickelten Methode (9, 10) aus gefriergetrockneten Nierenschnitten präpariert werden können. Die Elektrophorese auf Celluloseacetatgel und Färbung mit Nitroblautetrazolium (11) ermöglicht den Nachweis der LDH-Isoenzyme in sehr kleinen Gewebemengen. Wir verglichen die Isoenzytmuster in Frischgewebshomogenaten aus Nierenrinde, äußerer Markzone, innerer Markzone, Papille und feucht isolierten Glomerula mit den Isoenzytmustern in den aus gefriergetrockneten Schnitten präparierten Zellgruppen.

#### Methodik

Weibliche Sprague-Dawley-Ratten (150—175 g schwer) wurden durch Ausbluten getötet. 0,5—1 mm Nierenschnitte wurden in Rinde, äußere Markzone, innere Markzone und Papille unter einem Stereomikroskop bei 20facher Vergrößerung zerlegt. Von den getrennten Gewebeabschnitten wurden 10-proz. Homogenate im Potter-Elvehjem-Homogenisator in Barbitarpuffer pH 8,6 hergestellt. Die Homogenate wurden hochtourig zentrifugiert und die Überstände verwendet. Aus 16  $\mu$  dicken, gefriergetrockneten Nierenschnitten wurden Glomerula, corticale Tubuli, äußere Markzone (gestreckte Tubuli, Henlesche Schleifen, Sammelröhrchen), innere Markzone (Sammelröhrchen und Henlesche Schleifen) und Papille (Sammelröhrchen) bei 40facher Vergrößerung mikroseziiert.

Die Zellgruppen (Gewicht zwischen 3 und 10  $\mu$ g) wurden in 1  $\mu$ l Puffer eingetragen und die unlöslichen Anteile mit einer spitzen Glasnadel entfernt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte auf Celluloseacetatgel in Barbitarpuffer pH 8,9 bei +4°. Von den Enzymlösungen wurde je 1  $\mu$ l aufgetragen. Die Streifen wurden dann mit Tetrazolium-Lactat-NAD-PMS inkubiert, geklärt und im „Densicord“ (Colab) mit Filter 530 m $\mu$  ausgewertet (11). Das am weitesten anodenwärts wandernde Isoenzym ist LDH-1, das am weitesten kathodenwärts gelegene LDH-5.