

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
11. Jg. 1973, S. 24—30

Fluorometrische Hexokinase-Methode für routinemäßige Glucosebestimmungen mit dem Auto-Analyzer

Von F. DA FONSECA-WOLLHEIM

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie (Direktor: Prof. Dr. H.-J. Dulce) der Freien Universität Berlin

(Eingegangen am 6. September 1972)

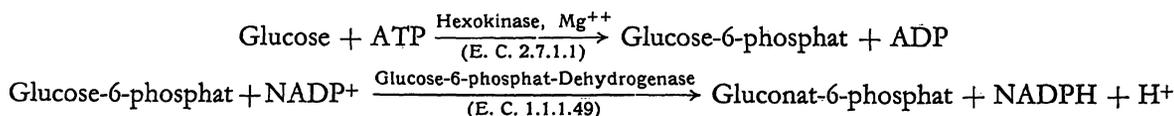
Es wurde eine fluorometrische Modifikation der Hexokinase-Methode für routinemäßige Glucosebestimmungen mit der Auto-Analyzer-Apparatur ausgearbeitet. Die Methode wurde so gestaltet, daß Blutglucosebestimmungen aus Vollblut ohne Enteiweißung ausgeführt werden können. Die Glucosebestimmung in Plasma, Harn und Liquor cerebrospinalis ist ebenfalls möglich. Untersuchungen über Spezifität, Richtigkeit und Präzision der Methode ergaben sehr befriedigende Resultate. Unter den praktisch wertvollen Eigenschaften sind hervorzuheben: Denkbar einfaches Fließschema (keine Dialysiereinheit!), kurze Durchlaufzeit der Probe, hohe Analysenfrequenz, geringe Verschleppung und vertretbarer Reagenzienverbrauch. Die Methode hat sich im on-line-Betrieb bei über 100 000 Glucosebestimmungen unter Routinebedingungen bewährt.

A fluorometric hexokinase method for the routine determination of glucose with the autoanalyzer

A fluorometric modification of the hexokinase method has been developed for the determination of glucose with the autoanalyzer. With this method, blood glucose can be determined in whole blood without deproteinization. Glucose may also be determined in plasma, urine and cerebrospinal fluid. The specificity, accuracy and precision of the method are very satisfactory. The practical advantages include: simplest conceivable flow plan (no dialysis unit), short throughout time for the sample, high frequency of analysis, low carry-over, and the economic use of reagents. The method has proved satisfactory in on-line operation for over 100 000 glucose determinations.

Die Hexokinase-Methode ist für Glucosebestimmungen in Körperflüssigkeiten wegen ihrer hohen Spezifität und der geringen Störanfälligkeit besonders wertvoll. Als photometrischer UV-Test ist sie allerdings infolge der

beträchtlichen Reagenzienkosten nicht allgemein für die routinemäßige in klinisch-chemischen Laboratorien auszuführenden Glucosebestimmungen einsetzbar (1). Bestimmt man aber das bei der Reaktionsfolge



gebildete NADPH über seine Fluoreszenz (2), so kann die Methode um Größenordnungen empfindlicher und zugleich ökonomischer gestaltet werden (3, 4, 5). Ein weiterer Vorteil der Fluorometrie ergibt sich bei Anwendung der Hexokinase-Methode für Blutglucosebestimmungen aus Vollblut ohne vorhergehende Enteiweißung. Während die photometrische Bestimmung (6, 7) hierbei durch die hohe Hämoglobinoxidation erschwert wird, stört die Eigenfarbe des Hämolyzats bei Fluoreszenzmessung infolge der hohen Verdünnung nur wenig (8). Die sich hier bietende Möglichkeit zur Vereinfachung der Blutzuckerbestimmung wurde mit Fluoreszenztechnik zuerst von BERNT und LACHENICHT (9) an einem kontinuierlichen Analysenautomaten realisiert. Wir haben dann, nachdem aufgrund der Arbeit von HÄCKEL (7) Bedenken hinsichtlich der Spezifität aufgekommen waren, die Bedingungen der fluorometrischen Glucosebestimmung im Hämolyzats eingehender untersucht und gezeigt, wie der störende Einfluß der Erythrocytenenzyme ausgeschaltet werden kann (8). Die hier beschriebene Auto-Analyzer-Methode ermöglicht spezifische Glucosebestimmungen in hämolysierten Blutproben, ist aber gleichermaßen für die Analyse von Plasma, Harn und Liquor cerebrospinalis geeignet. Im

on-line-Anschluß an einen Prozeßrechner wurden mit dieser Methode bereits über 100 000 Glucosebestimmungen in unserem Routinelaboratorium ausgeführt.

Methodik

Reagenzien

Als Quelle für Triäthanolaminpuffersubstanz, NADP, ATP und Hexokinase-/Glucose-6-phosphatdehydrogenase-Gemisch wird zweckmäßigerweise die fertige Reagenzienzusammenstellung der Fa. Boehringer „Testkombination Glucose (HK-Methode)“, benutzt. Zusätzlich werden pro Testpackung 5 mg Hexokinase als Einzelsubstanz (10 mg/ml, spez. Akt. 140 U/mg, Boehringer, Mannheim GmbH) benötigt. Das Netzmittel Triton X 405 wurde von der Fa. Technicon GmbH Frankfurt/M., Rinderalbuminlösung (200 g/l) von den Behringwerken in Marburg bezogen. Bei den methodischen Voruntersuchungen verwendeten wir NADPH, Gluconat-6-phosphat und Fructose-6-phosphat der Fa. Boehringer, Maleinimid der Fa. EGA-Chemie und 2× kristallisiertes Rinderhämoglobin der SERVA-GmbH, Heidelberg. Alle übrigen Reagenzien wurden in p. a.-Qualität von der Fa. Merck, Darmstadt, bezogen.

Geräte

Wir benutzten die folgende Kombination von Technicon-Geräten:
1. Probennehmer II mit Mikroprobennehmerkanüle und Nockenscheibe 60—1/1.
2. Proportionierpumpe I.

3. Fluoro-Nephelometer II mit Primärfilter 7—60 (360 nm Narrow Pass) und Sekundärfilter 4 (465 nm Sharp Cut). Die gewählte Blendeneinstellung ist: Position 1 für die Reference Aperture und Position 3 für die Sample Aperture.
4. Schreiber.

Für die Probenvorverdünnung ist der Einsatz eines Probe-Reagenz-Dosierers zweckmäßig (z. B. Dosierautomat „Dilumatik“ der Fa. Braun, Melsungen). Ein thermostatisiertes Wasserbad (25°C) dient zur Temperierung des Reaktionsgemisches (siehe Fließschema).

Lösungen

1. 0,3 mol/l Triäthanolamin/HCl-Puffer pH 7,5; 4 mmol/l MgSO₄
2. 12 mmol/l NADP
3. 16 mmol/l ATP
4. 1 mg/ml Hexokinase; 1 mg/ml Glucose-6-phosphatdehydrogenase
5. 10 mg/ml Hexokinase
6. Rinderalbumin (200 g/l)
7. Triton X 405 (100 ml/l)
8. 25 mmol/l Essigsäure
9. Glucosestandardlösungen
 - 9.1. 5,00 g/l Glucosestammlösung: 4,75 g Glucose (wasserfrei) auf 1000,0 ml mit bidest. Wasser lösen.
 - 9.2. Glucose-Eichreihe: Entsprechend den Glucosekonzentrationen 0,25—0,50—1,50—2,50—3,50 g/l werden 2,5—5,0—15,0—25,0 und 35,0 ml Glucosestammlösung auf 50,0 ml mit bidest. Wasser verdünnt. Zum Gebrauch werden diese Lösungen 1 + 50 mit 25 mmol/l Essigsäure verdünnt.
10. Spüllösung: 1 ml Triton (100 ml/l) X 405 auf 5 l dest. Wasser.
11. Reaktionsgemisch (ausreichend für etwa 500 Bestimmungen):

Bestandteile der Boehringer Test-combination TGAB

In der angegebenen Reihenfolge gibt man in einen 1000-ml-Meßkolben:

- 200 ml Lösung 1
 5,0 ml Lösung 2
 5,0 ml Lösung 3
 1,0 ml Lösung 4
 0,25 ml Lösung 5
 0,40 ml Lösung 6
 0,20 ml Lösung 7

Nach Auffüllen bis zur Marke wird gut durchgemischt. Das Gemisch wird auf Eis gehalten und ist unter diesen Bedingungen 48 h verwendbar. Bei Raumtemperatur nimmt trotz der Schutzwirkung des zugesetzten Albumins (11) die Hexokinaseaktivität schon innerhalb von 24 h deutlich ab. Auch die Glucose-6-phosphatdehydrogenase ist bei Raumtemperatur nicht stabil.

Untersuchungsmaterial

Für Blut- und Plasmaglucosebestimmungen gehen wir von Fluorid-Oxalat-stabilisiertem Venenblut aus. Harn und Liquor cerebrospinalis werden ohne Zusatzstoffe zur Analyse eingesetzt.

Probenvorverdünnung

100 µl Vollblut (vor der Entnahme Blutprobe umschwenken!), Plasma oder Liquor cerebrospinalis + 5,00 ml 25 mmol/l Essigsäure werden mit dem Probe-Reagenz-Dosierer in Technicon-Gefäße entsprechender Größe dosiert. Harn wird im Verhältnis 1:535 mit Essigsäure vorverdünnt.

Fließschema

Abbildung 1 zeigt das Fließschema der Methode. Die glucosehaltige Probenlösung vereinigt sich an einem H3-Fitting mit dem vorgewärmten Reaktionsgemisch. Damit wird die enzymatische Reaktionsfolge gestartet. Während das Gemisch innerhalb von 2 1/2 min eine Doppelmischschlange durchläuft, werden etwa 90% der Glucose zu Gluconat-6-phosphat umgesetzt. Nach Abscheiden der Luftblasen wird das gebildete NADPH in der Durchflußzelle des Fluorometers gemessen.

Bestimmung des Korrekturfaktors für den Hämoglobin-Quench

Bei fluorometrischen Glucosebestimmungen in Hämolystat kommt es zu einer gewissen Minderung der NADPH-Fluoreszenz infolge der Eigenfarbe des Materials (8). Der Korrekturfaktor läßt sich auf folgende Weise ermitteln:

Über den Reagenzienschlauch wird eine etwa 10 µmol/l NADPH-Lösung in Triäthanolaminpuffer pH 7,5 angesaugt und der Ausschlag am Schreiber mit dem F. S. R.-Potentiometer am Fluorometer auf 95% Transmission eingestellt. Wenn jetzt über den Probennehmer 1:51 verdünnte Blutproben zugeführt werden, ergeben sich negative Schreiberausschläge, welche die prozentuale Berechnung des Fluoreszenzverlustes erlauben.

Als Mittelwert einer größeren Zahl von Bestimmungen haben wir für unsere Methode eine durchschnittliche Fluoreszenzminderung von 5,0% festgestellt. Mit einer ebenfalls 1:51 verdünnten reinen Hämoglobinlösung von 160 g/l erhielten wir 5,4% Fluoreszenzlöschung. Damit ist nachgewiesen, daß es sich bei der Fluoreszenzabnahme bei Hämolystat um ein Quenchphänomen handelt und daß ein Verschwinden von NADPH durch dehydrierende Erythrocytenenzyme keine Rolle spielt.

Für Blutproben ergibt sich aus den genannten Zahlen der Korrekturfaktor 1,05. Dieser wird beim Ansetzen der Standardlösungen bereits berücksichtigt (s. o.). Bei Harn wird diese Korrektur durch entsprechende Verdünnung ausgeglichen. Die Meßwerte für Plasma und Liquor müssen durch Multiplikation mit 0,95 umgerechnet werden.

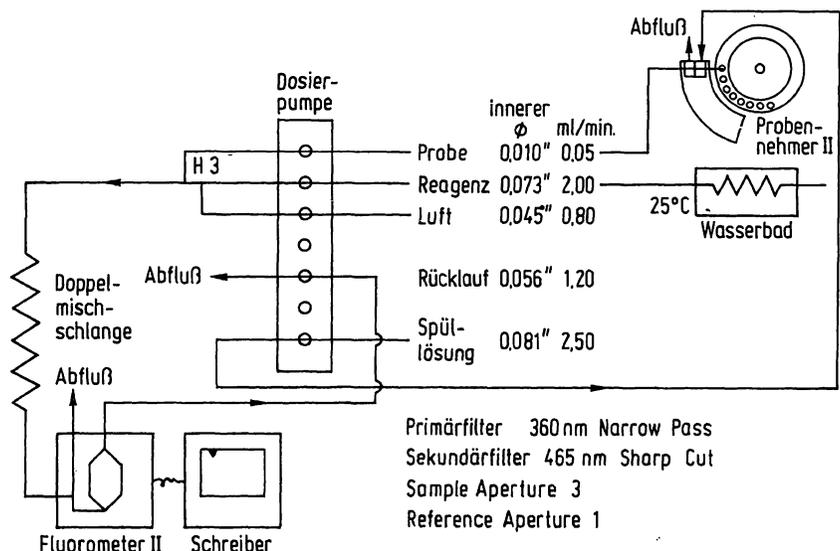


Abb. 1
 Fließschema der fluorometrischen Glucose-Bestimmung

Ausführung der Glucosebestimmungen

Vor Beginn der Messungen hängt man den Reagenzienschlauch in Spüllösung und pumpt diese 15 min lang durch das System. Der Schreiberausschlag liegt hierbei einige Skalenteile über der Nulllinie. Anschließend läßt man Reaktionsgemisch ansaugen, wobei die Basislinie um etwa 3 Skalenteile ansteigt. Während kontinuierlich über den Probenschlauch die Eichlösung mit der höchsten Glucosekonzentration (3,5 g/l, 1:51) angesaugt wird, stellt man den Schreiberausschlag mit dem F.S.R.-Potentiometer am Fluorometer auf 95% Transmission.

Bei einer Frequenz von 60/h wird dann die Fluoreszenz aller Standardlösungen der Eichreihe und daran anschließend die der unbekanntenen Proben bestimmt.

Nach Beendigung der Probenserie wird vor dem Abschalten noch einige Minuten mit Spüllösung durchgewaschen. Zur gründlichen Reinigung wird einmal täglich für 15 min RBS (100 ml/l) (Hersteller: Karl Roth GmbH, Karlsruhe) durch das System gepumpt.

Auswertung

Zur Auswertung werden die Standardmeßwerte gegen die Glucosekonzentration aufgetragen (s. Abb. 2. u. 3). Die Eichkurve ist nur bis etwa 2 g/l Glucose linear. Es empfiehlt sich aber, den Meßbereich bis 3,5 g/l auszudehnen, da so erfahrungsgemäß über 95% aller Proben ohne Nachverdünnung analysiert werden können.

An dieser Eichkurve lassen sich bei Hämolystat die Ergebnisse unmittelbar ablesen. Bei den 1:535 verdünnten Harnproben sind die abgelesenen Konzentrationen mit dem Faktor 10 zu multiplizieren. Bei Liquor und Plasma erhält man das Ergebnis aus dem abgelesenen Wert durch Multiplikation mit 0,95.

Wir selbst verfügen über einen Prozeßrechner, der die am Schreiber erscheinenden Peaks nach Analog-Digital-Wandlung auswertet und die Glucosekonzentration direkt ausdrückt (10).

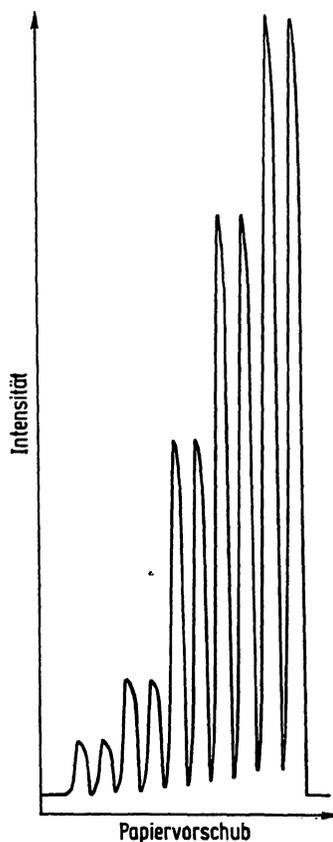
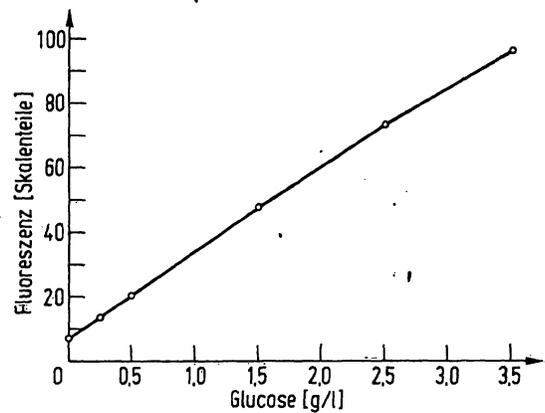


Abb. 2

Doppelstimmung der Fluoreszenz bei Standard-Lösungen mit 3,50, 2,50, 1,50, 0,50 und 0,25 g/l Glucose

Abb. 3
Eichkurve

Ergebnisse

Charakterisierung der Methode

Bei der Automation der fluorometrischen Hexokinase-Methode ging es uns vor allem darum, ein sehr einfaches Routineverfahren für die Blutzuckerbestimmung zu entwickeln. Um den Zeitaufwand für die manuelle Probenvorbereitung möglichst gering bzw. den in mancher Hinsicht nachteiligen Einsatz einer Dialyseeinheit überflüssig zu machen, sollte die Glucosebestimmung direkt aus Hämolystat, ohne Enteiweißung, ausführbar sein.

Wir haben das Fließschema so gestaltet, daß die Inkubationszeit kurz ist, und daß die Probe im Inkubationsansatz und bei der Fluoreszenzmessung in hoher Verdünnung vorliegt.

Dadurch wird folgendes erreicht:

1. Die Störungsmöglichkeiten durch Erythrocytenenzyme (8) sind reduziert.
2. Der Einfluß des Hämoglobingehaltes in den Blutproben auf das Meßergebnis (s. o.) wird in sehr engen Grenzen gehalten.

Um auch unter diesen Bedingungen eine ausreichende Umsatzrate zu erhalten, war es notwendig, die Hexokinase-Konzentration im Reaktionsgemisch relativ hoch zu wählen (siehe Abb. 4). Bei Vergleich mit der Fluoreszenzintensität von photometrisch überprüften NADPH-Lösungen (13), die über den Probenschlauch angesaugt wurden, ergab sich, daß unter Standardmeßbedingungen

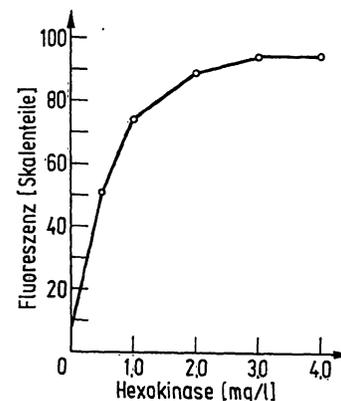


Abb. 4

Einfluß der Hexokinase-Konzentration im Reaktionsgemisch auf die mit einer Glucose-Standardlösung (3,5 g/l) erhaltenen Fluoreszenz

mit 3,5 mg Hexokinase/l eine Umsatzrate von etwa 90% erreicht wird. Aus Gründen der Empfindlichkeit wäre eine so hohe Umsatzrate nicht erforderlich. Bei fast quantitativem Umsatz besteht aber der Vorteil, daß bei Schwankungen der Hexokinase-Aktivität innerhalb gewisser Grenzen die Eichkurve ihre Steilheit praktisch nicht ändert.

Wenn man als Reagenzienquelle eine kommerziell erhältliche Reagenzienkombination benutzt, muß man die Hexokinase in der Testpackung aufstocken (s. „Methoden“). Die als Einzelsubstanz wesentlich teurere Glucose-6-phosphatdehydrogenase ist dagegen in der Kombination ausreichend vorhanden.

Spezifität

Rolle der Gluconat-6-phosphatdehydrogenase

Bei den Untersuchungen zur Spezifität der Methode bei Anwendung auf Vollblut war vor allem zu prüfen, ob die Gluconat-6-phosphatdehydrogenase (EC 1.1.1.44) der Erythrocyten bereits während der kurzen Inkubation zu einer merklichen Verfälschung der Glucosemeßwerte führt (6, 7, 8). Zur Klärung dieser Frage wurde Maleinimid, das Erythrocyten-Gluconat-6-phosphatdehydrogenase inaktiviert (7, 8), eingesetzt. Es zeigte sich, daß mit und ohne Maleinimid die bei Hämolyse gemessenen Fluoreszenzintensitäten praktisch gleich sind (s. Tab. 1). Dies heißt, daß unter den gewählten Inkubationsbedingungen keine meßbare NADPH-Bildung an Erythrocyten-Gluconat-6-phosphatdehydrogenase stattfindet. Hieraus und aus den unten mitgeteilten Befunden über die Richtigkeit der Methode ist zu schließen, daß bei der kontinuierlichen Methode, im Gegensatz zu den Bedingungen bei der manuellen Bestimmung (7, 8), auf den Zusatz von Maleinimid verzichtet werden kann.

Eine andere Situation liegt vor, wenn man von vornherein dem Hämolyse in hoher Konzentration Gluconat-6-phosphat zusetzt. In diesem Fall wird dem Erythrocytenenzym während der gesamten Inkubationszeit Substrat angeboten, und man findet etwas höhere Fluoreszenzwerte als mit Glucose allein (s. Tab. 2). Im Durchschnitt werden etwa 3% des zugesetzten Gluconat-6-phosphats innerhalb der Reaktionszeit umgesetzt.

Fructose-Interferenz

Die Anwendung der Hexokinase-Methode bei fructosehaltigem Hämolyse ist nicht unproblematisch, da

Tab. 1

Einfluß von Maleinimid auf die gemessene Glucose-Konzentration. Verschiedene Blutproben wurden mit $H_2O \pm 1$ g/l Maleinimid hämolyse

Proben-Nr.	Gemessene Glucose-Konzentration (g/l)	
	ohne Maleinimid	mit Maleinimid
1	0,68	0,64
2	0,84	0,84
3	0,67	0,69
4	1,10	1,06
5	2,05	2,07
\bar{x}	1,05	1,06

Tab. 2

Glucose-Bestimmung im Hämolyse mit und ohne Zusatz von Gluconat-6-phosphat (5 g/l)

Proben-Nr.	Gemessene Glucose-Konzentration (g/l)	
	ohne Gluconat-6-phosphat	mit Gluconat-6-phosphat
1	1,45	1,50
2	0,77	0,84
3	0,82	0,87
4	0,72	0,84
5	0,74	0,79
\bar{x}	0,90	0,97

Fructose nach Phosphorylierung an Hefe-Hexokinase und Isomerisierung an der reichlich vorhandenen Erythrocyten-Phosphoglucose-Isomerase (EC 5.3.1.9) als Glucose-6-phosphat miterfaßt wird (7).

Bei manueller Arbeitsweise mit ausgedehnter Inkubationszeit entstehen auf diesem Wege bei Nichtbeachtung beträchtliche Fehler (7, 8). Wegen der kurzen Reaktionszeit kann dagegen bei der hier beschriebenen kontinuierlichen Methode nur ein kleiner Fructosebetrag mitreagieren (s. Tab. 3). Limitierend wirkt sich hierbei die Trägheit der Hexokinase-Reaktion aus. Dies geht aus dem in Tabelle 4 niedergelegten Versuch hervor, bei dem der Einfluß von Fructose-6-phosphat auf die Meßergebnisse geprüft wurde. Es ist ersichtlich, daß mit Fructose-6-phosphat die Verfälschung der Glucosemeßwerte erheblich ist, da unter diesen Bedingungen die Phosphoglucose-Isomerase über die gesamte Reaktionszeit nahezu unter Sättigungsbedingungen arbeitet.

Unter Ausnutzung der Säurelabilität der Erythrocyten-Phosphoglucose-Isomerase (8) schalten wir die Miterfassung von Fructose bzw. Fructose-6-phosphat durch Verwendung von 25 mmol/l Essigsäure bei der Probenverdünnung vollständig aus (s. Tab. 3 u. 4). Die Ausführung der Hämolyse mit Essigsäure bringt den weiteren Vorteil mit sich, daß die verdünnten Blutproben über 24 Stunden bei Raumtemperatur keinen Abfall der Glucosekonzentration zeigen. Dagegen fanden wir bei neutralem pH einen langsamen Glucoseabbau im Hämolyse, der im Durchschnitt von 5 Einzelmessungen 0,15 g/l in 24 h betrug.

Tab. 3

Einfluß zugesetzter Fructose auf die bei hämolyseierten Blutproben gefundenen Glucose-Werte. Die Hexokinase-Konzentration im Reaktionsgemisch betrug, abweichend von den Standard-Meßbedingungen, 6 mg/l. Der Fructose-Zusatz entsprach einer Fructose-Konzentration von 5 g/l in der Blutprobe

Spalte a: ohne Fructose-Zusatz, Hämolyse mit 25 mmol/l Essigsäure;
Spalte b: mit Fructose-Zusatz, Hämolyse in H_2O ;
Spalte c: mit Fructose-Zusatz, Hämolyse in 25 mmol/l Essigsäure

Proben-Nr.	Gemessene Glucose-Konzentration (g/l)		
	a	b	c
1	1,45	1,53	1,42
2	0,77	1,00	0,81
3	0,82	0,93	0,79
4	0,72	0,84	0,75
5	0,74	0,83	0,72
\bar{x}	0,90	1,03	0,90

Tab. 4

Spezifität der Glucosebestimmung in Hämolysat gegenüber Fructose-6-phosphat (F-6-P)

Bei 5 verschiedenen Blutproben wurde mit und ohne Zusatz von 15 mg/l Fructose-6-phosphat zu dem Reaktionsgemisch (siehe „Methoden“) die Glucosekonzentration bestimmt. Die kontinuierliche Zunahme der Reagenzienfluoreszenz nach Zusatz des Fructose-6-phosphats (durch Phosphoglucose-Isomeraseaktivität in den Reagenzienzymen) wurde bei der Auswertung berücksichtigt

Proben-Nr.	Gemessene Glucosekonzentration (g/l)			
	Hämolyse mit H ₂ O		Hämolyse mit 25 mmol/l Essigsäure	
	ohne F-6-P	mit F-6-P	ohne F-6-P	mit F-6-P
1	0,63	1,59	0,63	0,62
2	0,76	1,52	0,79	0,79
3	0,67	1,56	0,70	0,67
4	0,87	2,20	0,87	0,89
5	1,22	1,93	1,24	1,22

Untersuchung weiterer Störungsmöglichkeiten

D-Xylose, D-Mannose und D-Galactose ergaben bei einer Konzentration von 5 g/l, sowohl in reiner Lösung, als auch bei Anwesenheit von Hämolysat, keine meßbare Fluoreszenz. Der Zusatz von Fluorid-Oxalat zu den Blutproben beeinträchtigte den Glucoseumsatz im System nicht. Auch Heparin (Liquemin Roche) in einer Konzentration von 25 USPE/ml Glucoseverdünnung blieb ohne Einfluß auf das Meßergebnis.

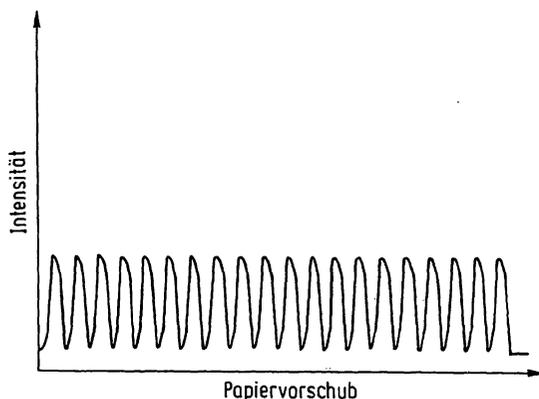
Bei mehreren Hundert Blut- und Harnproben aus dem Bereich des Klinischen Routinelaboratoriums wurde mit Puffer statt mit Reaktionsgemisch die Eigenfluoreszenz geprüft. Sie ging unter den Standardmeßbedingungen nie über 1 Skalenteil hinaus. Dagegen darf die Eigenfluoreszenz des Materials bei der zur Erfassung der normalen Glucosurie erforderlichen Meßempfindlichkeit (mit entsprechend geringerer Probenverdünnung) nicht vernachlässigt werden (4).

Richtigkeit

Ergebnisse mit Kontrollseren

Mit verschiedenen kommerziellen Kontrollseren wurden die folgenden Analysenergebnisse erhalten (in Klammern die vom Hersteller angegebenen Sollwerte):

Versatol	0,84 (0,86) g/l
Versatol A	2,06 (2,04) g/l
Patho-Trol	2,53 (2,57) g/l



Tab. 5

Ergebnisse von Vergleichsuntersuchungen (klassische photometrische Hexokinase-Methode/fluorometrische Hexokinase-Methode). Angegeben sind die Konstanten der errechneten Regressionsgeraden $y = a + bx$ und der Korrelationskoeffizient r

Material	Anzahl der Bestimmungen	Bereich der Meßwerte (g/l)	b	a	r
Hämolysat	53	0,24—2,53	0,991	0,01	0,997
Harn	49	0,3—62,5	1,03	-0,17	0,994
Liquor	30	0,41—2,77	1,00	-0,03	0,997

Wiederfindung bei Hämolysat

10 verschiedenen Blutproben wurde Glucose in der Endkonzentration 1,00 g/l zugesetzt. Die durchschnittliche Wiederfindung bei Berücksichtigung des Hämoglobin-Quench betrug 100%.

Korrelation mit den Ergebnissen der klassischen photometrischen Hexokinase-Methode

Bei 53 Blutproben bestimmten wir die Glucosekonzentration einerseits photometrisch aus entweißtem Überstand (1), andererseits mit der automatischen fluorometrischen Methode aus Hämolysat. Ebenso wie bei entsprechend ausgeführten Untersuchungen mit Harn- und Liquorproben fanden wir eine nahezu ideale Regression und enge Korrelation (s. Tab. 5).

Präzision

Präzision in Serie

Bei 20 unmittelbar nacheinander aus demselben Hämolysat ausgeführten Analysen sind die Ablesungen bei einer Probe mit 0,42 g/l Glucose praktisch identisch (s. Abb. 5). Für zwei in Serie analysierte Blutproben im mittleren ($\bar{x} = 1,38$ g/l) und oberen ($\bar{x} = 3,08$ g/l) Meßbereich ergab die statistische Auswertung einen Variationskoeffizienten von 0,47 bzw. 0,68%.

Präzision innerhalb eines Arbeitstages

Im 24-h-Routinebetrieb lassen wir auf jeder 10. Position des Probentellers eine mit dem Verdünnungsautomaten frisch verdünnte 2,00 g/l-Glucoselösung laufen. Bei einem herausgegriffenen Arbeitstag ergab die statistische Auswertung der Ergebnisausdrucke: $n = 24$; $\bar{x} = 1,98$ g/l; $s = 0,031$ g/l; $V_k = 1,6\%$.

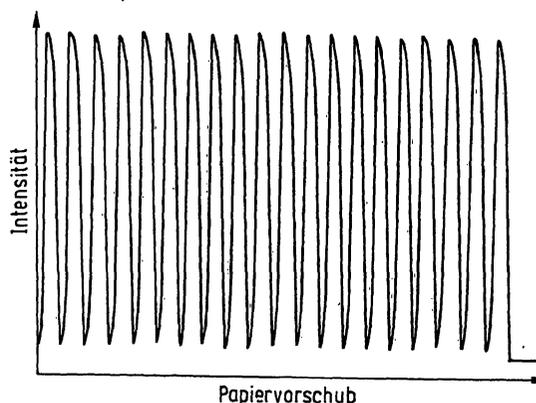


Abb. 5

Wiederholbarkeit der fluorometrischen Glucose-Bestimmung im Hämolysat. links gezeigte Meßserie: $\bar{x} = 0,42$ g/l; rechts: $\bar{x} = 1,38$ g/l

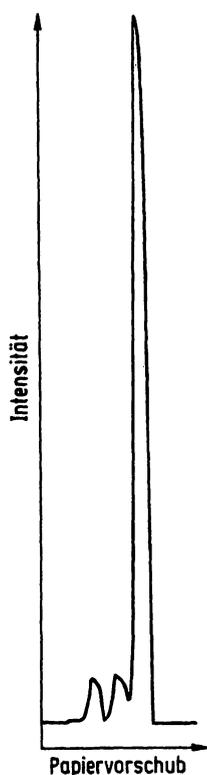


Abb. 6

2fach-Bestimmung bei einer Glucoselösung mit niedriger Konzentration im Anschluß an einen hohen Meßwert
Probenfrequenz 60/h

Aus Erfahrung können wir sagen, daß am ehesten Fehler durch Ungenauigkeiten bei der Probenvorverdünnung entstehen.

Präzision von Tag zu Tag

Die statistische Qualitätskontrolle mit Rinderserum (12) ergab über einen Zeitraum von 20 Tagen ($n = 26$):
 $\bar{x} = 0,630$ g/l; $s = 0,014$ g/l; $V_k = 2,2\%$.

Verschleppung

Wegen des denkbar einfachen Aufbaus des Fließsystems, vor allem auch wegen der günstigen Auswascheigenschaften der Durchflußküvette im Technicon-Fluorometer II ist die Verschleppung einer Probe in die nachfolgende bei einer Analysenfrequenz von 60/h sehr gering. So erhöht sich z. B. bei einem unmittelbar nach einer 3,50 g/l-Lösung analysierten Standard von der Konzentration 0,25 g/l der gemessene Wert nur um 0,01 g/l. Die Verschleppung liegt also unter 0,5% (siehe Abb. 6).

Normalwerte

Bei 261 gesunden Personen, die am Klinikum Steglitz der Freien Universität zur personalärztlichen Einstellungs-Untersuchung kamen, wurde morgens nüchtern der venöse Blutglucosespiegel bestimmt. Als Normalbereich, definiert als 95%-Intervall, ergab sich die Spanne von 0,54–0,98 g/l. Als Zentralwert errechnete sich 0,73 g/l.

Diskussion

Von den bisher publizierten kontinuierlichen Verfahren für fluorometrische Glucosebestimmungen mit der Hexokinase-Methode unterscheidet sich die von uns entwickelte Modifikation durch Enzymkonzentration, Inkubationsdauer und Aufbau des Flußsystems. SCHERSTÉN und TIBBLING (4) inkubieren mit nur 30% der von uns angewendeten Hexokinase- und 45% der Glucose-6-phosphatdehydrogenase-Konzentration, halten zwecks besserer Sättigung der Enzyme die Glucose während der Inkubation möglichst konzentriert und verdünnen erst kurz vor der fluorometrischen Messung auf das für die Messung im Durchfluß erforderliche Volumen. Innerhalb von 7 Minuten wird so bei Raumtemperatur und minimalem Enzymverbrauch praktisch vollständiger Umsatz erreicht. LEESE und BRONK (5) wenden eine ähnlich niedrige Enzymkonzentration an, verdünnen aber den Ansatz von vornherein auf ein höheres Volumen und benötigen 15,5 min Inkubationszeit bei 37°C.

Sofern keine Verfälschung der Meßergebnisse durch Störreaktionen auftritt, bestehen gegen eine derartig prolongierte Inkubation keine Bedenken. Wird aber z. B. das Fließschema von SCHERSTÉN und TIBBLING für Glucosebestimmungen im Hämolystat eingesetzt (9), so kommen, wie wir feststellen mußten, Störreaktionen durch Erythrocytenenzyme merklich zum Tragen (4). Der von uns unternommene Versuch, die Methode von BERNT und LACHENICHT durch Inaktivierung der Erythrocyten-Enzyme zu verbessern, führte zu keinem befriedigenden Resultat, da die Meßwerte dann bei allen Blutproben deutlich zu niedrig lagen. Die Ursache hierfür konnte nicht eindeutig geklärt werden. Möglicherweise können bei länger dauerndem Kontakt mit Hämolystat NADPH-verbrauchende Enzymreaktionen zu einem partiellen Verlust des bei der Bestimmungsreaktion gebildeten NADPH führen (vgl. (7), (8)).

Durch das von uns angewendete Prinzip der Kurzinkubation ist das Problem der unspezifischen Reaktionen bei Glucosebestimmungen im Hämolystat gelöst. Trotz des dadurch erforderlichen relativ hohen Enzymeinsatzes betragen die Reagenzienkosten insgesamt weniger als 15% der manuellen photometrischen Methode und liegen damit pro Bestimmung unter 10 Pfennig. Für die Niedrighaltung der insgesamt entstehenden Reagenzienkosten, insbesondere bei Dauerbetrieb der Anlage im 24-h-Dienst, ist es natürlich entscheidend, daß in den Pausen zwischen den Probenreihen die Reagenzlösung durch Spüllösung ersetzt wird. Eine optimale Reagenziennutzung ist garantiert, wenn durch eine vom Probennehmer gesteuerte Zusatzeinrichtung die Reagenziefuhr auf die Zeiten des effektiven Bedarfs reduziert wird (15).

Weiterhin hat die beim Routineeinsatz der Methode gewonnene Erfahrung gezeigt, daß es ein großer Vorteil ist, wenn die Analysenergebnisse infolge der kurzen Durchlaufzeit der Proben schon innerhalb von 5 min vorliegen. Dies gilt einmal für klinische Notfälle, bei

denen die Bearbeitungszeit im Labor so kurz wie möglich sein sollte. Vor allem aber ist auch die „Rüstzeit“ bei Beginn der Arbeit recht kurz. Sind infolge von Defekten oder Bedienungsfehlern am Gerät oder dem angeschlossenen Rechner z. B. Wiederholungen der Eichung erforderlich, so kommt das Labor kaum in Verzug.

Vor kurzem wurde noch die Ansicht vertreten, daß die Fluorometrie wegen ihrer Störanfälligkeit möglichst nicht für einfache Routinebestimmungen eingesetzt werden sollte (16). Für die Analyse im Fluß erscheinen uns aber mit den heute zur Verfügung stehenden Meßgeräten diese Bedenken nicht mehr angebracht zu sein. Durch einen in den Reagenzienstrom eingeschalteten Thermostaten ist das bei der Fluorometrie kritische Problem der gleichmäßigen Temperierung von Proben- und Standardansätzen (17) in einfacher Weise gelöst. Eine Streulichtempfindlichkeit, die eine Filtration der Lösungen erforderlich machen würde, besteht nicht. Der Reagenzienleerwert ist bei der hier beschriebenen Methode niedrig und sehr konstant. Auch von anderer

Seite wurden günstige Erfahrungen über die Driftfreiheit des Fluorometers mitgeteilt (5). Daß die Fluorometrie grundsätzlich nur Relativmessungen zuläßt, ist bei kontinuierlichen Analysengeräten vom Typ des Auto-Analyzers kein zusätzlicher Nachteil, da in jedem Fall eine Eichung mit Standardlösungen erforderlich ist.

Die benötigte Apparatur ist für ein Einkanalgerät relativ kostspielig. Es sei aber in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen, daß mit dem gleichen apparativen Aufbau, eventuell sogar ohne Veränderungen am Fließsystem, noch eine Reihe wissenschaftlich und auch klinisch interessierender Metabolite enzymatisch über die Fluoreszenz von NAD(P)H bestimmt werden können (vgl. (5)).

Danksagung

Den medizinisch-technischen Assistentinnen, Frau R. BRAUN, Frau M. KLEINE-TEBBE und Frau K. KRÜGER danke ich für exakte und engagierte Mitarbeit.

Literatur

- SCHMIDT, F. H. (1963), *Internist* 4, 554—559. — 2. WARBURG, O. & CHRISTIAN, W. (1936), *Biochem. Z.* 287, 291—328. — 3. SCHERSTÉN, B. & TIBBLING, G. A. (1967), *Clin. Chim. Acta*, 18, 383—393. — 4. SCHERSTÉN, B. & TIBBLING, G. A. (1968), *Clin. Chem.* 14, 243—252. — 5. LEESE, H. J. & BRONK, J. R. (1972), *Analyt. Biochem.* 45, 211—221. — 6. STORK, H. & SCHMIDT, F. H. (1968), *Klin. Wochenschr.* 46, 789—790. — 7. HAECKEL, R. (1970), *diese Z.* 8, 480—482. — 8. DA FONSECA-WOLLHEIM, F. (1971), *diese Z.* 9, 497—502. — 9. BERNT, E. & LACHENICHT, R. (1970) in *Methoden der enzymatischen Analyse* (BERGMEYER, H. U., Hrsg.) 2. Aufl., Bd. 2, 1168—1172, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. — 10. BORNER, K. & KLEIN, E. (1969). On line data acquisition by a small digital computer. 6. Internationaler Kongreß für Klinische Chemie. Genf 1969. — 11. SLEIN, M. W. (1962) in *Methoden der enzymatischen Analyse* (BERGMEYER, H. U., Hrsg.) 1. Aufl., 117—123 Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. — 12. BORNER, K., FABRICIUS, W. & MAROWSKI, B. (1970), *diese Z.* 8, 170—172. — 13. MATTENHEIMER, H. (1961). *Mikromethoden für das klinisch-chemische und biochemische Laboratorium* 126, Verlag de Gruyter & Co. Berlin. — 14. DA FONSECA-WOLLHEIM, F.: Unveröffentlichte Versuche. — 15. DA FONSECA-WOLLHEIM, F. & MAIGATTER, G.: In Vorbereitung. — 16. RICHTERICH, R. (1971). *Klinische Chemie — Theorie und Praxis*, 3. Auflage, 172, Verlag S. Karger Basel-New York. — 17. RUBIN, M. & KNOTT, L. (1967): *Clin. Chim. Acta* 18, 409—415.

Dr. F. da Fonseca-Wollheim
 Institut für Klinische Chemie u. Klin. Biochemie
 Klinikum Steglitz der FU Berlin
 1 Berlin 45,
 Hindenburgdamm 30