

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 15, 1977, pp. 457-464

Vollenzymatische Triglycerid-Bestimmung: Präzision, Richtigkeit, Methodenvergleich

Von P. H. Müller, R.-M. Schmülling, H. M. Liebich, M. Eggstein

Medizinische Klinik, Abteilung Innere Medizin IV (Direktor: Prof. Dr. M. Eggstein) der Universität Tübingen,

F. Stähler und K. Stinshoff

Biochemica Werk Tutzing, Boehringer Mannheim GmbH

(Eingegangen am 13. August 1976/5. Mai 1977)

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. G. Schettler zum 60. Geburtstag gewidmet

Zusammenfassung: Mit der von Eggstein & Kreutz (Eggstein, M. & Kreutz, F. H. (1966), *Klin. Wochenschr.* 44, 262-267; Eggstein, M. & Kuhlmann, Elisabeth (1974) in *Methoden der enzymatischen Analyse* (Bergmeyer, H. U., ed.) 3. Aufl., S. 1871-1878, Verlag Chemie, Weinheim, Bergstr.) entwickelten enzymatischen Bestimmung der Triglyceride über Glycerin vor und nach alkalischer Verseifung wird eine vollenzymatische Triglyceridmessung verglichen, bei der die Verseifung mit Hilfe eines Lipase-Esterase-Gemisches erfolgt.

Die Praktikabilität dieser vollenzymatischen Methode übertrifft das bisherige Verfahren. Die enzymatische Verseifung erfolgt bei 37 °C oder Raumtemperatur. Die Serumproben können direkt zum Reaktionsgemisch gegeben und der Arbeitsgang auf drei Pipettierungen reduziert werden. Die analytische Präzision der vollenzymatischen Methode war im Meßbereich von 2 bis 7 mmol/l (177 bis 620 mg/100 ml) mit Variationskoeffizienten zwischen 0,5 und 4% gut. Im unteren Meßbereich bei einer Triglycerid-Konzentration von 0,7 mmol/l (62 mg/100 ml) Serum wurde ein mittlerer Variationskoeffizient bis zu 9% errechnet, bei extrem hohen Triglycerid-Konzentrationen bis 70 mmol/l (6195 mg/100 ml) Serum stieg der Variationskoeffizient auf 7%. Die Originalmethode von Eggstein & Kreutz ((1966), *Klin. Wochenschr.* 44, 262-267) ergab für den Bereich von 5-70 mmol/l (443-6195 mg/100 ml) Serum Variationskoeffizienten unter 1,5%. Die Richtigkeit der beiden Methoden wurde mit Glycerin- und Triolein-Lösungen und durch Aufstockungsversuche belegt. Störende Einflüsse durch Hämolyse, Hyperbilirubinämie und durch 59 häufig verordnete Medikamente konnten nicht nachgewiesen werden. Die Korrelation der beiden Methoden ergab für die vollenzymatische Methode systematisch etwa 10% niedrigere Ergebnisse als für die Originalmethode Eggstein & Kreutz. Die Überprüfung des Gehaltes an freiem Glycerin im Serum bestätigte die Literaturangaben, daß für diagnostische Routine-Triglycerid-Bestimmungen ein Pauschalbetrag für das freie Glycerin in Abzug gebracht werden kann.

A fully enzymatic triglyceride determination

Summary: A fully enzymatic triglyceride determination utilizing enzymatic hydrolysis with a lipase-esterase-mixture is compared with the enzymatic determination by Eggstein & Kreutz (Eggstein, M. & Kreutz, F. H. (1966), *Klin. Wochenschr.* 44, 262-267; Eggstein, M. & Kuhlmann, Elisabeth (1974) in *Methoden der enzymatischen Analyse* (Bergmeyer, H. U. ed.) 3. ed., pp. 1871-1878, Verlag Chemie, Weinheim, Bergstr.) which is based on the glycerol determination before and after alkaline saponification.

The fully enzymatic method is the more practicable. The enzymatic hydrolysis is performed at 37 °C or at room temperature. The serum samples are added directly to the reaction mixture and the working process is reduced to three pipetting steps. With a relative standard deviation of 0.5 to 4% in the measuring range of 2 to 7 mmol/l (177 to 620 mg/100 ml) the analytical precision was good. In the lower measuring range with a concentration of triglycerides in serum of 0.7 mmol/l (62 mg/100 ml) a mean relative standard deviation of up to 9% was calculated; for the extremely high concentrations of triglycerides up to 70 mmol/l (6195 mg/100 ml) a relative standard deviation of 7% was found. For the range of concentration of 5 to 70 mmol/l (443-6195 mg/100 ml) serum the original method by Eggstein & Kreutz ((1966), *Klin. Wochenschr.* 44, 262-267) had a relative standard deviation of below 1.5%. The accuracy of the two methods was established with solutions of glycerol and triolein and by standard addition experiments. No interference was observed from hemolysis, hyperbilirubinemia, or frequently

administered drugs. The correlation of the two methods proved that the results from the fully enzymatic method were systematically lower by 10% than the results from the method by *Eggstein & Kreutz*. The examination of the free glycerol in serum confirmed the findings reported in the literature, that for routine determinations of triglycerides and for diagnostic purposes the subtraction of a global amount for the free glycerol is satisfactory.

Einleitung

Neben der quantitativen Bestimmung des Serumcholesterins kommt wahrscheinlich auch den Triglyceriden eine Bedeutung als Risikoindikator für arteriosklerotische, koronare und periphere Gefäßerkrankungen zu (1). Beide Verfahren liefern die Kardinalsymptome zur Klassifizierung der primären Hyperlipoproteinämien. Sekundäre Blutfettverschiebungen, Resorptions- und Ernährungsstudien verlangen ebenfalls eine spezifische und präzise Messung der Triglyceride im Blut.

Das von *Eggstein & Kreutz* 1966 (2) beschriebene Verfahren zur enzymatischen Neutralfettbestimmung besitzt den Rang einer „empfohlenen Methode“ (Selected Routine Methode, *Büttner* et al. (3)) mit entsprechender Verbreitung in der laboratoriumsdiagnostischen Analytik.

Aus Gründen der arbeitstechnischen Rationalisierung, der „Praktikabilität von Methoden“, muß der bislang manuell durchgeführte Schritt der chemischen Verseifung als verbesserungswürdig und – für die Anpassung der Methode an Analysenautomaten – als hinderlich angesehen werden. Chemische Lösungen dieses Problems (z. B. *Soloni* (4), *Tiffany* et al. (5), *Giegel* et al. (6), *Neri & Frings* (7), *Köhling & Kattermann* (8)) durch Übergang auf andere Extraktions- und Verseifungsverfahren vermochten sich nicht durchzusetzen.

Die Arbeiten von *Bucolo & David* (9) und von *Wahlefeld* (10) führten zur Entwicklung eines Lipase-Esterase-Gemisches mit einer der chemischen Verseifung vergleichbaren lipolytischen Wirkung. Damit wird die vollenzymatische Triglycerid-Bestimmung in einer einzigen Arbeitslösung im Prinzip durchführbar.

Präzision, Richtigkeit und Vergleichbarkeit zur bisherigen Triglycerid-Bestimmung mit alkalischer Verseifung werden untersucht.

Die Erprobung nach Adaptation der Bestimmung an Endpunkt-Automaten wird zur Zeit durchgeführt. Wir verfügen über eine Weiterentwicklung des Vorfahrens zur vollenzymatischen Triglycerid-Bestimmung in „Continuous Flow Automaten“ vom Typ Technicon Autoanalyzer der I. und II. Generation (11, 12).

Methoden

Die Triglyceride im Serum werden nach Hydrolyse der Glycerin-Fettsäure-Ester über die quantitative Bestimmung des Glycerins errechnet. Das zugrunde gelegte Molekulargewicht von 885 (13) entspricht Triolein. Es stimmt mit dem mittleren Molekulargewicht von Serumtriglycerid-Gemischen überein (14).

Der Gehalt des Serums an freiem, unverestertem Glycerin wird bei der Berechnung in Abzug gebracht. Aus einem doppelten Ansatz mit und ohne Triglycerid-Hydrolyse kann aus der Differenz des „Gesamt-Glycerins“ und des „freien Glycerins“ das „Triglycerid-Glycerin“ bestimmt und daraus – in der Annahme, daß im menschlichen Plasma Di- und Monoglyceride nur in Spuren vorkommen – die Konzentration der Triglyceride berechnet werden.

Da der Anteil des freien Glycerins am gesamten Glycerin nach Hydrolyse klein ist, begnügt man sich unter Routinebedingungen mit einer allgemeinen Korrektur und verzichtet auf die Bestimmung des freien Glycerins. Folgende Berechnungen der Serum-Triglyceride sind üblich:

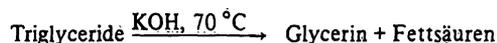
1. „unkorrigierte Triglyceride“ unter Vernachlässigung des freien Glycerins im Gesamt-Glycerin,
2. „korrigierte Triglyceride“ über ein allgemeines Korrekturglied für freies Glycerin,
3. „wahre Triglyceride“ unter Berücksichtigung des freien Glycerins.

In dieser Arbeit wurde der Anteil des freien Glycerins nicht gesondert berücksichtigt; für den Methodenvergleich wurden ausschließlich „unkorrigierte Triglycerid-Werte“ verwandt.

Methodenprinzip *Eggstein & Kreutz* (15)

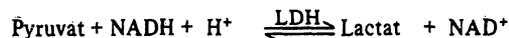
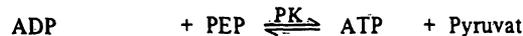
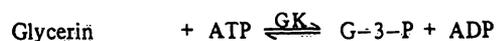
Triglycerid-Hydrolyse

Durch ethanolische Alkalilösung wird die Esterbindung der Triglyceride verseift. Es entstehen Glycerin und die Alkalisalze der freien Fettsäuren.



Meßreaktion

Die quantitative Bestimmung des Glycerins erfolgt in einem zusammengesetzten optischen Test:

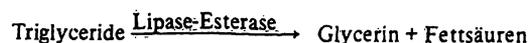


GK: Glycerokinase
G-3-P: D-Glycerin-3-phosphat
PEP: Phosphoenolpyruvat
PK: Pyruvat-Kinase
LDH: Lactat-Dehydrogenase

Vollenzymatische Methode

Triglycerid-Hydrolyse

Bei dieser Methode werden die Triglyceride durch ein Lipase-Esterase-Gemisch (Carboxy-esterase) in Glycerin und Fettsäuren gespalten.



Meßreaktion

Die Bestimmung des Glycerins wird nach der gleichen Meßreaktion wie bei der Methode *Eggstein & Kreutz* durchgeführt.

Arbeitsgang**Originalmethode**

Bei der Originalmethode wird nach der Serum-Hydrolyse und der nachfolgenden Perchlorat-Neutralisation der Eiweiß-Perchlorat-Niederschlag abzentrifugiert. Vom Überstand (Hydrolysat) wird eine Probe zum Reaktionsgemisch gegeben und die Meßreaktion mit Glycerokinase-Lösung gestartet.

Vollenzymatische Methode

Bei der enzymatischen Hydrolyse werden 0,05 ml Serum zu 2,5 ml Reaktionsgemisch gegeben und bei 37 °C für 25 min inkubiert. Nach dem Testprinzip der Originalmethode wird anschließend die Meßreaktion gestartet. Die Neutralisation, Zentrifugation und das Überpipettieren in den Meßansatz entfällt.

Methodenvergleich

Der Vergleich der Methode *Eggstein & Kreutz* und der vollenzymatischen Methode wurde nach 3 verschiedenen Verfahren durchgeführt.

Verfahren I

0,05 ml Serum in 2,5 ml Reaktionsgemisch werden 25 min bei 37 °C¹⁾ inkubiert, nach Zugabe von 0,01 ml Glycerokinase-Lösung wird bei Raumtemperatur nach 12 min die Absorption der Probe (A_P) und in einer Vergleichsküvette bei entsprechendem Ansatz die Absorption des Proben-Leerwerts (A_L) mit Wasser anstelle von Glycerokinase-Lösung am Photometer abgelesen.

$$\Delta A = A_P - A_L$$

Verfahren II

2,5 ml Reaktionsgemisch und 0,05 ml Serum werden 25 min bei 37 °C¹⁾ inkubiert, dann Absorption A_1 gemessen. Start der Meßreaktion mit 0,01 ml Glycerokinase-Lösung, nach 12 min Absorption A_2 messen.

$$\Delta A = A_1 - A_2$$

Verfahren III

Bei dieser Bestimmung wird wie bei Verfahren II vorgegangen. Um mögliche Nebenreaktionen zu erfassen, wurde zusätzlich nach weiteren 12 min noch eine Absorption A_3 abgelesen.

$$\Delta A = (A_1 - A_2) - (A_2 - A_3)$$

Bei jeder der drei Meßreihen wurde ein Reagenzien-Leerwert berücksichtigt. Es wurde nur frisches Serum verwandt. Lipämische Seren müssen vor Gebrauch gut durchmischt werden. Stark lipämische Seren wurden 1 + 9 mit 9 g/l NaCl-Lösung verdünnt.

Materialien

Die Materialien zur Durchführung der Originalmethode entsprechen den Angaben von *Eggstein in Bergmeyer*: „Methoden der enzymatischen Analyse“ (15). Die Materialien für die vollenzymatische Triglycerid-Bestimmung sind:

Reagenzien

1. Lipase (EC 3.1.1.3), aus *Rhizopus arrhizus*
2. Esterase (EC 3.1.1.1), aus Schweineleber
3. Glycerokinase (EC 2.7.1.30) aus *Candida mycoderma*
4. Lactatdehydrogenase (EC 1.1.1.27) aus Schweineherz
5. Pyruvatkinase (EC 2.7.1.40) aus Kaninchenmuskel
6. di-Natriumhydrogenphosphat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, p. a.
7. Natrium-di-hydrogenphosphat, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, p. a.

8. Magnesiumsulfat, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, p. a.
9. NADH als Dinatriumsalz, $\beta\text{-NADH-Na}_2$
10. ATP als Dinatriumsalz, $\text{ATP-Na}_2\text{H}_2 \times 3 \text{H}_2\text{O}$
11. Phosphoenolpyruvat als Tricyclohexylammoniumsalz
12. Glycerin wasserfrei $D = 1,26 \text{ kg/l}$ reinst
13. Triolein (Trioleylglycerin), Reinheit 99%, Fa. Roth, Karlsruhe
14. Ethanol abs., p. a.

Die Bestimmungsansätze wurden mit Enzymen der Fa. Boehringer Mannheim durchgeführt.

Konzentration der Lösungen

Lösung 1: 50 mmol/l Phosphat-Puffer, pH = 7,0
2 mmol/l Magnesiumsulfat

Lösung 2: 10 mmol/l NADH
25 mmol/l ATP
19 mmol/l Phosphoenolpyruvat

Lösung 3: 300 kU/l Lactatdehydrogenase
50 kU/l Pyruvatkinase
5 MU/l Lipase
400 kU/l Esterase

Lösung 4: 150 kU/l Glycerokinase

Das Reaktionsgemisch wurde täglich frisch angesetzt (nach Bedarf ein Vielfaches der angegebenen Mengen).

Reaktionsgemisch: Lösung 1: 5,0 ml
Lösung 2: 0,1 ml
Lösung 3: 0,1 ml

Geräte

Photometer Eppendorf mit Thermostat, Wechselautomatik und Registriereinrichtung; Messung bei 334 nm. Laborzentrifuge. Wasserbad. Normal- und Halbmikro-Glasküvetten.

Untersuchungsgut

Der Methodenvergleich wurde durchgeführt mit wäßrigen Glycerin- und ethanolischen Triolein-Standardlösungen und mit Patientenserum der Medizinischen Universitätsklinik und ihrer Fettstoffwechselambulanz. Bei Zumisch-Versuchen erfolgte die Zugabe von Glycerin bzw. Triolein in ethanolischer Lösung.

Ergebnisse und Diskussion**Technische Eigenschaften****Stabilität der Reagenzien**

Die Stabilität der Arbeitslösung (Reaktionsgemisch mit Lipase, Esterase, Pyruvatkinase, Lactatdehydrogenase, ATP, Phosphoenolpyruvat, NADH) wurde bei den 3 Lagerungstemperaturen +4 °C, Raumtemperatur und 33 °C geprüft. Die Stabilität wurde als gewährleistet betrachtet, wenn die Wiederfindung in einem fraktioniert eingefrorenen, gepoolten Humanserum mit einer Triglycerid-Konzentration von 1,65 mmol/l (146 mg/100 ml) bei $100 \pm 5\%$ des Sollwertes lag. Der Sollwert und Streubreich waren zu Beginn des Experimentes in einer 20-fach-Analyse ermittelt worden.

Die Arbeitslösung ist bei +4 °C 7 Tage, bei Raumtemperatur 2 Tage und bei 33 °C maximal 8 Stunden haltbar (Abb. 1).

Die zum Start der Reaktion eingesetzte Glycerokinase-Suspension ist bei allen Temperaturen mindestens 4 Wochen stabil.

¹⁾ Mit einer Esterase mikrobiellen Ursprungs wird neuerdings die Triglycerid-Hydrolyse in kürzerer Zeit (15 min) und bei Raumtemperatur erreicht.

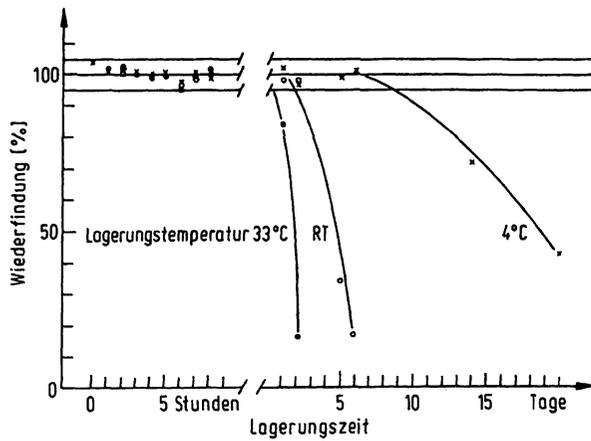


Abb. 1. Stabilität der Arbeitslösung für verschiedene Lagerungstemperaturen und Lagerungszeiten. RT = Raumtemperatur.

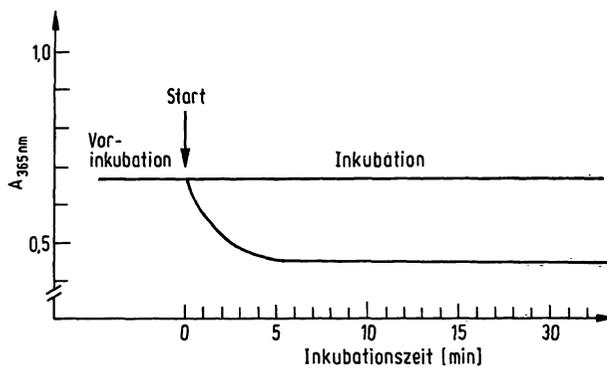


Abb. 2. Reaktionsverlauf: 10 min. Vorinkubation von 0,1 ml Serum (Triglycerid-Gehalt: 5,16 mmol/l = 457 mg/100 ml) mit 5,0 ml Arbeitslösung, dann Teilung des Ansatzes und Start der Reaktion mit 0,01 ml Glycerokinase-Lösung.

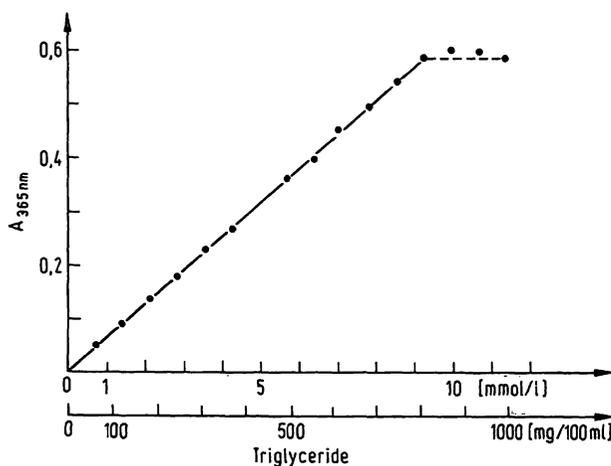


Abb. 3. Abhängigkeit des Meßsignals ($A_{365 \text{ nm}}$) von der Triglycerid-Konzentration (Verdünnungsreihe eines Humanserums mit 9 g/l NaCl-Lösung), für $x \leq 9,0 \text{ mmol/l}$, $y = 0,0635x - 0,0002$, $r = 0,9998$.

Reaktionsverlauf

Die Reaktion ist auch bei Vorlage höherer Triglycerid-Konzentrationen nach 10 min abgelaufen (Abb. 2). Von der 10. bis zur 30. min ist die Absorptionsdifferenz bis auf einen geringen Schleich von $A_{334 \text{ nm}} = 0,002$ –

0,012/10 min (entsprechend einem Triglycerid-Gehalt von 0,02–0,09 mmol/l bzw. 2–8 mg/100 ml) stabil. Bei unseren Untersuchungen wurde bei der Erweiterung des Ableszeitraums auf 30 min maximal ein Fehler von 5% durch unspezifischen NADH-Umsatz gefunden.

Meßbereich und Linearität

Die Linearität zwischen Triglycerid-Konzentration und Meßsignal und auch der Meßbereich wurden durch stufenweise Verdünnung von 5 klaren und trüben Humanseren mit mäßig und stark erhöhtem Triglycerid-Gehalt überprüft. Bis zu einer Konzentration von 7,90 mmol/l (699 mg/100 ml) wurde eine lineare Absorptions-Konzentrationsbeziehung gefunden (Abb. 3). Unter Einbehaltung einer Sicherheitsreserve empfiehlt sich eine Begrenzung des Meßbereiches auf 6,80 mmol/l (602 mg/100 ml).

Analytische Eigenschaften

Präzision

Die Präzision in der unterbrochenen Serie wurde in 5 Konzentrationsbereichen mit der Originalmethode und den 3 Verfahren der vollenzymatischen Methode ermittelt (16). Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Zur Beurteilung wurden die Methoden vom kleinsten zum größten Variationskoeffizienten rangiert. Die Originalmethode wurde mit der niedrigsten Rangsumme als beste Methode bewertet. Von den vollenzymatischen Verfahren hat Verfahren II mit der nächst niedrigsten Rangsumme das beste Ergebnis.

Entsprechend werden im Folgenden die Ergebnisse der Präzision in der Serie und von Tag zu Tag bewertet. Da von den vollenzymatischen Verfahren I, II und III immer Verfahren II die relativ beste Bewertung erhielt, beschränken wir uns auf den Vergleich der Originalmethode mit Verfahren II.

Die Präzision in der Serie und von Tag zu Tag wurde folgendermaßen ermittelt: In 10 fraktioniert eingefrorenen, gepoolten Humanserumproben mit verschiedenen Triglycerid-Konzentrationen wurden an 5 Tagen jeweils 5fach-Bestimmungen durchgeführt. Die Reihenfolge der Analysen wurde jeden Tag durch Randomisierung neu festgelegt. Pro Bereich ließen sich für jeden Tag eine Präzision in der Serie und aus der Reihe der jeweils ersten, zweiten, dritten, vierten und fünften Bestimmungen an jedem Tag eine Präzision von Tag zu Tag berechnen. Auf diese Weise ergaben sich für jeden der 10 Konzentrationsbereiche 5 Präzisionen in der Serie und je 5 Präzisionen von Tag zu Tag.

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4a–c zusammengestellt. In Abbildung 4a ist die Präzision für Proben mit Konzentrationen innerhalb der Meßbereichsgrenzen dargestellt, sie zeigt eine Abhängigkeit vom Triglycerid-Gehalt. Im Entscheidungsbereich und darüber wurden mittlere Variationskoeffizienten bis 9% gefunden. In den Abbildungen 4b + c finden sich die Daten für Seren mit

Tab. 1. Präzision in der unterbrochenen Serie zur Bewertung der Methoden und der Verfahren I, II und III.

	N	\bar{x} (mmol/l)	\bar{x} (mg/100 ml)	VK (%)	Rang	Rang-Summe	Methoden-Bewertung
Originalmethode	25	5,45	482	0,9	1		
Eggstein & Kreutz	25	5,64	499	0,6	1		
	25	19,27	1705	0,3	1	6	1
	25	28,06	2483	1,9	2		
	15	70,08	6202	1,0	1		
	Verfahren I	25	4,95	438	3,6	3	
$\Delta A = A_p - A_L$	25	5,02	444	2,0	2		
	25	17,11	1514	1,8	4	17	4
	25	25,33	2242	3,2	4		
	15	70,99	6283	7,0	4		
	Verfahren II	25	4,89	433	3,3	2	
$\Delta A = A_1 - A_2$	25	5,05	447	2,6	4		
	25	17,31	1532	1,2	2	11	2
	25	23,93	2118	1,6	1		
	15	70,17	6210	5,6	2		
	Verfahren III	25	4,87	431	3,6	4	
$\Delta A = (A_1 - A_2) - (A_2 - A_3)$	25	5,02	444	2,5	3		
	25	17,25	1527	1,5	3	16	3
	25	25,15	2226	2,9	3		
	15	69,74	6172	5,8	3		

Abb. 4. Mittlerer Variationskoeffizient (VK) in Abhängigkeit von der Triglycerid-Konzentration.

Leere Symbole: Einzel-VK für jede Serien-Reihe (Dreiecke) bzw. jede von-Tag-zu-Tag-Reihe (Kreise).
 Volle Symbole: Arithmetisches Mittel der Einzel-VK in der Serie (Dreiecke) bzw. von Tag zu Tag (Kreise) für jeden Konzentrationsbereich.
 Durchgezogene Linie (—): in der Serie
 Unterbrochene Linie (-----): von Tag zu Tag
 x: Triglycerid-Konzentration des Serumpools (mmol/l) bzw. (mg/100 ml)
 y: Variationskoeffizient (%)

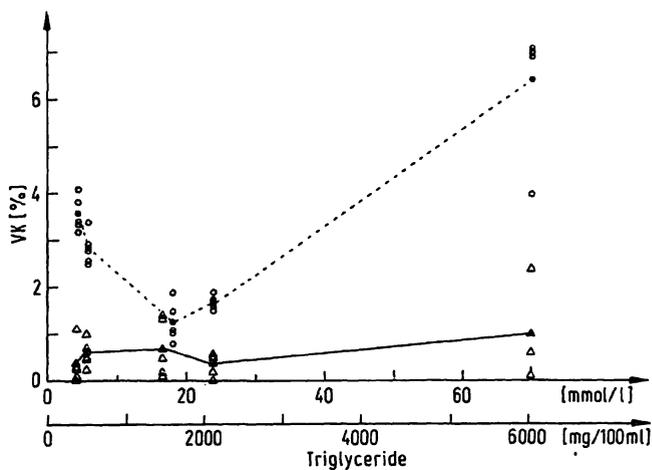


Abb. 4 b: Präzision der vollenzymatischen Methode, hohe Konzentrationsbereiche.

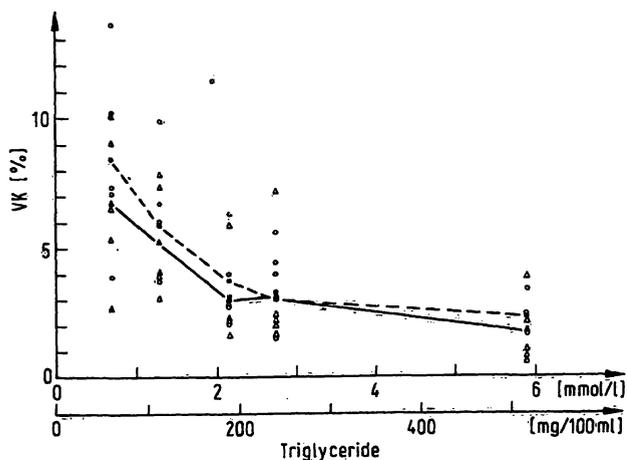


Abb. 4 a. Präzision der vollenzymatischen Methode, Konzentrationsbereiche unterhalb der Verdünnungsgrenze.

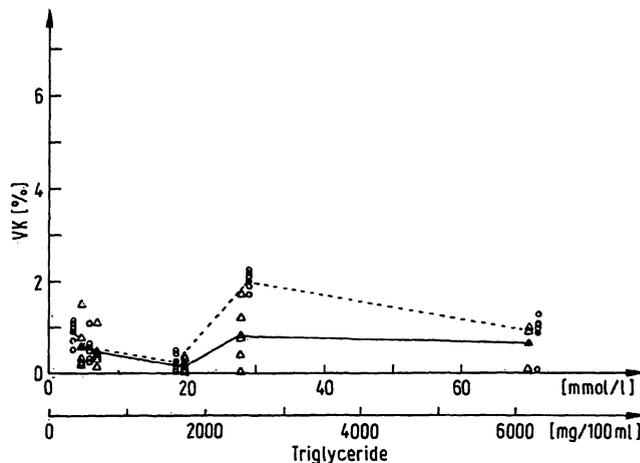


Abb. 4 c. Präzision der Methode Eggstein & Kreutz, hohe Konzentrationsbereiche.

stark erhöhtem Triglycerid-Gehalt (bis 68 mmol/l bzw. 6018 mg/100 ml). Aus ihnen folgt, daß in diesem Bereich die Präzision von Tag zu Tag der vollenzymatischen Methode im Vergleich zur *Eggstein & Kreutz*-Methode ungünstiger ist (F-Test: $p \leq 0,001$, *Wilcoxon*-Test: $p \leq 0,01$).

Richtigkeit

1. Wiederfindung von Glycerin

Die Wiederfindung von Glycerin in wäßriger Lösung wurde weder durch den vorausgegangenen „Verseifungs- und Neutralisationsschritt“ noch durch das Enzymgemisch beeinflusst. Die Ausbeute stimmte im Rahmen der analytischen Präzision überein (Tab. 2).

2. Wiederfindung von Triolein

Die Vollständigkeit der Verseifung wurde an 5 Patientenserum, denen 3 verschiedenen konzentrierte ethanolische Triolein-Lösungen zugemischt wurden, geprüft (Tab. 3). Mit der enzymatischen Methode betrug die Wiederauffindung $\bar{x} \pm s = 99,9 \pm 0,9\%$. Die Sollwert-Wiederfindung bei Kalilauge-Verseifung betrug im Mittel $100,5 \pm 1,1\%$. Die Vollständigkeit der Triolein-Spaltung durch das eingesetzte Lipase-Esterase-Gemisch ist demzufolge auch gewährleistet.

Tab. 2. Wiederfindung von Glycerin in wäßriger Lösung
Glycerin-Konzentration (Einwaage): 1,17 mmol/l;
N = 20.

Methode	\bar{x} (mmol/l)	Abwei- chung vom Sollwert (%)	s (mmol/l)	VK (%)
KOH-Verseifung	1,18	+ 1,2	0,02	1,74
Enzymatische Verseifung A ₁ /A ₂ -Ableseung	1,17	+ 0,4	0,05	4,05

3. Kontrollseren

Im Vergleich zur Verseifung mit ethanolischer Kalilauge wurden nach enzymatischer Esterspaltung in Humanserum-Lyophilisaten (Kontrollseren²) im Mittel um 5–10% niedrigere Werte (siehe auch unter Methodenvergleich an Patientenserum) gefunden. Die Ursache der Differenz konnte bisher experimentell nicht geklärt werden. Längere Inkubationszeiten und Erhöhung des Enzymgehaltes führten nicht zu einer Beseitigung der Differenz.

Störungen

1. Hämolyse und Hyperbilirubinämie

Hämoglobin bis zu einer Konzentration von 10 g/l (1 g/100 ml) und Bilirubin bis 0,171 mmol/l (10 mg/100 ml) stören den Test nicht.

2. Pharmaka und Antikoagulantien

Proben eines Humanserum-Pools wurden mit einer Auswahl von Medikamenten und Antikoagulantien (Tab. 4) versetzt. Die Konzentration der Pharmaka entsprach dabei der nach Gabe therapeutischer Maximaldosen. Eine Störung konnte auch in dieser Untersuchung nicht festgestellt werden, da die Wiederauffindung in keinem Fall außerhalb eines Bereiches lag, der durch den Mittelwert \pm doppelte Standardabweichung einer 10fach-Bestimmung der medikamentenfreien Kontrollprobe des gleichen Serum-pools definiert war.

²) Hyland Europa-Kontrolle II Monitrol I, Monitrol II

Precilip (Chargen: 323 A, 328 B, 429 B, 430 A, 433 A,
434 B, 435 A)

Validate A, Validate N.

Tab. 3. Zumischversuche mit ethanolischen Triolein-Lösungen zu Patientenserum.

Basiswert (mmol/l)	Zumischung (mmol/l)	Sollwert (mmol/l)	Verseifung mit KOH	Ist-Werte
				enzymatische Verseifung (% des Sollwertes)
1,26	1,35	2,61	100,4	100,9
2,35	1,35	3,70	101,2	100
2,25	1,35	3,60	100,9	100,3
3,49	1,35	4,84	100,9	100,2
3,78	1,35	7,13	100,8	100,8
1,26	2,31	3,57	101,9	99,7
2,35	2,31	4,66	100,9	100,2
2,25	2,31	4,56	101,7	99,8
3,49	2,31	5,80	100	100,6
5,78	2,31	8,09	97,2	99
1,26	3,45	4,71	100,5	100
2,35	3,45	5,80	99,4	100
2,25	3,45	5,70	100,4	99,8
3,49	3,45	6,94	100,3	99,7
5,78	3,45	9,23	100,2	97,2
		\bar{x}	100,5	99,9
		s	1,1	0,9

Tab. 4. Medikamente, Röntgen-Kontrastmittel und Antikoagulantien, deren Anwesenheit im Bestimmungsansatz keine nachweisbaren Störungen zeigte.

Actol	– Acidum niflumicum
Aldactone	– Spironolactonum
Amuno	– Indometacinum
Angiografin	– Amidotrizoate sodium
Antistin	– Antazolinsulfat, Naphazolinnitrat, Acid. boric.
Aponal	– Doxepinum
Aspirin	– Acidum acetosalicylicum
Benemid	– Probenecidum
Biligrafin	– Adipiodonum, Megluminum
Binotal 500	– Ampicillinum
Buscopan	– Butylscopolaminum
Butazolidin	– Phenylbutazonum
Cebion	– Acidum ascorbicum
Dipar	– Phenforminum
Dolviran	– Acidum acetosalicylicum, Phenacetin, Codeinum phosphoric., Coffeinum anhydric., Phenobarbitalum
Dulcolax	– Bisacodylum
Dura Clofibrat	– Clofibratum
Durenat	– Sulfamethoxydiazinum
Endoxan	– Cyclophosphamidum
Euglucon	– Glibenclamidum
Furadantin	– Nitrofurantoinum
Glifan	– Glafeninum
Hostacyclin	– Tetracyclinum
Hygroton	– Chlorthalidonum
Intensain	– Carbocromenum
Lanicor	– Digoxinum
Lasix	– Furosemidum
Librium 5	– Chlordiazepoxidum
Luminal	– Phenobarbitalum
Macrodex 6%	– Dextran
Marcumar	– Phenprocoumonum
Megaphen	– Chlorpromazinum
Metalcaptase	– Penicillaminum
Methotrexat	– Methotrexatum
Miroton	– Standard. Pflanzenauszüge mit den Gesamtglycosiden aus Extr. Bulb. Scill. var. alb., Extr. Fol. Convall., Extr. Fol. Oleandr., Extr. Herb. Adon.
Modenol	– Thiabutazid, Reserpin, Rescinnamin, Raubasin, Kaliumchlorid
Neoplasmagel 20%	– modifizierte, flüssige Gelatine, Natriumchlorid, Calciumchlorid, Elektrolyte
Nicobion	– Nicotinsäureamid
Novadral	– Norfenefrin-HCl
Novalgin	– Noramidopyrini methansulfonas natriicum
Paraxin	– Chloramphenicolum
Polybion	– Aneurinnitrat, Riboflavin, Nicotinsäureamid, Calcium-D-pantothenat, Pyridoxinhydrochlorid, Cyanocobalamin, Biotin
Prolixan	– Azapropapone
Rastinon	– Tolbutamidum
Refobacin	– Gentamycinum
Resochin	– Chloroquinum
Sembrina	– Méthyl dopum
Solu-Decortin	– Prednisolonum succinat natrium
Sulfa-Furadantin	– Nitrofurantoin, Sulfadiazin
Tanderil	– Oxyphenbutazonum
Tolbutamid	– Tolbutamidum
Uricovac	– Benzbromaronum
Urografen	– Acidum amidotrizoicum
Zyloric	– Allopurinolum
Na-Heparin	
NaF	
Na-Oxalat	
Titriplex III/EDTA	
Na-Citrat	

Methodenvergleich

Die Originalmethode von *Eggstein & Kreutz* und die vollenzymatische Methode wurden an einem Kollektiv von 107 Seren von Patienten mit erhöhten Lipid-Spiegeln verglichen. Abbildung 5 zeigt das Ergebnis der Korrelationsanalyse. Die Regressionsgleichung lautet:

für mmol/l

$$y = 0,922x - 0,107, r = 0,998 - 0,005$$

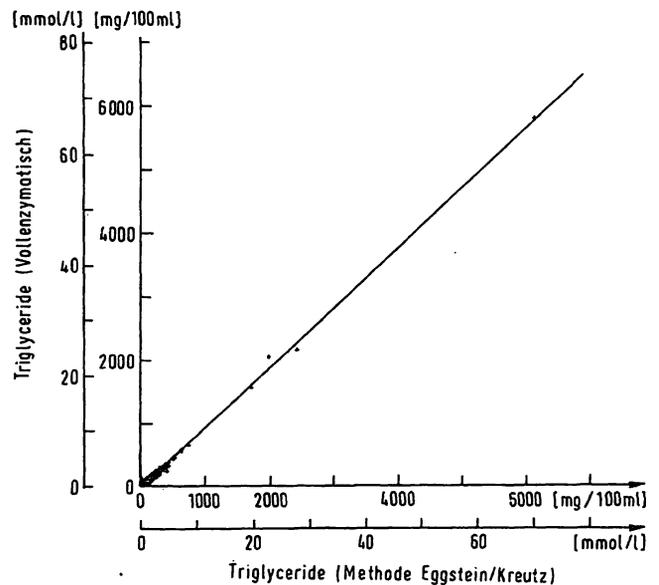
für mg/100 ml

$$y = 0,922x - 9,4, r = 0,998 - 0,005$$

Der Korrelationskoeffizient $r \pm s_r$ von $0,998 - 0,005$ spricht für die Vergleichbarkeit beider Methoden. Das vollenzymatische Verfahren liefert Resultate, die im Mittel um 8% und zusätzlich 0,107 mmol/l (9,4 mg/100 ml) niedriger liegen als die nach ethanolscher Kalilauge-Verseifung und unter Berücksichtigung des Leerwerts gemessenen Werte. Die bei den Kontrollseren beschriebene methodische Differenz von 5 bis 10% entspricht dieser Beobachtung.

Einfluß des freien Glycerins

Freies Glycerin und Gesamt-Glycerin wurden nach der vollenzymatischen Methode in 142 frischen Humanseren, unter denen der Anteil mit erhöhten Lipidwerten deutlich überrepräsentiert war, bestimmt. Aus diesen Daten wurden die jeweiligen wahren Triglycerid-Konzentrationen berechnet und mit unkorrigierten Triglyceriden korreliert (Abb. 6).

Abb. 5. Korrelation der Methode nach *Eggstein & Kreutz* mit der vollenzymatischen Methode

N = 107

 $y = a + b x$

a = -0,107 (für mmol/l) a = -9,4 (für mg/100 ml)

b = 0,922 ± 0,004

r = 0,998 ± 0,005

 $\bar{x} = 3,41 \pm 7,47$ (für mmol/l) $\bar{x} = 302 \pm 661$ (für mg/100 ml) $\bar{y} = 3,04 \pm 6,90$ (für mmol/l) $\bar{y} = 269 \pm 611$ (für mg/100 ml)

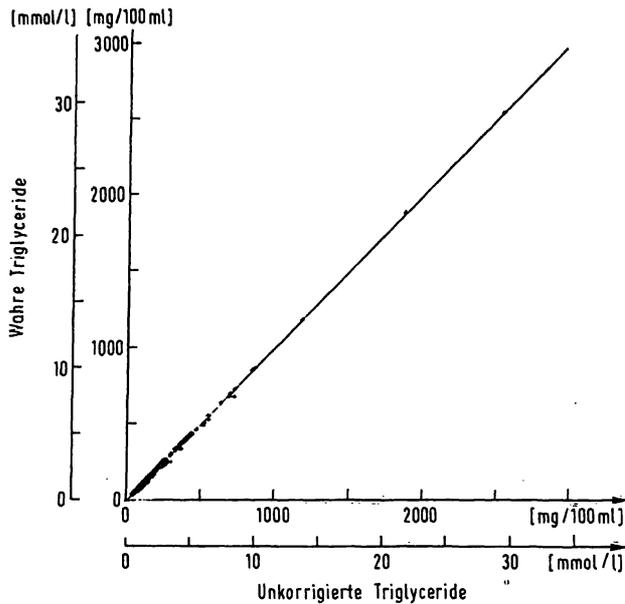


Abb. 6. Korrelation unkorrigierter Triglyceride zu wahren Triglyceriden

$N = 142$

$y = a + b \cdot x$

$a = -0,097$ (für mmol/l) $a = -8,5$ (für mg/100 ml)

$b = 0,955 \pm 0,002$

$r = 0,999 \pm 0,002$

$\bar{x} = 2,91 \pm 3,40$ (für mmol/l) $\bar{x} = 258 \pm 301$ (für mg/100 ml)

$\bar{y} = 2,80 \pm 3,38$ (für mmol/l) $\bar{y} = 248 \pm 300$ (für mg/100 ml)

Der hohe Korrelationskoeffizient von 0,999 ist damit zu erklären, daß die Konzentration des freien Glycerins im Verhältnis zum Triglycerid-Glycerin nur gering ist und somit keinen wesentlichen Einfluß auf den Triglycerid-Wert ausübt. Aus einer Steigung von 0,995 und einem Schnittpunkt mit der y-Achse bei $-0,097$ ist abzulesen, daß die „wahren“ Triglycerid-Werte im Mittel um einen systematischen Betrag unter den „unkorrigierten“ Triglycerid-Werten liegen. Im Bereich 1–23 mmol/l (89–2036 mg/100 ml) Triglyceride, berechnet aus dem Gesamt-Glycerin-Gehalt, liegt der wahre Triglycerid-Wert um 0,114–0,228 mmol/l (10–20 mg Triglyceride/100 ml) Serum niedriger. Es kann also die bisherige Praxis, pauschal 0,114 mmol/l (10 mg Triglyceride/100 ml) Serum als Anteil des freien Glycerins vom Gesamt-Glycerin-Gehalt (unkorrigierter Triglycerid-Wert) abzuziehen, beibehalten werden.

Danksagung

Wir danken den med.-techn. Assistentinnen Frau H. Dietrich und Frä. D. Bauder für ihre exakte und fleißige Mitarbeit.

Literaturverzeichnis

- Barbosiak, J. J., Rimm, A. A., Anderson, A. J., Tristani, F. E., Walker, J. A. & Flemma, R. J. (1974). *Amer. Heart J.* 87, 716–721.
- Eggstein, M. & Kreutz, F. H. (1966). *Klin. Wochenschr.* 44, 262–267.
- Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie zur Durchführung klinisch-chemischer Untersuchungen bei der Prüfung von Arzneimitteln (1976). *diese Z.* 14, 161–164.
- Soloni, F. G. (1971). *Clin. Chem.* 17, 529–534.
- Tiffany, T. O., Morten, J. M., Hall, E. M. & Garrett, A. S., Jr. (1974). *Clin. Chem.* 20, 476–481.
- Giegel, J. L., Ham, Anna B. & Clema, W. (1975). *Clin. Chem.* 21, 1575–1581.
- Neri, B. P. & Frings, C. S. (1973). *Clin. Chem.* 19, 1201–1202.
- Köhring, B. & Kattermann, R. (1974). *diese Z.* 12, 282–286.
- Bucolo, G. & David, H. (1973). *Clin. Chem.* 19, 476–482.
- Wahlefeld, A. W. (1974) in *Methoden der enzymatischen Analyse* (Bergmeyer, H. U. ed.), 3. Aufl., S. 1878–1882. Verlag Chemie, Weinheim.
- Wahlefeld, A., Klose, S. & Munz, E. (1975). IX. Int. Congr. of Clinical Chemistry, Toronto, Canada, 13.–18. Juli. Abstracts, S. 25.
- Liebich, H. M., Müller, P. H., Schmülling, R.-M., Eggstein, M., Stähler, F. & Weisshaar, D. (1977). *diese Z.* 15, 503–508.
- Eggstein, M. (1965). *Klin. Wochenschr.* 43, 1031–1038.
- Eggstein, M. (1961). *Habilitationschrift*, Marburg/Lahn.
- Eggstein, M. & Kuhlmann, Elisabeth (1974) in *Methoden der enzymatischen Analyse* (Bergmeyer, H. U. ed.), 3. Aufl., S. 1871–1878. Verlag Chemie, Weinheim.
- Schmülling, R.-M., Liebich, H., Locher, M., Mildner, I. & Eggstein, M. (1973). *diese Z.* 11, 513–520.

Dipl.-Biochem. Dr. med. Peter H. Müller
Medizinische Univ.-Klinik
Abteilung Innere Medizin IV
Auf dem Schnarrenberg
D-7400 Tübingen