

# D-Glucose

Chemische Methoden zur Bestimmung der Glucose nützen vor allem die Reduktionswirkung des Zuckers aus. Diese Methoden werden jedoch durch andere reduzierende Substanzen der Probe gestört, sind unspezifisch und häufig sehr arbeitsaufwendig. Mit Hilfe von Enzymen kann man Glucose schnell und spezifisch bestimmen.

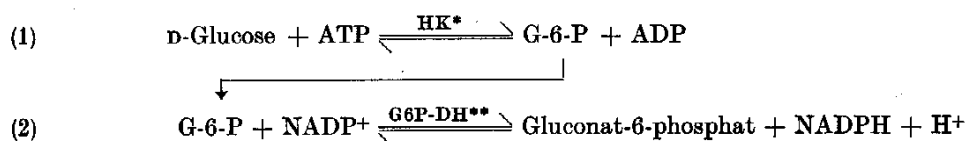
## Bestimmung mit Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase

Hans Ulrich Bergmeyer, Erich Bernt, Felix Schmidt und Harald Stork

Mit dem hier beschriebenen Verfahren<sup>1-4</sup> können Glucose und Glucose-6-phosphat nebeneinander bestimmt werden.

*Verwendung der Methode:* In der Biochemie, in der Lebensmittelchemie, in der klinischen Chemie. Die Modifikation für 10  $\mu$ l Blut wird vorzugsweise in der Kinderheilkunde und bei schlecht blutenden alten Patienten angewendet.

### Prinzip



Die NADPH-Zunahme, gemessen an der Extinktionsänderung bei 340 (334, 365) nm, ist der Glucose-Menge proportional.

### Optimale Meßbedingungen

Die Reaktionen verlaufen optimal bei  $\text{pH} = 7,5$ . Das Gleichgewicht der Reaktion (2) liegt weit auf der rechten Seite. Das Gleichgewicht der Reaktion (1) ist bedeutungslos, da G-6-P sofort

\* Hexokinase (ATP:D-hexose-6-phosphotransferase, EC 2.7.1.1).

\*\* Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (D-Glucose-6-phosphate:NADP 1-oxidoreductase, EC 1.1.1.49).

weiterreagiert. Beide Reaktionen verlaufen stöchiometrisch. Unter speziellen Bedingungen (Anwesenheit von Gluconat-6-phosphat- $\delta$ -Lacton und Gluconat-6-phosphat-Dehydrogenase oder höhere Konzentration an ADP und G-6-P) können die Reaktionen jedoch reversibel sein<sup>5-7</sup>.

### Notwendige Geräte

Spektralphotometer oder Spektrallinienphotometer mit Möglichkeit zur exakten Messung bei 340, 334 oder 365 nm; Laborzentrifuge.

### Notwendige Reagentien\*

1. Perchlorsäure, ca. 70% (w/w),  
Dichte = 1,67
2. Triäthanolamin-hydrochlorid
3. Magnesiumsulfat, p. a.,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
4. Adenosin-5'-triphosphat, ATP  
als Dinatriumsalz  $\text{ATP-Na}_2\text{H}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ .  
Handelspräparate s. S. 562.
5. Nicotinamid-adenin-dinucleotid-  
phosphat, NADP  
als Dinatriumsalz  $\text{NADP-Na}_2\text{H}$ . Handels-  
präparate s. S. 582.
6. Hexokinase, HK  
aus Hefe kristallisiert, Suspension in 3,2 M  
Ammoniumsulfat-Lösung;  $\geq 140$  U/mg  
(25°C). Handelspräparate s. S. 503.
7. Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase,  
G6P-DH  
aus Hefe, Suspension in 3,2 M Ammonium-  
sulfat-Lösung;  $\geq 140$  U/mg (25°C). Han-  
delspräparate s. S. 488.

### Reinheit der Enzympräparate

HK und G6P-DH dürfen nicht mehr als je 0,1% NADPH-Oxydase, Gluconat-6-phosphat-Dehydrogenase, Phosphoglucomutase, Phosphoglucose-Isomerase und nicht mehr als 0,01% Invertase (Saccharase) enthalten. Die Prozentzahlen beziehen sich jeweils auf die spezifische Aktivität von HK und G6P-DH.

### Herstellung der Lösungen (für ca. 25 Bestimmungen)

Alle Lösungen mit frisch bereitetem destilliertem Wasser herstellen.

- I. Puffer/ $\text{MgSO}_4$  (0,3 M Triäthanolamin-Puffer,  $\text{pH} = 7,5$ ; 3 mM  $\text{MgSO}_4$ ):  
5,6 g Triäthanolamin-hydrochlorid und 740 mg  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  in 50 ml Wasser lösen, mit ca. 6,0 ml 1 N NaOH  $\text{pH} = 7,5$  einstellen und mit Wasser ad 100 ml auffüllen.
- II. Adenosin-5'-triphosphat/Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (150 mM ATP; 12 mM NADP):  
455 mg  $\text{ATP-Na}_2\text{H}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  und 50 mg  $\text{NADP-Na}_2\text{H}$  mit 5,0 ml Triäthanolamin-Puffer (Lösung I) lösen.
- III. Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, G6P-DH (1 mg Protein/ml):  
Stammsuspension mit 3,2 M Ammoniumsulfat-Lösung verdünnen.

\* Fertige Reagentien-Zusammenstellungen sind im Handel, s. S. 591.

**IV. Hexokinase, HK (1 mg Protein/ml):**

Stamm suspension mit 3,2 M Ammoniumsulfat-Lösung verdünnen.

**V. Perchlorsäure (ca. 0,33 M):**

2,85 ml 70-proz. Perchlorsäure mit Wasser ad 100 ml verdünnen.

**Haltbarkeit der Lösungen**

Die Pufferlösung ist bei Raumtemperatur unbegrenzt haltbar. ATP/NADP-Lösung bei +4°C lagern und monatlich frisch bereiten. Die Suspensionen von HK und G6P-DH sind bei ca. +4°C aufbewahrt mindestens 1 Jahr stabil.

**Arbeitsweise****Probenahme, Behandlung und Stabilität der Probe**

**Probenahme:** Blut aus der ungestauten Vene, der Fingerbeere oder dem Ohrläppchen entnehmen und sofort enteiweißen. Antikoagulantien stören in den üblichen Konzentrationen nicht.

Gewebe nach Entnahme mit Frierstopp-Zange (vgl. „Zell- und Gewebeaufschluß“, S. 427) sofort im *Potter-Elvehjem*- bzw. *Ultra-Turrax*-Homogenisator zerkleinern. Trübe Lösungen filtrieren. Lösliches Ausgangsmaterial nach dem Lösen in Wasser auf ein geeignetes Volumen bringen und direkt in den Test einsetzen; nur teilweise lösliches Material mit Wasser 10 min schütteln. Unlösliches abfiltrieren, Filter mit Wasser nachwaschen und Filtrat auf ein geeignetes Volumen bringen. Nicht mehr als 70 µg Glucose (bzw. Summe Glucose + G-6-P) in den Test einsetzen.

Harn mittels Glukotest® auf ungefähren Gehalt an Glucose prüfen. Anschließend gemäß Tabelle mit Wasser verdünnen.

Glucosegehalt nach Glukotest® geschätzt	Verdünnung	Verdünnungsfaktor
< 0,05%	—	1
0,05–0,50%	1 + 9	10
0,50–5,00%	1 + 99	100
> 5,00%	0,1 ml + 99,9 ml	1000

Eiweißgehalt oder Harntrübung können vernachlässigt werden. 0,2 ml zur Bestimmung einsetzen.

**Enteiweißung:** In ein Zentrifugenglas nacheinander 1,00 ml Perchlorsäure (V) und 0,10 ml Blut pipettieren. Gut mischen und 10 min bei 3000 Upm zentrifugieren. 0,20 ml Überstand in den Test einsetzen.

**Stabilität der Probe:** Bei Vermeidung von Bakterien- und Pilzwachstum ist die Probe mindestens 2 Tage bei +4°C haltbar. Die Probelösung kann jedoch mit Benzoesäure für längere Zeit konserviert werden. Der Überstand nach Enteiweißung mit Perchlorsäure ist bei +4°C ebenfalls längere Zeit haltbar. Bei Anwesenheit von glucosehaltigen Polysacchariden tritt jedoch mit der Zeit eine langsame Freisetzung von Glucose ein.

**Bestimmungsansatz**

Meßstrahlung: 340 (Hg 334, Hg 365) nm; Schichtdicke: 1 cm; Testvolumen: 2,94 ml; Raumtemperatur. Messung gegen Luft.

Nacheinander in die Küvette pipettieren:		Konzentration im Test
Puffer-Lösung (I)	2,50 ml	0,25 M Triäthanolamin 2,5 mM MgSO <sub>4</sub> bis ca. 140 µM 10 mM ATP; 0,8 mM NADP
Probe	0,20 ml	
ATP/NADP-Lösung (II)	0,20 ml	
mischen und Extinktion E <sub>1</sub> ablesen.		
G6P-DH-Suspension (III)	0,02 ml	6,8 µg/ml; ≥ 1,0 U/ml
mischen und Stillstand der Extinktion abwarten (ca. 5–10 min), andernfalls noch 5 weitere Ablesungen in 2-min-Abständen durchführen und Extinktion E <sub>2</sub> auf die Zeit der Zugabe von G6P-DH extrapolieren. E <sub>2</sub> – E <sub>1</sub> = ΔE <sub>G-6-P</sub>		6,8 µg/ml; ≥ 1,0 U/ml
HK-Suspension (IV)	0,02 ml	
mischen, Stillstand der Reaktion abwarten (ca. 5 bis 10 min), andernfalls E <sub>3</sub> wie oben auf die Zeit der Zugabe von HK extrapolieren. E <sub>3</sub> – E <sub>2</sub> = ΔE <sub>Glucose</sub>		

Selbst hochgereinigte HK- und G6P-DH-Präparate können Spuren von Phosphoglucose-Isomerase enthalten. Enthält die Probe Fructose oder F-6-P, reagieren diese daher langsam mit. E<sub>2</sub> und E<sub>3</sub> müssen in diesem Fall durch Extrapolation ermittelt werden.

Zur Routine-Analyse von Blut, welches kein G-6-P in nachweisbaren Mengen enthält, Reagentien- und Enzym-Gemisch ansetzen:

Puffer-Lösung (I)	2,5 Vol.
ATP/NADP-Lösung (II)	0,2 Vol.
G6P-DH-Suspension (III)	0,02 Vol.
HK-Suspension (IV)	0,02 Vol.

Zur Analyse in der Küvette mischen:

2,70 ml Reagentien-Gemisch
0,20 ml Probe

E<sub>1</sub> ablesen,

0,04 ml Enzym-Gemisch

einmischen, nach 5–10 min E<sub>2</sub> ablesen.

### Modifikation der Arbeitsweise

Verwendet man hämolysiertes Blut zur Analyse<sup>13,14,16</sup>, können Enteiweißung und Zentrifugation entfallen. Der Arbeitsaufwand verringert sich so beträchtlich.

Dazu versetzt man die Pufferlösung (I) mit 10 mg Digitonin pro 100 ml. Zugewetztes Blut hämolysiert spontan.

10  $\mu$ l Blut mit Mikropipette\* entnehmen, in 2,60 ml Reagentien-Mix (s. oben) geben, 0,1 ml Maleinimid-Lösung\*\* zufügen, mischen,  $E_1$  ablesen, 0,02 ml Enzymgemisch einmischen, nach 4–6 min  $E_2$  ablesen.

### Berechnung

Beide Reaktionen verlaufen unter den angegebenen Bedingungen stöchiometrisch. Es gilt daher die Berechnungsformel (2) von S. 333. Die entsprechende Formel gilt auch für die Berechnung von G-6-P. Man erhält als Ergebnis  $\mu$ Mol Glucose pro ml Probe. Dieser Wert ist jedoch noch mit einem Faktor zu multiplizieren, wenn die Probe enteiweißt, neutralisiert oder sonstwie verdünnt wurde. Bei Einsatz von Vollblut muß ferner dessen spezifisches Gewicht (ca. 1,06) sowie der Flüssigkeitsgehalt (ca. 80%) berücksichtigt werden.

Für diese Vorschrift ergibt sich daher für Vollblut aus diesen Daten sowie aus der Verdünnung  $1 + 10$  bei der Enteiweißung der Faktor 10,85. Somit gelten für die Glucose-Konzentration des Blutes folgende Beziehungen:

Meßstrahlung:	334 nm	340 nm	365 nm	
c =	$\Delta E \cdot 26,1$	$\Delta E \cdot 25,6$	$\Delta E \cdot 46,2$	[ $\mu$ Mol/ml]
c =	$\Delta E \cdot 471,2$	$\Delta E \cdot 462,1$	$\Delta E \cdot 833,1$	[mg/100 ml]

*Modifikation mit 10  $\mu$ l Vollblut:* Spezifisches Gewicht und Flüssigkeitsgehalt können bei dem geringen Probenvolumen unberücksichtigt bleiben. Bei 10  $\mu$ l Probe, 2,73 ml Testvolumen und 1 cm Schichtdicke gelten für die Glucose-Konzentration des Blutes die folgenden Beziehungen:

Meßstrahlung:	334 nm	340 nm	365 nm	
c =	$\Delta E \cdot 44,75$	$\Delta E \cdot 43,89$	$\Delta E \cdot 79,13$	[ $\mu$ Mol/ml]
c =	$\Delta E \cdot 806,4$	$\Delta E \cdot 791$	$\Delta E \cdot 1426$	[mg/100 ml]

### Richtigkeit und Präzision

Bei einem Mittelwert von 105 mg Glucose in 100 ml Blut wurde eine Standardabweichung von 1,26 mg Glucose gefunden. Der Variationskoeffizient VK ist demnach 1,2%.

Der Mittelwert aus einer Zehnfachbestimmung nach der modifizierten Arbeitsweise mit 10  $\mu$ l Humanblut (nüchtern) war 69,7, die Standardabweichung  $s = 3,3$  mg Glucose/100 ml. VK = 4,7%.

### Störungen

*Beeinflussung durch therapeutische Maßnahmen* ist nicht bekannt.

*Störungen in der Meßtechnik:* Ungenügende Reinheit der verwendeten Reagentien, besonders der Enzyme, führt zu falschen Werten. Enthält eines der Enzyme zuviel Gluconat-6-phosphat-Dehydrogenase, so wird zuviel Glucose gefunden. Enthält eines der Enzyme zuviel NADPH-Oxydase, so wird zu wenig Glucose gefunden. Phosphatpuffer darf bei der Vorbereitung des Unter-

\* Z. B. Mikropipette „Marburg“ der Fa. Eppendorf Gerätebau Hamburg; Haemometerpipetten nach *Sahl* der Fa. Brand, Wertheim; Dispo-Kapillarpipette der Fa. Dade, Miami, Florida, USA; BB-Pipette der Fa. Bio-Rad, Gräfelfing b. München und andere.

\*\* 10 mg Maleinimid mit 1 ml Wasser lösen. Täglich frisch ansetzen. — Maleinimid hemmt Gluconat-6-phosphat-Dehydrogenase der Erythrocyten.

suchungsmaterials nicht verwendet werden, da hierdurch die G6P-DH gehemmt wird<sup>8-10</sup>. Enthält die Probe > 600 mg Glucose pro 100 ml, so muß sie verdünnt werden. Trichloressigsäure hemmt HK/G6P-DH; sie darf nicht zur Enteiweißung verwendet werden.

### Spezifität der Methode

HK katalysiert die Phosphat-Übertragung von ATP auf D-Glucose, D-Fructose und D-Mannose. L-Arabinose, D-Xylose, L-Rhamnose, D-Galactose, D-Lactose, Sucrose und Maltose werden nicht phosphoryliert<sup>11</sup>. G6P-DH ist spezifisch für G-6-P; andere Hexose- oder Pentose-Ester werden nicht umgesetzt. Das Enzym reagiert nicht mit NAD als Coenzym<sup>12</sup>.

### Literatur

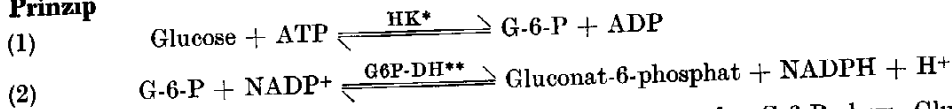
- <sup>1</sup> M. Slein in H. U. Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie, Weinheim 1962, 1. Aufl., S. 117.
- <sup>2</sup> F. H. Schmidt, Klin. Wschr. 39, 1244 [1961].
- <sup>3</sup> J. I. Peterson u. D. S. Young, Anal. Biochemistry 23, 301 [1958].
- <sup>4</sup> F. H. Schmidt, Fortschritte der Diabetesforschung, 1. Symp. d. Dtsch. Diabetes. Kom. 26/27.10. 1962, Düsseldorf.
- <sup>5</sup> J. L. Gamble jr. u. V. A. Najjar, Science (Washington) 120, 1023 [1954]; J. biol. Chem. 217, 595 [1955].
- <sup>6</sup> S. Kaufman, J. biol. Chem. 216, 153 [1955].
- <sup>7</sup> B. L. Horecker u. P. Z. Smyrniotis, Biochim. biophys. Acta 12, 98 [1953].
- <sup>8</sup> L. Glaser u. H. B. Brown, J. biol. Chem. 216, 67 [1955].
- <sup>9</sup> H. Theorell, Biochem. Z. 275, 416 [1935].
- <sup>10</sup> E. Negelein u. E. Haas, Biochem. Z. 282, 206 [1935].
- <sup>11</sup> M. Kunitz u. M. R. McDonald, J. Gen. Physiol. 29, 393 [1946].
- <sup>12</sup> A. Kornberg u. B. L. Horecker in S. P. Colowick u. N. O. Kaplan: Methods in Enzymology, Academic Press, New York, Bd. I, S. 323.
- <sup>13</sup> H. Stork u. F. H. Schmidt, Klin. Wschr. 46, 789 [1968].
- <sup>14</sup> R. Haekkel, Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem., 8, 480 [1970].
- <sup>15</sup> F. da Fonseca-Wollheim, Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 9, 497 [1971].

## Fluorimetrische Bestimmung im Blut mit Analysen-Automaten

Rudolf Lachenicht und Erich Bernt

Glucose kann im Blut fluorimetrisch bestimmt werden<sup>1-4</sup>. Mit der hier beschriebenen Methode nach Hénon<sup>5</sup> (ohne Enteiweißung) können Glucose-Konzentrationen von 50–400 mg Glucose/100 ml bestimmt werden.

### Prinzip



Die aus NADP entstehende NADPH-Menge ist äquivalent der G-6-P- bzw. Glucose-Menge. NADPH ist Meßgröße und auf Grund seiner Fluoreszenz bei einer Sekundär-Strahlung von 485 nm leicht zu bestimmen.

### Notwendige Geräte

Auto-Analyzer®-System<sup>\*\*\*</sup> bestehend aus Probenehmer II, Dosierpumpe, Registriergerät mit einem Papiervorschub von 18'' (ca. 45 cm/h), Technicon Fluoronephlometer

\* Hexokinase, HK (ATP:D-hexose-6-phosphotransferase, EC 2.7.1.1).

\*\* Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, G6P-DH (D-Glucose-6-phosphate:NADP 1-oxidoreductase, EC 1.1.1.49).

\*\*\* Technicon Corporation, Tarrytown, N. Y., USA.