

Eine neue Bestimmung der Neutralfette im Blutserum und Gewebe

I. Mitteilung

Prinzip, Durchführung und Besprechung der Methode

M. EGGSTEIN und F. H. KREUTZ

Medizinische Universitätsklinik Tübingen (Direktor: Prof. Dr. H. E. BOCK) und Medizinische Universitätsklinik Marburg (Direktor: Prof. Dr. G. A. MARTINI)

Diagnostischen Zwecken genügen Neutralfettwerte die als Differenz aus Fettsäureesterwert und Lipoid- (cholesterin- und phosphatid-) gebundenen Fettsäuren errechnet werden (EGGSTEIN, 1956, 1960, 1965). Plant man aber kurzfristige Verlaufskontrollen und sollen auch geringfügige Neutralfettänderungen im Blut zuverlässig registriert werden, dann versagen die bisherigen Verfahren. Wir schlagen deshalb für die *gezielte* und *präzise* Ermittlung der Neutralfette im Blut und Gewebe (auch in Ölen, Nahrungsmitteln usw.) eine Berechnung aus dem „Glycerid-Glycerin“ vor. Entsprechende Methoden, die enzymatische Bestimmung des „Gesamtglycerins“ neben dem „freien Glycerin“ haben wir ausgearbeitet. Diese Verfahren bewährten sich über 4 Jahre und werden durch unsere Vermittlung auch in anderen Laboratorien geübt (KREUTZ, 1964; EGGSTEIN und KREUTZ, 1965; WOLF u. Mitarb. i. Dr.; JAHNKE u. Mitarb. 1964).

I. Das Reaktionsprinzip der Glycerinbestimmung

Glycerin wird im Serum und/oder Gewebe vor (freies Glycerin) und *nach* alkalischer Verseifung (Gesamtglycerin) enzymatisch bestimmt. Reaktion und Hilfsreaktionen des enzymatischen Tests (KREUTZ, 1962) sind im folgenden Schema zusammengestellt.

- (1) $\text{Glycerin} + \text{ATP} \xrightarrow{A} \text{L}(-) \text{Glycerin-1-phosphat} + \text{ADP}$
 (2) $\text{ADP} + \text{Phosphoenolpyruvat} \xrightarrow{B} \text{ATP} + \text{Pyruvat}$
 (3) $\text{Pyruvat} + \text{NADH}_2 \xrightarrow{C} \text{Lactat} + \text{NAD}$
 (4) $\text{Glycerin} + \text{Phosphoenolpyruvat} + \text{NADH}_2 \rightleftharpoons \text{L}(-) \text{Glycerin-1-phosphat} + \text{Lactat} + \text{NAD}$
 $A = \text{Glycerokinase (GK)}, B = \text{Pyruvat-Kinase (PK)}, C = \text{Lactat-Dehydrogenase (LDH)}$
 ad (1) Glycerokinase (A) katalysiert die Phosphatübertragung von ATP auf Glycerin.
 ad (2) Unter Pyruvatkinase (B) erfolgt zur Enol-Ketonumlagerung und Hydrolyse des Enol-Phosphates eine zweite Transphosphorylierung, ADP wird wieder zu ATP, Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat. Hier setzt die Indikator-Reaktion an.
 ad (3) und (4) Mit der LDH-katalysierten (C) Pyruvat-Reduktion werden — siehe Summenformel (4) — der Glycerophosphatbildung äquivalente Mengen NADH_2 oxydiert und über die Abnahme der Lichtabsorption bei $\lambda 340 \text{ nm}$, 334 nm oder 366 nm direkt meßbar.

II. Die Bestimmungsmethode für Gesamt- und freies Glycerin

II. 1. Vorbemerkungen. Die für enzymatische Substratanalysen erforderliche Arbeitstechnik, Sauberkeit und präzises Arbeiten werden vorausgesetzt (BERGMAYER). Wir verwenden Mikroreaktionsgefäße und Mikropipetten (Typ Marburg) der Firma Gerätebau Eppendorf GmbH Hamburg, Mikrozentrifugen von der gleichen Firma oder Firma Hettich, Tuttlingen, das Photometer Eppendorf mit Multiplier, Filter Hg 334 und Hg 366 bzw. Spektralphotometer PMQ II der Firma Zeiss, ferner Mikroküvetten Typ MK 4, Firma Hellma, Müllheim.

II. 2. Reagentien. (Eine Testpackung der Firma Boehringer Mannheim, ist in Vorbereitung.)

1. Triäthanolamin-HCl (Boehringer TRA 15325)
2. $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ p. a. (Merck 5833)
3. Tricyclohexylammoniumphosphoenolpyruvat (Boehringer PEP-C 15308)
4. Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid reduziert (Boehringer DPNH 15142)

5. Adenosin-Triphosphat (Boehringer ATP 15028)
6. Pyruvatkinase (Boehringer PK 15744)
7. Lactat-Dehydrogenase (Boehringer LDH 15145)
8. Glycerokinase (Boehringer GK 15746)
9. Perchlorsäure ca. 70%ig (Merck 519)
10. KOH 25%ig (Merck 5024)
11. Äthanol absolut p. a. (Merck 972)
12. Lyphanpapier pH 6,6 bis 8,1 (Dr. G. KLOZ, Berlin) oder Universal-Indicator pH 1—10 (Merck 9526)
13. NaHCO_3 p. a. (Merck 6391)

II. 3. Lösungen:

- (I.) Triäthanolamin-Puffer 0,1 m, pH 7,6 (TRA-Puffer):
 Triäthanolamin-HCl 18,57 g (TRA 15325)
 Aqua bidest, etwa 800, 0 ml
 pH auf 7,6 mit 1 n NaOH einstellen
 Aqua bidest. ad. 1000,0 ml
- (II.) Magnesiumchlorid 0,5 m (Mg^{++}):
 $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ (p. a.) 17,17 g (Merck 5833)
 Aqua bidest. ad 100,0 ml
- (III.) Phosphoenolpyruvat 5×10^{-2} m (PEP):
 Tricyclohexylammoniumphosphoenolpyruvat 23,0 mg (PEP-C 15308)
 Aqua bidest. 1,0 ml
- (IV.) Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid red. 0,02 m (NADH_2):
 NADH_2 14,0 mg (DPNH 15142)
 1%ige wäßrige NaHCO_3 1,0 ml (Merck 6391)
- (V.) Adenosintriphosphat 10^{-1} m (ATP):
 ATP-Na crist. 60,0 mg (ATP 15028)
 Aqua bidest. 1,0 ml
- (VI.) Pyruvatkinase (Boehringer PK 15744):
 (2 mg/ml, spez. Akt. ca. 125 E/mg)
- (VII.) Lactatdehydrogenase (Boehringer LDH 15145):
 (5 mg/ml, spez. Akt. ca. 360 E/mg)
- (VIII.) Glycerokinase (Boehringer GK 15746):
 (1 mg/ml, spez. Akt. ca. 85 E/mg)
- (IX.) KOH in Äthanol 0,5 n:
 KOH (25%ig) 11,2 ml (Merck 5024)
 Äthanol ca. 95% ad 100,0 ml (Merck 969)
- (X.) Perchlorsäure 2,5 n:
 Perchlorsäure ca. 70% 21,0 ml (Merck 519)
 Aqua bidest. ad 100,0 ml

Die äthanolische KOH (IX) und Perchlorsäure (X) werden bei Zimmertemperatur, die Encymsuspensionen (VI, VII, VIII) bei $+4^\circ$, die Coenzyme (IV und V) und übrigen Lösungen eingefroren aufbewahrt.

II. 4. Zubereitung des „Reaktionsgemisches“. Das Reaktionsgemisch wird für jede Bestimmung bzw. Bestimmungsreihe „frisch“ angesetzt. Die nachfolgende Tabelle enthält Angaben über die Reagensmengen pro Test und die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches.

Tabelle I

		Einzumessen sind		
		für Einzelanalysen	für 10fache Analysen	das sind
TRA-Puffer	(I)	0,418 ml	4,18 ml	(0,5 bzw. 5 ml Endvol.)
MgCl_2	(II)	0,01 ml	0,1 ml	(5 bzw. 50 μMol)
PEP	(III)	0,02 ml	0,2 ml	(1 bzw. 10 μMol)
NADH_2 (DPNH)	(IV)	0,02 ml	0,2 ml	(0,4 bzw. 4 μMol)
ATP	(V)	0,02 ml	0,2 ml	(2 bzw. 20 μMol)
PK	(VI)	0,01 ml	0,1 ml	(20 bzw. 200 μg)
LDH	(VII)	0,002 ml	0,02 ml	(10 bzw. 100 μg)

II. 5. Bestimmung von „Gesamtglycerin“.

a) Glyceridhydrolyse:

In ein verschließbares Mikrogefäß gibt man
 äthanolische KOH (X) 1,0 ml
 dazu unter Umschwenken tropfenweise
 Serum bzw. Gewebehomogenat 0,2 ml
 Ansatz im Wasserbad (Alublock) verschlossen bei 70° C für
 15—20 min inkubieren. Dann neutralisieren auf pH 7 mit
 Perchlorsäure (IX) 0,2—0,22 ml
 pH-Kontrolle mit Lyphan- o. Universalindicatorpapier. Eiweiß-
 Perchloratniederschlag scharf abzentrifugieren (1 min 10000
 bis 16000 U/min in Mikrozentrifuge Eppendorf).

Im neutralen Überstand wird nach II. 5. b das Gesamt-
 glycerin bestimmt.

b) Optischer Test:

Direkt in die Mikroküvette (MK 4, $d=1$ cm) gibt man
 Reaktionsgemisch (II 4) 0,5 ml
 je nach vorgesehener Hydro-
 lysatmenge TRA-Puffer (I) 0,45—0,40 ml (bzw. 0,3 ml)
 neutralisiertes Hydrolysat 0,05—0,10 ml (bzw.
 tropfenweise zu. 0,20 ml)

Das Testvolumen beträgt zunächst 1,0 ml.

Im Photometer wird die unspezifische Extinktionsänderung
 über 1—2 min registriert. Dann wird das eigentliche Reak-
 tionsgeschehen mit

Glycerokinase (VIII) 0,005 ml
 gestartet. Das Reaktionsende nach 5—8 min erkennt man aus
 dem Verlauf der Extinktionskurve.

II. 6. Bestimmung von „freiem Glycerin“.

Serum wird direkt in den optischen Test eingesetzt. Man mischt
 in MK 4 Küvetten ($d=1$ cm)

Reaktionsgemisch (II 4) 0,5 ml
 TRA-Puffer (I) 0,3 ml
 Serum/Gewebehomogenat 0,2 ml

Wie für Gesamtglycerin wird die Extinktionsänderung
 über 5—10 min kontrolliert, dann

Glycerokinase (VIII) 0,005 ml zugegeben und
 die Extinktionsabnahme über 5—10 min verfolgt.

II. 7. Auswertung. Die durch Glycerokinase erreichte Ex-
 tinktionsabnahme ΔE kann bei fortlaufender Registrierung
 (vgl. Abb. 2) gegenüber dem „Leerschleib“ zuverlässig abge-
 grenzt und abgelesen werden. (Papiervorschub 1 cm/5 min,
 Extinktionsbereich $0,1 \triangleq 2-4$ cm.) Steht kein registrierendes
 Gerät zur Verfügung, dann mißt man über 5—10 min die
 unspezifische Extinktionsänderung $\Delta E_1 = (E_1 - E_2)$, gibt GK
 zu und liest nach weiteren 5 bzw. 10 min E_3 ab. ΔE_{kor} er-
 rechnet sich nach $(E_2 - E_3) + \Delta E^0$.

II. 8. Berechnung der Gesamtglycerinwerte.

ΔE_{kor} wird mit dem reziproken Wert des NADH₂-Ko-
 effizienten ($M^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) multipliziert, Serumverdünnung und
 Endvolumen des Meßansatzes sind zu berücksichtigen.

Serumverdünnung: 1,40 ml (1,42 ml) neutralisiertes Hy-
 drolysat entsprechen 0,2 ml Blut/Gewebehomogenat, 0,1 ml
 Hydrolysat enthalten dann 0,01428 ml (0,01408 ml) Serum.
 Die Umrechnung auf 1 Liter Serum erfolgt mit Faktor 70×10^3
 bzw. bei 1,42 ml Hydrolysatvolumen mit Faktor (71×10^3) .

Meßansatz: Bei einem Endvolumen von 1,005 ml gilt
 Faktor 1,005.

NADH₂-Extinktionskoeffizient

bei 334 nm: $6,0 \times 10^3 M^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ daraus Faktor $0,167 \times 10^{-3}$;
 bei 340 nm: $6,20 \times 10^3 M^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ daraus Faktor $0,161 \times 10^{-3}$;
 bei 366 nm: $3,30 \times 10^3 M^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ daraus Faktor $0,303 \times 10^{-3}$.

Faßt man diese Daten zusammen, dann gelten für die
 Neutralfettberechnung bei einem Meßvolumen von 1,005 ml
 mit 0,1 ml eingesetztem Hydrolysat folgende Formeln:

$$E_{d=1\text{cm}}^{334\text{nm}} \times 11,7 = \text{mMol Gesamtglycerin/Liter}$$

$$E_{d=1\text{cm}}^{340\text{nm}} \times 11,3 = \text{mMol Gesamtglycerin/Liter}$$

$$E_{d=1\text{cm}}^{366\text{nm}} \times 21,3 = \text{mMol Gesamtglycerin/Liter}$$

II. 9. Berechnung des freien Glycerins.

Der Meßansatz von 1,005 ml Volumen enthält 0,2 ml Serum.
 Die Umrechnung auf 1 Liter erfolgt mit Faktor 4975. Die aus
 dem NADH₂-Extinktionskoeffizienten abgeleiteten Faktoren
 siehe oben.

Je nach Meßbereich ergeben sich für freies Glycerin fol-
 gende Berechnungsschemen:

$$E_{d=1\text{cm}}^{334\text{nm}} \times 0,929 = \text{mMol freies Glycerin/Liter}$$

$$E_{d=1\text{cm}}^{340\text{nm}} \times 0,901 = \text{mMol freies Glycerin/Liter}$$

$$E_{d=1\text{cm}}^{366\text{nm}} \times 1,518 = \text{mMol freies Glycerin/Liter}$$

II. 10. Berechnung der Neutralfette über „Glyceridglycerin“.

Die Differenz (in mMol/l)

(a) „Gesamtglycerin — freies Glycerin = Glyceridglycerin“
 setzen wir gleich mMol Neutralfett/l Serum bzw. Gewebe-
 homogenat.

Für Neutralfett-Fettsäuren (TGFS) bzw. mÄq. Neutral-
 fett gilt dann

(b) $„3 \times [\text{Gesamtglycerin} - \text{freies Glycerin (in mMol/l)}] =$
 $\text{mÄq. TGFS/l}“$.

Bei einem mittleren Molekulargewicht von 885 für die Serum-
 neutralfette (EGGSTEIN, 1965) gilt für die Umrechnung in
 mg/100 ml Serum

(c) $[\text{Gesamtglycerin (mMol/l)} - \text{freies Glycerin (mMol/l)}]$
 $\times 88,5 = \text{mg Neutralfett/100 ml}$.

Eine Begründung der hier vorgeschlagenen Berechnung folgt
 in 2. Teil der Arbeit.

III. Diskussion der Methode

III. 1. Mikromaßstab. Substanzmengen, Arbeits-
 technik und Gerätebedarf deklarieren das beschriebene
 Verfahren als Mikromethode. Selbstverständlich können
 andere Dimensionen gewählt werden, wenn die
 Relation Substrat zu Reaktionsgemisch beibehalten
 wird. Der Bedarf an aufwendigen Reagentien spricht
 gegen größere Ansätze. Umgekehrt haben sich Ultra-
 mikroanalysen für den „Routinebetrieb“ bei uns nicht
 bewährt. Die eingesparten Substanz-(Serum-) und
 Reagentienmengen stehen in keinem Verhältnis zur
 dann erforderlichen diffizilen Arbeitstechnik.

III. 2. Prinzip. Die dreistufige enzymatische Nach-
 weisreaktion für Glycerin, die auch GARLAND u.
 RANDLE (1962) in der Zwischenzeit empfehlen, kommt
 den an eine Endwertmethode gestellten Forderungen
 am nächsten. Die Phosphorylierung von Glycerin mit
 Adenosin-Triphosphat und Glycerokinase zu L(-)-
 Glycerin-1-Phosphat und Adenosin-Diphosphat ist
 ein exergonischer, zu Ende verlaufender Vorgang
 (BUBLITZ, KENNEDY, 1954).

Auch für die Hilfs- und Indikatorreaktion ist der
 quantitative Umsatz gewährleistet (HOHORST u.
 Mitarb., 1959, Mc QUATE und UTTER, 1959). Für die
 LDH-katalysierte Reaktion liegt das Gleichgewicht
 mit $K=1 \times 10^4$ l/M (pH 7,6) weit auf der Lactatseite,
 für die PK-Reaktion ($K=2 \times 10^3$, 30°) auf der ATP-
 und Pyruvatseite (ADAM, 1959).

Die zugesetzte GK erlaubt im Testansatz eine
 Reaktionsgeschwindigkeit um 0,4—0,45 $\mu\text{Mol/min}$
 (pH opt. 9,8). Das bedeutet, daß theoretisch bei übli-
 chem Testansatz das 20fache einer normalen Serum-
 Gesamtglycerinmenge/min umgesetzt werden kann.

Für die Hilfsreaktion steht eine theoretische Reak-
 tionsgeschwindigkeit von 2,5 $\mu\text{Mol/min}$ und für die
 Indikatorreaktion von 3,6 $\mu\text{Mol/min}$ zur Verfügung.

Die vorgelegten Substrate und Cofermente reichen
 für Glycerinmengen aus, die für PEP dreifach, für
 NADH₂ um ein Drittel höher liegen als das aus opti-
 schen, d. h. registrier- bzw. ablesetechnischen Gründen
 gesetzte obere Limit von 0,3 μMol Glycerin pro Test-
 ansatz. Deshalb machen erst extrem hohe Pyruvat-
 konzentrationen, ein Anstieg auf die 100fache Norm-
 menge für Blut, zusätzliches NADH₂, und extrem
 hohe ADP-Werte (als ATP-Verunreinigung) mehr
 PEP als im Reaktionsansatz vorgesehen, erforderlich.

III. 3. Andere enzymatische Glycerinbestimmun-
 gen stammen von WIELAND (1957) und von HAGEN
 u. HAGEN (1962). An die Glycerokinasereaktion
 schließt WIELAND (1957) die NAD-abhängige Dehy-
 drierung mit α -Glycerophosphat-Dehydrogenase als
 Indikatorreaktion an. Das Gleichgewicht dieser Reak-
 tion liegt ungünstig, trotz alkalischem Milieu (pH 9,8)

und Hydrazin als trapping-Reagens braucht eine Messung 30—60 min. Bei der von HAGEN u. HAGEN (1962) empfohlenen Methode wird Glycerin mit Glycerin-Dehydrogenase *direkt* zu Dioxyaceton oxydiert und das entstehende NADH₂ gemessen. Gegen diesen einstufigen Enzymtest sprechen lange Reaktionsdauer, da genügend aktive Enzympräparate bislang nicht zur Verfügung stehen. Auch soll das gebildete NADH₂ der Glycerinmenge im Test nicht parallel gehen.

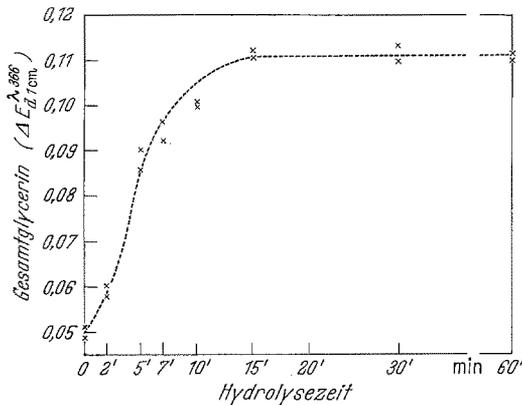


Abb. 1. Gesamtglycerinwerte bei unterschiedlichen Hydrolysezeiten (70°, 0,5 n äthanol. KOH). Vollständige Hydrolyse mit konstanten Gesamtglycerinwerten ab 15' = 2,36 mM/l (freies Glycerin = 0,13 mM/l)

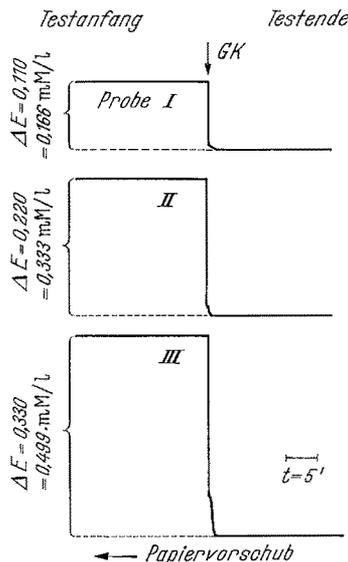


Abb. 2. Fortlaufend registrierte Glycerinmessung im optischen Test bei Einsatz wäßriger Glycerintestlösungen. Der Extinktionsabfall ist direkt von der vorgelegten Glycerinmenge abhängig. (Endvolumen 1,005 ml, 366 nm, d = 1 cm)

Die beiden zuletzt genannten Verfahren bieten also keine Vorteile, von der unter (II) angegebenen Glycerinmessung.

III. 4. Spezifität. Reine Glycerokinase und ATP reagieren außer mit Glycerin auch mit Dioxyaceton und mit L(-) Glyceraldehyd zu Dioxyacetonphosphat bzw. Glyceraldehydphosphat und ADP. Da Hilfs- und Indikatorreaktion der Glycerinbestimmung am ADP ansetzen, werden Dioxyaceton und L(-) Glyceraldehyd mit erfaßt. Beide Substanzen kommen aber im Blut nicht vor. Für die PK-katalysierte Teilreaktion sind außer PEP keine Substrate bekannt, deren Reaktionsprodukte durch LDH umgesetzt werden (CZOK u. ECKERT, 1962).

Der Glycerinnachweis ist also in hohem Maße spezifisch. Serum, Plasma, Gewebehomogenate und an-

deres biologisches Material (vgl. DRAWERT u. KUPFER, 1963) können deshalb *direkt*, ohne Präparation in den Test eingesetzt werden.

III. 5. Triglyceridhydrolyse, Gesamtglycerinbestimmung. Die spezifische Reaktion auf Glycerin macht keine Fettextraktion, keine Abtrennung der Phosphatide und anderer Substanzen für den Triglyceridnachweis erforderlich. Die Triglyceride müssen lediglich quantitativ und so hydrolysiert werden, daß unverändertes Glycerin als Hydrolyseprodukt anfällt. Das läßt sich mit einem fünffachen Überschuß an 0,5 n äthanolischer KOH bei 70° über 15—20 min erreichen (s. Abb. 1, Tabelle 2).

Versuchsordnung zur Triglyceridhydrolyse: In acht Ansätzen (A—H) wurden zu jeweils 1,0 ml 0,5 n äthanolischer KOH von der gleichen Serumprobe 0,2 ml zugesetzt. Ansatz A wurde nicht, die nächsten Ansätze (B—H) zwischen 2—60 min bei 70° C verschlossen inkubiert und danach in Doppelanalysen das Gesamtglycerin nach (II, 5) bestimmt.

Tabelle 2
Gesamtglycerinwerte bei unterschiedlichen Hydrolysezeiten

Zeit min	$\Delta E_{d=1\text{ cm}}^{366\text{ nm}}$	mM/l	Zeit min	$\Delta E_{d=1\text{ cm}}^{366\text{ nm}}$	mM/l
0	0,051	1,08	10	0,100	2,12
0	0,049	1,04	10	0,100	2,12
2	0,060	1,27	15	0,111	2,36
2	0,058	1,23	15	0,112	2,38
5	0,086	1,82	30	0,113	2,40
5	0,090	1,91	30	0,110	2,33
7	0,092	1,95	60	0,110	2,33
7	0,096	2,02	60	0,111	2,36

Resultat: Abb. 1, Tabelle 2. Nach 15 und 30 min Inkubation wird der höchste Gesamtglycerinwert als Zeichen für vollständige Hydrolyse gemessen. Kürzere Hydrolysezeiten als 15 min sind nicht vertretbar, auch längere Inkubation führt eher zur Abnahme der Glycerinwerte.

Kritisch sind Alkalität, Hydrolysezeiten und Temperatur, aber auch das Lösungsmittel. In methanolischer Lauge entstehen Reaktionsprodukte, welche enzymatisch nicht mehr nachweisbar sind. In wäßrigem Milieu ist die Verseifung nicht quantitativ. Es resultieren zu niedere Gesamt-, damit zu niedere Glyceridglycerinwerte. Neben Triglyceriden verseifen unter den gewählten Bedingungen auch Cholesterinester und Glycerophosphatide (ALBRINK, 1959; ABELL, 1952). Aus diesen entsteht kein Glycerin, sondern alkalisches α -Glycerophosphat, welches teilweise in β -Glycerophosphat umgelagert wird. Beide Verbindungen reagieren bei der enzymatischen Glycerinbestimmung *nicht* mit. Glycerophosphatide stören also die Triglycerin- bzw. Glyceridglycerin-Berechnung nicht.

III. 6. Optischer Test. Die folgende Abb. 2 zeigt die in unterschiedlich konzentrierten wäßrigen Glycerinlösungen meßbare Extinktionsabnahme bei 366 nm nach GK-Zugabe. Vor der Enzymzugabe bleibt die Extinktion über 10 min und länger konstant, sofort nach GK wird ein scharfer Extinktionssturz über knapp 2 min registriert, danach wieder konstante Lichtabsorption, reduziert um die vom NADH₂-Verbrauch bzw. vom Glycerinumsatz bestimmte Absorptionsabnahme (Abb. 2). Meßtechnisch bestimmen bei fehlendem Leerschleib die Ablesegenauigkeit und Konstanz des Photometers, die Wellenlänge, Schichtdicke und die Lichtabsorption der GK (Leerwert durch Enzymzusatz) die Empfindlichkeit des Testes.

Photometer der höheren Leistungsklasse garantieren eine Reproduzierbarkeit, besser als 1%. Die Reproduzierbarkeit einer photometrischen Messung — das ist die Standardabweichung (σ_T) des Transmissionsgrades — ist annähernd unabhängig von der Transmission. Wegen des Zusammenhanges $E = \log 1/T$ ist der Meßfehler aber von der Größe der Extinktion abhängig. Im Bereich von E zwischen 0,2—0,8 beträgt der relative Fehler der Extinktion etwa $3 \times \sigma_T$.

„Gute Routinephotometer“ sollten eine Reproduzierbarkeit um 0,2% haben. Damit berechnet sich der relative Extinktionsfehler, das ist der Photometer-abhängige Fehler der Konzentrationsbestimmung bei E 0,2—0,8 auf ungefähr 0,6%.

Zu diesem rein meßtechnischen Fehler kommen noch systematische Fehler, wenn die Berechnung mit dem Extinktionskoeffizienten der $NADH_2$ erfolgt.

Störlicht, Fehler der Anzeigeskala und Registrierung und die Wellenlängenwahl spielen eine Rolle (HÖFERT, 1964). Ihr Umfang läßt sich durch Eichwerte erfassen und eliminieren.

Die Reproduzierbarkeit einer Extinktion im Bereich von $E = 0,2$ beträgt nach diesen Überlegungen $E = 0,0012$ das entspricht $0,0002 \mu\text{Mol}$ (bei 344 nm) bzw. $0,00036 \mu\text{Mol}$ Glycerin/Standardansatz (bei 366 nm). In praxi können aber bestenfalls Extinktionen ab 0,005 — etwa das Vierfache des relativen Extinktionsfehlers — abgelesen werden. Damit lassen sich (bei 334 nm) $0,0008 \mu\text{Mol}$ bzw. (bei 366 nm) $0,0015 \mu\text{Mol}$ Glycerin/Standardansatz registrieren. Das entspricht (334 nm) $0,058 \text{ mMol}$ bzw. (366 nm) $0,106 \text{ mMol}$ Gesamt-Glycerin/l (Normalwert zwischen 0,26 bis $2,88 \text{ mMol/l}$) oder $0,0046 \text{ mMol}$ bzw. $0,008 \text{ mMol}$ freies Glycerin/l (normal $0,05$ — $0,18 \text{ mMol/l}$). Diese unteren Grenzwerte charakterisieren nach der Definition die Empfindlichkeit der Gesamt- und freien Glycerinbestimmung, damit der Glycerid-Glycerin-Berechnung.

Die obere Grenze für die Glycerinbestimmung liegt aus meßtechnischen Gründen bei $0,15 \mu\text{Mol}$ Glycerin je Ansatz, wenn bei 334 nm bzw. bei $0,3 \mu\text{Mol}$ Glycerin je Ansatz, wenn bei 366 nm abgelesen wird. Erst das 200fache der die Empfindlichkeit charakterisierenden Menge oder knapp das 8fache (bei 334 nm) bzw. das 15fache des Normalwertes für Gesamt- und freies Glycerin (bei 366 nm) schöpft den Extinktionsbereich von 1,0 aus. Ab dann wird eine Verdünnung des Untersuchungsgutes auch erforderlich um sicher unter der kritischen Coferment- und Substratvorgabe zu bleiben. Bis zu diesen Werten — $0,3 \mu\text{Mol}$ pro Ansatz, das sind 21 mMol Gesamtglycerin/l, oder $1,4 \text{ mMol}$ freies Glycerin/l — verläuft die Eichkurve linear.

Versuchsordnung. Von zweifach destilliertem Glycerin p.a. (Merck 4091) in Wasser wurden ansteigende Mengen $9,2$ — $184,0 \mu\text{g/Ansatz}$, entsprechend $\sim 0,05$ — $1,0 \text{ mMol/l}$ nach II. 6. gemessen.

Resultat (Abb. 3, Tabelle 3). Die mittlere Abweichung der Eichkurve vom Soll beträgt $-1,36 \pm 5,78\%$. Die geschätzte Streuung der Doppelwerte ist — absolut — in niederen Bereichen etwa gleich wie bei mittleren und hohen Konzentrationen. Prozentual streuen Doppelwerte bei geringen Konzentrationen natürlich stärker.

Bei sehr geringen Glycerinkonzentrationen sind, abweichend vom Standardtest, mehr Serum oder Hydrolysat einzusetzen um einen Extinktionsbereich mit geringen relativen Fehlern zu erreichen. Bis zu $0,4 \text{ ml}$ Serum und bis zu $0,2 \text{ ml}$ neutralisiertes Hydrolysat in Äthanol werden vom Standard-Reaktionsansatz statt Puffer toleriert.

Versuchsordnung. a) Freies Glycerin: $0,05$ — $0,5 \text{ ml}$ Serum wurden mit TRA-Puffer auf jeweils $0,5 \text{ ml}$ Endvolumen aufgefüllt, $0,5 \text{ ml}$ Reaktionsgemisch zugegeben und nach II. 6. freies Glycerin bestimmt.

b) Gesamtglycerin: $0,2 \text{ ml}$ Serum wurden in üblicher Weise in $1,0 \text{ ml}$ äthanolischer KOH ($0,5 \text{ n}$) verseift, mit $0,2 \text{ ml}$

Perchlorat ($2,5 \text{ n}$) neutralisiert und $0,05, 0,1, 0,2, 0,3$ und $0,4 \text{ ml}$ Hydrolysat mit TRA-Puffer auf $0,5 \text{ ml}$ aufgefüllt, $0,5 \text{ ml}$ Reaktionsgemisch zugegeben und nach II. 5 b bestimmt.

Resultat (Abb. 4): a) Entsprechend den ansteigenden Serumengen steigen die Extinktionsdifferenzen, damit das freie Glycerin linear an. Nur im Ansatz mit $0,5 \text{ ml}$ Serum ohne TRA-Puffer ist der Reaktionsablauf gestört.

b) Nach Hydrolysatmengen von $0,05, 0,1$ und $0,2 \text{ ml}$ nehmen die Extinktionsdifferenzen den Gesamtglycerinmengen entsprechend linear zu. Mehr als $0,25 \text{ ml}$ Hydrolysat stören

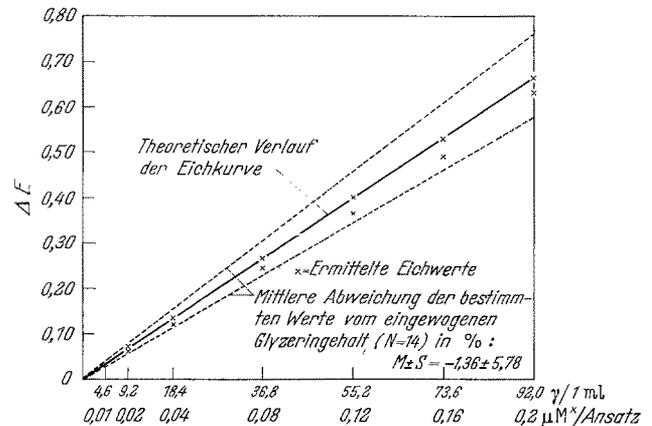


Abb. 3. Eichkurve für enzymatische Glycerinbestimmung. Konzentrationsbereich: $0,05$ — $1,0 \text{ mMol/l}$. Einwaage: Glycerin p. a. (Merck 4091) $\text{Mg } 92,1$ in Wasser gelöst (Die Werte $\mu\text{Mol/Ansatz}$ sind mit Faktor $0,9989$ zu transformieren)

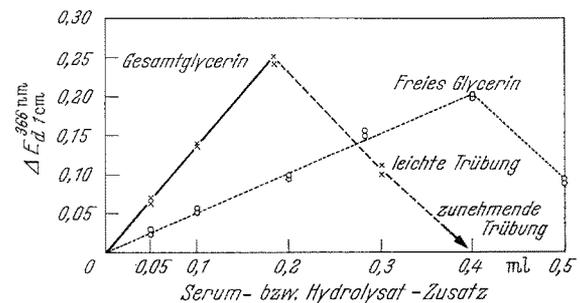


Abb. 4. Bestimmungen von freiem und Gesamtglycerin bei ansteigendem Serum- bzw. Hydrolysatansatz. $\uparrow a$ = Toleranzgrenze für Serum und $\uparrow b$ für neutralisiertes Hydrolysat im Standardansatz zum Nachweis von freiem bzw. Gesamtglycerin

Tabelle 3. Enzymatische Bestimmung ansteigender Glycerinmengen (Einsatz $0,2 \text{ ml}$, Endvolumen $1,005 \text{ ml}$, opt. Test bei 366 nm , $d = 1 \text{ cm}$, Photometer Eppendorf)

Einwaage		Resultat		Auswertung		
γ/ml	$\mu\text{M}^*/\text{Ansatz} \times 0,9989$	ΔE 366 nm $d = 1 \text{ cm}$	Istwert	Sollwert	Differenz Istwert/Sollwert	Differenz der Doppelwerte
			$\mu\text{Mol/l}$	$\mu\text{M/l}$	%	%
4,6	0,01	0,036	54,5	49,95	+ 9,0	11,0
4,6	0,01	0,032	48,5	49,95	- 3,0	
9,2	0,02	0,070	106,0	99,89	+ 6,0	3,6
9,2	0,02	0,073	110,0	99,89	+ 10,0	
18,4	0,04	0,135	204,0	199,78	+ 2,0	3,4
18,4	0,04	0,130	197,0	199,78	- 1,5	
36,8	0,08	0,225	386,0	399,56	- 4,0	0
36,8	0,08	0,225	386,0	399,56	- 4,0	
55,2	0,12	0,376	569,0	599,35	- 5,0	0,9
55,2	0,12	0,379	574,0	599,35	- 4,2	
73,6	0,16	0,490	742,0	799,13	- 7,2	0,4
73,6	0,16	0,492	745,0	799,13	- 6,8	
92,0	0,20	0,630	955,0	999,10	- 4,4	1,7
92,0	0,20	0,620	939,0	999,10	- 6,0	

$M \pm \sigma (\%) = -1,36 \pm 5,78.$

die enzymatische Reaktion durch Enzymdenaturierung. Der Reaktionsansatz wird trüb.

Die oben für den Standardansatz angegebene untere Empfindlichkeitsgrenze kann also durch größeren Substanz- bzw. mehr Hydrolysateinsatz weiter unterschritten, die untere Nachweisgrenze damit ohne Genauigkeitseinbuße gesteigert werden. Ein beson-

b) *Verschiedene Seren mit unterschiedlichem freiem Glyceringehalt* wurden im Standardansatz nach II. 6. gemessen und die Extinctionsänderungen vor GK, während und nach abgelaufener Glycerokinasereaktion gegen die Zeit registriert.

Resultat (Abb. 5a, b). a) Der Leerwert ist unbedeutend. Die Extinktion fällt nach GK proportional zur eingesetzten Hydrolysatsmenge (und Gesamtglycerinmenge) ab. Vor- und Nachschleich fehlen, da mitreagierende Substrate — z. B. Glucose — bei der Hydrolyseprozedur umgesetzt werden.

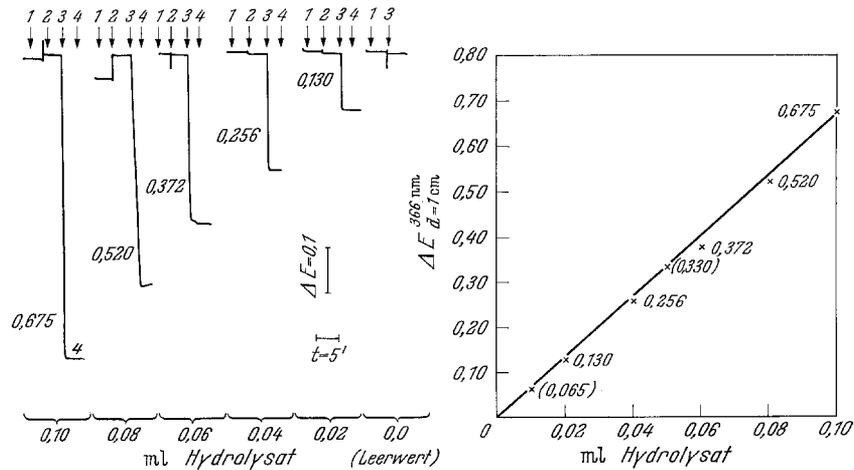


Abb. 5a. Fortlaufend registrierte Gesamtglycerinmessung im optischen Test bei Einsatz unterschiedlicher Serumhydrolysatsmengen. (Eppendorf 366 nm, $d=1$ cm, $E 0,1 \cong 2$ cm, $5' \cong 1$ cm). 1 Reaktionsgemisch, 2 Hydrolysatzugabe, 3 GK-Zugabe, 4 Extinktion nach abgelaufenem Test

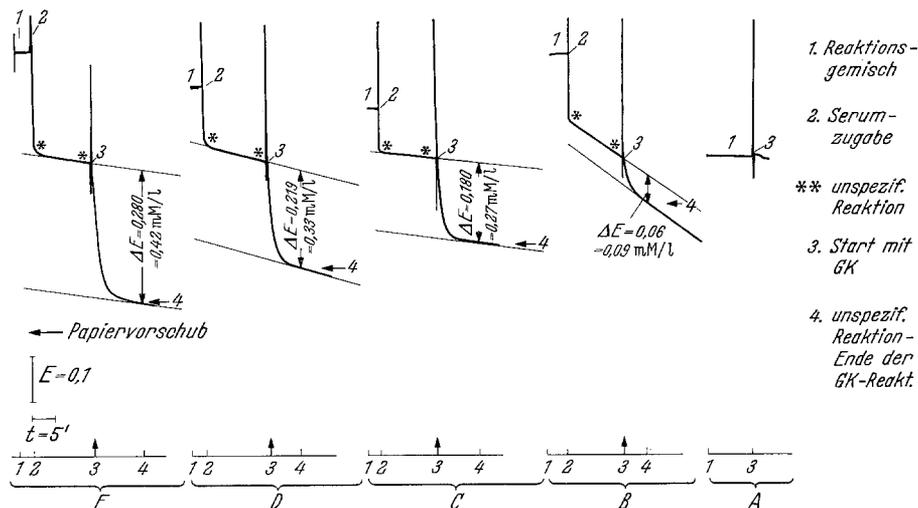


Abb. 5b. Fortlaufend registrierte „freie“ Glycerinmessung im optischen Test bei Einsatz verschiedener Seren. (Eppendorf 366 nm, $d=1$ cm, $E 0,1 \cong 2$ cm, Vorschub 1 cm $\cong 5'$)

derer Glücksfall ist die, wenn auch begrenzte Stabilität des Reaktionsgemisches gegenüber Äthanol mit dem das durch Alkalihydrolyse freigesetzte Gesamtglycerin in den Test direkt eingebracht wird.

III. 8. Auswertung. Wäßrige Glycerineichlösungen und in Äthanol gelöstes „Gesamtglycerin“, also neutralisiertes Serumhydrolysat zeigen keinen, oder nur einen geringen „Leerschleib“. Dieser wird bei der Bestimmung des „freien Glycerins“ mit direkter Serumzugabe zum TRA-Puffer-Reaktionsgemisch erheblich und differiert von Serum zu Serum. Er mag zum wesentlichen Teil auf Verunreinigungen der Enzyme zurückgehen. Glycerokinasepräparate weisen z. B. eine Hexokinaseaktivität auf.

Versuchsordnung. a) Von einem Serumhydrolysat wurden unterschiedliche *Hydrolysatsmengen* im Standardansatz nach II. 5. gemessen und die Extinctionsänderung vor GK, während und nach abgelaufener GK-Reaktion gegen die Zeit registriert.

b) Die unterschiedliche, unspezifische Extinctionsabnahme macht hier eine exakte Ablesung nur bei fortlaufender Registrierung des optischen Tests möglich.

Eine exakte Abtrennung der GK-bedingten Extinctionsänderung vom „Leerschleib“ bzw. „Vor- und Nachschleich“ ist zumindest beim freien Glycerin für das Meßresultat, damit auch für den Glycerid-Glycerinwert entscheidend.

Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit, Richtigkeit und Normalwerte von „freiem“, „gesamtem“ und von „Glycerid-Glycerin“ als Berechnungsgrundlage für die Serumtriglyceride werden im 2. Teil der Arbeit untersucht.

Zusammenfassung. Die Neutralfette im Blutserum und Gewebe lassen sich über Glycerin exakt ermitteln. „Freies“ und nach alkoholischer Verseifung nachweisbares „Gesamt“-Glycerin werden mit Glycerokinase in einer dreistufigen enzymatischen Nachweisreaktion

im Mikroverfahren bestimmt. Die Differenz wird als „Glycerid-Glycerin“ angesprochen. Reaktionsprinzip, Durchführung der Methode und Berechnungsweise werden ausführlich besprochen.

Für freies Glycerin werden 0,2 ml Serum, für Gesamtglycerin etwa 0,007—0,015 ml Serum äquivalente Hydrolysatmengen in den Test eingesetzt. Bei einer „Empfindlichkeit“ von 0,0008 μMol (wenn bei 340 nm, bzw. 0,0015 μMol Glycerin, wenn bei 366 nm gemessen wird), können noch $1/20$ bis $1/10$ des im Normalserum vorhandenen freien bzw. Gesamtglycerins mit den Standardansätzen erfaßt werden. Die obere Nachweisgrenze reicht dann bis 0,15 bzw. 0,3 μMol Glycerin, das entspricht der 8- bzw. 15fachen Normalmenge für freies und Gesamtglycerin. In den angegebenen Grenzen liegen die über Glyceridglycerin nachweisbaren Triglyceridkonzentrationen. Empfindlichkeit und obere Nachweisgrenze können durch andere Serum- bzw. Hydrolysatmengen in weiten Grenzen variiert und der jeweiligen Fragestellung angepaßt werden.

Summary. Triglycerides in blood serum and tissue can be identified exactly by means of glyceride-glycerol. „Free“ and „total“ glycerol, measurable after alcoholic saponification, are determined by glycerolkinase in a three-step enzymatic proof-reaction by means of micro-methods. The difference between „total“ and „free“ glycerol is called „glyceride-glycerol“. Reaction principles, working instructions and the calculation will be discussed in detail.

The sensitivity of the standard test runs to 0,0008 respectively 0,0015 μMol glycerol or $1/20$ resp. $1/10$ of the normal concentrations. The „upper proof limit“ is at 0,15 respectively 0,3 μMol glycerol per test. This is equal to 8—15 times more than the normal of free and total glycerol. Sensitivity and upper proof limit can easily be varied and adapted to the formulation of the question.

Literatur. ABELL, L., B. B. LEVY, B. B. BRODIE, and F. E. KENDELL: A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. *J. biol. Chem.* **195**, 357 (1952). — ADAM, H.: Diss. Marburg 1955. Zit. nach H. ADAM in: H. N. BERGMAYER, Methoden zur enzymatischen Analyse, S. 573—577. Weinheim: Chemie-Verlag 1962. — ALBRINK, M. J.: The microtitration of total fatty acids of serum with notes on the estimation of triglyce-

rides. *J. Lipid Res.* **1** (1), 53—59 (1959). — BERGMAYER, H. N.: Methoden der enzymatischen Analyse. Weinheim: Chemie-Verlag 1962. — BUBLITZ, C. E., and P. KENNEDY: Synthesis of phosphatides in isolated mitochondria. *J. biol. Chem.* **211**, 951—961 (1954). — CZOK, R., u. H. ECKERT: D-3-Phosphoglycerat, D-2-Phosphoglycerat, Phosphoenolpyruvat. In: H. N. BERGMAYER, Methoden der enzymatischen Analyse, S. 224—233. Weinheim: Verlag Chemie 1962. — DRAWERT, F.: u. G. KUPFER: Bestimmung von Glycerin in Weinen und Traubenmosten. *Z. Lebensmitt.-Untersuch.* **123** (3), 211—217 (1963). — EGGSTEIN, M.: Die Bestimmung der veresterten Fettsäuren und der Nachweis von Sphingomyelin im Blut. In: *The blood lipids and the clearing factor*, p. 150—163. Brüssel 1956; — Die symptomatische Lipidämien. In: *Klinik der Gegenwart*, Bd. IX, S. 593—635. München u. Berlin: Urban & Schwarzenberg 1960; — Chemie, Physiologie und Pathologie der Plasmaneutralfette. *Habil.-Schr.* 1960. Marburg; — Die Neutralfettberechnung für Blutserum als Differenz aus Fettsäureesterwert und Lipoid-Fettsäuren. *Klin. Wschr.* **43**, 1031—1038 (1965). — EGGSTEIN, M., u. F. H. KREUTZ: Enzymatische Bestimmung der Neutralfette im Blutserum. *Ergeb. Laboratoriumsmedizin* **2**, 99—103 (1965). — GARLAND, P. B., and P. J. RANDLE: A rapid enzymatic assay for glycerol. *Nature (Lond.)* **196**, 987 (1962). — HAGEN, J. H., and P. J. HAGEN: *Canad. J. Biochem.* **40**, 1129 (1962). Zit. nach F. H. KREUTZ 1963. — HANDEL, E. VAN, and D. ZILVERSMIT: Micro-method for the direct determination of serum triglycerides. *J. clin. Med. (China)* **50**, 152—157 (1957). — HÖFERT, H. J.: Meßtechnische Fragen bei der photometrischen Analyse. *Ärzt. Lab.* **10** (4), 101—112 (1964). — HOHORST, H. J., F. H. KREUTZ u. TH. BÜCHER: Über Metabolitgehalte und Metabolitkonzentration in der Leber der Ratte. *Biochem. Z.* **332**, 18—46 (1959). — JAHNKE, K., F. A. GRIES, H. WALLENFELS u. H. SCHULTE: Verhalten von Metaboliten des Fettstoffwechsels im Serum adipöser und nichtadipöser Personen unter Grundumsatzbedingungen. *Klin. Wschr.* **42**, 1016—1020 (1964). — KREUTZ, F. H.: Enzymatische Glycerinbestimmung. *Klin. Wschr.* **40**, 362—363 (1962); — Enzymatic determination of glycerol in the measurement of triglycerides. Intern. congr. of clinical Chemistry Detroit 1963. — MCQUATE, J. T., and M. F. UTTER: Equilibrium and kinetic studies of the pyruvic kinase reaction. *J. biol. Chem.* **234**, 2151—2157 (1959). — WIELAND, O.: *Biochem. Z.* **329**, 313 (1957). Zit. nach O. WIELAND in: H. N. BERGMAYER, Methoden der enzymatischen Analyse, S. 211—214. Weinheim: Verlag Chemie 1962. — WOLF, H., M. SCHUSTER u. H. LÖHR: Enzymatische Triglyceridbestimmung bei Kindern. *Weltfettkongr. Hamburg 1964* (im Druck).

Priv.-Doz. Dr. M. EGGSTEIN
Med. Universitätsklinik
74 Tübingen, Otfried-Müller-Straße

Eine neue Bestimmung der Neutralfette im Blutserum und Gewebe

II. Mitteilung

Zuverlässigkeit der Methode, andere Neutralfettbestimmungen, Normalwerte für Triglyceride und Glycerin im menschlichen Blut

M. EGGSTEIN

Med. Univ.-Klinik Tübingen (Direktor: Prof. Dr. H. E. BOCK)

Aktuelle Fett- und Kohlenhydratstoffwechseluntersuchungen verlangen unter anderem sehr „genaue“ Triglyceridmessungen im Blut. Bereits geringe Schwankungen interessieren (EGGSTEIN, 1965). Die Kenntnis, wie zuverlässig die nach unseren Empfehlungen (I. Mitteilung, Kap. I—III) bestimmten Neutralfettwerte des Serums sind, bildet daher eine wesentliche Voraussetzung für eine richtige Befundbewertung.

IV. Zuverlässigkeit der enzymatischen Glycerin- und Triglyceridbestimmung

Spezifität, Empfindlichkeit, Reproduzierbarkeit und Richtigkeit entscheiden über den Wert einer Laboratoriumsmeßmethode.

IV.1. Der Wiederholungsfehler und die Reproduzierbarkeit (repeatability and reproducibility Definition bei HUGHES 1952) werden durch die zufälligen Fehler von Messungen, welche an einem Tag von einem bzw. über Wochen verteilt von verschiedenen Untersuchern durchgeführt werden, bestimmt. Angegeben wird die Standardabweichung (S) oder anschaulicher der Variationskoeffizient

$$V = \frac{S \cdot 100}{M}$$

Tabelle 4 enthält die Meßresultate von enzymatisch bestimmtem „freien“ und „Gesamtglycerin“ und für daraus errechnetes „Glyceridglycerin“. Die statistischen Grundwerte ergeben für freies Glycerin einen