

Zakład Biochemii, Instytut Chemii Podstawowych,  
Akademia Medyczna w Lublinie  
Kierownik: prof. dr hab. Marian Szymona

Marian SZYMONA, Tadeusz BERLIŃSKI\*

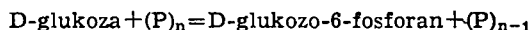
**Porównawcze oznaczenia glukozy metodą heksokinazową  
i jej glukokinazową modyfikacją**

Сравнительные определения глюкозы по гексокиназному методу  
и его глюкокиназовой модификацией

Comparative Determination of Glucose with the Hexokinase Method and Its  
Glucokinase Modification

Spśród wielu metod oznaczania glukozy za najbardziej wiarygodną uważa się metodę heksokinazową (5). Polega ona na spektrofotometrycznym pomiarze zredukowanej formy koenzymu NADPH, która powstaje w wyniku utlenienia glukozo-6-fosforanu (G-6-P), będącego produktem fosforylacji glukozy. Zaletą tej metody jest wysoka czułość i specyficzność, wadą — wysoka cena związana z użyciem dwóch czystych enzymów: heksokinazy i dehydrogenazy G-6-P oraz odpowiednich koenzymów: ATP i NADP.

W r. 1974 zwrócono uwagę na możliwość zastąpienia ATP-zależnej heksokinazy polifosforanową glukokinazą (6). Enzym ten fosforyluje glukozę według równania:



W niniejszej pracy badano przydatność wymienionego enzymu do celów analitycznych drogą porównania wyników oznaczeń z wynikami metody referencyjnej.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

ODCZYNNIKI SPECJALNE I APARATURA

Heksokinaza drożdżowa, krystaliczna (Sigma, USA). Glukoza — roztwór wzorcowy (Lachema, Czechosłowacja). Adenozynotrójfosforan, ATP (Sigma, USA). Dehydrogenaza G-6-P drożdżowa, krystaliczna (Koch-Light,

\* Pracownia Kliniczna Szpitala Wojskowego, Al. Raławickie 23, 20-049 Lublin.

Anglia). Fosforan dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego, NADP (Reanal, Węgry). Tris(hydroxymethylaminomethan) p.a. (Fluka, Szwajcaria). Polifosforan długołańcuchowy,  $(P)_n$  (BDH, Anglia). Glukokinaza polifosforanowa (EC 2.7.1.63) — preparat własny, otrzymany według procedury opisanej poprzednio (7), z wyjątkiem ostatniego etapu, który zmieniono w następujący sposób. Eluat z DEAE-celulozy wzbogacono w białko przez dodanie albuminy (1,5 mg/ml) i zagęszczono wysalając siarczanem amonu do 75% nasycenia. Osad odwirowano i po rozpuszczeniu go w najmniejszej objętości wody poddano filtracji na kolumnie wypełnionej przez Sephadex G-50, stosując 10 mM bufor Tris-HCl (pH 7,4) z dodatkiem 5 mM 2-merkaptotetanolu i 1 mM EDTA. Aktywne frakcje stabilizowano przy użyciu  $MgCl_2$  i polifosforanu w ilościach odpowiednio 5  $\mu$ mol i 20  $\mu$ mol P/ml. Końcowy preparat wykazywał aktywność 15 IU/ml i nie zawierał śladów glukozy ani enzymów interferujących, jak fosfoglukoizomeraza i dehydrogenaza 6-fosfoglukonianu. Przechowywany w stanie zamrożenia pozostawał aktywny w ciągu co najmniej 6 mies.

Spektrofotometer VSU-2G firmy Zeiss (Jena, NRD), kuwety kwarcowe o grubości warstwy 10 mm, mikropipety BB (Calbiochem AG, Szwajcaria).

#### WARUNKI I PRZEBIEG OZNACZEŃ

Opierając się o dane literaturowe (2, 3) i badania własne (6, 7), opracowano zestawy reakcyjne dla metody heksokinazowej (HK) i jej modyfikacji (GfK). Zestawy te zawierały wszystkie niezbędne składniki (tab. 1) i były sporządzane do oznaczeń seryjnych każdorazowo na okres 1 dnia.

Do kuwety o objętości 2,3 ml odmierzano 1,60 ml odpowiedniej mieszaniny, ustalano absorbancję początkową w ciągu 3—5 min. i dodawano 0,05—0,10 ml roztworu glukozy o różnym stężeniu. Przyrost absorbancji śledzono w temperaturze pokojowej przy 340 nm w ciągu 5—10 min., tj. do ustalenia się równowagi. Stężenie glukozy obliczano na podstawie współczynnika dla NADPH:  $6,2 \mu\text{mol}^{-1}\text{ml}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

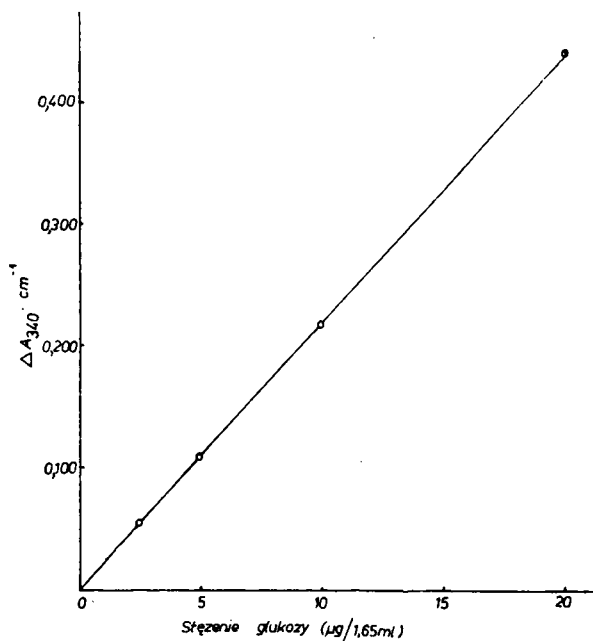
Tab. 1. Skład mieszanin reakcyjnych do oznaczania glukozy  
Composition of reaction mixtures for glucose determination

| Składnik                       | HK<br>(ml) | GfK<br>(ml) |
|--------------------------------|------------|-------------|
| Bufor Tris-HCl (0,2 M), pH 8,0 | 14,0       | 12,0        |
| $MgCl_2$ (0,1 M)               | 0,7        | 0,6         |
| NaCl (2 M)                     | —          | 1,8         |
| NADP (0,01 M)                  | 1,0        | 1,0         |
| ATP (0,1 M)                    | 0,25       | —           |
| Dehydrogenaza G-6-P            | 0,1        | 0,1         |
| Heksokinaza                    | 0,1        | —           |
| Glukokinaza (z polifosforanem) | —          | 1,0         |

## KALIBRACJA METODY ZMODYFIKOWANEJ

Do czterech probówek odmierzone wodę destylowaną w ilościach: 0,20, 0,50, 0,50 i 0,50 ml. Do probówki nr 1 dodano 0,80 ml firmowego roztworu glukozy (500 mg%) i zmieszano, po czym przeniesiono kolejno — mieszając za każdym razem — 0,50 ml z probówki pierwszej do drugiej, z drugiej do trzeciej i z trzeciej do czwartej, otrzymując roztwory podstawowe o malejącym stężeniu. W czterech innych probówkach sporządzono 10-krotne rozcieńczenia przez zmieszanie 0,10 ml objętości poszczególnych wzorców z 0,90 ml porcjami wody. Końcowe roztwory o stężeniu 40, 20, 10 i 5 mg% służyły do oznaczeń kalibracyjnych. Tak przygotowany zakres wzorców odpowiadał w danych warunkach optymalnemu zakresowi absorbancji 0,000—0,500. Otrzymane wyniki naniesiono na układ współrzędnych, uzyskując wykres zgodny z prawem Lamberta-Beera (ryc. 1).

Aby określić dokładność procedury analitycznej, do 1,60 ml mieszaniny GIK dodano 0,0555  $\mu$ moła glukozy (50  $\mu$ l 20 mg% roztworu) i po zakończeniu reakcji odczytano  $\Delta A$ . Następnie dodano ponownie 50  $\mu$ l tego samego roztworu glukozy i odczytano kolejny przyrost absorbancji. Po-



Ryc. 1. Zależność absorbancji od stężenia glukozy w mieszaninie inkubacyjnej z polifosforanową glukokinazą

Dependence of absorbance on the concentration of glucose in the incubation mixture with poliphosphate glucokinase

stępowanie to wykonano 3-krotnie uzyskując 6 wartości, które po przeliczeniu (z uwzględnieniem poprawek na objętość) stanowiły odzysk glukozy w granicach 99,1—100,9% ( $\bar{x}=0,0555 \pm SD 0,0005$ ).

#### OZNACZENIA PORÓWNAWCZE — WYNIKI I WNIOSKI

W tab. 2 zestawiono wyniki oznaczeń porównawczych. Jak widać, różnice pomiędzy odpowiadającymi sobie w poszczególnych parach odczytami wahały się w granicach od  $-0,005$  do  $+0,008$ . Statystyczną identyczność wyników badano dla prób nr 4 i 5, obliczając według *Barnetta* (1): średnie arytmetyczne  $\bar{x}$ , różnice pomiędzy odczytami  $d$ , średnie różnice  $\bar{d} = \bar{x}_{HK} - \bar{x}_{G1K}$ , różnice  $d - \bar{d}$  i ich kwadraty, błędy standardowe różnic  $S_d = \sqrt{\frac{(\sum d - \bar{d})^2}{n-1}}$  i wartości  $t_b = \frac{\bar{d} \sqrt{n}}{S_d}$ .

Znalezione wartości  $t_b$  (odpowiednio 0,88 i 1,09) okazały się znacznie niższe od krytycznych (wartości  $t$  z tablicy dla  $f=4$  i  $f=5$  przy 5% prawdopodobieństwie wynoszą odpowiednio 2,78 i 2,57), a zatem wyniki otrzy-

Tab. 2. Porównanie wyników oznaczeń różnych prób glukozy metodą heksokinazową (HK) i jej modyfikacją (G1K)

A comparison of determinations of various glucose samples by the hexokinase method (HK) and by its modification (G1K)

| Nr próby | $\Delta A_{840} \cdot \text{cm}^{-1}$ |       | $d$    |
|----------|---------------------------------------|-------|--------|
|          | HK                                    | G1K   |        |
| 1        | 0,060                                 | 0,056 | +0,004 |
| 2        | 0,098                                 | 0,092 | +0,006 |
|          | 0,089                                 | 0,090 | -0,001 |
| 3        | 0,154                                 | 0,153 | +0,001 |
|          | 0,154                                 | 0,148 | +0,006 |
|          | 0,155                                 | 0,156 | -0,001 |
| 4        | 0,167                                 | 0,170 | -0,003 |
|          | 0,170                                 | 0,172 | -0,002 |
|          | 0,173                                 | 0,170 | +0,003 |
|          | 0,170                                 | 0,172 | -0,002 |
|          | 0,171                                 | 0,170 | +0,001 |
| 5        | 0,191                                 | 0,185 | +0,006 |
|          | 0,184                                 | 0,187 | -0,003 |
|          | 0,187                                 | 0,188 | -0,001 |
|          | 0,186                                 | 0,188 | -0,002 |
|          | 0,188                                 | 0,186 | +0,002 |
|          | 0,193                                 | 0,185 | +0,008 |
| 6        | 0,360                                 | 0,364 | -0,004 |
|          | 0,360                                 | 0,365 | -0,005 |
|          | 0,364                                 | 0,363 | +0,001 |

mane sposobem zmodyfikowanym nie różnią się istotnie od wyników metody referencyjnej.

Zadowolające wyniki otrzymano również oznaczając glukozę w osoczu krwi człowieka zdrowego. Elementy komórkowe oddzielono wg Meitesa i Saniel-Banreya (4) przez wirowanie z dodatkiem fluorku sodu (0,50 ml krwi+4,50 ml 1,67% NaF) i w 0,10 ml porcjach supernatantu wykonywano oznaczenia jak poprzednio. Dla dwóch serii analiz (każda po 10 prób tej samej krwi), wykonanych metodą heksokinazową i jej modyfikacją znaleziono wartości średnie odpowiednio 1008 mg/l  $\pm$  SD 9,5 ( $v=0,95\%$ ) oraz 998 mg/l  $\pm$  SD 8,5 ( $v=0,89\%$ ).

Całokształt opisanych wyżej badań wskazuje, że polifosforanowa glukokinaza może być wykorzystana do oznaczania glukozy również dobrze jak heksokinaza. Dla wybranego zakresu stężeń, który odpowiadał optymalnemu zakresowi absorbancji, stwierdzono zgodność wyników uzyskiwanych metodą oryginalną i zmodyfikowaną. Współczynniki zmienności były prawie jednakowe i bardzo niskie (poniżej 1%), co świadczy o dużej precyzji oznaczeń. Całkowicie zadowolające były również wyniki prób odzysku glukozy badanej w ilościach 0,0555—0,1110  $\mu$ moles.

Na szczególną uwagę zasługuje możliwość użycia polifosforanowej glukokinazy do analiz „prawdziwej” glukozy krwi. Oczywiście, przed wprowadzeniem tego enzymu jako odczynnika do celów lekarskich konieczne byłoby zbadanie ewentualnego wpływu wielu często stosowanych leków i innych związków mogących występować we krwi osób chorych.

#### PISMIENNICTWO

1. Barnett R. N.: Statystyka w laboratorium klinicznym. PWL, Warszawa 1977.
2. Bergmeyer H. V.: Methoden der enzymatischen Analyse. Vol. 2, Akademie-Verlag, Berlin 1970.
3. Boehringer Mannheim GmbH — Arbeitsanleitungen-Mikrolitermethoden 1/76.
4. Meites S., Saniel-Banreya K.: Modified Glucose Oxidase Method for Determination of Glucose in Whole Blood. Clin. Chem. **19**, 308, 1973.
5. Passey R. B. i wsp.: Evaluation and Comparison of 10 Glucose Methods and the Reference Method Recommended in the Proposed Product Class Standard. Clin. Chem. **23**, 131, 1977.
6. Szymona M.: Zastosowanie polifosforanowej glukokinazy do spektrofotometrycznego oznaczania glukozy w surowicy krwi. Diagn. Lab. **10**, 323, 1974.
7. Szymona M., Kowalska H., Pastuszek I.: Polyphosphate-glucose Phosphotransferase. Purification of *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra Enzyme to Apparent Homogeneity. Acta Biochim. Polon. **24**, 133, 1977.

Otrzymano 2 XI 1981.

## РЕЗЮМЕ

Гексокиназовый метод определения глюкозы модифицировали, заменяя АТФ-зависимую гексокиназу полифосфатной глюкокиназой (ЕС 2.7.1.63) и исполняли сравнительное определение сахара в стандартных растворах и в крови. Полученные результаты не проявляли статистически существенных различий между оригинальным и модифицированным методами.

## SUMMARY

The hexokinase method of determination of glucose was modified by substituting polyphosphate glucokinase (EC 2.7.1.63) for ATP-dependent hexokinase, and comparative determinations of this sugar were performed by using standard solutions and blood. The results obtained showed no statistically significant differences between the original method and that modified one.