DETERMINATION OF GALACTOSE IN BLOOD

Bunrueang Niyomporn M.B., Dr. med.
Sompong Ong-aj yooth B.Sc. Pharm., M.S.
(Dept. of Biochemistry)
(Head of Dept. : Prof. Dr. Sanong Unakul)

Abstract. Niyomporn, Bunrueang, Sompong Ong-aj yooth: Determination of Galactose in Blood. Siriraj Hosp. Gaz. 1970, 22:277-282.

By employing the o-toluidine method together with the glucose oxidase method in the determination of the blood sugars, the galactose level is conveniently measured along with the glucose. The procedure is also applicable as a micro-technique.

Most workers have determined galactose levels in the galactose tolerance test from the residual reducing sugar following destruction of glucose. Glucose can be removed by yeast[1] or by glucose oxidase[2] and the galactose which is not attacked is then measured by reducing method or by o-toluidine method. The accuracy of these approaches to the determination of blood galactose has been questioned. Feissinger and Schrumpf[3] claimed that reducing substances equivalent to 25 mg. of glucose per 100 ml. remained after yeast treatment of a pure glucose solution. On the otherhand Relander[4] reported that glucose was removed completely in 5 minutes by activated yeast, and the remaining galactose was then determined by o-toluidine method which is specified for aldosugar and not interfered by other reducing substances. Destruction of glucose by glucose oxidase produced an augmentation of reducing substances, the "rest reduction" equivalent to only about 5 mg. glucose per 100 ml. [5] An accurate method in the determination of galactose is by using galactose oxidase.[6] Whenever the enzyme galactose oxidase is not available, the following method may also be helpful.

In the procedure described here, o-toluidine method as introduced by Hultman[7] and modified by Haväarinen and Nikkilä [8] is coupled with glucose oxidase method.[9] The principle is based on:

1. According to Ek and Daae[10] the value of blood glucose as determined from Nelson[11] - Somogyi[12] protein free filtrate by using either glucose oxidase or o-toluidine method is the same.

2. Total absorption with glucose and galactose o-toluidine complexes at 630 nm. is equal to the summation of the absorption of the o-toluidine complexes of individual sugars.

3. First the value of glucose in blood (mg. per 100 ml.), as obtained by glucose oxidase method is changed into optical density from a standard curve of glucose determined by o-toluidine method. The optical density of glucose is subtracted from the total optical density of glucose plus galactose. The difference is the optical density of galactose which can be read off in mg. per 100 ml. of blood from a standard curve of galactose determined by o-toluidine method.

Material and Methods

Reagents

1. O-Toluidine reagent To a solution of 0.15% thiourea in glacial acetic acid, 6% redistilled o-toluidine is added, mixed and stored in a brown bottle.

2. Glucose oxidase reagent 1.5 mg. of peroxidase and 50 mg. of glucose oxidase are dissolved in 150 ml. of 0.12 M phosphate buffer, pH 7.0. To this is added 1.0 ml. of o-dianisidine in acetone (5 mg./ml.) and mixed. The reagent is stored in a brown bottle but for longer use, 0.4 ml. of chloroform is added and stored in refrigerator.

3. Standard galactose solution containing 0.1 or 0.2 mg. of galactose in saturated benzoic acid solution.

4. Standard glucose solution containing 0.1 or 0.2 mg. of glucose in saturated benzoic acid solution.

5. Nelson-Somogyi protein precipitant

a. 4.5% Barium hydroxide solution in water.

b. 5% Zinc sulfate solution in water.

Procedure

1. Deproteinization 9.5 ml. of barium hydroxide is added to 1.0 ml. of whole blood* (or plasma) in 50 ml. flask and mixed thoroughly. To this is slowly added with constant swirling of the flask 9.5 ml. of zinc sulfate solution. The content is shaken vigorously and filtered.

The filtrate is collected for determining of glucose by glucose oxidase method and glucose together with galactose by o-toluidine method.

2. Determination of glucose 0.2 ml. of the blood filtrate, 0.2 ml. of standard glucose solution and 0.2 ml. of water as blank are pipetted into three tubes. To each tube is added 5.0 ml. of glucose oxidase reagent and mixed. After incubation in 37°C waterbath for 20 minutes the optical densities of standard and unknown are measured against reagent blank at 430 nm. (O.D. of unknown=A_1).

3. Determination of glucose plus galactose 0.5 ml. of the blood filtrate, 0.5 ml. of standard glucose and galactose solutions, and 0.5 ml of water as blank are pipetted into four tubes. To each tube is added 4.5 ml. of o-toluidine reagent, mixed and boiled for 8 minutes. After cooling optical density of blue-green color of standards and unknown are measured against reagent blank at 630 nm. (O.D. of unknown = $A_2 = A_{gluc} + A_{gal}$).

4. A standard curve of glucose by glucose oxidase method is prepared by plotting optical density against concentration of glucose in mg. per 100 ml. of blood.

5. A standard curve of glucose and of galactose by o-toluidine method is prepared by plotting optical density against concentration of corresponding sugar in mg. per 100 ml. of blood.

Calculation

$$\text{mg./100 ml. of sugar in blood} = \frac{A_u}{A_s} \times 200$$

A_u = Absorbance of unknown

A_s = Absorbance of standard 0.1 mg. per ml.

* Sodium iodoacetate (2 mg. per ml. blood) should be usesd as anticoagulant since sodium fluoride might interfere with peroxidase activity.[13] If the latter cannot be avoided, the incubation period in glucose oxidase method may be extended to 60 minutes; or 0.1 ml. of capillary blood without anticoagulant is taken in 0.95 ml. of barium hydroxide and protein is precipitated with 0.95 ml. of zinc sulfate.

1. Determination of glucose Applying the above formula, $A_l = A_u$, or by reading the concentration of glucose in mg. per 100 ml. blood out of the standard curve glucose concentration is determined.

2. Determination of galactose

a. The optical density of x mg. of glucose per 100 ml. blood as obtained in 1. is read out from the standard curve of glucose by o-toluidine method.

b. $A_2 - A_{gluc} = A_{gal}$

c. The concentration of galactose in mg. per 100 ml. blood is determined from the standard curve of galactose.

Discussion

The principle of the laboratory method is that o-toluidine reacts with galactose and glucose giving colored complexes which absorb maximally at a wavelength of 630 nm. Galactose, however, is more sensitive to o-toluidine than glucose.

Two experiments were run to determine whether or not the formation of the glucose and galactose o-toluidine complexes under study are separate reactions, independent from and do not interfere with each other.

1. A standard curve was plotted from four varying concentrations of glucose determined with o-toluidine reagent. A certain amount of galactose was added to each of the four standard concentrations, and the absorbance of glucose plus galactose complexes was again measured. The result showed the equal additive absorbance at all points.

2. The determinations of combined sugars agreed well with the theoretical plot of the numerical combined values from the individual determinations as shown in Table 1.

Table 1

Glucose Absorbance Plus Galactose Absorbance

Combined Sugars (μg.) glucose + galactose		Theoretical O.D. glucose + galactose	Exper. O.D. glucose + galactose
25	100	0.610	0.615
50	75	0.553	0.570
75	50	0.533	0.525
100	25	0.466	0.480
25	25	0.168	0.168
50	50	0.345	0.353

Therefore, the o-toluidine complexes studies are formed independently. A mixture of a galactose and a glucose will yield a total absorbance value equal to the sum of that representative of each individual concentration.

Thus, this method is useful for the observation of galactose along with glucose in galactose or lactose tolerance test by oral as well as parenteral administration of the sugars, since the blood volume can be reduced to 0.1 ml.

(or 0.2 ml. for duplicates) yielding enough filtrate after centrifugation for the two determinations.

In addition, determinations of other aldosugars such as lactose (at 630 nm.) or xylose [14] (at 430 nm.) can be performed in blood and also in urine.

The method is simple, rapid, more economical and needs no special equipments and techniques.

Summary

A method is described for the determination of galactose along with glucose in blood which is based on the additive absorbance obtained from glucose and galactose o-toluidine complexes.

References

1. Henry, R.I.: Clinical Chemistry. 3rd. ed. Harper and Row, New York, 1965, p. 546.

2. Sφndergaard, G.: Micro-method for Determination of Blood Galactose by Means of Glucose Oxidase (Notation) and Anthrone. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1958, 10:203.

3. Fiessinger, N., et A. Schrumpf: Du résidu non fermentescible du sang dans le métabolismé du galactose. Compt. Rend. Soc. Biol. 1932, 109: 289. (quoted by 1, p. 547).

4. Relander, A.: Determination of Blood Galactose. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1963, 15: 218.

5. Tygstrup, N., et al.: A Clinical Method for Determination of Plasma Galactose in Tolerance Tests. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1954, 6: 43.

6. De-Verdier, C.H., and M. Hjelm: A Galactose-oxidase Method for the Determination of Galactose in Blood Plasma. Clin. Chim. Acta 1962, 7: 742.

7. Hultman, E.: Rapid Specific Method for the Determination of Aldosaccharides in Body Fluids. Nature 1959, 183: 108.

8. Hyvärinen, A., and E.A. Nikkilä: Specific Determination of Blood Glucose with O-toluidine. Clin. Chim. Acta 1962, 7: 140.

9. Huggett, A. St., and D.A. Nixon: Enzymatic Determination of Blood Glucose. Biochem. J. 1957, 66:124.

10. Ek, J., and L.N.W. Daae: Whole Blood Glucose Determination in Newborn Infants; Comparison and Evaluation of Five Different Methods. Acta Paediat. Scand. 1967, 56: 461.

11. Nelson, N.: Photoelectric Adaptation of the Somogyi Method for the Determination of Glucose. J. Biol. Chem. 1944, 153: 375.

12. Somogyi, M.: Determination of Blood Sugar. J. Biol. Chem. 1945, 160, 69.

13. Marks, V., and K. Lloyd: Preservation of Blood Samples for Glucose Analysis by Glucose Oxidase. Clin. Chim. Acta 1963, 8: 326.

14. Harris, A.L.: Determination of D-xylose in Urine for the D-xylose Absorption Test. Clin. Chem. 1969, 15: 65.

(เรื่องย่อจากภาษาอังกฤษข้างต้น)

วิธีวิเคราะห์ปริมาณ กาแลคโทส ในเลือด

บุญเรือง นิยมพร พ.บ., Dr. med.

สมพงษ์ องอาจยุทธ์ ภ.บ., วท.ม.

(ภาควิชาชีวเคมี)

(หัวหน้าภาควิชา : ศาสตราจารย์ นายแพทย์สนอง อูนากูล)

ในการศึกษา เมตะบอลิสม ของ กาแลคโทส และ แลคโทส (ที่ได้รับโดยการฉีดหรือกินก็ดี) โดยการวิเคราะห์ปริมาณ กาแลคโทส รวมกับ กลูโคส ในเลือดเป็นค่าเดียว อาจให้ผลที่ไม่แม่นยำพอใน บางกรณี. สำหรับห้องปฏิบัติการที่พร้อมสรรพ สามารถวิเคราะห์ กลูโคส และ กาแลคโทส แยกกันได้โดยใช้วิธี เอ็นซัยม กลูโคส อ็อกซิเดส และ กาแลคโทส อ็อกซิเดส ตามลำดับ. ส่วนห้องปฏิบัติการซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณ กลูโคส โดยวิธี กลูโคส อ็อกซิเดส และวิธี ออร์โธโทลูอิดีน อยู่แล้วก็จะสามารถวิเคราะห์ปริมาณ กาแลคโทส ได้โดยง่าย และ สะดวก รวดเร็ว ตามหลักการดังนี้ :

๑. ปริมาณ กลูโคส ในเลือดที่วิเคราะห์ได้โดยวิธี กลูโคส อ็อกซิเดส และ ออร์โธโทลูอิดีน, จากน้ำกรองไร้ โปรเทอิน ของ เนลสัน—โสโมยีย์อิ, มีค่าเท่ากัน.

๒. เมื่อ ออร์โธโทลูอิดีน ทำปฏิกิริยากับ กลูโคส และ กาแลคโทส ปริมาณเท่ากันจะให้สีของ คอมเปล็กซ กับ กาแลคโทส เข้มกว่าสีของ คอมเปล็กซ กับ กลูโคส; และเมื่อทำปฏิกิริยากับ กลูโคส และ กาแลคโทส รวมกัน ความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจะเท่ากับผลรวม ของความเข้ม ของสีที่เกิดจากปริมาณของน้ำตาลแต่ละอย่าง.

๓. เมื่อหาค่า กลูโคส ในเลือดโดยวิธี กลูโคส อ็อกซิเดส ได้แล้วก็เทียบเป็นค่า โอ.ดี. ตาม กราฟ มาตรฐานของ กลูโคส วิธี ออร์โธโทลูอิดีน. หัก โอ.ดี. ของ กลูโคส ออกจาก โอ.ดี. รวมที่อ่านได้จากการ ทำปฏิกิริยา ของ ออร์โธโทลูอิดีน กับ อัลโดเฮกโซส (กลูโคส รวม กาแลคโทส) ในน้ำกรองไร้โปรเทอิน. โอ.ดี. ที่เหลือเป็น

ค่า กาแลคโทส, ซึ่งอ่านเป็น มก./๑๐๐ มล. เลือดตาม กราฟ มาตรฐาน กาแลคโทส.

การวิเคราะห์ปริมาณ กาแลคโทส โดยวิธีนี้จะได้ค่าแม่นยำกว่าวิธีใช้ ยีสต์ ย่อยกลูโคส ออกแล้ว หาค่า น้ำตาล ส่วนเหลือ, และยังสามารถใช้ได้กับวิธีย่อส่วน คือใช้เลือดเพียง ๐.๑ มล., จึงเหมาะสำหรับใช้ ทดสอบ ความ ทน กาแลคโทส และ แลคโทส.

มูลนิธิสารศิริราช

◎ ต้องการผลประโยชน์ต่อปีจากเงินกองทุนอย่างน้อยสามแสนบาท.

◎ ขอเชิญชวนบริจาคเงินสมทบทุนมูลนิธิ ฯ ตามกำลังศรัทธาเพื่อประโยชน์ของท่านผู้อ่านร่วมกัน.