Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
11. Jg. 1973, S. 421—425

Bedeutung von Wasserstoffionenkonzentration und ADP-Zusatz bei der Ammoniakbestimmung mit Glutamatdehydrogenase

Verbesserter enzymatischer Ammoniaktest, I. Mitteilung

Von F. DA FONSECA-WOLLHEIM

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie (Direktor: Prof. Dr. H.-J. Dulce) Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin

(Eingegangen am 16. Februar 1973)

Die Trägheit des NH_3 -Umsatzes und die Instabilität der Glutamatdehydrogenase (EC 1.4.1.3) bei der Inkubation waren bisher die Hauptschwierigkeiten bei der enzymatischen Ammoniakbestimmung.

Durch die allosterische Wirkung von zugesetztem ADP lassen sich die Eigenschaften der Glutamatdehydrogenase günstig beeinflussen: 1. Unter ADP-Einfluß steigt die NH_3 -Umsatzgeschwindigkeit erheblich an. 2. Die Glutamatdehydrogenase verliert ihre Denaturierungstendenz. Dank dieser stabilisierenden Wirkung des ADP kann die Inkubation bei kinetisch optimaler Wasserstoffionenkonzentration (pH 8,6) ausgeführt werden, wo ohne zugesetztes ADP eine rasche Inaktivierung der Glutamatdehydrogenase stattfinden würde. Durch die so erreichte höhere Umsatzgeschwindigkeit ergeben sich für die Anwendung der enzymatischen Ammoniakbestimmung auf verschiedenen Gebieten der biochemischen Analytik günstige Voraussetzungen.

The significance of the hydrogen ion concentration and the addition of ADP in the determination of ammonia with glutamate dehydrogenase

An improved enzymic determination of ammonia, I

The chief difficulties in the enzymic determination of ammonia have hitherto been the slowness of the conversion and the instability of the glutamate dehydrogenase (EC 1.4.1.3).

Added ADP exerts an allosteric effect upon the glutamate dehydrogenase, with the result that:

1. the rate of conversion of the NH_3 is considerably increased;

2. the glutamate dehydrogenase no longer shows a tendency to become denatured.

Owing to the stabilizing action of the ADP, the incubation can be carried out at the kinetically optimal hydrogen ion concentration (pH 8.6), where the glutamate dehydrogenase would otherwise be rapidly inactivated. With this improved rate of reaction, the enzymic determination of ammonia should find application in many fields of biochemical analysis.

Die Ammoniakbestimmung nimmt in der biochemischen Analytik eine wichtige Stellung ein. Bei verschiedenen experimentellen und klinischen Fragestellungen interessiert die Konzentration von Ammoniak als Bestandteil des Intermediärstoffwechsels direkt. Weiterhin kann eine Reihe von Aminen und Amiden nach enzymatischer Hydrolyse über das freigesetzte NH_3 spezifisch bestimmt werden, wie z. B. bei der Harnstoffbestimmung mit Urease. Auch die Aktivitätsmessung von NH_3 -abspaltenden Enzymen ist mit Hilfe von Ammoniakbestimmungen möglich.

Prinzipiell bietet für alle genannten Anwendungsgebiete die 1963 von KIRSTEN et al. (1) und FAWAZ und v. DAHL (2) eingeführte enzymatische Ammoniakbestimmung mit Glutamatdehydrogenase (L-Glutamate: NAD(P) oxidoreductase, deaminating, EC 1.4.1.3), entsprechend der Reaktionsgleichung

bemerkenswerte Vorteile:

1. Die Methode ist absolut spezifisch (3).
2. Bei der Auswertung kann der Extinktionskoeffizient von NAD(P)H zugrunde gelegt werden (Absolutmeßverfahren).

3. Es ist bei NH_3 -freisetzenden Enzymen eine direkte Beobachtung des Reaktionsablaufs im gekoppelten Test möglich.

Der praktische Wert der Glutamatdehydrogenase-Methode für Ammoniak wird aber bisher durch die Trägheit des NH_3 -Umsatzes, die durch die geringe Affinität des Enzyms zum Substrat bedingt ist (4), stark beeinträchtigt. Weiterhin können Störungen bei der enzymatischen Ammoniakbestimmung durch Denaturierung der Glutamatdehydrogenase während der Inkubation auftreten (5). In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß durch Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen diese Schwierigkeiten überwunden werden können.

Methodik

Reagenzien

Glutamatdehydrogenase aus Rinderleber, spez. Aktivität etwa 90 U/mg, bezogen wir in einer Konzentration von 10 mg/ml als Lösung in 500 g/kg Glycerin von der Firma Boehringer, Mannheim. Die Angabe, daß im Enzympräparat störende Mengen von Ammoniak enthalten seien, konnten wir bei keiner der von uns benutzten Enzymchargen bestätigt finden (5). NADH und NADPH wurden jeweils frisch vor Gebrauch in 0,12 mol/l Natriumhydro-

gencarbonat gelöst und stammten ebenso wie ADP und Tris von der Firma Boehringer. Die übrigen Reagenzien wurden in p. a.-Qualität von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

Geräte

Für die Enzymaktivitätsbestimmungen stand ein Eppendorf-Spektrellinienphotometer mit temperierbarer Küvettenwechselausstattung und linearisiertem Kompensationsschreiber zur Verfügung.

Durchführung der Versuche

1. Messung der Glutamatdehydrogenase-Aktivität

Die Bestimmung der Glutamatdehydrogenaseaktivität bei Sättigung mit Ammoniak wurde unter den folgenden Bedingungen ausgeführt:

0,1 mol/l Tris-HCl-Puffer, pH 8,0; 0,1 mol/l Ammoniumacetat; 6,4 mmol/l 2-Oxoglutarat; 0,25 mmol/l NADH; 1,0 mmol/l ADP. Gesamtvolumen 3,22 ml; $d = 10$ mm; $\lambda = 366$ nm; Temperatur = 25°C. Aus der Anfangsgeschwindigkeit der mit dem Kompensationsschreiber registrierten Extinktionsabnahme wurde die Enzymaktivität in üblicher Weise ermittelt und in μmol Substratumsatz/min, bezogen auf 1 ml der untersuchten Enzymverdünnung, ausgedrückt. Als Variationskoeffizienten der Methode bestimmten wir bei drei verschiedenen Meßserien Werte zwischen 2 und 3%.

2. Untersuchungen zur Denaturierungsgeschwindigkeit der Glutamatdehydrogenase bei der Inkubation

Bei diesen Versuchen wurde das Enzym in einer Endkonzentration von 50 mg/l unter verschiedenen pH- und Temperaturbedingungen sowie mit verschiedenen Zusätzen, die bei den speziellen Versuchsbeschreibungen jeweils angegeben sind, inkubiert. Die Enzymdenaturierung wurde in Anlehnung an FRIEDEN (6) durch Messung der nach verschiedenen Zeiten noch vorhandenen Enzymaktivität verfolgt. Hierbei wurde unmittelbar nach Einmischen von 20 μl der unverdünnten Enzymstammlösung (10 mg/ml in 500 g/kg Glycerin) zu 4,0 ml vortemperiertem Inkubationsgemisch, sowie an vier späteren Zeitpunkten, 20 μl des Ansatzes entnommen und sofort auf verbliebene Glutamatdehydrogenase-Aktivität getestet. Die Bedingungen des Aktivitätstestes (s. o.) boten die Gewähr dafür, daß bei der Aktivitätsmessung keine weitere Inaktivierung stattfand. Die Glutamatdehydrogenase-Inaktivierung verläuft als Reaktion 1. Ordnung (6). Man erhält daher bei Auftragung der gemessenen Enzymaktivität gegen die Zeit auf halblogarithmischem Papier eine Gerade (s. Abb. 1). Der prozentuale Aktivitätsschwund pro Minute (K) wurde für die im einzelnen untersuchten Inkubationsbedingungen mit Hilfe eines Olivetti-Tischrechners berechnet. Als „Ausreißer“ erkannte Meßwerte wurden nicht berücksichtigt.

Abb. 1

Zeitverlauf der Glutamatdehydrogenase-Inaktivierung in 0,1 mol/l Tris-HCl-Puffer (pH 8,8) bei 25°C. Die nach verschiedenen langer Inkubation noch vorhandene Enzymaktivität ist gegen die Zeit aufgetragen

3. Bestimmung der K_m -Werte für Ammoniak bei verschiedenem pH

Zur Ermittlung der pH-abhängigen K_m -Werte der Glutamatdehydrogenase für Ammoniak wurde in 0,1 mol/l Tris-HCl-Puffern von unterschiedlichem pH die Anfangsgeschwindigkeit der NADPH-Oxydation mit jeweils 13 verschiedenen Ammoniumacetatkonzentrationen im Bereich zwischen 0,6 mmol/l und 0,1 mol/l bestimmt. Die übrigen Bedingungen waren: 7 mmol/l 2-Oxoglutarat; 0,2 mmol/l NADPH; 0,7 mmol/l ADP; 0,3 mg/l Glutamatdehydrogenase. Gesamtvolumen: 3,22 ml $\lambda = 366$ nm; $d = 10$ mm; Temperatur = 25°C; Start mit Enzym. Die Auswertung erfolgte nach LINEWEAVER und BURK (7).

Ergebnisse

Untersuchung der Glutamatdehydrogenase-Stabilität

Voraussetzung für eine erfolgreiche Anwendung der Glutamatdehydrogenase für Ammoniakbestimmungen ist eine genaue Kenntnis, unter welchen Bedingungen das Enzym während der Inkubation aktiv bleibt bzw. unter welchen Bedingungen Störungen in der Meßtechnik infolge Ausflockung des Proteins (5) und Aktivitätsverlust zu erwarten sind. Es wurde daher im Bereich um pH 8, wo das Aktivitätsoptimum für die interessierende Reaktionsrichtung liegt (8), das Stabilitätsverhalten der Glutamatdehydrogenase untersucht. Alle Parameter, die für den Assoziationsgrad des allosterischen Enzyms und die Denaturierungsreaktion von Bedeutung sind (Temperatur (9), Konzentration von Enzym (10), Coenzym (6, 9) und Puffer (9)) wurden hierbei so gewählt, wie sie auch für den Ammoniaktest praktisch in Frage kamen.

Tabelle 1 zeigt, daß bei 25°C in 0,1 mol/l Tris-HCl-Puffer oberhalb von pH 8,2 mit einer raschen Zunahme der Denaturierungstendenz zu rechnen ist. Die wahlweise im Ammoniaktest verwendbaren (s. u.) Coenzyme NADH und NADPH sensibilisieren die Glutamatdehydrogenase (6,9), wobei die denaturierungsfördernde Wirkung von NADPH schon unterhalb von pH 8 offenkundig wird, während NADH in diesem pH-Bereich sogar stabilisierend wirkt (vgl. (9)). Mit zuge-setztem ADP (11) ist bis pH 9 keine Inaktivierung, weder im Ansatz mit NADH, noch mit NADPH, zu beobachten. Abgesehen von seinem fördernden Einfluß auf die NH_3 -Umsatzgeschwindigkeit (s. u.) ist schon aus diesem Grund der Zusatz von ADP zum Ammoniaktest unbedingt ratsam.

Bei auf 35°C erhöhter Temperatur war in einem Ansatz mit 0,1 mol/l Tris-HCl-Puffer (pH 8,6), 0,2 mmol/l NADH und 1 mmol/l ADP eine mit geringer Geschwindigkeit ablaufende Denaturierung feststellbar ($K = -1,7\%/ \text{min}$). Durch Erhöhung der Ionenstärke des Ansatzes (Zusatz von 0,1 mol/l sek. Natriumphosphat) ließ sich das Enzym auch bei dieser Temperatur vollständig stabilisieren. Die Verwendung eines Puffers ausreichender Ionenstärke (9) und vor allem ADP-Zusatz dürften zur Stabilisierung bei höherer Reaktionstemperatur zweckmäßiger sein, als die von BUTTERY und ROWSELL vorgeschlagene Benutzung eines Puffergemisches mit 300 g/kg Glycerin (5).

Tab. 1

Geschwindigkeit der Glutamatdehydrogenase-Inaktivierung bei verschiedenen Inkubationsbedingungen. Angabe in % Aktivitätsänderung pro min (siehe „Methoden“). Temperatur = 25°C

pH	0,1 mol/l Tris-HCl	0,1 mol/l Tris-HCl + 0,1 mmol/l NADPH	0,1 mol/l Tris-HCl + 0,1 mmol/l NADH	0,1 mol/l Tris-HCl + 0,1 mmol/l NADPH + 1 mmol/l ADP	0,1 mol/l Tris-HCl + 0,1 mmol/l NADH + 1 mmol/l ADP
7,0	— 0,4	— 0,2	>— 0,1	—	—
7,4	— 0,4	— 0,6	>— 0,1	>— 0,1	>— 0,1
7,8	— 0,7	— 1,5	— 0,1	—	—
8,0	— 0,7	— 3,4	— 0,2	>— 0,1	>— 0,1
8,2	— 1,0	— 8,2	— 1,0	—	—
8,4	— 3,3	— 16,4	— 6,1	—	—
8,6	— 5,6	— 40,5	— 13,6	>— 0,1	>— 0,1
8,8	— 12,4	—	— 41,2	—	—
9,0	— 25,0	—	—	>— 0,1	>— 0,1

Ermittlung des pH-Optimums für den Ammoniaktest

Um den kinetisch günstigsten pH-Bereich für die Ammoniakbestimmung zu ermitteln, wurde zwischen pH 6,8 und 9,2 die Anfangsgeschwindigkeit des NH_3 -Umsatzes bei hoher Enzymkonzentration (61,5 mg/l Glutamatdehydrogenase) und niedriger Substratkonzentration (0,1 mmol/l Ammoniumacetat, d. h. 1/1000 der beim Glutamatdehydrogenase-Aktivitätstest angewendeten Sättigungskonzentration, siehe „Methoden“) gemessen. Das erhaltene pH-Aktivitäts-Profil (s. Abb. 2) sieht völlig anders aus als die von uns bei Substratsättigung (0,1 mol/l Ammoniumacetat) mit 0,31 mg/l Enzym gemessene und in Abbildung 3 dargestellte pH-Abhän-

Abb. 2

Abhängigkeit der NH_3 -Umsatzgeschwindigkeit vom pH bei niedriger Substratkonzentration (0,1 mmol/l Ammoniumacetat). Die übrigen Bedingungen waren: 61,5 mg/l Glutamatdehydrogenase; 0,15 mol/l Tris-HCl-Puffer; 6,4 mmol/l 2-Oxoglutarat; 0,1 mmol/l NADPH und 1,0 mmol/l ADP. Temperatur = 25°C. x—x—x Ansätze mit ADP; o—o—o Ansätze ohne ADP. Angegeben sind die nach Start mit Enzym gemessenen Anfangsgeschwindigkeiten

Abb. 3

Abhängigkeit der NH_3 -Umsatzgeschwindigkeit vom pH bei Sättigung der Glutamatdehydrogenase mit Substrat (0,1 mol/l Ammoniumacetat). Enzymkonzentration 0,31 mg/l; übrige Bedingungen wie bei Abb. 2 angegeben

gigkeit der Glutamatdehydrogenase-Aktivität. Als Ursache für die Verschiebung des pH-Optimums bei kleinen Ammoniakkonzentrationen um eine pH-Einheit zum Alkalischen hin war eine starke Zunahme der Enzymaffinität zum Substrat in diesem pH-Bereich zu erwarten. Tatsächlich fanden wir bei der Verfolgung der K_m -Werte der Glutamatdehydrogenase für Ammoniak von pH 7,0 aufwärts eine laufende Abnahme bis zu einem Minimum in der Umgebung von pH 8,6 (s. Abb. 4). Aus Abbildung 2 geht hervor, daß der Zusatz von ADP bei pH 8,0 den NH_3 -Umsatz gegenüber einem Kontrollansatz ohne ADP um den Faktor 4,5 beschleunigt. Für das pH-Optimum bei 8,6 ließ sich der Aktivierungsfaktor in 0,1 mol/l Tris-HCl-Puffer nicht mehr bestimmen, da die Glutamatdehydrogenase in diesem pH-Bereich ohne ADP sehr rasch denaturiert wird (s. Tab. 1). Der Wert von ADP für den Ammoniaktest liegt also darin, daß durch seine stabilisierende Wirkung

Abb. 4

pH-Abhängigkeit der K_m -Werte von Glutamatdehydrogenase für Ammoniak. Durchführung der Bestimmung siehe bei „Methoden“

die Glutamatdehydrogenase im optimalen pH-Bereich eingesetzt werden kann, und daß zusätzlich durch seine aktivierende Wirkung noch eine beachtliche Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit zu erzielen ist.

Einfluß weiterer Parameter auf die NH_3 -Umsatzgeschwindigkeit

Die Coenzyme NADH und NADPH können bei der Säugetier-Glutamatdehydrogenase (L-Glutamate: NAD(P) oxidoreductase, deaminating, EC 1.4.1.3) beide als Wasserstoffdonator fungieren, jedoch sind die mit ihnen erreichten Umsatzgeschwindigkeiten je nach Reaktionsbedingungen und Herkunft des Enzyms recht verschieden (12). Bei Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten bei pH 8,6 im Ammoniaktest entsprechend den bei Abbildung 2 niedergelegten Bedingungen erhielten wir mit 0,15 mmol/l NADPH 92% der Umsatzgeschwindigkeit eines Parallelansatzes mit der gleichen molaren Konzentration an NADH. NADH und NADPH sind also unter kinetischem Gesichtspunkt fast gleichwertig. Es ist daher z. B. möglich, auf NADPH auszuweichen, wenn die Ammoniakbestimmung durch NADH-oxydierende Enzyme in der Probe gestört wird (13).

Um den vollen aktivierenden Effekt von ADP zu erhalten, ist unter den bei Abbildung 2 angegebenen Versuchsbedingungen bereits 0,2 mmol/l ADP ausreichend. Eine Variation der ADP-Konzentration ergab unter diesen Bedingungen, bezogen auf den Ansatz mit 0,2 mmol/l ADP, die folgenden relativen Umsatzgeschwindigkeiten:

mmol/l ADP	%
0,012	31
0,020	52
0,090	93
1,00	100.

In den Ansatz hineingegebene Salze (s. Tab. 2) bewirken je nach Art des Anions eine verschieden starke Verlangsamung des NH_3 -Umsatzes. Unangenehm ist der gerade

Tab. 2

Einfluß verschiedener Salze (Endkonzentration 0,1 mol/l) auf die NH_3 -Umsatzgeschwindigkeit bei pH 8,6. Alle Ansätze enthielten: 0,06 mol/l Tris-HCl-Puffer (pH 8,6); 17 mmol/l 2-Oxoglutarat; 2 mmol/l ADP; 0,1 mmol/l NADPH, 0,1 mmol/l Ammoniumchlorid und 100 mg/l Glutamatdehydrogenase. Die bei dem Ansatz ohne Salzzusatz gemessene Anfangsgeschwindigkeit wurde gleich 100% gesetzt

Zugesetztes Salz	Relative Umsatzgeschwindigkeit (%)
—	100
Natriumchlorid	89
Natriumacetat	85
Natriumsulfat	78
sek. Natriumphosphat	73
Natriumcitrat	57
Natriumtrichloracetat	48
Natriumperchlorat	42

bei Trichloracetat und Perchlorat besonders ausgeprägte Hemmeffekt, da Trichloressigsäure und Perchlorsäure häufig zur Gewinnung eiweißfreier Extrakte bei Bestimmungen in biologischem Material angewendet werden müssen. Wegen derartiger Störungsmöglichkeiten sollte bei Proben unbekannter Zusammensetzung der Reaktionsablauf im Photometer überprüft werden. Auf Grund der experimentellen Befunde dieser Arbeit und nach praktischen Gesichtspunkten (Pufferkapazität, Enzymverbrauch pro Bestimmung, Extinktionsbereich des Ansatzes) halten wir die folgenden Bedingungen im Ammoniak-Testansatz für optimal: 0,1 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 8,6; 10 mmol/l 2-Oxoglutarat; 1 mmol/l ADP und 100 mg/l Glutamatdehydrogenase. Die Konzentration von NAD(P)H richtet sich nach den in der Probe zu erwartenden Ammoniakkonzentrationen und wird im allgemeinen zwischen 0,1 und 0,3 mmol/l zu wählen sein. Die Reaktionszeit beträgt unter diesen Bedingungen bei 25°C etwa 5 min. Ähnlich ist der Zeitbedarf bei Plasma-Ammoniakbestimmungen, wenn Blutplasma ohne vorhergehende Deproteinisierung mit eiweißfällenden Säuren in den enzymatischen Test eingesetzt wird (13).

Diskussion

Tabelle 3 zeigt, daß bisher bei enzymatischen Ammoniakbestimmungen pH-Werte $\leq 8,0$ angewendet wurden. Nach unseren Untersuchungen über die pH-Abhängigkeit der Glutamatdehydrogenase-Inaktivierung (s. Tab. 1) ist also anzunehmen, daß größere Schwierigkeiten durch Enzymaktivierung während der Inkubation auch ohne ADP im allgemeinen vermieden wurden. BUTTERTY und ROWSELL (5) berichten allerdings von Störungen der Ammoniakbestimmung infolge Enzymausfällung in Phosphatpuffer pH 7,8 bei 37°C.

Unter kinetischem Gesichtspunkt sind aber die bisher angewendeten pH-Bedingungen als bei weitem nicht optimal anzusehen (s. Abb. 2 und Tab. 3). Anscheinend wurde von der Mehrzahl der Autoren angenommen, daß am pH-Optimum der Glutamatdehydrogenase bei Substratsättigung (s. Abb. 3) auch die Bestimmung von um 3–4 Zehnerpotenzen niedriger liegenden NH_3 -Konzentrationen am schnellsten abläuft. Die Abnahme

Tab. 3
Bedingungen bei verschiedenen Modifikationen des enzymatischen Ammoniaktests

Literatur-Zitat	Probenmaterial	Puffersystem	pH	Temperatur (°C)	ADP-Zusatz	Glutamatdehydrogenase-Konzentration (mg/l)	Inkubationszeit (min)
(1)	Trichloressigsäureextrakt	Phosphat	7,6	25	—	100	20
(2)	Perchlor-säureextrakt	Phosphat	7,6	25—27	+	100	20
(14)	Plasma	Phosphat	7,4	Raumtemperatur	—	nicht definiert	14*
(4)	Trichloressigsäureextrakt	Tris-HCl + Phosphat	7,8	Raumtemperatur	—	113	30—40
(5)	Perchlor-säureextrakt	Phosphat mit Glycerinzusatz	7,8	37	—	144	45
(15)	Perchlor-säureextrakt	Tris-Maleat	7,4	Raumtemperatur	—	860	30
(16)	Trichloressigsäureextrakt	Tris-HCl	8,0	Raumtemperatur	—	200	90
diese Arbeit und (13)	Plasma	Tris-HCl	8,6	Raumtemperatur	+	100	5

* Nach 25minütiger Vorinkubation vor Start mit Glutamatdehydrogenase

der K_m -Werte der Glutamatdehydrogenase für Ammoniak im stärker alkalischen Bereich (s. Abb. 4) bewirkt aber eine Verschiebung des pH-Optimums um etwa eine pH-Einheit zum Alkalischen hin (pH 8,6, S. Abb. 2), da die *Affinität* des Enzyms bei der NH_3 -Bestimmung das Hauptproblem ist (4). Die pH-Abhängigkeit der Glutamatdehydrogenase-Affinität war zwar schon früher aufgefallen (17), diese Feststellung blieb aber für die Verbesserung der Inkubationsbedingungen ungenutzt. Schwer verständlich ist, daß auch noch in den neueren Modifikationen der NH_3 -Bestimmung auf den ADP-Zusatz verzichtet wird (5, 16), obwohl sein aktivierender Effekt seit längerem bekannt ist (11). Lediglich FAWAZ und v. DAHL (2) setzen ihrem Testsystem ADP zu, wobei sich aber keine herausragende Beschleunigung des Reaktionsablaufs erzielen ließ, weil ein ungünstiger pH-

Wert und hemmende Perchlorationen im Ansatz vorhanden waren.

Unter den von uns als optimal gefundenen Reaktionsbedingungen (pH 8,6) wird sowohl der stabilisierende (vgl. Tab. 1), als auch der aktivierende Effekt von ADP ausgenutzt. Gegenüber den Bedingungen des Testansatzes von SCHMIDT und SCHWARZ (pH 7,8; kein ADP-Zusatz (4)) wird so z. B. eine Beschleunigung um den Faktor 7 erreicht (vgl. Abb. 2 und Tab. 3). Es ergeben sich somit für den enzymatischen Ammoniaktest zur Bestimmung von NH_3 und als Indikatorsystem bei gekoppelten Reaktionen günstige Voraussetzungen.

Danksagung

Für die exakte Durchführung der Versuche danke ich Frau Karin Krüger.

Literatur

1. KIRSTEN, EVA, GEREZ, Carmen & KIRSTEN, R. (1963), Biochem. Z. 337, 312—319. — 2. FAWAZ, G. & v. DAHL, KATHARINA (1963), Leban. Med. J. 16, 169—174. — 3. OLSON, J. A. & ANFINSEN, C. B. (1953), J. Biol. Chem. 202, 841—856. — 4. SCHMIDT, F. H. & SCHWARZ, MONICA (1966), Klin. Wochenschr. 44, 591—592. — 5. BUTTERY, P. J. & ROWSELL, E. V. (1971), Anal. Biochem. 39, 297—310. — 6. FRIEDEN, C. (1963), J. Biol. Chem. 238, 146—154. — 7. LINEWEAVER, H. & BURK, D. (1934), J. Amer. Chem. Soc. 56, 658—668. — 8. Recommendations of the German Society for Clinical Chemistry (1972), diese Z. 10, 281—291. — 9. BITENSKY, M. W., YIELDING, K. L. & TOMKINS, G. M. (1965), J. Biol. Chem. 240, 1077—1082. — 10. OLSON, J. A. & ANFINSEN, C. B. (1952), J. Biol. Chem. 197, 67—79. — 11. FRIEDEN, C. (1959), J. Biol.

Chem. 234, 815—820. — 12. LEHMANN, F.-G. (1969), Klin. Wochenschr. 47, 1045—1047. — 13. DA FONSECA-WOLLHEIM (1973), diese Z., nachstehend. — 14. MONDZAK, A., EHRLICH, G. E. & SEEGMILLER, J. E. (1965), J. Lab. Clin. Med. 66, 526—531. — 15. REICHELT, K. L., KYAMME, E. & TVEIT, B. (1964), Scand. J. Lab. Clin. Invest. 16, 433—439. — 16. KUN, E. & KEARNEY, E. B. (1970), in Methoden der enzymatischen Analyse (BERGMEYER, H. U., Hrsg.), 2. Aufl., Bd. 2, 1749—1752, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße. — 17. BERNT, E. & BERGMEYER, H. U. (1970), in Methoden der enzymatischen Analyse (BERGMEYER, H. U., Hrsg.), 2. Aufl., Bd. 2, 1738—1745, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße.

Dr. F. da Fonseca-Wollheim
Städtisches Behringkrankenhaus
Zentrallaboratorium
1 Berlin 37
Gimpelsteig 3/5