Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
11. Jg. 1973, S. 426—431

Direkte Plasmaammoniakbestimmung ohne Enteiweißung

Verbesserter enzymatischer Ammoniaktest, II. 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)

Der enzymatische Ammoniaktest mit Glutamatdehydrogenase (EC 1.4.1.3) wurde in wesentlichen Punkten so verbessert, daß eine rasche und störungsfreie photometrische Bestimmung der NH_3 -Konzentration im „nativen“ Blutplasma möglich ist. Der Fortfall der Enteiweißung bedeutet nicht nur eine methodische Vereinfachung, sondern auch die Eliminierung der hauptsächlichsten Fehlerquelle bei der „direkten“ Blutammoniakbestimmung. Unspezifische Extinktionsänderungen beim Bestimmungsansatz werden dadurch vermieden, daß NADPH an Stelle von NADH als Coenzym verwendet wird. Infolge Optimierung der Reaktionsbedingungen beträgt die Inkubationszeit bis zur Erreichung des Endpunktes nur fünf Minuten. Da die NH_3 -Konzentration bei ungerinnbar gemachten Blutproben in den ersten 30 Minuten nach der Entnahme praktisch konstant bleibt, ist die Methode auch unter Klinikbedingungen ohne besonderen Aufwand ausführbar. Der Normalwertbereich für venöses Plasma- NH_3 beträgt bei Männern 16—60 $\mu\text{mol/l}$, bei Frauen 11—51 $\mu\text{mol/l}$.

Direct determination of plasma ammonia without deproteinization

An improved enzymic determination of ammonia, II

With fundamental improvements in the enzymic determination of ammonia with glutamate dehydrogenase, it is now possible to perform a rapid and interference-free photometric determination of NH_3 in "native" blood plasma. The omission of the deproteinization not only simplifies the method, it also eliminates the chief source of error in the "direct" determination of blood ammonia. Unspecific changes in extinction upon initiation of the reaction are avoided by using NADPH in place of NADH as the coenzyme. As a result of the optimization of the reaction conditions, the end point is reached after five minutes incubation. The NH_3 concentration of coagulation-inhibited blood remains constant during the first 30 minutes after sampling, so the method can be used for clinical purposes with no further precautions or modifications. The normal range for venous plasma NH_3 was 16—60 $\mu\text{mol/l}$ for men, and 11—51 $\mu\text{mol/l}$ for women.

Für die Verlaufskontrolle bei Leberausfallkoma und zur Differentialdiagnose von unklaren komatösen Zuständen wird in der Klinik die Bestimmung des Blutammoniakspiegels benötigt. Weiterhin gibt die Blutammoniakbestimmung Hinweise für die Eiweißtoleranz bei Lebercirrhose und ist somit für die Verhütung der sog. portalen Encephalopathie von Bedeutung (1). In Verbindung mit oraler Ammoniakbelastung kann aus Blutammoniakwerten auf den Ausbildungsgrad portocavalen Anastomosen geschlossen werden (2, 3).

Einen festen Platz in der Routinediagnostik konnte die Blutammoniakbestimmung aber bisher noch nicht einnehmen, da die zur Verfügung stehenden Analysemethoden recht störanfällig und aufwendig sind. Auch die in neuerer Zeit eingeführte enzymatische Blutammoniakbestimmung nach SCHMIDT und SCHWARZ (4) erweist sich in der Klinik als wenig befriedigend, da es bei der Enteiweißung der Blutprobe mit starker Säure durch Zerfall labiler Ammoniak-Muttersubstanzen zu erheblicher artefizieller NH_3 -Neubildung kommen kann (5, 6). In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß mit einem verbesserten enzymatischen Testansatz (7) eine spezifische und störungsfreie Ammoniakbestimmung aus Blutplasma ohne den riskanten Schritt der Enteiweißung möglich ist. Die ausgearbeitete Bestimmungsmethode ist einfach und schnell ausführbar und entspricht besonders den Anforderungen des Routine-laboratoriums.

Methodik

Reagenzien

Glutamatdehydrogenase (10 mg/ml in 500 g/kg Glycerin, frei von Ammoniumionen), NADPH, NADH, ADP (freie Säure) und Tris stammen von der Firma Boehringer, Mannheim. Die übrigen Reagenzien wurden in p. a.-Qualität von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

Lösungen

Um den Reagenzienleerwert möglichst niedrig zu halten, werden alle Lösungen mit NH_3 -freiem Wasser in besonders sorgfältig gereinigten Gefäßen angesetzt.

1. 0,2 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 8,6
24,2 g Tris mit etwa 900 ml H_2O lösen. pH-Wert an der Glaselektrode mit conc. HCl auf 8,6 einstellen, dann auf 1000 ml auffüllen.
2. 0,4 mol/l 2-Oxoglutarat
1,46 g 2-Oxoglutarinsäure mit 18 ml 1 mol/l NaOH lösen. An der Glaselektrode auf neutrales pH bringen, dann auf 25 ml mit H_2O auffüllen.
3. 20 mmol/l ADP
21,4 mg Adenosin-5'-diphosphorsäure mit 2,5 ml H_2O lösen.
4. 4 mmol/l NADPH
10,0 mg etwa 75proz. NADPH mit 2,5 ml 0,12 mol/l NaHCO_3 lösen.
5. 10 mg/ml Glutamatdehydrogenase.
Lösung in 500 g/kg Glycerin unverdünnt anwenden.
6. Reaktionsgemisch (ausreichend für 20 Bestimmungen):
20,0 ml Lösung 1
1,0 ml Lösung 2
2,0 ml Lösung 3
1,0 ml Lösung 4 und
6,0 ml H_2O

werden gemischt. Dieses Reaktionsgemisch kann ohne wesentlichen Abfall der NADPH-Konzentration und ohne Anstieg des NH_3 -Leerwertes eine Woche bei 4°C gelagert und zur Ammoniakbestimmung verwendet werden.

Probenentnahme und -aufarbeitung

3 ml Venenblut werden ohne Stau und vorhergehende Anspannung der Muskulatur in eine Kunststoff-Einweg-Spritze aufgezogen, die mit 3 mg EDTA (Dinatrium-Salz) beschickt ist. Sehr bewährt haben sich für diesen Zweck die mit Dinatrium-EDTA-präparierten Monovetten der Firma Sarstedt. Nachdem durch Hin- und Herrollen der Spritze für die Auflösung des zugesetzten Antikoagulans gesorgt ist, wird die Probe mit einem Begleitzettel, auf dem der Zeitpunkt der Entnahme eingetragen ist, unverzüglich zum Labor transportiert. Dort wird die Probe in ein verschließbares Kunststoffröhrchen umgefüllt und zehn Minuten bei Raumtemperatur und 1700 g zentrifugiert. Das überstehende Plasma wird am besten gleich analysiert (s. u.). Notfalls kann das abgetrennte Plasma auch in einem verschlossenen Kunststoffröhrchen für ein bis zwei Stunden bei 0°C konserviert werden. Einweg-Kunststoffgefäße werden bei der Probenaufarbeitung generell bevorzugt, weil so die Gefahr der Kontamination der Probe mit Ammoniak vermieden wird, was bei wiederverwendeten Glasgefäßen ohne extreme Sorgfalt bei der Reinigung nicht zu gewährleisten ist. Nach unseren Erfahrungen sollte unter Routinebedingungen die Regel eingehalten werden, daß nicht mehr als 20–30 min zwischen Gefäßpunktion und Zentrifugation der Blutprobe vergehen. Wo längere Transportwege gegeben sind, ist es zweckmäßig, am Entnahmekort zu zentrifugieren und das abgetrennte Plasma auf Eis gekühlt in das Laboratorium zu senden.

Optischer Test

Schichtdicke: 10 mm; Meßstrahlung: 334 nm; Raumtemperatur. In zwei OS-Küvetten werden dosiert:

	Probenansatz	Reagenzienleerwertansatz
Reaktionsgemisch, ml	1,5	1,5
Plasma, ml	0,5	—
H ₂ O, ml	—	0,5

Mit Plastikspateln sorgfältig durchmischen und die Ausgangsextinktionen messen ($= E_1$). Bei beiden Ansätzen 20 µl Glutamatdehydrogenase einrühren. Den Extinktionsabfall bis zum Stillstand (etwa 5 min) verfolgen, dann E_2 messen. Bei Probenansatz und Reagenzienleerwertansatz die Extinktionsdifferenz $\Delta E = E_1 - E_2$ ausrechnen. Die korrigierte Extinktionsdifferenz

$$\Delta E_{\text{korrigiert}} = \Delta E_{\text{Probenansatz}} - \Delta E_{\text{Reagenzienleerwert}}$$

geht in die Berechnung ein:

$$\mu\text{mol NH}_3/\text{l} = \Delta E_{\text{korrigiert}} \cdot \frac{4,04 \cdot 1000}{6,0} = \Delta E_{\text{korrigiert}} \cdot 637.$$

(E_{334} von NADPH = 6,0 cm²/µmol; Verdünnung der Probe im Bestimmungsansatz 4,04fach; Umrechnung auf Liter).

Hinweise

1. Um Störungen in der Meßtechnik zu vermeiden, muß die verwendete Glutamatdehydrogenase-Lösung absolut klar sein.
2. Das beim Reagenzienleerwertansatz gemessene ΔE_{334} sollte 0,050 nicht überschreiten.
3. Stärkere Hämolyse und Lipämie können infolge der hohen Extinktion die Ablesung unmöglich machen.
4. Heparin-Plasma sollte nicht zur Bestimmung verwendet werden, da es bei Anwesenheit von Heparin im Testansatz zu unspezifischen Extinktionsänderungen kommt.

Ergebnisse

Besonderheiten der Ammoniakbestimmung im Nativplasma

Abbildung 1 zeigt den Extinktionsverlauf bei der Ammoniakbestimmung in EDTA-Plasma unter den von uns ausgearbeiteten optimalen Reaktionsbedingungen

Abb. 1

Enzymatische NH_3 -Bestimmung im Plasma. A (×—×—×): Ansatz mit NADH; B (O—O—O) Ansatz mit NADPH. Bei 1 Zusatz von NAD(P)H; bei 2 Start mit Glutamatdehydrogenase. Zusammensetzung der Reaktionsansätze wie unter „Methoden“ angegeben

(7). Bei dem Ansatz mit NADH als Coenzym (Kurve A) beobachtet man vor Start mit Glutamatdehydrogenase eine unspezifische Extinktionsabnahme, die selbst nach 15-minütiger Vorinkubation nicht zum vollständigen Stillstand gekommen ist. Diese „Schleichreaktion“ überlagert auch die durch Glutamatdehydrogenase-Zusatz in der 20. min ausgelöste Bestimmungsreaktion.

Bei dem Parallelansatz mit NADPH als Coenzym (Kurve B) finden sich dagegen vor Start und nach Abschluß der Glutamatdehydrogenase-Reaktion nur minimale unspezifische Extinktionsänderungen. Diese Beobachtung, daß NADPH im Gegensatz zu NADH von den im Normalplasma vorkommenden Enzymen nicht bzw. nur sehr langsam umgesetzt wird, fanden wir an einer großen Zahl von Plasmaproben bestätigt. Das Resultat der Ammoniakbestimmung ist daher beim Testansatz mit NADPH in einfacher Weise aus den Extinktionswerten vor Start ($= E_1$) und nach Abschluß der Bestimmungsreaktion ($= E_2$) zu berechnen (s. „Methoden“). Da außerdem eine Vorinkubation entfallen kann, ist der Zeitbedarf für eine Plasmaammoniak-Bestimmung nicht viel größer als die eigentliche Reaktionszeit, die beim optimierten Testansatz nur etwa 5 min beträgt (s. Abb. 1). Die im normalen Plasma vorkommenden NH_3 -Konzentrationen sind so niedrig, daß auch bei Einsatz von 0,5 ml Plasma in den Bestimmungsansatz (Endvolumen: 2,02 ml) nur geringe Extinktionsänderungen erhalten werden. Es sollte daher mit möglichst großer Empfindlichkeit, d. h. bei 340 (334) nm, und nicht bei 366 nm photometriert werden. Da die Extinktion des Probenmaterials in diesem Wellenlängenbereich beträchtlich ist, muß ein Photometer zur Verfügung stehen, das auch im höheren Extinktionsbereich gute Meßgenauigkeit aufweist (z. B. Photometer Eppendorf mit Sekundärelektronen-Vervielfacher). Bei stark hämolytischen und

lipämischen Seren kann die Ablesung am Photometer unmöglich sein. Bei trübem Plasma beobachteten wir zum Teil eine störende Abwärtsdrift der Extinktion, die nicht auf einer Oxydation von NADPH oder NADH beruhte. Wegen solcher trübungsbedingter Extinktionsänderungen ist auch Heparinplasma nicht gut zur enzymatischen Plasmaammoniakbestimmung geeignet: Bei Zusammengeben von Heparinplasma und Reaktionsgemisch registrierten wir über längere Zeit eine Zunahme der Extinktion, so daß nur durch das Mitführen von Leerwertansätzen ohne Glutamatdehydrogenase eine korrekte Ammoniakbestimmung möglich war. Als günstigstes Antikoagulans erwies sich EDTA. Die Verwendung von Serum zur Ammoniakbestimmung scheidet aus, da beim Gerinnungsvorgang in Abhängigkeit vom Fibrinogenspiegel unterschiedliche NH_3 -Mengen freigesetzt werden (8), so daß ein Rückschluß auf die in vivo vorhandene Ammoniakkonzentration nicht möglich ist.

Präzision

Bei Mehrfachbestimmung der Ammoniakkonzentration in derselben Plasmaprobe ergab sich ein Variationskoeffizient von 1,6% ($n = 11$; $\bar{x} = 99,1 \mu\text{mol/l}$; $s = 1,6 \mu\text{mol/l}$). Mit reinen NH_4Cl -Lösungen wurden die folgenden, von der Konzentration abhängigen Variationskoeffizienten erhalten:

$\bar{x} = 197,0 \mu\text{mol/l}$; $s = 1,0 \mu\text{mol/l}$; $V_k = 0,5\%$ ($n = 11$)
 $\bar{x} = 52,2 \mu\text{mol/l}$; $s = 0,8 \mu\text{mol/l}$; $V_k = 1,5\%$ ($n = 12$)
 $\bar{x} = 27,2 \mu\text{mol/l}$; $s = 1,7 \mu\text{mol/l}$; $V_k = 6,2\%$ ($n = 12$)

Wiederfindungsversuche

Bei 29 Plasmaproben, denen Ammoniumchlorid in einer Endkonzentration von $160,0 \mu\text{mol/l}$ zugesetzt wurde, fanden sich bei der Ammoniakbestimmung im Durchschnitt $160,8 \mu\text{mol/l}$ wieder, entsprechend einer „recovery“ von 100,5%. Die Standardabweichung betrug $4,0 \mu\text{mol/l}$.

Bei Zusatz von bekannten Ammoniakmengen zu Vollblut fanden sich im Plasma Konzentrationen, die durchschnittlich 95% des Wertes betrug, der bei Annahme einer völligen Gleichverteilung zwischen Plasma und Erythrocyten zu erwarten wäre (s. Tab. 1). Demnach

Tab. 1

Wiederfindung von NH_3 im Plasma nach Zusatz bekannter NH_3 -Mengen zu Vollblut. 1,0 ml EDTA-Blut wurde mit 0,1 ml NH_4Cl -Lösung (verdünnt in physiol. NaCl) versetzt. Nach Durchmischen und 2minütigem Stehen bei Raumtemperatur Zentrifugation und Analyse des Plasma auf NH_3 . Bei den Kontrollansätzen ohne NH_4Cl Voluminkorrektur mit physiol. NaCl

Nr. der Blut-Probe	Plasma-Ammoniak-konzentration ohne Zusatz ($\mu\text{mol/l}$)	Zugesetzte NH_3 -Konzentration ($\mu\text{mol/l}$)			
		17,5	35,0	70,0	140,0
		Gefunden im Plasma ($\mu\text{mol/l}$)			
1	14,0	31,0	—	81,5	151,5
2	31,5	—	65,5	97,0	160,5
3	9,0	—	43,5	76,0	143,5
4	18,0	34,5	50,0	—	—
5	26,5	43,0	58,5	—	—

enthält die Volumeneinheit Erythrocyt nicht wesentlich mehr Ammoniak als die Volumeneinheit Plasma, und es ist zu schließen, daß die mit einwandfreier Technik — d. h. unter Vermeidung aller Artefaktmöglichkeiten — im Vollblut gemessenen NH_3 -Konzentrationen nur geringfügig über den Plasmawerten liegen. Hierfür sprechen auch einige Versuche, bei denen wir nach Enteiweißung durch Druckfiltration (9), den NH_3 -Gehalt von lysierten Erythrocyten und von Plasma enzymatisch bestimmt haben (10). Berücksichtigt man allerdings den geringeren Wassergehalt des Erythrocyten, so ergibt sich ein deutliches Gefälle zwischen der Ammoniakkonzentration in Erythrocyten- und Plasmawasser (11).

Spontane NH_3 -Neubildung bei Blut- und Plasmaproben

Um die bei der Aufarbeitung der Blutproben einzuhaltenden Zeit- und Temperaturbedingungen definieren zu können, wurde die zeitliche Veränderung des Plasma- NH_3 -Spiegels bei einer größeren Zahl von frisch gewonnenen Blutproben in Abhängigkeit von der Temperatur untersucht. Wie Abbildung 2 zeigt, ist bei einer bei 37°C gehaltenen Blutprobe bereits nach 30 min eine deutliche Erhöhung des Plasma- NH_3 -Gehalts gegenüber dem Ausgangswert zu beobachten. Bei 20°C dagegen bleibt der NH_3 -Spiegel bis zur 40. min nach der Entnahme praktisch konstant und steigt erst dann meßbar an (Abb. 2).

Keine deutlichen Unterschiede bestehen hinsichtlich der NH_3 -Bildungsrate in der ersten Stunde bei Blutproben, die bei 0 oder 25°C gehalten wurden (s. Tab. 2). Im Durchschnitt fand sich in den ersten 30 min nach der Entnahme ein Anstieg der Ammoniakkonzentration von $2,4 \mu\text{mol/l}$ (0°C) bzw. $2,2 \mu\text{mol/l}$ (25°C), was bei routine-

Abb. 2
Einfluß der Temperatur auf die Ammoniakneubildung in frisch entnommenem Blut. $\times-\times-\times$ 25°C ; $\text{O}-\text{O}-\text{O}$ 37°C . Ungerinnbar gemachtes Blut wurde in Spritzen bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten Entnahme eines aliquoten Teils zur Plasma-Ammoniakbestimmung

Tab. 2

Veränderungen des Plasma-Ammoniakspiegels ($\mu\text{mol/l}$) bei verschiedenen Blutproben in der ersten Stunde nach der Entnahme. Inkubation der Blutproben mit EDTA-Zusatz in Spritzen bei 0 und 25°C

Probennummer	0°C				25°C			
	0 min	15 min	30 min	60 min	15 min	30 min	60 min	
1	16,0	16,0	14,0	20,0	14,6	16,0	24,0	
2	10,0	9,3	12,0	11,3	9,3	10,7	8,7	
3	31,3	35,3	38,0	41,3	32,6	32,6	29,3	
4	18,0	20,6	20,6	24,0	21,3	20,0	24,6	
5	33,3	31,3	34,6	33,3	33,3	38,6	42,0	
6	18,0	23,3	22,0	24,0	18,0	22,0	22,0	
7	14,6	14,0	17,3	—	15,3	16,6	11,3	
8	22,0	20,6	24,0	—	20,6	24,6	26,6	
$\bar{x}$	20,4	21,2	22,8	—	20,6	22,6	23,5	

Tab. 3

Einfluß verschiedener Zusätze auf die NH_3 -Bildungsrate im frisch entnommenen Blut

Zusatz	NH_3 -Bildung pro h ($\mu\text{mol/l}$)
—	0
1 mmol/l Monojodacetat	23
4,3 mmol/l Natriumfluorid	49
1,8 mmol/l Maleinimid	85

Tab. 4

Spontane NH_3 -Neubildung im abgetrennten Plasma. EDTA-Plasma wurde sofort nach Gewinnung sowie nach 2stündigem Stehen auf seinen NH_3 -gehalt analysiert. Spalte 1: Analyse sofort nach Plasmagewinnung; 2 und 3: nach 2stündigem Stehen bei 0 bzw. 25°C; 4: nach 2stündigem Stehen bei 25°C, vermischt mit Puffer, ADP und 2-Oxoglutarat, entsprechend den Bedingungen des NH_3 -Bestimmungsansatzes (s. „Methodik“)

Probennummer	NH_3 ($\mu\text{mol/l}$)			
	1	2	3	4
1	28	31	32	38
2	50	53	61	68
3	39	51	65	79
4	23	25	34	37
5	23	31	31	42

mäßiger Durchführung der Ammoniakbestimmung noch vernachlässigbar ist.

Bei Zusatz von Stoffwechselgiften wie Monojodacetat, Fluorid oder Maleinimid kommt es zu einer erheblichen Steigerung der NH_3 -Bildungsrate (s. Tab. 3). Für die Niedrighaltung der spontanen Ammoniakbildung in vitro bei 25°C scheint demnach die Intaktheit des Erythrocytenstoffwechsels notwendige Voraussetzung zu sein.

Abgetrenntes Plasma ist bei 0°C erwartungsgemäß stabiler als bei Raumtemperatur. Dies zeigen die in Tabelle 4 niedergelegten Analysendaten von Plasma-proben, die 2 Stunden bei 0 oder 25°C inkubiert wurden. Bei einer anderen Meßserie, bei der bei 17 Plasmaproben der NH_3 -Anstieg bei 0°C über 4 h verfolgt wurde, ergab sich eine durchschnittliche Zunahme pro h von 1,5 $\mu\text{mol/l}$, $s = 0,9 \mu\text{mol/l}$. Wenn die Ammoniakanalyse nicht sofort im Anschluß an das Zentrifugieren ausgeführt werden kann, ist es demnach ohne große Fehler

möglich, das abgeteilte Plasma bei 0°C für einige Zeit zu lagern. Nach Zusammengeben von Plasma mit Tris-Puffer pH 8,6, 2-Oxoglutarat und ADP, entsprechend den Bedingungen der Plasmaammoniakbestimmung (s. Methoden) kommt es bei Raumtemperatur zu einer stärkeren NH_3 -Bildung als im isolierten Plasma (s. Tab. 4). Zur Vermeidung fälschlich hoher Meßwerte sollte daher beim Ammoniaktest keine unnötig lange Zeit zwischen Zusammenpipettieren von Probe und Reaktionsgemisch und Start mit Glutamatdehydrogenase verstreichen.

Normalwertbestimmungen

Bei 178 gesunden Personen im Alter zwischen 18 und 55 Jahren, die am Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin anlässlich ihrer Einstellung personalärztlich untersucht wurden, bestimmten wir unter Nüchternbedingungen den venösen Plasmaammoniakspiegel. Als 95%-Bereich ergab sich für Frauen ($n = 113$) 11–51 $\mu\text{mol/l}$, für Männer ($n = 65$) 15–60 $\mu\text{mol/l}$. Für die Gruppe der Frauen errechnete sich ein Durchschnittswert von 28,0 $\mu\text{mol/l}$ und eine Standardabweichung $s = 10,1 \mu\text{mol/l}$. Für die Gruppe der Männer lauten die entsprechenden Zahlen 33,7 und 10,7 $\mu\text{mol/l}$. Der Unterschied zwischen den Mittelwerten ist statistisch auf dem 0,1%-Niveau gesichert.

Diskussion

Sobald Blut oder Plasma extremen pH-Bedingungen ausgesetzt wird, besteht die Gefahr artefizieller NH_3 -Neubildung. Es sind daher gegen die Blutammoniakbestimmungsmethoden mit Alkalisierung (Mikrodiffusionsverfahren [12]) und gegen die Verfahren mit Säurefällung (direkte Bestimmungsmethoden aus eiweißfreiem Säureextrakt [13, 14]) Bedenken geäußert worden (15, 6, 5). Um mit Sicherheit „wahre“ NH_3 -Konzentrationen bestimmen zu können, sind Methoden entwickelt worden, bei denen während der Probenaufarbeitung neutrales pH gewahrt bleibt. Die hierzu gehörenden Ionenaustauschverfahren (15, 16, 17) und die enzymatische Ammoniakbestimmung nach Enteiweißung durch Ultrafiltration (9) haben sich aber wegen ihres arbeitstechnischen Aufwandes im Routine-laboratorium nicht durchsetzen können.

MONDZAK et al. haben bereits 1964 versucht, die NH_3 -Konzentration im nativen, nicht enteiweißten Plasma enzymatisch im Test mit Glutamatdehydrogenase, 2-Oxoglutarat und NADH zu bestimmen (18). Unter den von diesen Autoren angewendeten Bedingungen treten aber erhebliche Schwierigkeiten durch Störreaktionen plasmazeigender Enzyme und Substrate auf: Man muß 25 min vorinkubieren, bis das in der Plasma-probe vorhandene Pyruvat unter Verbrauch von NADH zu Lactat umgesetzt ist. Völlig konstante Extinktionswerte werden nicht erreicht, da ständig aus L-Alanin durch Vermittlung von Plasma-Glutamat-Pyruvat-Transaminase (EC 2.6.1.2) Pyruvat nachgeliefert wird (19). Da der NH_3 -Umsatz in dem Testsystem von MONDZAK et al. relativ träge verläuft, ist der Endpunkt bei der Ammoniakbestimmung nicht deutlich zu er-

kennen (18). Es wurde deswegen bisher die Enteiweißung bei der enzymatischen Ammoniakbestimmung für unvermeidlich gehalten (28, 9).

Wie in dieser Arbeit gezeigt wird, lassen sich durch Verwendung von NADPH als Coenzym die unspezifischen Extinktionsänderungen bei der Ammoniakbestimmung im Plasma vermeiden (s. Abb. 1). Die Plasma-Lactatdehydrogenase (EC 1.1.1.27) und die auch noch als Störungsquelle zu diskutierende Plasma-Malatdehydrogenase (EC 1.1.1.37) (19) sind weitgehend NADH-spezifisch (20, 21). Im Ammoniaktest reagiert NADPH dagegen nicht wesentlich schlechter als NADH (7). Es ist daher mit dem von uns vorgeschlagenen Test eine praktisch störungsfreie Ammoniakbestimmung im nativen Blutplasma möglich. Wegen der nur kurzen Reaktionszeit entfällt auch der Einwand, daß es während der Inkubation zu einer nennenswerten Ammoniakneubildung kommt (18). Die Möglichkeit, NH_3 im Plasma ohne Enteiweißung zu analysieren, eröffnet auch interessante Aspekte für die Bestimmung von Asparagin und Glutamin im gekoppelten Test, eventuell auch von Creatinin (22).

Sehr unterschiedliche Auffassungen bestehen darüber, welche Regeln bei der Probenaufarbeitung eingehalten werden müssen, um Verfälschungen der Meßergebnisse durch NH_3 -Neubildung in der Probe bis zum Beginn der Analyse zu vermeiden. Die Untersuchungen von SELIGSON und HIRAHARA (23) haben zwar eine weitgehende Konstanz des Blut- bzw. Plasma-Ammoniakspiegels in der ersten Stunde nach der Entnahme bei Raumtemperatur gezeigt. Auch in neueren Arbeiten wird aber immer noch eine sofortige Enteiweißung der Blutprobe zum Abstoppen der enzymatischen Desaminierung oder eine rasche Abzentrifugation des Plasmas in der Kälte für notwendig gehalten (6, 17, 24). Zweifellos haben in diesem Zusammenhang die Angaben von CONWAY über eine rasche NH_3 -Bildung in den ersten Minuten nach der Blutentnahme (25) viel Verwirrung gestiftet. Die eigenen Untersuchungen zu diesem Problem haben bestätigt, daß der NH_3 -Spiegel in den ersten 30 min nach der Entnahme bei 0°C und auch bei 25°C nur minimal ansteigt, so daß besonderer Aufwand bei der Gewinnung und bei dem Transport der Blutprobe in das Labor nicht notwendig erscheint.

Bei Messungen des venösen Plasma- NH_3 -Spiegels an Gesunden fanden wir einen Normalwertbereich (de-

finiert als 95%-Intervall) von 11–51 $\mu\text{mol/l}$ bei den Frauen bzw. von 15–60 $\mu\text{mol/l}$ bei den Männern. Diese Werte liegen leicht unter den von MÜTING et al. (26) mit der Methode nach SCHMIDT und SCHWARZ (4) an 200 Probanden für venöses Vollblut erhaltenen Normwerten (♀ 20–77 $\mu\text{mol/l}$; ♂ 16–64 $\mu\text{mol/l}$). Deutlich höher liegen die von ENGLHARDT et al. (6) und REICHELT et al. (27) ebenfalls mit der enzymatischen Methode im Säureextrakt bestimmten oberen Normgrenzen (115 bzw. 108 $\mu\text{mol/l}$). Die Anwendung der BERTHELOT-Reaktion zur direkten Ammoniakbestimmung im Säureextrakt bringt die zusätzliche Schwierigkeit mit sich, daß je nach den gewählten Reaktionsbedingungen im Analysenansatz unterschiedliche Ergebnisse erhalten werden (6). Die mit diesen Methoden an größeren Probandenzahlen erhaltenen Normbereiche liegen z. T. in der Größenordnung der enzymatisch im Plasma gefundenen NH_3 -Konzentrationen (Normalwertbereich nach MÜLLER-BEISENHIRTZ und KELLER: 23–61 $\mu\text{mol/l}$ (13), z. T. auch deutlich höher (34–81 $\mu\text{mol/l}$, McCULLOUGH [14]). Mit der relativ aufwendigen Ionenaustauschermethode wurden von FORMAN (17) normale Plasma- NH_3 -Konzentrationen zwischen 14 und 41 $\mu\text{mol/l}$ gefunden. Andere Autoren erhielten allerdings mit Ionenaustauschtechnik noch wesentlich niedrigere venöse Plasma-Ammoniakkonzentrationen (z. B. FENTON (15): 2–20 $\mu\text{mol/l}$). Eine Erklärung hierfür können wir auf Grund fehlender eigener Erfahrung mit dieser Methodik nicht geben, McCULLOUGH weist in diesem Zusammenhang auf die z. T. nicht befriedigende Wiederfindung bei Ionenaustauschermethoden hin (14). Bemerkenswert ist die von uns beobachtete Geschlechtsabhängigkeit der Normalwertbereiche für Ammoniak mit durchschnittlich höheren NH_3 -Konzentrationen bei den Männern. Der statistisch gut abgesicherte Mittelwertsunterschied ($p < 0,001$) steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von MÜTING et al. (26), die bei Frauen durchschnittlich höhere NH_3 -Spiegel fanden. Durchschnittlich höhere NH_3 -Spiegel fanden aber auch REICHELT et al. für Männer (27). Zu klären wäre noch, wie weit sich eine Geschlechtsabhängigkeit des NH_3 -Spiegels auch im arteriellen Blut nachweisen läßt.

Danksagung

Frau KARIN KRÜGER danke ich für vorbildliche technische Assistenz.

Literatur

1. MÜTING, D. (1971), Deut. Med. Wochenschr. 95, 1403–1408.
2. CONN, H. O. (1960), J. Lab. Clin. Med. 55, 855–871.
3. SCHMITT, W., LAZARUS, G. & BRAUN, H. (1970), Med. Welt 21, 1251–1264.
4. SCHMIDT, F. H. & SCHWARZ, M. (1966), Klin. Wochenschr. 44, 591–592.
5. KELLER, H., MÜLLER-BEISENHIRTZ, W. & NEUMANN, E. (1967), Klin. Wochenschr. 45, 314–316.
6. ENGLHARDT, A., HAERTWIG, B. & FRANKEN, F. (1971), diese Z. 9, 229–234.
7. DA FONSECA-WOLLHEIM, F. (1973), diese Z. vorstehend.
8. WENZEL, E. & CHRIST, G. (1969), Thromb. Diath. Haemorrh. 22, 575–576.
9. GEROK, W. & PAUSCH, I. (1968), Z. Gesamte Exp. Med. 148, 337–354.
10. DA FONSECA-WOLLHEIM, F., Unveröffentlichte Versuche.
11. HUMOLLER, F. L., BARAK, A. J. & HOLTHAUS, J. M. (1964), Clin. Chem. 10, 589–596.
12. CONWAY, E. J. (1957), Microdiffusion Analysis and volumetric error. Crosby Lockwood & Son Ltd., London.
13. MÜLLER-BEISENHIRTZ, W. & KELLER, H. (1965), Klin. Wochenschr. 43, 43–49.
14. McCULLOUGH, H. (1967), Clin. Chim. Acta 17, 297–304.
15. FENTON, J. G. B. (1962), Clin. Chim. Acta 7, 163–175.
16. DIENST, S. G. (1961), J. Lab. Clin. Med. 58, 149–155.
17. FORMAN, D. T. (1964), Clin. Chem. 10, 497–508.
18. MONDCAK, A., EHRLICH, G. E. & SEEGMILLER, J. E. (1965), J. Lab. Clin. Med. 66, 526–531.
19. ISHIHARA, A.,

- KURAHASI, E. & UEHARA, H. (1972), *Clin. Chim. Acta* 41, 255—261. — 20. SCHWERT, G. W. & WINER, A. D. (1963), in *The Enzymes* (BOYER, P. D., LARDY, H. & MYRBÄCK, H., Hrsg.), Bd. 7, 127—148 Academic Press, New York. — 21. KUN, E. (1963), in *The Enzymes* (BOYER, P. D., LARDY, H. & MYRBÄCK, Hrsg.), Bd. 7, 149—160, Academic Press New York. — 22. MC LEAN, M. H. & GALLWAS, J. (1972), Evaluation of the Creatininase Creatinin Procedure Suitable for Clinical Use. 8th International Congress on Clinical Chemistry, Copenhagen. — 23. SELIGSON, D. & HIRAHARA, K. (1957), *J. Lab. Clin. Med.* 49, 962—974. — 24. KAPLAN, A. (1969) in *Methods of Biochemical Analysis* (GLICK, D. Hrsg.) Bd. 17, 311—324 John Wiley & Sons, New York. — 25. CONWAY, E. J. & COOKE, R. (1939), *Biochem. J.* 33, 457—478. 26. MÜTING, D., HEINZE, JOHANNA, REIKOWSKI, JOHANNA, BETZIEN, G., SCHWARZ, MONICA & SCHMIDT, F. H. (1968), *Clin. Chim. Acta* 19, 391—395. — 27. REICHELT, K. L., KVAMME, E. & TVEIT, B. (1964), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 16, 433—439. — 28. MANOUKIAN, E. & FAWAZ, G. (1969), *diese Z.* 7, 32—33.

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