

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 16, 1978, pp. 597-599

Enzymatische Bestimmung von Acetacetat und D(-)-3-Hydroxybutyrat im Harn

Von W. Tolckmitt und M.-L. Meschede

Zentrum für Kinderheilkunde am Klinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen

(Eingegangen am 28. Februar/18. Juli 1978)

Zusammenfassung: Die enzymatischen Methoden zur quantitativen Erfassung von Acetacetat und D(-)-3-Hydroxybutyrat im Blut werden für auf die Praxis abgestimmte quantitative Bestimmungen im Harn modifiziert. Es werden vorläufige Normalwerte für Kinder mitgeteilt.

Enzymic determination of acetoacetate and D(-)-3-hydroxybutyrate in urine

Summary: The enzymic methods for the quantitative determination of acetoacetate and D(-)-3-hydroxybutyrate in blood were modified for the routine determination of these compounds in urine for clinical purposes. Preliminary normal values are reported for children.

Einführung

Vorliegende enzymatische Bestimmungsmethoden stützen sich auf die Arbeiten von *Krebs*, *Williamson* et al. (1-3) sowie *Bergmeyer* et al. (4) und lehnen sich eng an die zum Nachweis im Blut ausgearbeiteten Methoden von *Williamson & Mellanby* (5, 6) und *Bergmeyer & Bernt* (7) an.

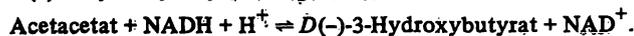
Methodik

Der sofort in geschlossenen Gefäßen bei 4° C über eine Zeit von dreimal 8 Stunden gesammelte Harn gelangt zur Bestimmung. Die Konzentration von D-3-Hydroxybutyrat, aber auch von Acetacetat ändert sich bei 4° C innerhalb eines untersuchten Zeitraumes von 48 Stunden nicht.

Bestimmung von Acetacetat

Prinzip

Acetacetat wird durch reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) mittels D(-)-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase¹ in D(-)-3-Hydroxybutyrat übergeführt:



Die Abnahme der NADH-Konzentration ist proportional der Acetacetat-Konzentration. NADH ist Meßgröße und wird aufgrund seiner Absorption bei 365 nm (bei Benutzung eines Filterphotometers) oder 340 nm bestimmt. Wegen möglicher Verunreinigung der D-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase mit Lactat-Dehydrogenase² ist es notwendig, im Harn vorhandenes Pyruvat

vor Beginn der Acetacetat-Bestimmung durch Zugabe von Lactat-Dehydrogenase zu entfernen:



Pyruvat kann daher im gleichen Ansatz vor Zugabe von D-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase bestimmt werden.

Geräte und Reagenzien

Beckman-Photometer (Spectrophotometer ACTA III und V); Wellenlänge: 365 und 340 nm; OS-bzw. Quarz-Küvetten: 1 cm Schichtdicke; Temperatur 25° C; Messung gegen Luft.

1. Phosphat-Puffer (0,1 mol/l; pH = 6,8): 6,6 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄) und 11,4 g Dikaliumhydrogenphosphat (K₂HPO₄ · 3H₂O) werden unter Kontrolle des pH-Wertes mit der Glaselektrode in 1000 ml Wasser gelöst.
 2. Reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid (etwa 6 mmol/l β-NADH): 10 mg NADH-Dinatriumsalz werden in 2 ml Natriumhydrogencarbonat-Lösung (10 g/l) gelöst.
 3. Lactat-Dehydrogenase (5 g/l).
 4. D-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (5 g/l)
- Reagenzien: 2-4 Fa. Boehringer Mannheim; übrige Fa Merck, Darmstadt.

Durchführung

Filterieren des Harnes durch doppeltes Kohlefilter. (Die Filtration ist ohne Einfluß auf die Konzentration der gemessenen Substanzen).

In eine Küvette werden pipettiert:

Puffer (1)	1,50 ml
Harn	0,50 ml
NADH-Lösung (2)	0,05 ml.

Mischen und Ablesen von Absorption A₁. Mit dem Plastikspatel wird dann weiterhin

Lactat-Dehydrogenase (3)	0,01 ml
--------------------------	---------

eingemischt und die Absorption A₂ nach 1-2 min abgelesen.

$$A_1 - A_2 = \Delta \text{Apyruvat.}$$

¹) D-3-Hydroxybutyrat: NAD-Oxidoreductase (EC 1.1.1.30)

²) L-Lactat: NAD-Oxidoreductase (EC 1.1.1.27)

Danach wird

D-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (4) 0,05 ml
eingemischt, nach 10 min Absorption A_3 und nach weiteren
10 min Absorption A_4 abgelesen. $(A_2 - A_3) - (A_3 - A_4) =$
 $\Delta A_{\text{Acetacetat}}$.

Auswertung

$c_{\text{Pyruvat}} = \Delta A \cdot 1,24 = \text{mmol/l}; \Delta A \cdot 109,8 = \text{mg/l (365 nm)}$
 $= \Delta A \cdot 0,662 = \text{mmol/l}; \Delta A \cdot 58,3 = \text{mg/l (340 nm)}$
 $c_{\text{Acetacetat}} = \Delta A \cdot 1,27 = \text{mmol/l}; \Delta A \cdot 130,4 = \text{mg/l (365 nm)}$
 $= \Delta A \cdot 0,678 = \text{mmol/l}; \Delta A \cdot 69,2 = \text{mg/l (340 nm)}$.

Ist $\Delta A_{\text{Acetacetat}}$ größer als 0,200 (365 nm) bzw. 0,400 (340 nm),
wird der Harn 1:10 mit Wasser verdünnt und die Bestimmung
mit 0,5 ml dieser Verdünnung wiederholt (Ergebnis $\times 10$).

Ist $\Delta A_{\text{Pyruvat}}$ größer als 0,400 (365 nm) bzw. 0,800 (340 nm),
so wird vor Zugabe von *D*-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase
nochmals 0,05 ml NADH-Lösung (2) zugegeben.

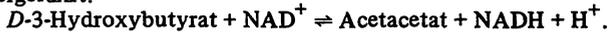
Variationskoeffizient und Abweichung bei Wiederfindung im
unteren Konzentrationsbereich gesunder Kinder: Pyruvat
0,023 mmol/l (2 mg/l) $\pm 14\%$, Acetacetat 0,049 mmol/l
(5 mg/l) $\pm 8\%$.

Werte gesunder Kinder (7–15 Jahre, $n = 20$), gemessen im 24-
h-Harn: Pyruvat $0,035 \pm 0,013$ mmol ($3,1 \pm 1,2$ mg), Acetace-
tat $0,060 \pm 0,031$ mmol ($6,1 \pm 3,2$ mg).

Bestimmung von *D*(-)-3-Hydroxybutyrat

Prinzip

D-3-Hydroxybutyrat wird durch Nicotinamid-adenin-dinucleotid
(NAD) mittels *D*-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase in Acetacetat
übergeführt.



Die Zunahme der NADH-Konzentration ist proportional der
D-3-Hydroxybutyrat-Konzentration. NADH ist Meßgröße und
wird aufgrund seiner Absorption bei 365 nm (340 nm) bestimmt.

Geräte und Reagenzien

Beckman-Photometer (Spectrophotometer ACTA III und V);
Wellenlänge: 365 und 340 nm, OS-bzw. Quarz-Küvetten: 1 cm
Schichtdicke; Temperatur 37° C; Messung gegen Luft.

1. Tris-Puffer (0,3 mol/l; pH = 9,0; 0,25 mol/l Hydrazinium-
hydroxid): 3,63 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan in
80 ml Wasser lösen, 5,2 ml Hydraziniumhydroxid (etwa
240 g/l) zugeben, mit etwa 1 mol/l Salzsäure auf pH 9,0 ein-
stellen (Glaselektrode) und auf 100 ml mit Wasser auffüllen.
2. Nicotinamid-adenin-dinucleotid-Lösung (50 mmol/l NAD^+):
40 mg NAD^+ in 1 ml Wasser lösen.
3. *D*-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (5 g/l).

Reagenzien: 2 u. 3 Fa. Boehringer Mannheim; sonst Fa. Merck,
Darmstadt.

Durchführung

Filterieren des Harnes durch doppeltes Kohlefilter. (Die Filtra-
tion ist ohne Einfluß auf die Konzentration des gemessenen
D-3-Hydroxybutyrats). Es wird ein Reagenzien-Leerwert mit
Wasser angesetzt. Die hierbei nach *D*-3-Hydroxybutyrat-Dehy-
drogenase-Zugabe auftretende Absorptionsdifferenz ist von der
mit der Probe erhaltenen abzuziehen.

In die Küvette werden pipettiert:

Puffer (1)	2,0 ml
Harn	0,2 ml
NAD^+ (2)	0,1 ml

Mischen und Ablesen von Absorption A_1 .

Mit dem Plastikspatel wird dann

D-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (3) 0,02 ml
eingemischt, nach 30–40 min Absorption A_2 abgelesen.

$$A_2 - A_1 = \Delta A.$$

In den seltenen Fällen, in denen nach Zugabe von *D*-3-Hydroxy-
butyrat-Dehydrogenase eine Trübung auftritt, wird einem neuen
Ansatz statt NAD^+ sofort *D*-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase

zugesezt, die Trübung abzentrifugiert und die Reaktion an-
schließend mit NAD^+ gestartet.

Auswertung

$c_{D\text{-}3\text{-Hydroxybutyrat}} = \Delta A \cdot 3,52 = \text{mmol/l}; \Delta A \cdot 366 = \text{mg/l}$
(365 nm)
 $= \Delta A \cdot 1,87 = \text{mmol/l}; \Delta A \cdot 194 = \text{mg/l}$
(340 nm).

Ist $\Delta A_{D\text{-}3\text{-Hydroxybutyrat}}$ größer als 0,250 (365 nm) bzw.
0,500 (340 nm), wird der Harn 1:10 mit Wasser verdünnt und
die Bestimmung mit 0,2 ml dieser Verdünnung wiederholt (Er-
gebnis $\times 10$).

Variationskoeffizient und Abweichung bei Wiederfindung
(unterer Konzentrationsbereich = 0,077 mmol/l (8 mg/l)): $\pm 7\%$.
24-h-Harnwerte gesunder Kinder (7–15 Jahre, $n = 20$):
D-3-Hydroxybutyrat $0,132 \pm 0,061$ mmol ($13,8 \pm 6,4$ mg).

Diskussion

Die bisher angewandten *chemischen* Methoden zur Be-
stimmung von Acetacetat und *D*-3-Hydroxybutyrat im
Harn sind unspezifisch, aufwendig und zum Teil wenig
empfindlich (7, 8). Durch Isolierung und Reinigung der
D-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase ist es möglich, Acet-
acetat und *D*-3-Hydroxybutyrat enzymatisch zu bestim-
men (1–3). Die für die Bestimmung im Blut ausgearbei-
teten Methoden sind genau und nahezu spezifisch (2,
5–7). Die hier angegebene Methodik ist für die Messung
der beiden Substanzen im Harn abgewandelt. Sie ist auf
die Praxis zugeschnitten, leicht zu handhaben, reprodu-
zierbar und genügend genau. Schwierigkeiten durch Trü-
bung des Harnes lassen sich durch das in der Methodik
beschriebene Vorgehen leicht beheben.

Im Harn enthaltenes Pyruvat reagiert quantitativ mit
NADH in Gegenwart von Lactat-Dehydrogenase ab und
beeinflusst die Bestimmung von Acetacetat nicht. Lactat
stört die *D*-3-Hydroxybutyrat-Bestimmung im Harn auch
in einer gegenüber *D*-3-Hydroxybutyrat 50-fach höheren
molaren Konzentration nicht. Auch *D*-Fructose- und
Sorbit-Konzentrationen im Harn, die bereits jenseits der
bei oraler Zufuhr zu erwartenden (5 g/l = 27,8 mmol/l
bzw. 27,4 mmol/l) liegen, beeinflussen die Bestimmung
von Acetacetat und *D*-3-Hydroxybutyrat (0,2 mmol/l)
nicht. Zusatz von *D*-Galaktose (5 g/l Harn = 27,8 mmol/l)
führt aber bei einem der Norm entsprechenden *D*-3-
Hydroxybutyrat-Gehalt des Harnes zu überhöhten *D*-3-
Hydroxybutyrat-Werten ($\approx + 70\%$), während die Acet-
acetat-Werte unbeeinflusst bleiben. Zusatz von *D*-Glucose
(bis 50 g/l Harn = 278 mmol/l) stört die Bestimmung
beider Substanzen nicht. Höhere bei Diabetes mellitus
vorkommende *D*-Glucose-Konzentrationen (um 100 g/l),
die für *D*-3-Hydroxybutyrat leicht überhöhte Werte er-
geben würden, lassen die Reaktion deshalb unbeein-
flußt, weil die mit einer hohen Harnzucker-Konzentra-
tion verbundene Erhöhung der Ketonkörper-Konzentra-
tion eine Verdünnung des Harnes mit Wasser notwendig
macht. Zusatz von Rinderserum-Albumin (bis zu 2 g/l
Harn) oder von menschlichem Serum entsprechenden
Eiweißgehaltes ist ohne Einfluß auf den durch hohe Ei-
weißkonzentration (Blut) störbaren Acetacetat-Nachweis.

Über Störungen der Methodik durch Pharmaka liegen noch keine Beobachtungen vor.

Angaben über Normalwerte der Ketonkörper im Harn von Kindern fehlen. Die im 24-Stunden-Harn gemessenen Acetacetat- und D-3-Hydroxybutyrat-Werte der untersuchten Kinder liegen im Bereich der von Wildenhoff (9, 10) mit ähnlicher Methodik bei Erwachsenen

bestimmten Werte. Die Angaben über die mit sehr unterschiedlichen chemischen Methoden gemessenen Normalwerte Erwachsener differieren untereinander innerhalb so weiter Grenzen (8, 11–16), daß eine Übereinstimmung mit den enzymatisch bestimmten Werten nicht generell vorhanden ist.

Literatur

1. Krebs, H. A., Mellanby, J. & Williamson, D. H. (1962), *Biochem. J.* **82**, 96–98.
2. Williamson, D. H., Mellanby, J. & Krebs, H. A. (1962), *Biochem. J.* **82**, 90–96.
3. Berry, M. N., Williamson, D. H. & Wilson, W. B. (1965) *Biochem. J.* **94**, 17c–19c.
4. Bergmeyer, H. U., Gawehn, K., Klotzsch, H., Krebs, H. A. & Williamson, D. H. (1967), *Biochem.* **102**, 423–431.
5. Mellanby, J. & Williamson, D. H. (1970), in *Methoden der enzymatischen Analyse* (Bergmeyer, H. U., ed.) 1776–1779, Verlag Chemie, Weinheim.
6. Williamson, D. H. & Mellanby, J. (1970), in *Methoden der enzymatischen Analyse* (Bergmeyer, H. U., ed.) 1772–1775, Verlag Chemie, Weinheim.
7. Bergmeyer, H. U. & Bernt, E. (1965), *Enzymol. Biol. Clin.* **5**, 65–76.
8. Passmore, R. (1961), *Lancet* **I**, 839–843.
9. Wildenhoff, K. E. (1975), *Acta Med. Scand.* **198**, 127–133.
10. Wildenhoff, K. E., Dalsager, H. H. & Schwartz, N. (1969), *Nord. Med.* **82**, 1201–1208.
11. Drewes, P. A. (1974), in *Clinical chemistry. Principles and technics* (Henry, R. J., Cannon, D. C. & Winkelman, J. W., eds.) 1354–1369, Harper & Row, Hagerstown, Maryland, 2nd ed., New York, Evanston, San Francisco, London.
12. Hübner, G., Voss, Ch. & Hartmann, R. (1974), *Z. Ges. Inn. Med.* **29**, 45–51.
13. Johnson, R. E., Sargent, F & Passmore, R. (1958), *Q. J. Exp. Physiol.* **43**, 339–344.
14. Levey, St., Balchum, O. J., Medrano, V. & Jung, R. (1964), *J. Lab. Clin. Med.* **63**, 574–584.
15. Passmore, R. & Johnson, R. E. (1958), *Q. J. Exp. Physiol.* **43**, 352–361.
16. Sargent, F., Johnson, R. E., Robbins, E. & Sawyer, L. (1958), *Q. J. Exp. Physiol.* **43**, 345–351.

Prof. Dr. W. Tolckmitt
Zentrum f. Kinderheilkunde
Feulgenstr. 12
6300 Gießen

