

Ketonkörper im postmortalen Blut*

L. HANSSON, K. LAIHO und U. UOTILA

Institut für gerichtliche Medizin der Universität Helsinki
(Vorstand: Prof. Dr. UNTO UOTILA)

Eingegangen am 1. Februar 1966

Die Diagnostizierung der Zuckerkrankheit im postmortalen Material bereitet nicht selten Schwierigkeiten, weil der Blutzuckerwert nur dann als zuverlässig gelten kann, wenn die Blutprobe innerhalb von 2 Std nach dem Tode genommen worden ist (HILL, 1941; NAUMANN, 1950). Wir haben in suspekten Fällen daher in unserem Labor den Gehalt an Ketonkörpern im Blut bestimmt, wobei die Methode von HANSEN (1959) befolgt wurde. Diese Methode hat wie auch die anderen kolorimetrischen Verfahren (LYON und BLOOM, 1958; AHOLA und SOMERSALO, 1963) den Nachteil, daß Äthanol die gleiche positive Reaktion gibt wie die Ketonkörper. Bei der Oxydierung wird Äthanol zu Acetaldehyd umgewandelt, das sowohl mit Furfurol wie auch mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin reagiert. Auch HAGENFELDTS und BLOMSTRANDS (1965) Methode schien uns für die Routinearbeit mit Blut nicht recht geeignet. Es sind auch gaschromatographische Untersuchungen des Acetons im Blut ausgeführt worden (CADMAN, 1963), die jedoch nur die Acetongehalte, nicht aber den gesamten Gehalt an Ketonkörpern ergeben. Dieser letztere kann jedoch bedeutsam sein, weil die verschiedenen Ketonkörper leicht ineinander übergehen, auch wenn das Blut im Reagensglas aufbewahrt wird.

Um diese Quellen irreführender Ergebnisse zu eliminieren, in unserem Material meist Äthanol, haben wir HANSENS Methode modifiziert. Acetessigsäure und β -Hydroxy-Buttersäure werden mit Dichromatschwefelsäure zu Aceton oxydiert. Das ursprünglich vorhandene und das so zustande gekommene Aceton werden abdestilliert, und das Destillat wird durch erneute Destillation konzentriert. Aus diesem Destillat wird nun der Acetongehalt gaschromatographisch bestimmt. Das Acetaldehyd wirkt hierbei nicht störend, da dieses einen Gipfel für sich bildet.

Material

Unser Untersuchungsmaterial läßt sich in drei Gruppen einteilen, nämlich eine Gruppe mit Blut von lebenden Diabetikern mit Ketonkörpern im Urin oder

* Herrn Prof. Dr. J. VARTIAINEN von der II. Medizinischen Klinik und Herrn Prof. Dr. N. HALLMAN von der Kinderklinik der Universität Helsinki danken wir bestens dafür, daß sie uns Material für unsere Untersuchung zur Verfügung gestellt haben. Die vorliegende Arbeit ist finanziert worden mit Mitteln von der Sigrid Juselius-Stiftung.

von Diabetikern im Koma oder Präkoma. Die Blutprobe wurde in Reagensgläschchen mit Heparin getan, die sofort verschlossen und, sofern die Probe nicht unmittelbar analysiert wurde, tiefgekühlt verwahrt wurden.

Der andere Teil des Materials besteht aus Blut, das bei gerichtsmedizinischen Obduktionen genommen wurde, und zwar unabhängig von Todesursache und Krankheiten. Die Probe wurde zumeist aus der Vena axillaris genommen. Dieser Teil des Materials wurde nochmals in zwei Gruppen unterteilt, nämlich in diabetes-suspekte Fälle sowie in solche, wo kein diesbezüglicher Verdacht bestand.

Methoden

Die Blutglukose wurde nach der Methode von HYVÄRINEN und NIKKILÄ (1962) mit o-Toluidin bestimmt.

Ketonkörperbestimmung. Reagens, p.a. Qualität.

1. Natriumwolframat, 10%ige wäßrige Lösung.

2. Schwefelsäure, 0,66 n. Wird hergestellt aus p.a. Schwefelsäure und wird folgendermaßen behandelt, um reduzierende Stoffe zu eliminieren: 250 ml Säure werden in einen 1,5 Liter-Kolben gemessen, 75 ml dest. Wasser werden zugesetzt und mindestens 30 min lang gekocht, bis das Volumen wieder 250 ml ist.

3. Dichromatschwefelsäurerereagens. 80 ml Schwefelsäure, spez. Gewicht 1,84, wird mit 152 ml dest. Wasser vermischt. 80 ml 5%ige Kaliumdichromatlösung in Wasser werden zugesetzt und gekocht, bis das Volumen 240 ml beträgt.

4. Standardlösungen. 10 mg Aceton/100 ml dest. Wasser. Wird täglich frisch hergestellt. 150 mg Na- β -Hydroxy-Butyrat/100 ml dest. Wasser.

Alle Lösungen wurden vor der Verwendung auf etwa 10° C abgekühlt.

Apparatur. 1. Destillationsapparat nach HANSEN (1959).

2. Gas-Chromatograph, Perkin-Elmer, Fraktometer F 6, mit Flammenionisierungsdetektor und Stickstoff als Trägergas mit einer Strömungsgeschwindigkeit von 94 ml/min. Kolonne, Perkin-Elmer R (Poly-Propylenglykol UCON-Oil-LB 550-X, 15% Celite 550, 60/100 mesh). Temperatur: Verbrennungskammer 90° C, Kolonne 145° C.

Ausführung: Es wird in ein Reagensgläschchen pipettiert und kräftig geschüttelt:
5 ml dest. Wasser
2 ml Blut
2 ml Wolframatlösung
2 ml Schwefelsäure, 0,66 N.

In der Standardprobe wird 1 ml Wasser durch Standardlösung ersetzt. Das Glas wird mit ca. 4300 RCF zentrifugiert.

5,5 ml von der Supernatantlösung werden in den Destillationskolben pipettiert. 10 ml kaltes dest. Wasser und 3 ml Dichromatreagens werden zugesetzt. Die Flüssigkeit wird fast gänzlich abdestilliert. Dieses Destillat wird nochmals destilliert, und der erste Milliliter wird in ein gekühltes Reagensglas getan, das sofort verschlossen wird. Wenn dieses zweite Destillat nicht unmittelbar im Gaschromatograph analysiert werden kann, wird es tiefgekühlt aufbewahrt.

Für die gaschromatographische Analyse werden 8 μ l benutzt, die mit einer Hamilton-Spritze eingespritzt werden.

Man kann auch eine fraktionierte Destillation der Ketonkörper vornehmen. Die Proteine werden wie bei der Totalbestimmung ausgefällt. Bei der Destillation wird das Dichromatreagens weggelassen, und die Temperatur darf nicht bis 100° C ansteigen. Dabei erhält man freies Aceton. Dann wird die Temperatur auf 100° C erhöht und die nächste Probe destilliert, wobei Aceton und Acetessigsäure erhalten werden. Zum Schluß wird eine Probe mit Dichromat destilliert. Indem man nun

den Acetongehalt vom Aceton plus der Acetessigsäure subtrahiert, erhält man die Acetessigsäurequantität, und durch Subtraktion des Acetons plus der Acetessigsäure von der totalen Ketonkörpermenge erhält man den β -Hydroxybuttersäuregehalt.

Von jedem zu analysierenden Blut muß mindestens eine Standarddestillation ausgeführt werden, entweder mit Aceton oder mit β -Hydroxybuttersäure. In unserem Laboratorium haben wir oft eine von jeder Standardlösung destilliert. Dabei haben wir feststellen können, daß unter diesen Verhältnissen die β -Hydroxybuttersäure vollständig in Aceton übergeht.

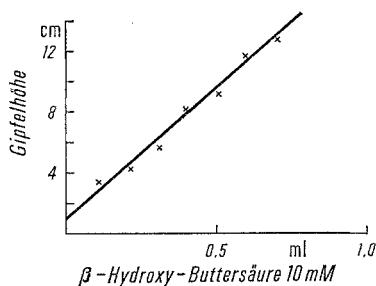


Abb. 1. Verhältnis zwischen der Höhe des Acetongipfels und der zugesetzten Menge β -Hydroxybuttersäure

den, die Basis war unter unseren Versuchsverhältnissen so gut wie konstant (Abb. 1).

Bei der Berechnung des Resultats ist folgende Formel angewandt worden:

$$\frac{(\text{Aceton mg- \% in der Standardlösung}) \times (\text{Höhe des Blutgipfels})}{(\text{Höhe des Standardgipfels} - \text{Höhe des Blutgipfels}) \times 2} = \text{mg- \% Aceton}.$$

Die gleiche Formel wurde zur Berechnung des β -Hydroxybuttersäuregehaltes benutzt, der in dieser Arbeit stets in mg-%, berechnet als Aceton, angegeben ist.

Ergebnisse und Diskussion

Unser Material kann in drei Gruppen eingeteilt werden. Gruppe I besteht aus Blut von lebenden Diabetikern. Von den 30 Proben wurde Fraktionierung der Ketonkörper in 17 Fällen ausgeführt. Die Resultate sind aus Tabelle 1 ersichtlich.

Aus der Tabelle geht hervor, daß der Ketonkörpergehalt weitgehend variiert und unabhängig ist vom Glukosegehalt im Blut, mit Ausnahme von extrem hohem Ketonkörpergehalt, dermit sehr hohem Glukosegehalt des Blutes einhergeht. Ferner geht aus der Fraktionierung hervor, daß Aceton und Acetessigsäure durchschnittlich 40% von den Ketonkörpern ausmachen.

In 13 Fällen wurde nur die Gesamtmenge der Ketonkörper im Blut bestimmt, und als Mittelwert der Gesamtmenge im ganzen Diabetesmaterial ergab sich 23 mg-%, ausgedrückt als Aceton.

In den 28 untersuchten Fällen war die Ausbeute an zugesetztem Aceton durchschnittlich 92%, wobei die Grenzwerte bei 120% und 75% lagen.

Bei der Berechnung des Acetongehalts aus dem Gaschromatogramm braucht nur die Höhe des Gipfels in Betracht gezogen zu wer-

Die postmortale Kontrollgruppe bestand aus 63 Fällen. In dieser Gruppe wurde nur die Gesamtmenge der Ketonkörper bestimmt, und wir erhielten einen Mittelwert von 1,5 mg-%, ausgedrückt in Aceton, wobei die Grenzwerte 0,5 mg-% und 3,4 mg-% betragen. In der Kontrollgruppe sind auch Fälle von Diabetes unter ärztlicher Behandlung enthalten. Der Ketonkörpergehalt im Blut wich in diesen Fällen von der übrigen Kontrollgruppe nicht ab.

Tabelle 1. *Fraktionierung der Ketonkörper aus Diabetikerblut*

Aceton + Acetessigsäure mg-%	% vom totalen Ketonkörper- gehalt	β -Hydroxy- buttersäure mg-%	Totale Keton- körper mg-%	Glukose mg-%
4,8	41	6,8	11,6	237
2,2	25	6,6	8,8	275
1,3	33	2,6	3,9	245
0,9	28	2,3	3,2	269
13,1	24	42,5	55,6	404
9,6	38	15,4	25,0	310
7,9	47	8,7	16,6	390
7,1	53	6,3	13,4	387
6,2	52	5,7	11,9	508
2,7	38	4,4	7,1	312
1,6	35	2,9	4,5	317
50,4	50	50,2	100,6	1108
34,0	37	58,7	92,7	1242
2,4	21	9,1	11,5	—
1,9	58	1,4	3,3	296
54,0	60	36,0	90,0	—
23,4	37	39,5	62,9	67

Diese Werte stimmen mit den früher publizierten überein. AHOLA und SOMERSALO (1963) geben einen Mittelwert von 1,45 mg-% an, und GREENBERG und LESTER (1944) entsprechend 0,80—2,40 mg-%, ausgedrückt in Aceton. HANSEN (1959) hat Ratten untersucht und stellte fest, daß ein normales Tier ca. 1,45 mg-% Ketonkörper im Blut hat, bei schwach ketogener Diät ca. 2,50 mg-% und bei leichtem Alloxan-diabetes ca. 4,30 mg-%, ausgedrückt in Aceton.

Unser Material zeigt, daß der Ketonkörpergehalt im postmortalen Blut unabhängig ist vom postmortalen Intervall, vom Alter des Verstorbenen und von der Todesursache. CADMAN (1963) fand erhöhten Acetongehalt in einem Fall von Aspirinvergiftung. Unser Material enthält auch 10 Arzneimittelvergiftungen, alle jedoch durch Barbitursäure-derivate. In diesen Fällen war der Ketonkörpergehalt normal, und auch bei Vergiftung mit Stoffen wie Äthylenglykol, Äthanol oder Kohlenmonoxyd kam keine Erhöhung vor.

Die andere postmortale Gruppe, Fälle also, wo Diabetesverdacht bestand, weist höheren Ketonkörpergehalt auf, wie aus der folgenden Tabelle hervorgeht (Tabelle 2).

Tabelle 2. *Ketonkörper im Blut in Fällen mit Diabetesverdacht, bestimmt an Blutproben aus der Achselvene*

Postmortal- intervall	Aceton + Acet- essigsäure mg-%	β -Hydroxy- buttersäure mg-%	Gesamtgehalt an Ketokörpern mg-%	Glukose mg-%
4 Tage	28,0	108,0	136,0	705
5 Tage	2,4	12,3	14,7	40
4 Tage	0,4	2,6	3,0	40
3 Tage	0,4	1,2	1,6	184
3 Tage	0,4	2,1	2,5	73
3 Tage	1,9	2,9	4,8	34
20 Std	0,5	0,7	1,2	94
3 Tage	0,8	5,8	6,6	4
5 Tage	0,4	3,0	3,4	24
2 Tage	1,0	2,0	3,0	—
4 Tage	2,1	4,7	6,8	0
3 Tage	0,9	9,0	9,9	36
6 Tage	0,6	24,5	25,1	—
2 Tage	31,2	56,6	87,8	507
1 Tag	0,6	1,3	1,9	77
3 Tage	2,4	0,9	3,3	12
4 Tage	0,3	0,3	0,6	265
2 Tage	0,4	1,3	1,7	21
?	4,2	8,2	12,4	5
5 Tage	0,5	1,8	2,3	22
4 Tage	2,8	10,6	13,4	0

Aufgrund der Resultate, die wir bei den Untersuchungen der Ketonkörper nach dieser Methode erhalten haben, sind wir zu der Ansicht gekommen, daß Fälle mit einem postmortalen Gesamtketonkörpergehalt von mehr als 5 mg-% Aceton berechnet den Verdacht auf Diabetes rechtfertigen. Unseres Erachtens ist die Methode für unsere Zwecke genügend genau, denn sie eliminiert eine große Fehlerquelle, die Einwirkung von Äthanol, ohne jedoch bloß auf die Acetonbestimmung begrenzt zu sein.

Als ein interessantes Beispiel sei folgender Fall erwähnt: Der Verstorbene war tot in einem Schuppen im Hafen aufgefunden worden. Es war bekannt, daß er an Zuckerkrankheit litt und Insulin benutzte. Gifte konnten keine nachgewiesen werden, und der einzige Obduktionsbefund war eine alte Tuberkulose. Der Gesamtgehalt an Ketonkörpern betrug 136 mg-%, und der Blutglukosegehalt 705 mg-%. Mit aller Wahrscheinlichkeit hatte der Verstorbene es unterlassen, Insulin zu nehmen, und die Todesursache war Diabetes.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Methode für die Bestimmung des Ketonkörpergehalts im Blut beschrieben. Acetessigsäure und β -Hydroxybuttersäure werden mit Dichromatschwefelsäure unter Erhitzung in Aceton umgewandelt, welches dann quantitativ mit Hilfe der Gaschromatographie bestimmt wird. Der Ketonkörpergehalt im Blut von lebenden Diabetikern, von Toten mit Diabetesverdacht und von Toten ohne Verdacht auf Diabetes ist nach dieser Methode bestimmt worden.

Summary

A new method is described for the determination of the ketone body content of the blood. Acetoacetic acid and β -hydroxybutyric acid were converted to acetone with dichromate-sulphuric acid under heating. Quantitative determination of the acetone was then made by gas chromatography. The ketone body content in the blood of living diabetics, of dead subjects with suspected diabetes, and of dead subjects without suspicion of diabetes was determined by this method.

Literatur

- AHOLA, T., u. O. SOMERSALO: Ann. Med. exp. Fenn. **41**, 237 (1963).
CADMAN, W. J.: Methods of forensic science, vol. II, p. 127 (ed. F. LUNDQUIST) London-New York: John Wiley & Sons 1963.
GREENBERG, L. A., and D. LESTER: J. biol. Chem. **154**, 177 (1944).
HAGENFELDT, L., u. R. BLOMSTRAND: Acta chem. scand. **19**, 251 (1965).
HANSEN, O.: Scand. J. clin. Lab. Invest. **11**, 259 (1959).
HILL, E. V.: Arch. Path. **32**, 452 (1941).
HYVÄRINEN, A., u. E. A. NIKKILÄ: Clin. chim. Acta **7**, 140 (1962).
LYON, J. B., and W. L. BLOOM: Canad. J. Biochem. **36**, 1047 (1958).
NAUMANN, H. N.: Amer. J. clin. Path. **20**, 314 (1950).

Prof. Dr. UNTO UOTILA
Snellmaninkatu 10
Helsinki 17, Finnland