

Kurzmitteilung

α -Amylase: Vergleich zweier Bestimmungsmethoden

A. Skurk, L. Thomas

Zentrallabor, Krankenhaus Nordwest, Frankfurt

Zur Bestimmung der α -Amylase (α -1,4-Glucan-4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1) sind eine Vielzahl von Methoden mit unterschiedlichen Substraten beschrieben worden (1). Dabei war die Entwicklung definierter Substrate mit der nötigen Spezifität für α -Amylase Hauptziel methodischer Verbesserungen (2). Es hat sich gezeigt, daß die durch α -Amylase spaltbaren Oligosaccharide aus mehr als 6 Glucosemolekülen bestehen sollten. Neuere Substrate sind daher mit chromogenen Indikatorgruppen (p-Nitrophenyl-) substituierte Maltoheptaoside, bei denen nach Spaltung durch α -Amylase die Geschwindigkeit der Indikatorfreisetzung gemessen wird. Diese Reaktion sollte die Bedingungen einer Kinetik 0. Ordnung erfüllen. Die bisher bekannten Testsysteme unterscheiden sich in der Stöchiometrie der Abbaureaktion, so daß Korrekturfaktoren zur Berechnung der Amylaseaktivität in U/l erforderlich sind (3).

Zwei neu entwickelte Substrate legen es nahe, die Praktikabilität der Testsysteme zu prüfen und die Ergebnisse zu vergleichen. Sowohl die Amylase CT-Methode wie auch Amylase EPS (Tab.1) verwenden blockierte Maltoheptaoside als Substrat. Der Schutz der Moleküle am nicht reduzierenden Ende durch Benzyliden- bzw. Äthylidengruppen führt dazu, daß nur Endo- α -Amylase die Glucosekette spalten kann, die Begleitenzyme α -Glucosidase und Glucoamylase dagegen nicht, da sie als Exo-Amylasen nur am nicht reduzierenden Ende angreifen können. Damit wird die Eingangsreaktion spezifisch, und das Substrat ist gegenüber unspezifischem Abbau stabil.

Der folgende Abbau zu Glucose und der Indikatorsubstanz p-Nitrophenol wird durch α -Glucosidase, die bevorzugt 2er und 3er Bruchstücke (p NP-G₂, p NP-G₃)

angreift und Glucoamylase, die vorwiegend auf länger-kettige Glucosemoleküle wirkt (p NP-G₄), erreicht. Fehlt im Testsystem Glucoamylase, so ist der Abbau des 4er Bruchstückes erschwert. Die Stöchiometrie der Reaktion ist damit gestört (Amylase EPS).

Material und Methode

In 138 Patientenserien wurde mit den Testsystemen Amylase CT (Human) und Amylase EPS (Boehringer Mannheim) die Aktivität der α -Amylase bestimmt. Die Messung erfolgte nach Programmen der Reagenzienhersteller am Hitachi 705. In Serie und von Tag zu Tag wurde die Präzision ermittelt.

Ergebnisse und Diskussion

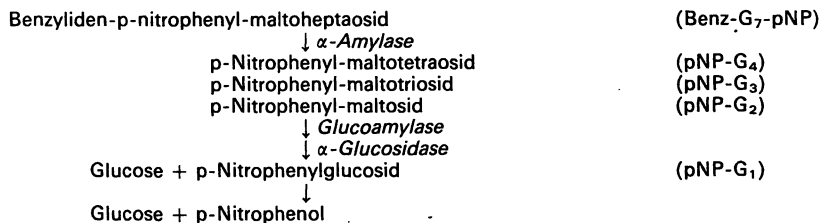
Die Korrelation der Werte beider Methoden (Abb.1) ist sehr gut ($r = 0,999$). Der Anstieg der Korrelationsgeraden liegt mit 2,94 nahe dem Wert, der mit 3,0 als Stöchiometriekoeffizient für die Amylase PNP-Methode (Boehringer Mannheim) angegeben wird (4). Der Faktor verbirgt sich auch hinter den unterschiedlichen Normbereichen beider Methoden:

Amylase CT bis 40 U/l bei 25°
Amylase EPS bis 120 U/l bei 25°.

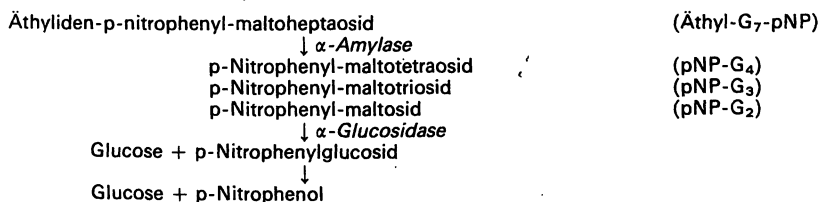
Dieser Sachverhalt bedeutet entweder, daß sich der Mechanismus der Abbaureaktion durch das Fehlen der Glucoa-

Tab. 1: Vereinfachtes Schema des Substratabbaus

Amylase CT (Human, Taunusstein)



Amylase EPS (Boehringer, Mannheim)



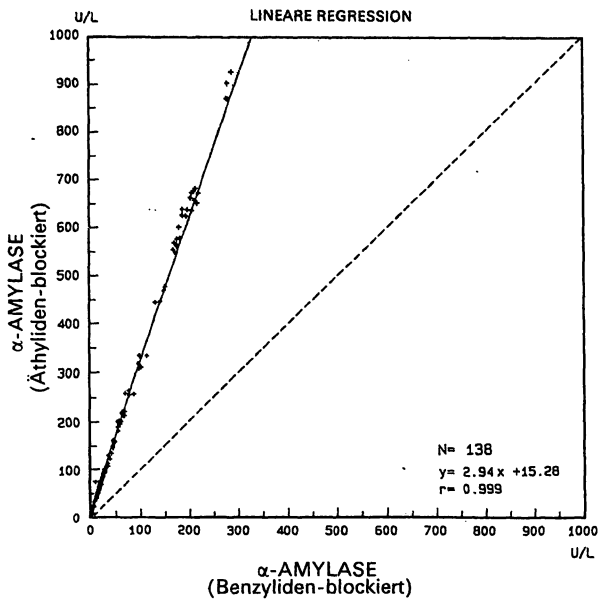


Abb. 1: Vergleich Amylase CT – Amylase EPS

mylase im EPS-System gravierend unterscheidet, oder daß der alte Normbereich der PNP-Methode Vorrang vor der neuen Stöchiometrie hat.

Die Präzision beider Methoden (Tab.2 und 3) in Serie und von Tag ist gut; sie erreicht die für kinetische Messungen am Hitachi 705 geltenden Werte. Unterschiede zwischen beiden Testsystemen gibt es in der Stabilität der Reagenzien. Die Abb.2 zeigt den Extinktionsverlauf des Leerwertansatzes über einen Zeitraum von 20 Tagen. Der deutlich stärkere unspezifische Abbau des EPS-Substrates geht zu Lasten des Meßbereiches, auf die Messung normaler oder mäßig erhöhter Aktivitäten hat er keinen Einfluß.

Die größere Stabilität des Benzyliden-geschützten Substrates hat möglicherweise in der Größe der Schutzgruppe ihre Ursache. Gegenüber älteren Amylase-Systemen ist der Zugewinn an Stabilität der geschützten Maltoheptaoside ein deutlicher Vorteil. Die Lag-Phase der Abbaureaktion ist kurz, die Methoden sind gut automatisierbar und ihre Linearität ist so groß, daß Amylase in unverdünntem Urin bestimmt werden kann. Der vollständige Abbau des Benzyliden-Maltoheptaosids (Amylase CT) ergibt ein hohes Meßsignal, so daß niedrige Aktivitäten ausreichend genau in kurzer Zeit bestimmt werden können. Damit sind die Voraussetzungen erfüllt, die an ein Referenzsubstrat gestellt werden (5).

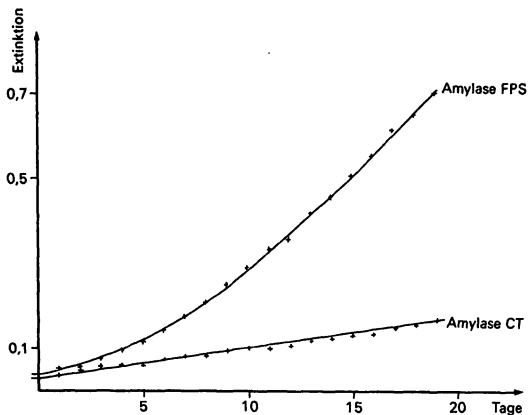


Abb.2: Extinktionsänderung der Leerwertreagenzien im Verlauf von 20 Tagen

Tab. 2: Präzision von Serie zu Serie, gemessen an 20 Tagen

Amylase CT	\bar{x}	(U/l)	49,9	206	40,6
	VK	(%)	2,7	1,6	2,1
Amylase EPS	\bar{x}	(U/l)	152	622	126
	VK	(%)	2,0	1,7	1,5

Tab. 3: Präzision in Serie, gemessen an 20 Proben

Amylase CT	\bar{x}	(U/l)	49,6	209	40,2
	VK	(%)	1,5	0,8	1,1
Amylase EPS	\bar{x}	(U/l)	153	637	127
	VK	(%)	0,5	0,5	0,6

Schrifttum:

1. LORENTZ, K.: J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17, 499–504 (1979).
2. LORENTZ, K.: J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 21, 463–471 (1983).
3. MÜLLER-MUTHESIUS, R.: Internist 23, 575–578 (1982).
4. HÄGELE, E. O., SCHAICH, E., RAUSCHER, E., LEHMANN, P., BÜRK, H., WAHLEFELD, A. W.: Clin. Chem. 28, 2201–2205 (1982).
5. WAHLEFELD, A. W.: Workshop Report: α -Amylase PNP. Boehringer Mannheim 1981, S.88.

Anschrift für die Verfasser:

Dr. Axel Skurk
Krankenhaus Nordwest
Steinbacher Hohl 2–26
6000 Frankfurt 90