J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 17, 1979, pp. 709–716

Kontinuierlich messende Verfahren zur Aktivitätsbestimmung der α -Amylase im Serum Vergleich zu amyloklastischen und chromolytischen Methoden

Von H. Meier, E. Henkel und H. Dankert¹⁾²⁾

Institut für Klinische Chemie, Abt. II, der Medizinischen Hochschule Hannover, Zentrallaboratorium am Krankenhaus Oststadt

(Eingegangen am 10. Juli/2. Oktober 1979)

Dem Gedenken an Professor Dr. Gábor Szász gewidmet

Zusammenfassung: In 57 Patientenseren mit normalem bis stark erhöhtem α -Amylasegehalt wurden vergleichende Bestimmungen der Enzymaktivität mit vier enzymatisch-kinetischen Testkombinationen sowie fünf herkömmlichen konfektionierten Verfahren durchgeführt. Die Ergebnisse wurden durch Regressionsanalysen ausgewertet.

Die Spezifität der Methoden wurde mit Humanpankreas-, Humanspeichel- und Schweinepankreasamylaseproben untersucht. Die Störanfälligkeit der kinetischen Verfahren ist gering. Die Problematik der Umrechnung von Aktivitätseinheiten und Normalbereichen wird diskutiert. Die UltraZyme- und die Monamyl neu-Methode wurden wegen guter Praktikabilität und Präzision und großen linearen Bereiches anderen Verfahren überlegen gefunden; ihre Spezifität ist für die Pankreasdiagnostik etwas weniger günstig als die der herkömmlichen Verfahren.

Continuously measuring procedures for the determination of α -amylase in serum. Comparison with amyloclastic and chromolytic methods

Summary: α -amylase has been measured in 57 patients' sera with normal to highly elevated amylase activities. The results obtained with four enzymatic-kinetic test-kits have been compared with those from five conventional marketed procedures. The results are evaluated by regression analysis.

The specificity of the methods was analysed with amylase samples from human pancreas, human saliva and pig pancreas. The susceptibility of the kinetic procedures to interferences is smaller. The problems of conversion of activity units and reference ranges are discussed. The UltraZyme and the Monamyl neu-methods have been found superior to the other procedures because of their good practicability, precision and broad linear range; their specificity for diagnostic purposes in pancreatic diseases is less favourable compared with that of conventional procedures.

Einführung

Die Methoden zur kontinuierlichen Messung der Aktivität der α -Amylase sind wegen ihrer einfachen Handhabung, der Automatisierbarkeit und ihrer auf molaren Umsätzen beruhenden Definition der Enzymaktivität auf großes Interesse bei den Anwendern gestoßen. Da über ihre Spezi-

fität, Störanfälligkeit, Richtigkeit und Präzision erst wenige Ergebnisse vorliegen (1–4), wurden vier konfektionierte kinetische Methoden und fünf ebenfalls im Handel erhältliche Testkombinationen mit Iod-Stärke-Reaktion, bzw. kovalent an Substrat gebundenen Farbstoffen vergleichend untersucht.

¹⁾ Auszugsweise vorgetragen auf der gemeinsamen Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Klinische Chemie und der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie, 29.–31. März 1979, Salzburg (Meier, H., Henkel, E. & Dankert, H. (1979), diese Z., 17, 180).

²⁾ Die Arbeit enthält Daten aus der Dissertation von H. Dankert an der Medizinischen Hochschule Hannover

Material und Methoden

Probenmaterial

Vergleichende Aktivitätsbestimmungen der α -Amylase wurden an 57 Serumproben von Patienten durchgeführt, die sich etwa gleichmäßig über das 10–33-fache der jeweils angegebenen

Tab. 1. Übersicht über die untersuchten Methoden.

Methode	DyAmyl-L	Harleco	Merckotest	Amylochrome
Einheit	SE/100 ml	U/l	U/l	U/l
Ansatzvariante	"Halbmikro"		"Mikro"	
Probenvolumen (ml)	0,05	0,02	0,01	0,05
Meßwellenlänge (nm)	546	623	623	623
Berechnung	$\frac{A_{Pr}}{A_S} \cdot 460$	$\frac{A_B - A_{Pr}}{A_B} \cdot 1800$	$\frac{A_B - A_{Pr}}{A_B} \cdot 610$	$\frac{A_{Pr}}{A_S} \cdot 460$
Substrat	Amylopectin-derivat	Stärke	Amylose	Amyloesederivat
Normalbereich im Serum laut Hersteller	30–180	135–360	50–300	100–310
Verdünnungsgrenze als Vielfaches der Entscheidungsgrenze	3	2,5	1–1,5	6
DM Kosten pro Test	0,87	0,34	0,02	0,82

Normalbereiche bei logarithmischem Aktivitätsmaßstab verteilen (s. Tab. 2). Zur Spezifitätsprüfung wurden affinitätschromatographisch gereinigte (5) Proben von Humanpankreas-, Humanspeichel- und Schweinepankreasamylase eingesetzt,

Methoden

Harleco UltraZyme Plus α -Amyl (American Hospital Supply, Best.-Nr. 64982, 64967)
 Monamyl (Biomed, Chargen-Nr. 7683)
 Monamyl neu (Biomed, Chargen-Nr. 9643)
 Amylase-DS (Beckman, Best.-Nr. 682427)
 Phadebas (Pharmacia, Best.-Nr. 93-986-2-1393-02)
 Amylochrome (Roche, Best.-Nr. 1002)
 DyAmyl-L (Gödecke, Chargen-Nr. 0253027)
 Merckotest α -Amylase (Merck, Best.-Nr. 3301)
 Harleco α -Amyl (American Hospital Supply, Best.-Nr. 81200A, 81200B)

Eine Übersicht über Charakteristika der Methoden und ggf. die in dieser Untersuchung benutzte Variante des Testansatzes gibt Tabelle 1. Die Aktivitätsbestimmungen wurden mit den folgenden Abweichungen nach den Angaben der Hersteller durchgeführt:

Zum Phadebas-Test wurden die Proben ab 3600 U/l (anstelle von 5000 U/l) 1:3 vorverdünnt.

Die Amylase-DS-Methode wurde bei 25 °C (anstatt 30 °C) verwendet.

Geräte

Photometer Eppendorf M 1100 mit Kompensationsschreiber 6511
 Eppendorf Mikrolitersystem

Darstellung der Reaktionsprinzipien

Beim UltraZyme-Verfahren werden von der aus dem als Substrat verwendeten Oligosaccharidgemisch (G_4 bis G_7 (6)) durch α -Amylase abgespaltenen (Reaktion 1) d. Formelschemas) Maltose (und Maltotriose) ausgehend, die Reaktionen 2) bis 4) zur Erzeugung von NADH durchlaufen.

Die nur geringfügig im pH-Wert des Puffers und den Hilfsenzymkonzentrationen verschiedenen Testkombinationen Amylase-DS und Monamyl neu (7,8) setzen als Substrat Maltotetraose (G_4) ein, die durch α -Amylase überwiegend symmetrisch nach Gleichung 5) gespalten wird, wodurch sich die Reaktionen 6), 7) und 4) anschließen.

Das alte Monamyl-Verfahren benutzt Stärke als Substrat. Die neben verschiedenen Oligosacchariden daraus abgespaltene Maltose (Reaktion 8) wird wie bei den letztgenannten Methoden nach den Gleichungen 6), 7) und 4), sowie zur Erhöhung der geringen Empfindlichkeit in der nicht quantitativ ablaufenden Reaktion 9) weiter umgesetzt.

Als Einheit U der α -Amylaseaktivität ist für UltraZyme, Monamyl und Amylase-DS die Bildung von 1 μ mol, für Monamyl neu 2 μ mol Maltose (entspr. Spaltung von 1 μ mol G_4) pro Minute definiert.

Die Methoden Merckotest und Harleco beruhen auf der Abnahme der Farbreaktion der polymeren Substrate (s. Tab. 1) mit Iod nach der Inkubation mit der Probe. Bei den chromolytischen Verfahren sind Farbstoffmoleküle kovalent an unlösliche bzw. fällbare polymere Substrate gebunden, aus denen durch α -Amylase lösliche, Farbstoff tragende Oligosaccharide abgespalten werden.

Ergebnisse und Diskussion

Verteilungsmuster der Ergebnisse bei den einzelnen Verfahren

Für jede Methode sind die Aktivitätsextremwerte, sowie Mittelwert und Median als Maß für die methodenabhängig unterschiedliche Schiefe der Werteverteilung neben den Angaben zur Präzision in Tabelle 2 aufgeführt.

Prüfung der Spezifität

Tabelle 3 gibt die Aktivitäten an, die mit den verschiedenen Methoden in α -Amylasepräparationen gefunden werden, die im Phadebas-Test 1000 U/l ergeben. Während die mit den Zweipunktmethode ermittelten Werte sich für Humanpankreas- und Speichelamylase nicht signifikant unterscheiden, werden mit den kontinuierlich messenden Verfahren in der Speichelenzymprobe deutlich höhere Aktivitäten gefunden als in der aus menschlichem Pankreas.

Die häufig in Kontrollseren enthaltene Schweinepankreasamylase wird durch einige Methoden im Vergleich zu Phadebas empfindlicher, durch andere weniger empfind-

Phadebas	Harleco UltraZyme Plus	Monamyl	Amylase-DS	Monamyl neu
U/l	U/l	U/l	U/l	U/l
		"Mikro"	eig. Modif.	"Mikro"
0,2	0,01	0,02	0,02	0,02
623	334	334	334	334
aus Standardkurve	$\frac{\Delta A}{\text{min}} \cdot 8172$	$\frac{\Delta A}{\text{min}} \cdot 2103$	$\frac{\Delta A}{\text{min}} \cdot 4207$	$\frac{\Delta A}{\text{min}} \cdot 2103$
Stärkederivat	Oligosaccharide G ₄ -G ₁₀	Stärke	Maltotetraose (G ₄)	Maltotetraose (G ₄)
70-300	< 100	4-21	20-110 (30 °C)	6-34
16 (12)	10	10	9	9
0,94	1,38	1,07	(0,83\$)	1,27

lich erfaßt als Amylasen menschlichen Ursprungs. Besonders auffällig ist die hohe Aktivität des tierischen Enzyms im Stärke-Monamyl- und im UltraZyme-Test mit mittleren Oligosacchariden als Substrat und die vergleichsweise niedrige gegenüber Maltotetraose.

Zur Normalbereichsdefinition

Die angegebenen Entscheidungsgrenzen stimmen in ihrer Aussage so wenig überein, daß sie nach proportionaler oder auf Regressionsgleichungen basierender Umrechnung für einige Verfahren (z.B. Merckotest) gut doppelt so hoch

gefunden werden wie für andere (z.B. Phadebas und Dy-Amyl-L). Eine eindeutige Einstufung als normal oder pathologisch ist allerdings, unter anderem bedingt durch das unterschiedliche Isoenzymmuster der Proben, auch mit umgerechneten Normalbereichen nicht möglich.

Regressionsanalyse der Meßergebnisse

Bei der Auswertung durch lineare Regressionsanalyse wurden zwischen den Meßergebnissen der verschiedenen Methoden Korrelationskoeffizienten von 0,9234 (Dy-Amyl-L/Amylase-DS) bis 0,9954 (Amylase-DS/Monamyl

1. Oligosaccharid G _n + H ₂ O	$\xrightarrow[\text{EC 3.2.1.1}]{\alpha\text{-Amylase}}$	Maltose + Oligosaccharid G _{n-2}
2) Maltose + H ₂ O	$\xrightarrow[\text{EC 3.2.1.20}]{\alpha\text{-Glucosidase}}$	2 Glucose
3) Glucose + ATP	$\xrightarrow[\text{EC 2.7.1.1}]{\text{Hexokinase}}$	Glucose-6-phosphat + ADP
4) Glucose-6-phosphat + NAD ⁺	$\xrightarrow[\text{EC 1.1.1.49}]{\text{Glucose-6-phosphat-dehydrogenase}}$	6-Phosphogluconat + NADH + H ⁺
5) Maltotetraose + H ₂ O	$\xrightarrow[\text{EC 3.2.1.1}]{\alpha\text{-Amylase}}$	2 Maltose
6) Maltose + PO ₄ ³⁻	$\xrightarrow[\text{EC 2.4.1.8}]{\text{Maltosephosphorylase}}$	β -Glucose-1-phosphat + Glucose
7) β -Glucose-1-phosphat	$\xrightarrow[\text{EC 2.7.5.1}]{\beta\text{-Phosphoglucomutase}}$	Glucose-6-phosphat
8) Stärke + H ₂ O	$\xrightarrow[\text{EC 3.2.1.1}]{\alpha\text{-Amylase}}$	Maltose + Oligosaccharide
9) 6-Phosphogluconat + NAD ⁺	$\xrightarrow[\text{EC 1.1.1.44}]{\text{6-Phosphogluconat-dehydrogenase}}$	Ribulose-5-phosphat + NADH + CO ₂ + H ⁺

Formelschema: Reaktionsschritte der kinetischen Methoden

Tab. 2. Werteverteilung des Patientenkollektivs, "normierte" Entscheidungsgrenzen nach Regressionsgleichungen des Teilkollektivs (s. Regressionsanalysen) berechnet a) entspr. DyAmyl-L und Phadebas b) entspr. Merckotest, Resultate der Präzisionsbestimmung.

	DyAmyl-L	Harleco	Merckotest	Amylochrome	Phadebas	UltraZyme	Monamyl	Amylase-DS	Monamyl neu
Extremwerte*)	26 2827	97 5683	32 2993	106 7598	50 9975	25 2722	2,8 435	9,2 1350	3,7 631
Mittelwert des Kollektivs*)	790	872	532	1320	1510	405	73,6	236	109
Median*)	585	507	349	853	1051	233	40,5	139	67,0
"normierte" Entscheidungsgrenze*) a) b)	180 461	253 443	144 300	296 700	302 794	78 186	11,8 33,6	40 114	21,4 51,5
VK in der Serie-(%) n=10	5,4	2,9	6,9	13,9	4,2	4,0	15,6	3,8	5,5
dazugehör. $\bar{x}$ *)	126	913	188	173	213	65,2	11,4	39,5	20,0
VK von Tag zu Tag (%) n=10	10,8	7,0	9,3	10,2	11,3	6,3	11,0	4,5	5,1
dazugehör. $\bar{x}$ *)	108	807	418	378	358	65,2	9,22	42,7	21,9

*) Einheiten s. Tab. 1.

Tab. 3. Spezifitätsunterschiede der Methoden.

Angegeben sind die jeweils 1000 U/l (Phadebas) entsprechenden Aktivitäten (Doppelbestimmungen an Proben in Proteinmatrix), sowie die Relationen der Aktivitäten von Humanspeichel- und Schweinepankreasamylase gegenüber Humanpankreasamylase.

	Human-Pankreas-Amylase	Human-Speichel-Amylase	Schweine-Pankreas-Amylase
Amylochrome (U/l)	726	758 _{f=1,04}	578 _{f=0,80}
DyAmyl-L (SE/100 ml)	672	724 _{f=1,08}	798 _{f=1,18}
Harleco (U/l)	662	635 _{f=0,96}	928 _{f=1,40}
Merckotest (U/l)	347	323 _{f=0,93}	619 _{f=1,78}
UltraZyme (U/l)	251	316 _{f=1,26}	637 _{f=2,54}
Monamyl (U/l)	41,4	63,2 _{f=1,53}	194 _{f=4,69}
Monamyl neu (U/l)	68	106 _{f=1,56}	54 _{f=0,79}
Amylase-DS (U/l)	145	230 _{f=1,59}	119 _{f=0,82}

neu) gefunden (Tab. 4). Werden die Korrelationskoeffizienten jeweils im Vergleich zu allen übrigen Methoden gemittelt, so weisen die Ergebnisse von Amylochrome mit $\bar{r} = 0,9778$, dicht gefolgt von UltraZyme ($\bar{r} = 0,9772$), Monamyl ($\bar{r} = 0,9749$) und dem Harleco-Iod-Stärke-Test ($\bar{r} = 0,9724$) die durchschnittlich besten Korrelationen zu allen übrigen Methoden auf, während DyAmyl-L mit $\bar{r} = 0,9378$ mit Abstand am schlechtesten abschneidet. Ansonsten sind die Korrelationen zwischen den vier kinetischen Methoden mit $r > 0,97$ besser als im Großteil der übrigen Methodenpaarungen, wobei die drei Testkits, die das Maltosephosphorylase- β -Phosphoglucomutase-Hilfsenzymssystem enthalten, mit Korrelationskoeffizienten durchweg über 0,99 in ihren Ergebnissen besonders gut übereinstimmen.

Die schlechte Korrelation von DyAmyl-L mit den übrigen Methoden ist in systematisch zu niedrigen Ergebnissen dieser Methode im hohen Aktivitätsbereich begründet, was durch ein typisches Regressionsdiagramm (Abb. 1) demonstriert werden soll. Dort ist, wie auch bei den übrigen ausgewählten Diagrammen, neben der für das gesamte Probenkollektiv errechneten eine zweite Regressionsgerade eingezeichnet, die für ein Teilkollektiv ohne Berücksichtigung der Proben mit sehr hohen Aktivitäten (U/l Phadebas > 3000) gilt, und in ihrem Bereich die Meßwerte sehr viel besser erfaßt als die des Gesamtkollektivs. Diese weist einen unvertretbar großen Achsenabschnitt auf, der den Normalbereich für DyAmyl-L weit überschreitet und mehr als ein Drittel des Kollektivmittelwertes ausmacht, und vermag die Beziehung der Meßgrößen zueinander nicht sinnvoll zu beschreiben.

Ähnlich große Achsenabschnitte, die je nach Vorzeichen für mangelnde Linearität der als unabhängige oder abhängige Variable behandelten Methode sprechen, werden für DyAmyl-L bei allen Vergleichen mit anderen

Tab. 4. Lineare Regressionsgleichungen für das gesamte Patientenprobenkollektiv (oben) und Korrelationsmatrix. Abhängige Variable waagrecht, darunter Kollektivmittelwert $\bar{y}$, unter $ax + b$ jeweils die Relation $b/\bar{y}$, und jeweils erst der Koeffizient der linearen Korrelation für das Gesamtkollektiv, darunter der für Proben mit U/I (Phadebas) < 3000, letzte Zeile ggf. der Korrelationskoeffizient für die Polynomgleichung mit quadratischen (q) oder quadratischen und kubischen Gliedern (k) mit dem kleinsten Achsenabschnitt.

	DyAmyl-L 790	Harleco 872,3	Mercktest 532,5	Amylochrome 1320	Phadebas 1510	UltraZyme 405,4	Monamyl 73,59	Amylase-DS 236,1	Monamyl neu 108,8
DyAmyl-L									
		1,36 ($\pm 0,06$)x -198 (± 63)	0,728 ($\pm 0,024$)x -42 (± 26)	1,93 ($\pm 0,06$)x -204 (± 66)	2,25 ($\pm 0,09$)x -269 (± 102)	0,687 ($\pm 0,028$)x -137 (± 30)	0,124 ($\pm 0,005$)x -24,5 ($\pm 5,0$)	0,378 ($\pm 0,016$)x -63 (± 18)	0,176 ($\pm 0,007$)x -30 (± 8)
	-0,23	-0,08	-0,15	-0,18	-0,34	-0,33	-0,27	-0,28	
Harleco	0,9272 0,9423 q 0,9715	0,512 ($\pm 0,010$)x + 86 (± 15)	1,36 ($\pm 0,02$)x + 132 (± 30)	1,63 ($\pm 0,03$)x + 84 (± 40)	0,501 ($\pm 0,06$)x -32 (± 8)	0,0883 ($\pm 0,0019$)x -3,4 ($\pm 2,7$)	0,269 ($\pm 0,008$)x + 2 (± 12)	0,124 ($\pm 0,004$)x + 0 (± 5)	
Mercktest	0,9543 0,9725 k 0,9933	0,16	0,10	0,06	-0,08	-0,05			
		2,61 ($\pm 0,04$)x -70 (± 32)	3,13 ($\pm 0,06$)x -157 (± 44)	0,947 ($\pm 0,021$)x -98 (± 6)	0,166 ($\pm 0,005$)x -14,7 ($\pm 4,0$)	0,502 ($\pm 0,020$)x -13 (± 16)	0,233 ($\pm 0,009$)x -15 (± 7)		
Amylo- chrome	0,9585 0,9758 q 0,9916	0,9888 0,9559 k 0,9905	1,19 ($\pm 0,02$)x -59 (± 39)	0,362 ($\pm 0,006$)x -72 (± 11)	0,0642 ($\pm 0,0014$)x -11,2 ($\pm 2,7$)	0,196 ($\pm 0,006$)x -23 (± 12)	0,0905 ($\pm 0,009$)x -11 (± 5)		
		-0,04	-0,18	-0,10	-0,24	-0,20	-0,13	-0,14	
Phadebas	0,9299 0,9587 q 0,9845	0,9862 0,9721 q 0,9866	0,9855 0,9273 q 0,9865	0,9880 0,9674 q 0,9915	0,298 ($\pm 0,006$)x -45 (± 15)	0,0524 ($\pm 0,0015$)x -5,5 ($\pm 3,7$)	0,159 ($\pm 0,006$)x -4 (± 14)	0,0733 ($\pm 0,002$)x -2 (± 7)	
UltraZyme	0,9328 0,9795 q 0,9911	0,9844 0,9358	0,9784 0,9494 k 0,9880	0,9894 0,9582 k 0,9934	0,9812 0,9480 k 0,9916	0,177 ($\pm 0,003$)x + 1,9 ($\pm 2,0$)	0,543 ($\pm 0,013$)x + 16 (± 9)	0,250 ($\pm 0,006$)x + 7 (± 4)	
Monamyl	0,9426 0,9730 k 0,9922	0,9793 0,9432	0,9591 0,9347 k 0,9647	0,9803 0,9643 q 0,9835	0,9627 0,9581 k 0,9665	0,9881 0,9826	3,08 ($\pm 0,04$)x + 9 (± 6)	1,42 ($\pm 0,02$)x + 4 (± 2)	
Amylase-DS	0,9234 0,9205 q 0,9763	0,9582 0,8399 q 0,9584	0,9337 0,8860 q 0,9444	0,9625 0,9175 q 0,9687	0,9388 0,8667 k 0,9418	0,9751 0,9284	0,9906 0,9360 k (0,9906)	0,458 ($\pm 0,005$)x + 1 (± 2)	
Monamyl neu	0,9337 0,9542 k 0,9841	0,9635 0,8971 q 0,9638	0,9403 0,9283 k 0,9511	0,9660 0,9480 q 0,9717	0,9417 0,9213 k 0,9450	0,9779 0,9553	0,9935 0,9633 q (0,9935)	0,9954 0,9443	
$\bar{r}$	0,9378	0,9724	0,9652	0,9778	0,9643	0,9772	0,9749	0,9597	0,9640

Abb. 1. Regressionsdiagramm UltraZyme gegen DyAmyl-L.

Die Ziffern bezeichnen die Anzahl der am jeweiligen Ort zusammenfallenden Wertepaare.

Methoden und in den meisten Fällen auch für die übrigen chromolytischen Verfahren und für Merckotest gefunden, nicht aber beim Vergleich der kinetischen Methoden untereinander.

Große additive Glieder in den Regressionsgleichungen (Tab. 4) und sehr unterschiedliche Gleichungen für das Gesamt- und das Teilkollektiv (Abb. 1, 2) unterstreichen besonders die Fragwürdigkeit sowohl einer proportionalen als auch einer aus der linearen Regression hergeleiteten Umrechnung von Ergebnissen einer Methode zu denen einer anderen.

Große additive Glieder in den Regressionsgleichungen des Gesamtkollektivs sind in denen des Teilkollektivs ganz erheblich reduziert und fallen auch bei Polynom-

Abb. 2. Regressionsdiagramm Monamyl neu gegen Merckotest.

Die Ziffern bezeichnen die Anzahl der am jeweiligen Ort zusammenfallenden Wertepaare.

Abb. 3. Regressionsdiagramm Monamyl neu gegen Monamyl.

Die Ziffern bezeichnen die Anzahl der am jeweiligen Ort zusammenfallenden Wertepaare.

angleichungen mit quadratischen oder quadratischen und kubischen Gliedern meist beträchtlich kleiner aus. Während durch Ausschließen der hohen Werte aber nur bei den sich extrem unlinear darstellenden Methodenpaarungen mit dem Rückgang der additiven Glieder auch eine Verbesserung der Korrelationskoeffizienten verbunden ist, wird durch die Polynomangleichung grundsätzlich eine Verbesserung der Korrelation erreicht. Diese ist allerdings in den Fällen unerheblich, die bereits gute lineare Korrelation zeigen (Tab. 4).

Praktikabilität

Die im Vergleich mit den recht umständlichen Zweipunktmethoden sehr gute Praktikabilität der kontinuierlich messenden Verfahren stellt die Bestimmung der α -Amylaseaktivität in eine Reihe mit anderen in der Routinediagnostik üblichen Enzymbestimmungen. Serumvorverdünnungen sind nur bei sehr hohen Aktivitäten erforderlich. Ein in der Charge konstanter Reagenzienleerwert ist lediglich bei UltraZyme in Abzug zu bringen.

Vom Einsatz des älteren Monamyl-Verfahrens auf einem Zentrifugalanalysator wurde von van Wersch et al. (2) berichtet. Wegen seiner nie ganz linearen Kinetik liefert dieses Verfahren nur in einer mechanisierten Anwendung reproduzierbare Ergebnisse; Versuche, durch Zusatz von Glykogen zu einem linearen Absorptionsanstieg zu kommen, wurden von Hanson et al. (8) mitgeteilt. Über die Adaption der UltraZyme-Methode an einen Eppendorf-Enzymautomaten berichtet Henkel (6). Die übrigen kinetischen Methoden sind ebenfalls gut zur Mechanisierung geeignet.

Die Haltbarkeit der mit dem Auflösen gebrauchsfertigen Reagenzien von etwa einem Tag wirkt sich bei sehr kleinen Serien auf den ohnehin relativ hohen Preis pro Analyse (Tab. 1) aus.

Tab. 5. Achsenabschnitte in Relation zu Kollektivmittelwerten. Einteilung wie in Tab. 4, unten Mittelwerte $b/\bar{y}$ für lineare Regression im Gesamtkollektiv.

x	y	DyAmyl-L	Harleco	Merckotest	Amylochrome	Phadebas	UltraZyme	Monamyl	Amylase-DS	Monamyl neu
DyAmyl-L			-0,23 n.b. n.b.	-0,08 n.b. n.b.	-0,15 n.b. n.b.	-0,18 n.b. n.b.	-0,34 0,04 n.b.	-0,33 (0,005) n.b.	-0,27 0,06 n.b.	-0,28 0,06 n.b.
Harleco	0,30 -0,12 q -0,12			0,16 n.b. n.b.	0,10 n.b. n.b.	0,06 n.b. n.b.	-0,08 -0,06 n.b.	-0,05 -0,12 n.b.	(0,01) (-0,01) n.b.	(0,005) (-0,03) n.b.
Merckotest	0,16 -0,05 k -0,06		-0,15 0,10 q (0,005)		-0,05 n.b. n.b.	-0,10 n.b. n.b.	-0,24 (0,01) n.b.	-0,20 -0,04 n.b.	-0,13 (0,03) n.b.	-0,14 (0,02) n.b.
Amylochrome	0,20 (-0,01) q (-0,03)		-0,09 0,12 —	0,07 0,06 k (0,01)		-0,04 n.b. n.b.	-0,18 0,03 n.b.	-0,15 -0,02 n.b.	-0,10 0,04 n.b.	-0,10 0,04 n.b.
Phadebas	0,27 0,07 q (0,01)		-0,03 0,16 q (0,01)	0,12 0,14 q (0,08)	0,06 0,08 q (-0,02)		-0,11 0,09 n.b.	-0,07 0,04 n.b.	(-0,02) 0,12 n.b.	(-0,02) 0,11 n.b.
UltraZyme	0,35 -0,02 k (-0,01)		0,08 0,12 —	0,23 0,06 k (0,02)	0,17 (0,02) k (-0,01)	0,13 -0,05 k		(0,03) -0,04 n.b.	0,07 (0,03) n.b.	0,07 0,03 n.b.
Monamyl	0,33 0,04 k (0,01)		0,08 0,15 —	0,23 0,12 k	0,17 0,07 q	0,14 (0,01) k (0,03)	(0,005) 0,05 —		0,04 0,07 n.b.	0,04 0,07 n.b.
Amylase-DS	0,33 0,03 q (0,01)		0,07 0,17 q (0,05)	0,23 0,12 q	0,15 0,06 q (0,02)	0,13 (0,02) k (0,01)	(-0,02) 0,05 —	(-0,02) (0,005) k (-0,02)		(0,01) 0,05 n.b.
Monamyl neu	0,32 (-0,01) k -0,06		0,07 0,13 q (0,04)	0,22 0,07 k	0,15 0,02 q (0,02)	0,13 (0,04) q (0,01)	(-0,03) (0,02) —	-0,03 -0,03 q (-0,02)	(0,005) (0,01) —	
Mittelwert	0,28		-0,02	0,15	0,07	0,03	-0,12	-0,10	-0,05	-0,05

Störanfälligkeit

Störende Einflüsse von Bestandteilen der Probe wurden nur bei den kinetischen Verfahren geprüft. Die Auswirkungen von Störfaktoren auf den UltraZyme-Test, sowie die Ausschaltung des nur dort störenden Einflusses hoher Serum- und Uringlucosekonzentrationen, werden von *Henkel* (6) ausführlich diskutiert. Über den bei kinetischen α -Amylase-Methoden zu niedrige Ergebnisse bedingenden Einfluß hoher Pyruvatkonzentrationen in der Probe wurde von *Hanson et al.* (8) berichtet. Hämolyse stört allgemein erst ab einer Hb-Konzentration von etwa 1 g/l merklich durch falsch niedrige Resultate, wohl infolge eines NADH-Verbrauchs durch Glutathione-reductase. Diese Störeinflüsse wirken sich beim Monamyl-Verfahren wegen dessen geringer Empfindlichkeit relativ am stärksten aus. Lipämie stört nur bei sehr starker Trübung.

Bei Pankreatitis und bestimmten Nierenerkrankungen kommt es zum erhöhten Auftreten von α -Glucosidase in Serum und Urin. Einige unserer Befunde deuten darauf hin, daß bei Monamyl, Monamyl neu und Amylase-DS α -Glucosidase aus der Probe mit der Maltosephosphorylase um die Maltose konkurriert und so zu niedrige Er-

gebnisse bedingt. Die Interferenz der α -Glucosidase bei diesen Tests ist Gegenstand weiterer Untersuchungen in unserem Arbeitskreis.

Störungen durch sonstige in menschlichem Serum vorkommende Substanzen konnten nicht beobachtet werden. Bei Methoden mit geringem Linearitätsbereich, z.B. Merckotest, stört die Adsorption der α -Amylase aus stark verdünnten Proben an die Gefäßwand. Dies entfällt bei den kinetischen Verfahren.

Ein im neuen Monamyl-Reagenz nach Zusatz von NADH anstelle der Probe beobachteter Absorptionsabfall weist auf die Anwesenheit einer NADH verbrauchenden Enzymverunreinigung hin, die um bis zu 4 U/l zu niedrige Ergebnisse bedingt; sie dürfte mitverantwortlich dafür sein, daß die Ergebnisse bei Monamyl neu verglichen mit Amylase-DS, wo sie nicht nachzuweisen war, allgemein niedriger ausfallen, als aus der Berechnung zu erwarten wäre.

Danksagung

Für mathematische Beratung und für die statistische Auswertung der Meßwerte danken wir Frau Dr. C. Zschege und Herrn PD Dr. U. Feldmann von der Abteilung für Biometrie der Medizinischen Hochschule Hannover.

Literatur

1. Bruckner, A., Schenkel, R. & Fritzsche, W. (1978), *Ärztl. Lab.* 24, 355–362.
2. Wersch, J. van, Quast, O. & Kleesiek, K. (1978), *Fresenius Z. Anal. Chem.* 290, 173–174 (Vortrag auf der Tagung Biochemische Analytik 1978 und Analytika 1978, 18.–21. April 1978, München).
3. Wissner, H., Dettmer, K. & Knoll, E. (1978), *Ärztl. Lab.* 24, 392–398.
4. Hauch, D. & Gibitz, H. J. (1979), *diese Z.* 17, 161 (Vortrag auf der Gemeinsamen Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Klinische Chemie und der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie, 29.–31. März 1979, Salzburg).
5. Meier, H. & Henkel, E. (1978), *Fresenius Z. Anal. Chem.* 290, 187 (Vortrag auf der Tagung Biochemische Analytik 1978 und Analytika 1978, 18.–21. April 1978, München).
- 6 a) Henkel, E. (1979), *diese Z.* 17, 163 (Vortrag auf der gemeinsamen Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Klinische Chemie und der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie, 29.–31. März 1979, Salzburg).
b) Henkel, E. (1979), *diese Z.* 17, 705–708.
7. Pierre, K. J., Tung, K. K. & Nadj, H. (1976) *Clin. Chem.* 22, 1219.
8. Hanson, N.Q. & Yasmineh, W. G. (1978), *Clin. Chem.* 24, 762–768.

Dr. Helmut Meier
Institut für Klinische Chemie, Abt. II,
Medizinische Hochschule Hannover,
Zentrallabor am Krankenhaus Oststadt
Podbielskistr. 380
D-3000 Hannover 51