

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.  
Vol. 17, 1979, pp. 705–708

## Die kinetische Bestimmung der $\alpha$ -Amylase im Serum und Urin mit einem Oligosaccharid als Substrat Modifikation für einen vollmechanisierten Enzymmeßplatz

Von E. Henkel

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

(Eingegangen am 10. Juli/1. Oktober 1979)

Dem Gedenken an Professor Dr. Gábor Szász gewidmet

**Zusammenfassung:** Es wird über eine Modifikation und Adaptation der UV-Methode UltraZyme Plus  $\alpha$ -Amyl Harleco an den Eppendorf-Enzymautomaten 5010 berichtet.

Aus einem Oligosaccharidgemisch entsteht durch  $\alpha$ -Amylase Maltose, die durch  $\alpha$ -Glucosidase zu Glucose gespalten wird. Durch die Hexokinase- und NAD-abhängige Glucose-6-phosphat-dehydrogenase-Reaktion wird Glucose spezifisch erfaßt. Durch Zusatz von Pyruvat, Lactat-dehydrogenase und ATP wird das durch den Abbau hoher Konzentrationen endogener Glucose, z.B. im Harn, entstandene NADH zu NAD oxidiert. Durch Oxamatzusatz wird die Lactat-dehydrogenase-Reaktion gestoppt und danach die  $\alpha$ -Amylase-Aktivität ermittelt. Bei einem Mittelwert von 65 U/l beträgt der VK in der Serie 4,02 %, die relative Standardabweichung von Tag zu Tag 6,3 %.

*Kinetic determination of  $\alpha$ -amylase in serum and urine with an oligosaccharide as substrate – Modification for a fully mechanized enzyme measuring device*

**Summary:** The author reports a modification of the UV method UltraZyme Plus  $\alpha$ -Amyl Harleco and the adaptation to the Eppendorf Enzymautomat 5010.

$\alpha$ -amylase acts on an oligosaccharide mixture yielding maltose, which is hydrolysed by  $\alpha$ -glucosidase. The liberated glucose is determined specifically by the hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>-dependent) method. NADH, resulting from the reaction of high concentrations of endogenous glucose, e.g. in urine, is oxidized to NAD<sup>+</sup> by addition of pyruvate, lactate dehydrogenase and ATP. Thereafter the lactate dehydrogenase reaction is stopped by addition of oxamate and the  $\alpha$ -amylase activity is measured.

The CV in the series is 4,02 % ( $\bar{x}$  = 65 U/l), the CV from day to day 6.3 %.

### Einführung

Zur Bestimmung der  $\alpha$ -Amylase sind eine Reihe von Analyseverfahren gebräuchlich, die sich in vielfacher Hinsicht als unzureichend herausgestellt haben. Die neu entwickelten Bestimmungsmethoden, die Oligosaccharide als Substrat verwenden, versprechen eine Reihe von Vorteilen. Die Molekülgröße des Substrates ist definiert, die Enzymaktivität ist kontinuierlich registrierbar und wird in gebräuchlichen Einheiten ausgedrückt. Der Zeitbedarf für die Durchführung eines Tests beträgt wenige Minuten.

### Material und Methodik

#### Material

Serum und Urin stammte von stationären und ambulanten Patienten.

#### Kontrollseren

Monitrol I (147B)  
Monitrol II (58A)  
Monitrol II (46A)

#### Geräte

Photometer Eppendorf M 1100 mit Kompensationsschreiber 6511  
Eppendorf Enzymautomat 5010  
Eppendorf Mikrolitersystem

#### Reagenzien

Harleco-UltraZyme Plus  $\alpha$ -Amyl (Vertrieb AHS-Deutschland Fa. Merz u. Dade, München) (Tab. 1)

#### Zusatzreagenzien

ATP (Fa. Boehringer Mannheim Best.-Nr. 1 26888) 0,4 mmol/l im Testansatz.  
Pyruvat (Fa. Boehringer Mannheim Best.-Nr. 1 27400) 0,4 mmol/l im Testansatz.

Tab. 1. Testzusammensetzung

	UltraZyme Plus $\alpha$ -Amyl	Modifikation
Phosphatpuffer pH 6,9		
Oligosaccharidgemisch	3,5 g/l	3,5 g/l
Natriumchlorid	50,0 mmol/l	50,0 mmol/l
Magnesiumacetat	2,5 mmol/l	2,5 mmol/l
Adenosintriphosphat	0,83 mmol/l	1,23 mmol/l
NAD <sup>+</sup>	3,0 mmol/l	3,0 mmol/l
Pyruvat	—	0,4 mmol/l
Glucose-6-phosphat-dehydrogenase	2,5 kU/l	2,5 kU/l
Hexokinase	2,5 kU/l	2,5 kU/l
$\alpha$ -Glucosidase	300 kU/l	300 kU/l
Lactat-dehydrogenase	—	1,4 kU/l

Lactat-dehydrogenase (Fa. Boehringer Mannheim Best.-Nr. 127230)  
1400 U/l im Testansatz.  
Oxamidsäure (Fa. Serva Best.-Nr. 31342) 500 mmol/l im Testansatz.

#### Reaktionsprinzip

$\alpha$ -Amylase hydrolysiert die Oligosaccharide im Reaktionsansatz zu Maltose, die mit  $\alpha$ -Glucosidase zu Glucose umgesetzt wird. Glucose wird mit Hexokinase und Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (Coenzym: NAD) bestimmt (1,2).

1 ml Reagenz wird in einer 1 cm Küvette mit 10  $\mu$ l Serum oder 10  $\mu$ l Urinverdünnung (1 Volumen Urin + 2 Volumina Natriumchloridlösung (162 mmol/l) gemischt) und die Absorptionzunahme bei 334 nm nach 10 min Inkubation bei 25 °C kontinuierlich gemessen.

#### Auswertung

$\Delta A/\text{min} \times 8172 = \text{U/l}$ .

#### Ergebnisse und Diskussion

Die störende endogene Glucose wird bis zu einer Konzentration von 27,7 mmol/l in der Inkubationszeit aus dem Reaktionsansatz entfernt. Bis zu einer  $\alpha$ -Amylaseaktivität von 1000 U/l verläuft die Reaktion über 20 bis 30 Minuten linear.

Der Verlauf der Kinetik ist an einem Beispiel in Abbildung 1 dargestellt. Auch  $\alpha$ -Glucosidase spaltet das Substrat; dies entspricht einer  $\alpha$ -Amylase-Aktivität von 15 U/l, die als Nebenreaktion in Abzug gebracht werden muß. Dieser Wert ist für jede Charge konstant und muß bei Verwendung einer anderen Charge jeweils erneut ermittelt werden. In vier verschiedenen Chargen konnten jedoch bei der Prüfung keine Unterschiede festgestellt werden.

#### Präzision und Richtigkeit

Bei Verwendung des modifizierten Testsystems wurde für die Präzision in der Serie (n=20) bei einem Mittelwert von 65,2 U/l eine relative Standardabweichung von 4,02 % gefunden. Im mittleren Bereich mit einem Mittelwert von 189 U/l betrug die relative Standardabweichung 3,13 % und im hohen Bereich mit einem Mittelwert von 703 U/l 0,76 %.

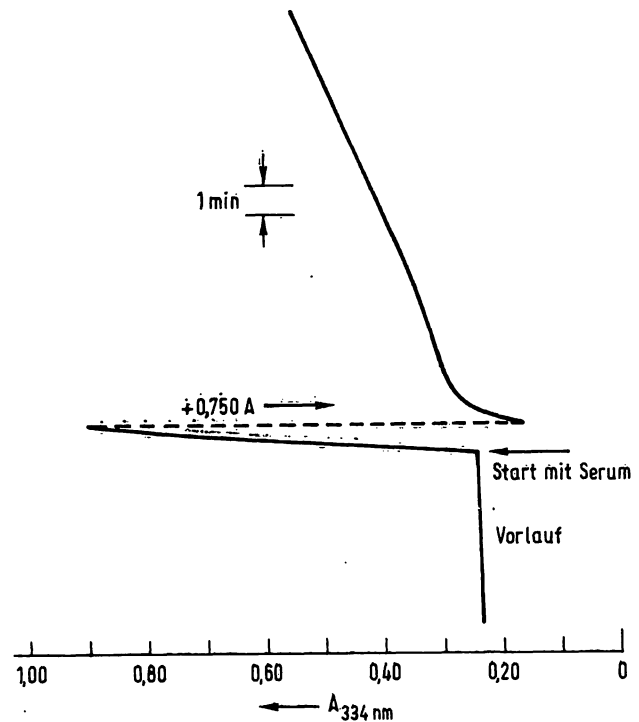


Abb. 1. Schreiber-Diagramm.

Kinetik des UltraZyme  $\alpha$ -Amyl-Tests. Vorreaktion zur Erfassung des Reagenzien-Leerwertes und Abbau der endogenen Glucose. Darstellung der Phase der Linearisierung der Kinetik durch Degradation des Substrates.

Für die Präzision von Tag zu Tag (n = 20) im niedrigen, mittleren und hohen Bereich betragen die relativen Standardabweichungen 6,38%, 4,3% und 2,2%.

Für die Ermittlung der Abweichung vom Sollwert wurden drei verschiedene Chargen Monitrol als Richtigkeitskontrollserum verwendet. Der Mittelwert aus Dreifach-Bestimmungen ergab für Monitrol I 70,2 U/l, die Abweichung vom Sollwert (76,5 U/l) betrug -8,23%. Monitrol II ergab bei 188,8 U/l (Sollwert 187 U/l) eine Abweichung von -0,96%. Eine andere Charge Monitrol II ergab für Sollwert und gefundenen Wert übereinstimmende Resultate.

#### Normalbereich

Da für die Messung bei 25 °C Referenzwerte fehlten, wurde an einem Kollektiv zunächst eine orientierende Untersuchung zur Erfassung von Bezugswerten durchgeführt. Sèren von 18- bis 75-jährigen Patienten, die keine Anzeichen für eine Pankreaserkrankung oder Speicheldrüsenerkrankung hatten, wurden untersucht. Das Verteilungsdiagramm (Abb. 2) ließ keine geschlechtsspezifischen Unterschiede erkennen. Danach liegt offenbar eine Normalverteilung vor, die einer Bestätigung bedarf. Im gleichen Kollektiv lagen die Enzymaktivitäten mit der Phadebas-Methode im Normalbereich (2).

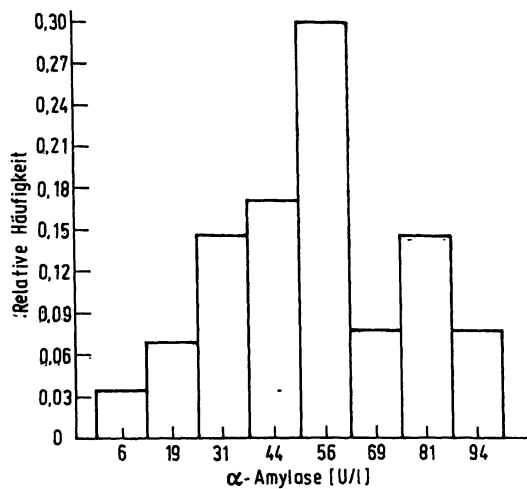


Abb. 2. Histogramm zur Überprüfung des Normalwertes der Ultrazyme Plus  $\alpha$ -Amyl-Methode.

#### Stabilität der Reagenzien

Das Reagenz ist bei Raumtemperatur 4 Stunden stabil, bei 4 °C beträgt die Stabilität mindestens 20 Stunden.

Die Oxamatlösung (pH 6,8) ist mindestens 2 Monate bei 4 °C stabil.

#### Störfaktoren

Bei Anwendung der Originalvorschrift hatte Pyruvat im Serum bis zu 5 mmol/l keinen Einfluß, da diese geringe Konzentration durch die Lactat-dehydrogenase des Serums und das im Testsystem entstandene NADH innerhalb der Vorinkubationszeit umgesetzt wird. Hämolyse zeigt erst bei Werten über 1000 mg/l Hämoglobin eine Interferenz.

Zusatz von Ascorbinsäure (5 mmol/l) und Methyl dopa (100 mg/l) stören im Urin und Serum nicht. Auch die  $\alpha$ -Glucosidase im Serum und Urin bedingt keinen Störeinfluß.

Die Beimengung geringer Mengen Phosphohexoseisomerase im Testsystem wurde durch Zusatz von Fructose nachgewiesen. Bei einer Konzentration von 5 mmol/l Fructose im Serum, z.B. nach Infusion von Fructoselösungen, wird die Kinetik der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase-Reaktion gestört. Die sehr geringe Menge Phosphohexoseisomerase setzt im Testsystem phosphorylierte Fructose um und eine geringe Absorptionzunahme ist über die gesamte Reaktionszeit nachweisbar. Bei den getesteten Chargen entsprach die Fremdaktivität 16 U/l  $\alpha$ -Amylase-Aktivität. Es ist anzumerken, daß Fructoselösungen in der Therapie nur noch eine untergeordnete Rolle spielen.

Die Reaktionsgeschwindigkeit der  $\alpha$ -Amylasebestimmungsmethoden mit Oligosacchariden hängt sehr von der Kettenlänge der eingesetzten Substrate ab. Bei der Überprüfung des Substrates von vier Chargen konnten keine Chargenunterschiede festgestellt werden. Die Chargen

wurden mit Enzympräparationen aus Speichel und Pankreas getestet. Die Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeit mit diesen Enzympräparationen ergab gleiche Aktivitäten in allen Chargen. Dies erlaubt den Schluß, daß offenbar keine oder nicht nachweisbare Chargenunterschiede bestehen, da nach der Vorinkubation für alle geprüften Chargen gleiche Substratgemische vorliegen.

Mit der Hochdruckflüssigkeitschromatographie wurden im wesentlichen die Substrate Maltopentaose, Maltose und Maltoheptaose im Substratgemisch gefunden. Höhere und niedrigere Oligomere sind nicht in nennenswerten Konzentrationen nachweisbar.

#### Mechanisierung des Verfahrens

Die Methode wurde mit einem speziellen Methodenstecker 10-1 an einen Enzymautomaten Eppendorf 5010 adaptiert. Der Stecker 15-1 mit 15 Minuten Inkubationszeit kann ebenfalls verwendet werden, jedoch muß eine Einschränkung des Meßbereichs bei hohen Aktivitäten berücksichtigt werden. Die Dosierervolumina sind 1 ml Reagenz und 10  $\mu$ l Probe. Der Probendurchsatz beträgt 120/Stunde. Urinproben müssen vor Einsatz im Verhältnis 1:3 verdünnt werden. In Abbildung 3 ist eine Gegenüberstellung der mit der mechanisierten Methode gewonnenen Resultate im Vergleich zur Phadebas-Methode dargestellt. Vergleichbare Resultate wurden mit manueller Technik gewonnen.

Bei der Bestimmung der  $\alpha$ -Amylase im Harn stört endogene Glucose durch hohe Ausgangsabsorption von NADH nach der Vorinkubation. Da dies den Meß-

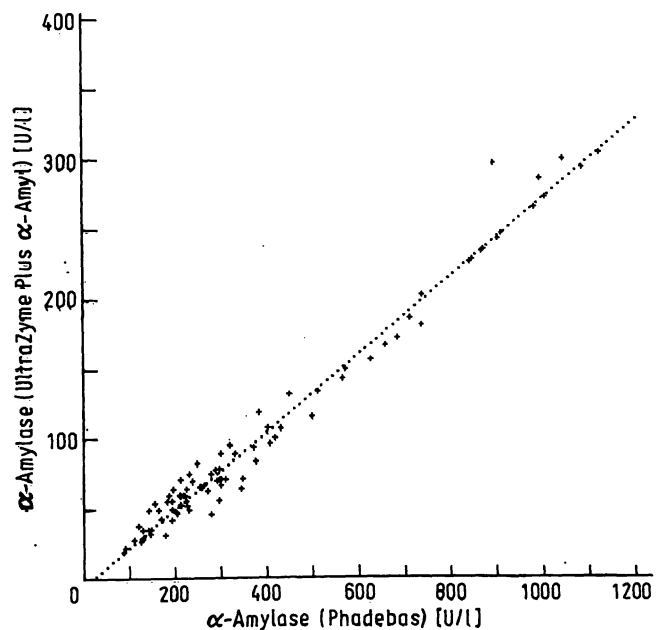


Abb. 3. Vergleich der mit dem Eppendorf-Enzymautomaten 5010 im Ultrazyme-Test enthaltenen Aktivitäten und den mit manueller Technik erzielten Enzymaktivitäten mit der Phadebas-Methode.

$$y = -4,16 + 0,28 x; r = 0,987; n = 90.$$

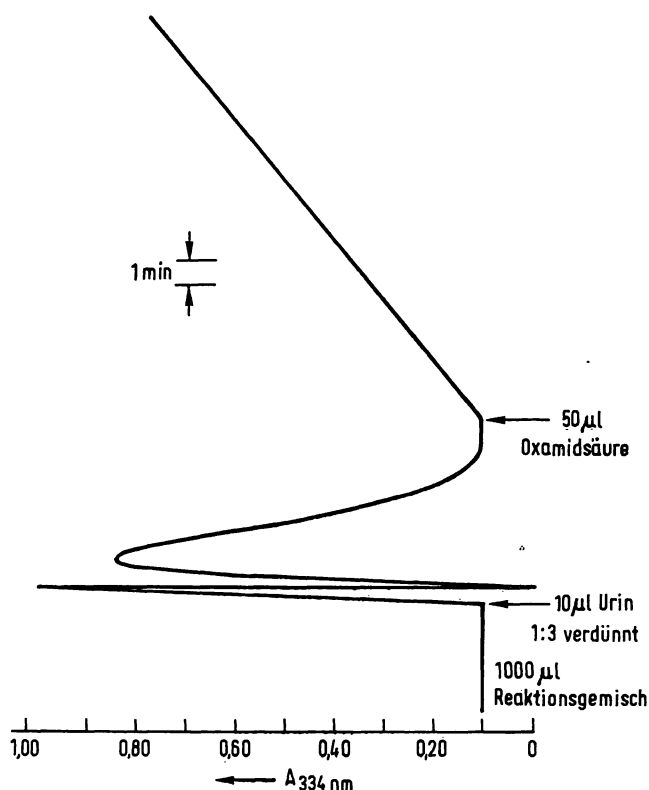


Abb. 4. Schreiber-Diagramm.

Kinetik des Amylasetests Ultrazyme mit Zusatz von Lactat-dehydrogenase, Pyruvat, ATP und Oxamat.

Konzentration an endogener Glucose 160 mmol/l. Amylase 1000 U/l Harn.

bereich limitiert, wurde folgende Modifikation angewandt:

Dem Ansatz werden 0,4 mmol/l Pyruvat und 1400 U/l Lactat-dehydrogenase sowie 0,4 mmol/l ATP zugesetzt. Mit diesem Zusatz können bis zu 120 mmol/l Glucose im Harn kompensiert werden. Nach der Vorinkubationszeit wird die Lactat-dehydrogenase-Reaktion durch Zugabe von 50  $\mu$ l einer 500 mmol/l Natriumoxamatlösung (pH 6,8) gestoppt (Abb. 4).

Bei der Adaptation an den Enzymautomaten Eppendorf wird mit 50  $\mu$ l Oxamatlösung durch eine zusätzliche Dosierstation die Lactat-dehydrogenase-Reaktion gestoppt. Die zugesetzten Reagenzien oxidieren NADH zu NAD und das in der Reaktion verbrauchte ATP des Testkits wird durch ATP-Zugabe substituiert. Der Berechnungsfaktor für 334 nm durch das veränderte Volumen nach der Oxamatzugabe beträgt  $\Delta A/\text{min}$

## Literatur

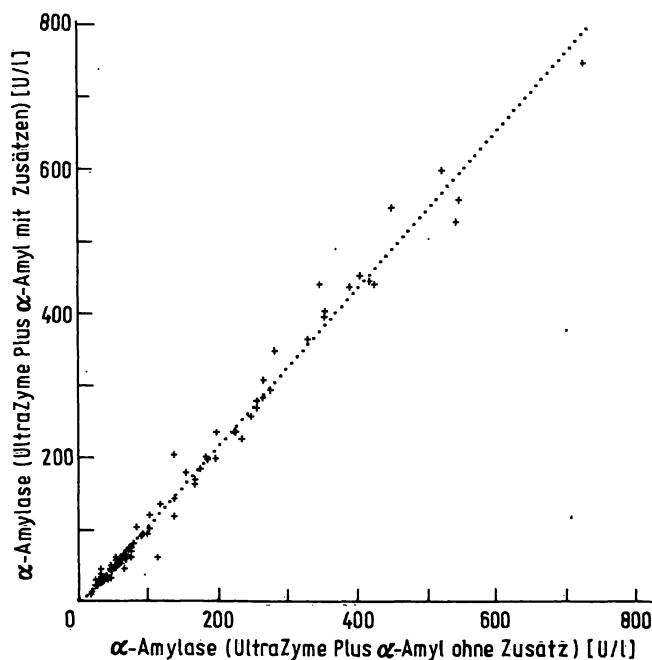
1. Richter, R., Kemmler, Ardella & O'Malley, J. A. (1973). Clin. Chem. 19, 644, Abstract.

$\times 8657 = \text{U/l}$ . Es hat sich gezeigt, daß durch die Modifikation des Reagenz die Ausgangsabsorption eines geringfügig überalterten Reaktionsgemisches auf eine niedrige Absorptionsstufe zurückführt und daß die Reaktion der  $\alpha$ -Amylase durch die zugesetzten Reaktionskomponenten in keiner Weise beeinflusst wird. Vergleichsmessungen im Serum mit und ohne Oxamat-zusatz sind in Abbildung 5 dargestellt.

Der kommerziell erhältliche Test zur Bestimmung der  $\alpha$ -Amylase gibt auch im niedrigen Aktivitätsbereich ein genügend großes Signal. Die für den Test benötigte Arbeitszeit liegt in vergleichbarer Größenordnung zu anderen gebräuchlichen Verfahren zur Enzymaktivitätsbestimmung.

Die Pipettierung von 10  $\mu$ l Probe stellt für die Präzision der Methode bei manueller Arbeitsweise ein Problem dar, nicht jedoch für den Einsatz von Automaten und Dilutoren.

Die Reagenzienkosten pro Test liegen gegenwärtig bei DM 1,34. Die Modifikation erweist sich besonders für die Bestimmung der  $\alpha$ -Amylase im Urin als eine wesentliche Verbesserung in der Praktikabilität der Methode.

Abb. 5. Methodenvergleich des Ultrazyme  $\alpha$  Amyl-Tests mit und ohne Zusatz von Pyruvat, Lactat-dehydrogenase und ATP, sowie Oxamat.

$$y = -0,84 + 1,09 x; r = 0,993; n = 90.$$

2. Meier, H., Henkel, E. & Dankert, H. (1979) J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17, 709-716.

Dr. med. E. Henkel  
Institut f. Klinische Chemie, Abt. II,  
Medizinische Hochschule Hannover  
Zentrallabor im Krankenhaus Oststadt  
Podbielskistr. 380  
D-3000 Hannover 51