

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
11. Jg. 1973, S. 152—154

Eine automatische kinetische Bestimmungsmethode der Cholinesterase (EC 3.1.1.8) im Serum

Von A. EBERHARD und R. KLEY

Aus dem Klinisch-Chemischen Zentrallaboratorium (Leiter: Prof. Dr. Dr. H. Greiling)
der Medizinischen Fakultät der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen

(Eingegangen am 9. November 1972/15. Januar 1973)

Es wird eine automatische kinetische Bestimmung der Pseudocholinesterase im Serum mit dem Enzymautomaten 5010 Eppendorf beschrieben. Die Methode verwendet Acetylthiocholin als Substrat und 5:5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure als Reagenz für SH-Gruppen. Nach dem Verfahren lassen sich 120 Proben/h analysieren. Die Zuverlässigkeitskriterien der Methode werden dargelegt.

An automated kinetic determination method for serum cholinesterase (EC 3.1.1.8)

An automated kinetic method is described for the determination of cholinesterase activities in sera using an automatic enzyme analyser 5010 Eppendorf. The method uses acetylthiocholine as substrate and 5:5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) as the reagent for SH-groups. With this method 120 determinations per hour can be made. The criteria of reliability are reported for the method.

Die Bestimmung der Pseudocholinesterase im Serum hat in der klinisch-chemischen Diagnostik ihren festen Platz. Im folgenden beschreiben wir eine Bestimmungsmethode der Pseudocholinesterase mit dem Enzymautomaten der Firma Eppendorf (Hamburg) Modell 5010 nach dem Prinzip von ELLMAN (1) und GARRY (2).

Material und Methoden

Reagenzien

Lösung 1

(Puffer/Chromogen-Gemisch) 50 mmol/l Phosphatpuffer pH 7,2
0,25 mmol/l Dithiobisnitrobenzoesäure

Lösung 2

156 mmol/l Acetylthiocholinjodid

Bestimmungsansatz

		Endkonzentration
Puffer-Chromogenlösung 1	1,00 ml	0,47 mmol/l Phosphatpuffer
Serum	0,01 ml	2,4 µmol/l Dithiobisnitrobenzoesäure
Mischen. 15 min bei 25°C inkubieren		
Substratlösung 2	0,05 ml	7,36 mmol/l Acetylthiocholinjodid
Mischen. Extinktionszunahme bei 405 nm während 154 s im Abstand von 25,7 s messen		

Vorbereitung des Automaten (5010 Eppendorf)

1. Programmstecker

1-Kanal GOT, GPT, LDH, ALD, HBDH (Probenfrequenz: 120/h)

2. Probenkette

etwa 100 µl Serum pro Gefäß

3. Probenreagenzdosierer

Vorratszylinder „100“ mit Lösung 1, Schalterstellung: 100

Probenzylinder „10“ für Serum, Schalterstellung: 10

4. Startreagenzdosierer

Zylinder „10“ mit Lösung 2, Schalterstellung: 50

5. Inkubation 15 min bei +25°C

6. Photometer Hg 405 nm

7. Transformationsstufe Taste E = 0—1

8. Analogdrucker 5 cm/min

9. Abgleich des Photometers:

Lösung 1 in Spezialeküvette pipettieren und Nullpunkt am Photometer einstellen. Stufenschalter während der ganzen Messung entsprechend der Nullpunkteinstellung stehen lassen.

Berechnung

Da der Enzymtestauswerter für den Eppendorf Automaten 5010 nur für eine Papiergeschwindigkeit von 2 cm/min eingerichtet ist, markieren wir den ersten Meßpunkt der 1. Probe auf dem Druckerstreifen und drehen den Transportknopf des Auswerter 2,5 Umdrehungen von Probe zu Probe. Aus dem Tangens des gemessenen Winkels ergibt sich die Aktivität der Pseudocholinesterase im Serum nach (3)

$$\operatorname{tg} \alpha \cdot \frac{a \cdot V \cdot 10^9}{b \cdot \varepsilon \cdot v \cdot d} [\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{l}] = U/l$$

zu

$$\operatorname{tg} \alpha \cdot 1993 [\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{l}] = U/l$$

hierbei sind

a	Papiervorschub	5 cm/min
b	Papierbreite	20 cm
V	Endvolumen	1,06 ml
v	Probevolumen	0,01 ml
$\varepsilon_{405 \text{ nm}}$	Thionitrobenzoesäure	$13,3 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$
d	Schichtdicke	1 cm
10^9	Multiplikator zur Umrechnung von mol/cm ³ auf µmol/l.	

Ergebnisse

Die Zuverlässigkeit der Methode wurde an vier handelsüblichen Kontrollseren geprüft.

Tab. 1
Richtigkeitsprüfung der Pseudocholinesterase-Bestimmung mit vier handelsüblichen Kontrollseren

Kontrollserum	Analysenzahl	Sollwert (\bar{x}_s) (U/l)	$\pm 2s$ Bereich (U/l) ^a	gefundener Wert (\bar{x}_f) (U/l)	$\pm 2s$ Bereich (U/l)	$\frac{\bar{x}_{Soll} - \bar{x}_{Ist}}{\bar{x}_{Soll}} \cdot 100$
Precilip ¹⁾	85	2250	1913—2588	2124	2228—2020	-5%
Seronorm ²⁾	56	3020	nicht angegeben	3144	3314—2974	+4%
Monitrol ³⁾ I	56	2450	2200—2700	2309	2487—2131	-5%
Monitrol ³⁾ II	56	1810	1620—2000	1622	1698—1548	-10%

¹⁾ Fa. Boehringer, Mannheim, Kontr. No. 101

²⁾ Fa. Molter, Heidelberg, Batch No. 117

³⁾ Fa. Merz + Dade, München 50, Lot No. 27 A und 114 A, B

⁴⁾ Von den Herstellerfirmen angegebener Vertrauensbereich

Linearität

Zur Prüfung der Linearität wurde von einem Kontrollserum (Precilip Lt. Nr. 101, Fa. Boehringer (Mannheim)) eine Verdünnungsreihe hergestellt. Beim Vergleich von Ist- und Sollwerten zeigte sich eine nahezu ideale Übereinstimmung im Bereich zwischen 35 und 4500 U/l Pseudocholinesterase im Serum (s. Abb. 1).

Richtigkeit

Das Ergebnis der Richtigkeitskontrolle zeigt die Tabelle 1.

Präzision

Das Ergebnis der Präzisionsprüfung zeigen die Tabellen 2 und 3.

Driftkontrolle

Zur Prüfung wurden zu Anfang und am Ende einer jeden Analysenserie 25 Tage lang ein Segment mit 10 Kontrollseren eingefügt. Es wurde keine Drift festgestellt. Die Anheizzeit des Gerätes (etwa 30 min) muß streng eingehalten werden.

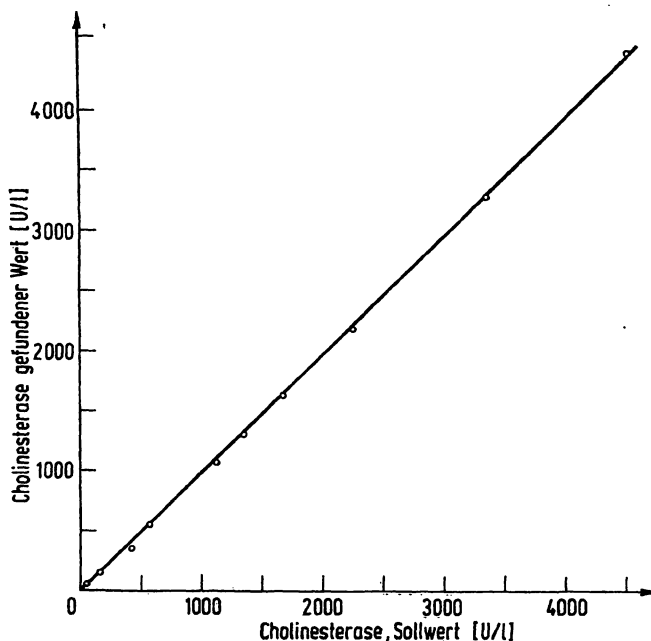


Abb. 1

Wiederfindung der eingesetzten Pseudocholinesteraseaktivität (Verdünnungsreihe von dem Kontrollserum Precilip) durch den Enzymautomaten 5010 Eppendorf. Auf der Abszisse sind die eingesetzten und auf der Ordinate die gemessenen Enzymaktivitäten eingezeichnet. Die Gleichung der Regressionsgeraden lautet:

$$y = 0,996x + 14,283. r = 0,999$$

Tab. 2

Präzision der Pseudocholinesterase-Bestimmung in der Serie, geprüft an vier handelsüblichen Kontrollseren

	Analysenzahl n	Mittelwert \bar{x} [U/l]	2s-Bereich [U/l]	Variationskoeffizient [%]
Precilip	31	2028	± 94	2,3
Seronorm	31	2934	± 150	2,5
Monitrol I	31	2192	± 126	2,8
Monitrol II	38	1622	± 74	2,2

Tab. 3

Präzision der Pseudocholinesterase-Bestimmung von Tag zu Tag, geprüft 25 Tage lang an vier handelsüblichen Kontrollseren

	Mittelwert \bar{x} [U/l]	2s-Bereich [U/l]	Variationskoeffizient [%]
Precilip	2124	± 104	2,4
Seronorm	3145	± 170	2,7
Monitrol I	2309	± 178	3,8
Monitrol II	1622	± 84	2,2

Verschleppungsfehler

Ähnlich wie bei der Drift-Kontrolle wurden Analysen-Segmente täglich mitgeführt, in denen Kontrollseren und Wasserproben sich abwechselten. Eine Verschleppung war nicht meßbar.

Prüfung der nicht-enzymatischen Eigenhydrolyse von Acetylthiocholin

Hierzu wurden täglich in bestimmten Segmentabschnitten der Analysenreihe Wasserproben eingefügt. Bei intakter Substratlösung (Lösung 2) konnten keine Extinktionsdifferenzen festgestellt werden (bei +4°C ist die Lösung 2 mindestens 1 Woche haltbar).

Spezifität der Methode

Die Methode ist spezifisch für die Pseudocholinesterasen im Serum (2). Aufgrund der Untersuchungen von LEVINE (4) läßt sich mit Acetylthiocholin die Acetylcholinesterase in den Erythrocyten (EC 3.1.1.7) nach Dialyse des gebildeten Farbstoffes bestimmen. Dieses ist mit unserer automatischen Methode nicht durchführbar, da die Eigenfärbung der hämolysierten Erythrocyten die Messung der Extinktionszunahme bei 405 nm stört.

Normalwerte

An 125 Seren lebergesunder Patienten wurde ermittelt: 2490 U/l (1850—3030 U/l).

Diskussion

Von einer modernen automatischen Enzymaktivitätsmessung wird erwartet, daß der Methode ein kinetisches Meßprinzip zugrundeliegt und Probenfrequenz und Zuverlässigkeit der Methode den Anforderungen des Routinelaboratoriums genügen. Die bisher bekannten automatischen Bestimmungsmethoden der Pseudocholinesterase erfüllen nicht gleichzeitig diese Bedingungen. JENSEN-HOLM (5) gibt eine Bestimmungsmethode der Cholinesterase an, die auf der automatischen Titration der freigesetzten Essigsäure bei konstantem pH beruht. Das Verfahren erreicht eine hohe Präzision

(VK 1,5%); da die Proben jedoch nur einzeln gemessen werden können, ist sein praktischer Wert beschränkt. Andere automatische Bestimmungsverfahren der Pseudocholinesterase verwenden das Autoanalyserprinzip (6—9), wobei einige Autoren ebenfalls Acetylthiocholin als Substrat und 5:5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure als SH-Gruppen-Reagenz verwenden. Das Meßprinzip des Autoanalyzers ist jedoch kein kinetisches, und es haften diesen Verfahren alle Nachteile einer Zweipunktmessung an. Bei der vorliegenden Methode wird die Aktivität der Pseudocholinesterase kinetisch gemessen. Die Analysenfrequenz beträgt 120/h, Präzision und Richtigkeit der Methode erfüllen die Zuverlässigkeitskriterien der Qualitätskontrolle. Das Verfahren kann für die Anwendung im Routinebetrieb empfohlen werden.

Literatur

1. ELLMAN, G. L., COURTNEY, D. K., ANDRES jr., V. & FEATHERSTONE, R. M. (1961), *Biochem. Pharmacol.* 7, 88—95. — 2. GARRY, P. J. & ROUTH, J. I. (1965), *Clin. Chem.* 11, 91—96. — 3. WEBER, H. & RICHTERICH, R. (1963), *Klin. Wochenschr.* 41, 665—667. — 4. LEVINE, J. B. (1970), *Methoden der enzymatischen Analyse* (BERGMEYER, H. U.) Hrsg.: Bd. I, Seite 813—815 Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße, 2. Auflage. — 5. JENSEN-HOLM, J., LAUSEN, H. H., MILTHERS, K. & MÖLLER, K. O. (1959), *Acta Pharmacol. Toxicol.* 15, 384—394. — 6. JACQUES LONGPRE, A. R. T. (1971), *Can. J. Tech.* 33, 213—217. — 7. BOUTIN, D. & BRODEUR, J. (1970), *Clin. Biochem.* 3, 245—254. — 8. BOUTIN, D. & BRODEUR, J. (1970), *Clin. Biochem.* 3, 3—9. — 9. BAUM, G., WARD, F. B. & YAVERBAUM, S. (1972), *Clin. Chim. Acta* 36, 405—408.

Dr. A. Eberhard und Dr. R. Kley
Zentrallabor der Klinischen Anstalten der RWTH
Aachen
51 Aachen
Goethestraße 27/29