

Kongreßbericht

alpha-Amylase-Bestimmung: Gegenwärtiger Stand und zukünftige Entwicklung

alpha-Amylase-Assay: Current state and future development

Bericht über die Workshop-Konferenz der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie am 7.–8. Oktober 1978 in Frankfurt/Main

Standardisierungskriterien

In einem Einführungsvortrag stellte der Referent K. Lorentz (Lübeck) fest, daß in den letzten 100 Jahren etwa 200 verschiedene Bestimmungsmethoden für alpha-Amylase entwickelt wurden. Eine Standardisierung wird für dringend erforderlich gehalten. Eine Arbeitsgruppe hat Kriterien für eine alpha-Amylase-Standard-Methode entwickelt:

- a) Definiertes Substrat, gut meßbare Reaktionsprodukte, gleichmäßige Reproduzierbarkeit, Wirtschaftlichkeit.
- b) Die Methode muß fortlaufend registrierbar sein und eine Kinetik nullter Ordnung (für mindestens 10 Minuten im Normbereich) aufweisen. Die Linearität muß gesichert sein.
- c) Die Empfindlichkeit muß so groß sein, daß exakte Bestimmungen im Normbereich (bei 30°) möglich sind.
- d) Die Methode darf durch endogene Glucose nicht gestört werden.

Um diese Ziele zu erreichen, hat die Arbeitsgruppe Wissenschaftler aus Europa und USA, die auf dem Gebiet der alpha-Amylase-Bestimmung arbeiten, eingeladen. Durch diesen Workshop soll eine internationale Zusammenarbeit zur Standardisierung der alpha-Amylase-Bestimmung ermöglicht werden.

Überblick über die Methoden zur Messung der alpha-Amylase

In einem Überblick über die alpha-Amylase-Methoden, die heute in der Klinik durchgeführt werden, zeigte der Referent, daß es zur Zeit mehrere Gruppen von Methoden gibt, die sich prinzipiell unterscheiden:

Amyloklastische Methoden

Amyloklastische Methoden stellen die Mehrzahl der alpha-Amylase-Bestimmungsmethoden dar. Ihr Anteil beträgt in Deutschland ca. 60% und in den USA ca. 50%. Sie sind einfach, billig und schnell. Das am besten geeignete Substrat ist ein aus 12 Glucoseeinheiten bestehendes Amylodextrin.

Saccharogene Methoden

Saccharogene Methoden nehmen, obwohl sie sehr exakte Werte liefern, nur einen Anteil von etwa 3% aller Messungen in den USA ein. Sie sind zeitaufwendig und störanfällig. Die die Reaktion störende endogene Glucose kann nur durch aufwendige Verfahren eliminiert werden.

Chromolytische Methoden

Diese Gruppe umfaßt ca. 30–40% aller Amylaseuntersuchungen. Prinzip der Methoden ist, daß aus löslichen oder unlöslichen farbstoffgekoppelten Polysacchariden kleine wasserlösliche Bruchstücke abgespalten werden.

Kinetische Methoden

Kinetische Methoden sind Gegenstand der auf dem Workshop vorgetragenen Referate und Diskussionen.

Kinetische Methoden

Spaltung von Nitrophenylglykosiden durch alpha-Amylase
(P. Földi)

Prinzip der Methode ist die Spaltung von 4-Nitrophenyl-Oligosacchariden (4 NPG_x) durch α -Amylase zu Maltose und niedermolekularen NPG_x -Molekülen. Durch weitere Spaltung wird gelbes 4-Nitrophenolat freigesetzt. Diese Freisetzung hat eine meßbare Kinetik. Allerdings ist die Freisetzung des 4NP abhängig von der Art des Substrats: Die Geschwindigkeit nimmt ab in der Reihenfolge: 4 NPG_3 , 4 NPG_2 , 4 NPG_4 , 4 NPG_5 . Die Definition einer Einheit ($\mu\text{mol}/\text{min}$ 4NP), ist daher nur möglich bei Vorliegen eines einheitlichen Substrats. Hierfür wurde 4 NPG_3 als am besten geeignet angesehen.

Kinetisch-enzymatische Amylase-Bestimmung mit Stärke als Substrat

(J. van Wersch und H. Greiling)

Testprinzip ist die Spaltung von Stärke durch α -Amylase zu Maltose und nachfolgende Maltosebestimmung mit Hilfe von Maltosephosphorylase, beta-Phosphoglucomutase und 6-Phosphogluconatdehydrogenase. Eine Einheit ist definiert als Maltose ($1\mu\text{mol}/\text{min} = 1$ Einheit). Die Untersucher ermittelten einen Referenzbereich von 21–78 U/l für Serum und von 78 U/l für Urin. Die Methode wurde durch Hämolyse, Bilirubinämie und Lipämie nicht gestört, dagegen durch Pyruvat und 2-Oxo-Glutarat.

Kinetisch-enzymatische Methode mit Maltotetraose als Substrat

(F. Clerie)

α -Amylase spaltet aus Maltotetraose pro Mol Maltose zwei Mol Maltose ab. Die Maltosebestimmung erfolgt in dieser Methode ebenfalls enzymatisch auf folgendem Weg: Spaltung durch Maltose-Phosphorylase in Glucose und Glucose-1-phosphat, Umwandlung von Glucose-1-phosphat durch beta-Phosphoglucomutase in Glucose-6-phosphat, sowie nachfolgende Oxydation zu 6-Phosphogluconat durch Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase mit Reduktion von NAD zu NADH. Durch Zusatz von Mutarotase entsteht eine schnelle Reaktion 1. Ordnung. Das optimierte System ist 5mal so empfindlich als das System, in dem Stärke als Substrat verwendet wird. Die Vorphase wird auf 4 Minuten reduziert, danach ist die Reaktion 15 Minuten lang linear. Der Normbereich liegt bei 20–110 U/l bei 37°.

In der Diskussion berichtet Wahlefeld, daß der Einsatz von Maltotetraose an Stelle von Stärke als Substrat die Stabilität des Systems verbessert. Das Reagenz ist bei 2–4 Grad 1 Jahr lang stabil. Weiter wird festgestellt, daß die Maltoseproduktion durch α -Amylase aus Stärke spezieabhängig ist, nicht dagegen diejenige aus Maltotetraose oder Maltopentose. Dies kann bei der Verwendung unterschiedlicher Kontrollseren von Bedeutung sein.

Eine stöchiometrische Methode zur Amylasebestimmung über Glucose am ACA

(G. Wermus, T. Adams und R. Menzon)

Die Methode geht von Maltopentaose als Substrat aus und beruht auf folgender Reaktionsfolge: Maltopentaose wird durch α -Amylase gespalten unter Bildung von Maltose und Maltotriose. Diese werden abgebaut durch α -Glucosidase, wobei 5 Moleküle Glucose entstehen, die in der NAD abhängigen HK-G6PDH-Reaktion gemessen werden können. Endogene Glucose, die den Test stören würde, wird in diesem System durch vorausgehende Säulen-Gel-Filtration entfernt. Da aller Teilnehmer der Reaktion in nicht geschwindigkeitsbegrenzenden Konzentrationen vorliegen, ist die NADH-Bildung bei 340 nm proportional der Amylaseaktivität. Auf dieser Proportionalität beruht auch die Eichung ($1\text{ U} = 1\mu\text{mol}$ Substratumsatz/min). Der Normbereich liegt bei 23–85 U/l im Serum.

α -Amylasebestimmung über Glucose mit Stärke als Substrat

(H. Scheuringer)

Die SKI-Methode beruht ebenfalls auf der HK/G6PDH-Reaktion, als Substrat wird jedoch Stärke verwendet. Glucose stört die Bestimmung. Konzentrationen unter 14 mmol/l werden während der 25 Minuten dauernden Vorinkubation abgebaut, bei höheren Konzentrationen ist eine Verdünnung erforderlich.

(R. Spaethe)

Im Gegensatz zu der zuletzt beschriebenen Methode verwendet die Harleko-Methode als Substrat Oligosaccharide mit Kettenlängen zwischen 4 und 12 Glucoseeinheiten. Im übrigen entspricht das Testsystem dem vorher beschriebenen. Probenvolumen, Vorphase, Empfindlichkeit und Störanfälligkeit durch Glucose liegen zwischen der Maltopentaose- und Stärketeknik. Die Länge der Vorphase ist wiederum abhängig von der Glucosekonzentration der Probe. Sie ist je nach Meßtemperatur unterschiedlich lang. Ebenso unterschiedlich ist die Grenzkonzentration der Glucose oberhalb der eine Verdünnung erforderlich ist.

In der Diskussion um die Bestimmungsmethoden mit Glucose als Substrat berichtete Henkel, Hannover, daß die Anwendung des Glucosedehydrogenase-Systems anstelle des HK/G6PDH-Systems das Verfahren vereinfacht. Insgesamt ergab die Diskussion um die Methoden, die Maltose über Glucose bestimmen, daß für alle Variationen ähnliche Problemstellungen bestehen:

Glucose muß aus dem System entfernt werden. Längs der Vorphase und Empfindlichkeit sind abhängig von der Wahl eines geeigneten Substrats. Die Reaktionsoptima der im Test verwendeten Hilfsenzyme sind nicht übereinstimmend. Die Frage der Definition einer Einheit ist nur gelöst, wenn Oligosaccharide mit weniger als 6–7 Glucoseeinheiten verwendet werden. □