

α -Amylase auf dem SMAC

A. Scholer, J. Muser, R. von Rickenbach und Germaine Lüdi
Klinisch-chemisches Zentrallabor, Kantonsspital Basel

Zusammenfassung:

Die α -Amylase kann auf dem SMAC mittels einer Zweipunkt-Kinetik-Methode gemessen werden. Als Substrat wurde Maltotetraose verwendet. Die neue Methode ist weitgehend störungsfrei. Sie korreliert sehr gut mit einer Handmethode ($r = 0,9806$), weist aber eine bessere Präzision auf als die manuelle Analytik.

Schlüsselwörter:

α -Amylase – SMAC – vollenzymatisch – Maltotetraose Substrat

Summary:

α -Amylase can be determined on SMAC by a two-point kinetical way with Maltotetraose used as substrate. The new method is almost free of interferences. It correlates well with a manual method ($r = 0.9806$), but its precision is better than the one of the manual analysis.

Keywords:

α -Amylase – SMAC – fully enzymatic – Maltotetraose substrate

Einführung

Die Entwicklung der α -Amylasebestimmung in den letzten Jahren, insbesondere die neuen enzymatischen Tests erlauben eine Adaption der Methoden auf automatisierte Analysengeräte.

Eine der erwähnten Methoden wurde auf dem SMAC® (Technicon) installiert. Sie richtet sich nach Pierre et al. (1) und verwendet Maltotetraose als Substrat. Diese Wahl wurde getroffen, da die endogene Glucose bei dieser Analytik nicht stört und die Reaktion nach kurzer Anlaufzeit (5 Minuten) linear verläuft. Nach unseren (nicht publizierten) Ergebnissen ist diese Methode viel empfindlicher als z. B. die amyloklastischen Methoden, was auch von anderen Autoren bestätigt wird (5). Ein Nachteil ist dabei allerdings, daß die Isoenzyme der α -Amylase (P = Pankreas, S = Speichel) verschieden reagieren (S-Typ schneller, P-Typ langsamer) (4). Weitere, auf ähnlichem Analysenprinzip basierende Methoden können auf das Gerät noch nicht adaptiert werden (2, 3).

Reagenzien und Methode

Die Herstellung der Reagenzien entspricht den Angaben von Pierre et al. (1). Die gleichen Angaben sind auch den Beipackzetteln der Packungen für die α -Amylasebestimmung der Firmen Beckman Instruments, Gödecke, Biomérieux etc. zu entnehmen:

pH 6,6 (25 °C), Maltotetraose 5 g/l, NAD 2,5 mmol/l, Maltose phosphorylase 3000 U/l, β -phosphoglucomutase 1000 U/l, Glucose-6-phosphat Dehydrogenase 6000 U/l.

Dem nach Vorschrift aufgelösten Reagens wird pro 15 ml 1 Tropfen Triton-X-100 zugesetzt. Haltbarkeit im Kühlschrank etwa 24 Stunden.

Die Bestimmungen wurden bei einer Temperatur von 37 °C durchgeführt. Faktor für die Umrechnung der Extinktionsdifferenzen pro Minute in U/l = 3376.

Zur Qualitätskontrolle wurden Kontrollseren verschiedener Hersteller eingesetzt. Als Standard wurde Monitrol II der Firma Merz & Dade verwendet, ebenso α -Amylase aus *Bacillus subtilis* (Lyophilisat) von Boehringer Mannheim.

Die Prüfung der Störungen erfolgte mit folgenden Substanzen verschiedener Hersteller:

Aethanol, L-Dopa, Kreatinin, 3,4-Dihydroxyphenylsäure, 2,5-Dihydroxybenzoesäure, Ascorbinsäure, Glucose, Glutathion, Pyruvat, Heparin.

Geräte

Die Adaption erfolgte auf einem SMAC, Technicon. Ein Kanal wurde entsprechend dem Fließ-Schema auf Bild 1 ausgerüstet.

Abb. 1 zeigt den einfachen Aufbau des Kanals, der einem LDH-Kanal entspricht. Für diesen Kanal wurde von Technicon ein Computerprogramm entwickelt. Der neue Kanal ist im Gegensatz zum LDH-Kanal für eine steigende Reaktionskinetik programmiert. Um die Verschleppung niedrig zu halten, wurde für die Umrechnung auf dem SMAC-Computer ein Abzug von 5% eingegeben.

Für die Vergleiche wurden ein LKB 2086 (Clinicon) und ein Eppendorf 6121 Photometer (Eppendorf Gerätebau) verwendet (6, 7, 8).

Ergebnisse

Die durch die Anordnung dieses Kanals erreichten Kurvenbilder sind in Abb. 2 dargestellt.

Verschleppung

Die nach Hjelm (9) berechnete Verschleppung ergab einen Faktor von 0,003. Bei Werten bis 1000 U/l ist die Verschleppung also sehr klein (im Streubereich der Methode ca. 3%). Nach Proben mit Werten über 1000 U/l wurden die nachfolgenden Proben wiederholt, wenn deren Werte tief waren.

Linearität

Die Linearität der Methode ist im Bereich von 10–850 U/l gewährleistet, wie Abb. 3 zeigt.

Präzision und Richtigkeit

Die Methode weist eine genügende Präzision in der Serie auf (Tab. 1). Tab. 2 zeigt sowohl die Präzision von Tag zu Tag als auch die Richtigkeit der Methode, da die gleichen Testseren verwendet wurden.

Die Präzision läßt sich noch verbessern (vor allem für Urinanalysen wichtig), wenn dem Reagens 40 g/l Albumin zugesetzt wird. Laut Garber (10) ist dieser Zusatz für die Urinamylasebestimmung unumgänglich. Eigene Versuche bestätigen, daß vor allem bei niederen Aktivitäten die α -Amylase-Aktivität im Urin durch den Albuminzusatz erhöht und die Präzision der Messungen verbessert werden konnte.

Korrelationen

Die Sollwerte der Kontrollseren waren zu Beginn der Studie nicht bekannt. Sie wurden daher mit Hilfe einer manuellen Methode auf dem Photometer Eppendorf PCP 6121 und einer Methode auf dem LKB 2086 ermittelt.

Die Methode auf dem SMAC wurde mit der Handmethode auf dem Photometer Eppendorf PCP 6121 und einer selbst adaptierten Methode auf dem LKB 2086 verglichen. Die Ergebnisse dieser Vergleiche sind in den Abbildungen 4a und 4b zu sehen. Die Bilder zeigen die orthogonale Regression der Werte der Handanalyse (Abb. 4a) und der LKB 2086 Analysen mit den SMAC-Werten (Abb. 4b).

Störungen

Die Prüfung der möglichen Störung durch einige ausgewählte Substanzen ergab die in Tabelle 3 aufgezeigten Ergebnisse.

Von den aufgeführten Substanzen stören Pyruvat in einer Konzentration von 10 mg/ml, starke Lipämie (Triglyceridwerte über 1000 mg/dl) und starke Hämolyse (über 1300 mg/dl Hämoglobin).

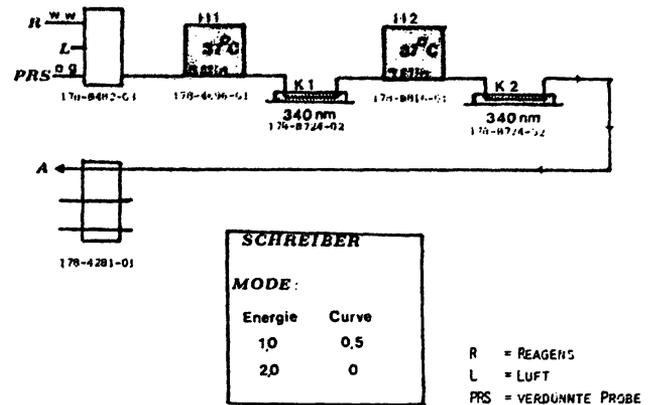


Abb. 1: Fließ-Schema der Methode

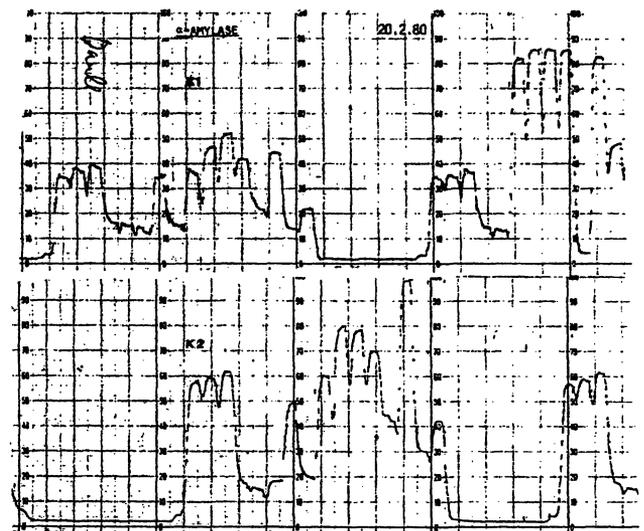


Abb. 2: Kurvenaufzeichnung der beiden Küvetten

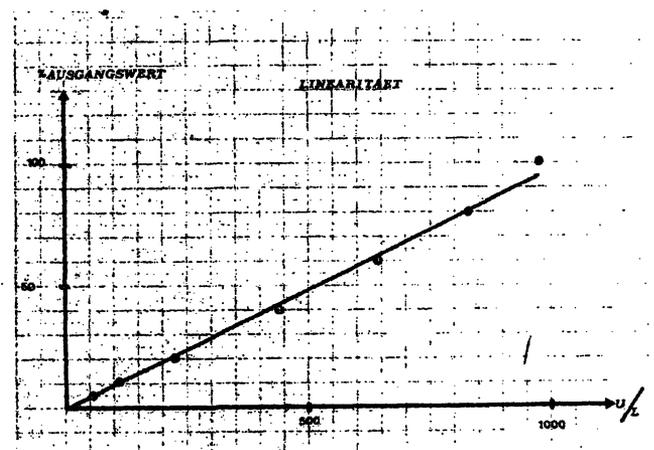


Abb. 3: Linearität im Bereich 0–1000 U/l

Eichung des Kanals

Da im Originalstandard für den SMAC nur geringe, undefinierte Aktivitäten von α -Amylase enthalten sind, wird mit einem Kontrollserum geeicht, das höhere Aktivitäten aufweist (z. B. Monitrol II, ca. 200–250 U/l). Dazu darf aber nur dieser eine Kanal auf dem SMAC in Betrieb sein, da die anderen Kanäle nicht mit diesem Standard geeicht werden. Die Eichung erfolgt aus der „Standard 1“-Position des SMAC.

Tab. 1: Präzision in der Serie.

Serie	n	\bar{x}	s	VK%
I	14	76,6	3,5	4,6
II	17	241,5	2,3	0,9
III	12	44,7	3,7	8,4
IV	33	229,2	4,7	2,1
V	34	787,0	18,5	2,3

Tab. 2: Richtigkeit und Präzision von Tag zu Tag.

Kontrolle	Soll U/l	1 Ist U/l	2 Ist U/l
Hyland N	90	89	86
Hyland P	232	227	231
Precinorm U	93	94	87
Seroquant	64	55	52

Hyland P	n = 18	s = 17,14
	\bar{x} = 244,3	VK% = 7,0

Die beste Lösung ist, dem SMAC-Standard eine definierte Menge α -Amylase beizufügen. Wir führten diesen Versuch unter Verwendung von α -Amylase aus *Bazillus subtilis* (100mg) mit einer ungefähren Aktivität von 200–300 U/l durch. Alle anderen Parameter wurden auf Störungen durch den Zusatz dieser α -Amylase zum Eichserum des SMAC geprüft. Eine Störung wurde nur beim Calcium festgestellt, da die α -Amylase vom Hersteller in einer Calcium-Acetatlösung geliefert wird. Diese Störung zu beheben, dürfte nicht schwierig sein.

Tab. 3: Störeinflüsse ausgewählter Substanzen.

Substanz	Gehalt	Störung
Aethanol	2‰	–
L-Dopa	100 mg%	–
Kreatinin	100 mg%	–
3,4-Dihydroxyphenyl-essigsäure	100 mg%	–
2,5-Dihydroxybenzoesäure	100 mg%	–
3,4-Dihydroxybenzoesäure	100 mg%	–
Ascorbinsäure	100 mg%	–
Glucose	1000 mg%	–
Glutathion	100 mg%	–
Pyruvat	10 mg%	100% Verlust
Pyruvat	2,5 mg%	–
Heparin	50 IU	–
Lipämie	stark	ab ~1000 mg% Triglyceride Störungen
Bilirubin	20 mg%	–
Haemolyse	1300 mg%	ab 1300 mg% Hb Störung

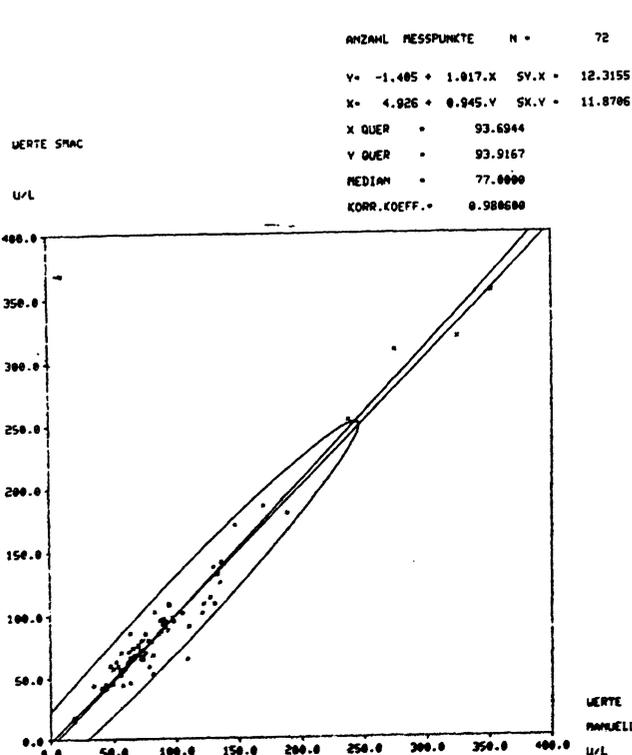


Abb. 4a: Korrelation und orthogonale Regression beim Vergleich der neuen Methode mit einer manuellen Methode

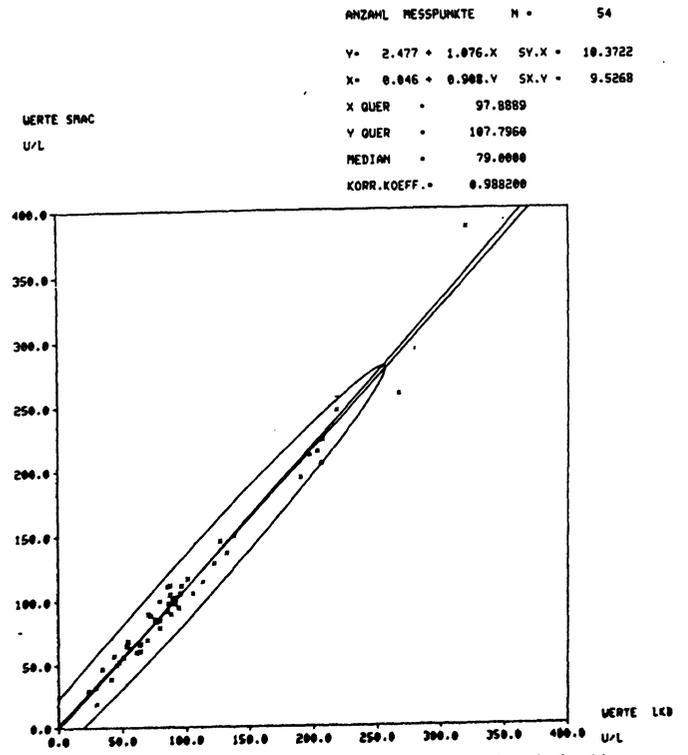


Abb. 4b: Korrelation und orthogonale Regression beim Vergleich der neuen Methode mit einer entsprechenden LKB-Methode

Tab. 4: Fehleranzeigen des SMAC während eines Monats.

8-Stunden-Tag, während 1 Monat	
am häufigsten	„SHIFT“ (13 x)
selten	„FIRST SAMPLE“ (3 x)
selten	„MIXED ERROR“ (2 x)
selten	„DWELL FAST“ (6 x)*
sonst keine Fehleranzeigen	

* Dwell nicht von Anfang an bekannt.

Fehlermeldungen

Da die Anordnung des verwendeten Kanals (Zweipunkt-Kinetik, zunehmende Extinktion) sonst auf dem SMAC nicht zu finden ist, wurde die Häufigkeit der evtl. durch den neuen Kanal verursachten Fehleranzeigen geprüft. Es ergab sich ein auch für andere Kanäle übliches Bild, wie aus Tab. 4 hervorgeht. Die häufigen Dwell-Fehler zu Beginn der Versuche wurden durch fehlende Kenntnisse der Dwell-Zeit verursacht.

Normalwerte

Um die Angaben des Reagenzienherstellers (11) zu prüfen, wurde Serum und Urin von gesunden Probanden (Personal des Kantonsspitals Basel) auf α -Amylase-Aktivitäten untersucht. In Tabelle 5 sind die Referenzwerte der bei uns verwendeten neuen α -Amylasebestimmungsmethode aufgeführt. Dabei sind die Werte für den 24-Stunden-Urin und die Urinportion (spontan) mit den Angaben in der Literatur vergleichbar. Zusätzlich sind die auf die Kreatininausscheidung umgerechneten Normalwerte zu finden.

Diskussion

Wie die Ergebnisse zeigen, zeichnet sich die Methode durch eine gute Präzision in der Serie und von Tag zu Tag aus. Die Richtigkeit wurde durch die Werte aus verschiedenen Kontrollseren bewiesen.

Die Korrelationen und die Regressionsgeraden lassen auf eine gute Übereinstimmung der Methode mit der Hand- und anderen automatisierten Methoden schließen. Alle weiteren Ergebnisse beweisen, daß die neue α -Amylase-Bestimmung

auf dem SMAC eine hohe Linearität, wenig Störeinflüsse (lediglich höhere Pyruvatkonzentrationen, starke Hämolyse, starke Lipämie) und wenig Fehleranzeige aufweist.

Es muß allerdings darauf hingewiesen werden, daß der SMAC eine Screening-Maschine ist und die α -Amylase sicherlich keinen Screening-Parameter darstellt. Die Kanäle können aber einzeln standardisiert und benutzt werden, was bestimmt dort nützlich ist, wo wenig andere Geräte für größere Analysenserien vorhanden sind. Mit DM 0,70 pro Analyse (Annahme: 400 Analysen, wenn das Gerät 8 Std. auf Reagenzien läuft) liegt der Preis für die Reagenzien noch relativ hoch.

Die neue α -Amylase-Methode auf dem SMAC kann den an sie gestellten Anforderungen genügen und läßt sich leicht auf ein solches Analysengerät adaptieren.

Schrifttum:

1. PIERRE, K. J., TUNG, K. K., NAJ, H.: A New Enzymatic Kinetic Method for Determination of α -Amylase. Clin. Chem. 22, 1219 (1976).
2. KAUFMANN, R. A., DUNKA, L. J., HALL, L. M.: Optimization of a Kinetic Colorimetric α -Amylase Assay Using the Defined Substrate P-Nitrophenyl- α -D-Maltoheptaoside. Clin. Chem. 26, 1018 (1980).
3. HAEGELE, E. O., SCHAICH, E., RAUSCHER, E., LEHMANN, P., GRASSL, M.: Action Pattern of Human Pancreatic α -Amylase on Maltoheptaose, a Substrate for Determining α -Amylase in Serum. J. Chrom. 223, 69-84 (1981).
4. SAMPSON, E. J., DUNCAN, P. H., FAST, D. M., WHITNER, V. S., MCKNEALLY, S. S., BAIRD, M. A., MACNEIL, M. L., BAYSE, D. D.: Characterization and Intermethod Relationships of Materials Containing Purified Human Pancreatic and Salivary Amylase. Clin. Chem. 27, 714-720 (1981).
5. ABRAHAM, K., WEIGOLD, W. W.: Ergebnisse der α -Amylase-Bestimmung mit der enzymatischen und der Jod-Stärke-Methode. Vortrag am Kongreß der deutschen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin, Berlin 3.-7. 5. 1981.
6. Product Labelling for the Technico SMAC, High Speed Computer-Controlled Biochemical Analyzer. Technical Publication No. UA-0306-00 (1974), Technicon Instruments Corporation, Tarrytown, N.Y., USA.
7. Instruction Manual, Reaction Rate Analyzer 2086 Enzyme Analyzer, I-2086-E01, LKB Produkter AB, S-16125 Bromma, Schweden.
8. Bedienungsanleitung PCP 6121, Eppendorf Gerätebau, Netheler & Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland.
9. HJELM, M.: Quality Control of Automated Analytical Systems in Clinical Chemistry. Z. Anal. Chem. 243, 781-790 (1968).
10. GARBER, C. C., CAREY, R. N.: Albumin Activation of Urinary Amylase as Determined with the Du Pont ACA. Clin. Chem. 24, 702-705 (1978).
11. Beckman, Enzymatic Amylase-PS, Beckman Instructions 015-555560, Beckman Instruments Inc., Carlsbad, Ca. 92008, USA.

Anschrift der Verfasser:

André Scholer
Leiter des klinisch-chemischen Laboratoriums
Kantonsspital
CH-4031 Basel

Jürgen Muser
Richard von Rickenbach
Germaine Lüdi
(alle gleiche Adresse)



Tab. 5: Normalwerte in Serum und Urin (Werte in U/l).

Material	Geschlecht	Anzahl Probanden	\bar{x}	S	2s Bereich	95 Percentile
Serum	♀	50	76,5	22,4	33-121	30-120
Serum	♂	168	68,0	45,0	23-113	30-120
Serum	♀+♂	218	69,8	22,7	24-115	30-120
Serum*	♀+♂	?	?	?	20-110	?
Urin Portion	♀+♂	?	?	?	25-450	?
Urin 24 Std.	♀+♂	?	?	?	20-350	?
Urin 24 Std.	♀	20	13,12	2,1	9,0-17,0 U/mmol Kreatinin	
Urin 24 Std.	♂	20	10,35	1,76	6,5-14,0 U/mmol Kreatinin	

Bedingungen: 37°C, Faktor 3376 (11)

* Angaben laut (11)