

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 19, 1981, pp. 1057–1061

Die polarimetrische Messung der α -Amylase-Aktivität

Von W. Hönig, E. Moshudis und K. Oette

Abteilung für Klinische Chemie (Leiter: Prof. Dr. K. Oette) Universitätskliniken Köln

(Eingegangen am 23. Februar/15. Juni 1981)

Zusammenfassung: Die relativ langsam ablaufende Hauptreaktion der amylasekatalysierten Hydrolyse von Oligosacchariden ist die Voraussetzung dafür, daß die Mutarotation als natürliche Folgereaktion keinen wesentlichen Einfluß auf die Kinetik der Gesamtreaktion besitzt. Für eine polarimetrische Aktivitätsbestimmung der α -Amylase sind relativ große Probenmengen und lange Meßzeiten (Drehwinkeländerung pro Zeit) notwendig. Deshalb ist als Probenmaterial nur Urin und Duodenalsaft geeignet. Wegen der Unabhängigkeit von Folgereaktionen und Hilfsenzymen ist die polarimetrisch gemessene Kinetik der wahren Kinetik der Amylasereaktion generell näher als die mit vollenzymatischen Methoden gemessene und die polarimetrische Einzelbestimmung weniger anfällig gegen individuelle Störungen durch Probenbestandteile. Die dargestellten Ergebnisse polarimetrischer Untersuchungen zeigen bei Meßzeiten im Minutenbereich eine ausgezeichnete Linearität der Einzelkinetik, eine sehr gute Proportionalität zwischen Meßgröße und Enzymmenge und eine gute Präzision in der Serie (VK = 1,3%). Ein Vergleich der polarimetrischen mit einer chromogenen und einer vollenzymatischen Methode ergab brauchbare Korrelationen (r jeweils etwa 0,98). Die Vor- und Nachteile der polarimetrischen Methode unter Einbeziehung möglicher Störfaktoren werden diskutiert.

Polarimetric determination of α -amylase activity

Summary: In the study of the relatively slow amylase-catalysed hydrolysis of oligosaccharides, it is assumed that the subsequent mutarotation has essentially no effect on the kinetics of the total reaction. Relatively large samples and long measurement times (slow rate of change in angle of rotation) are necessary for the polarimetric determination of α -amylase activity. For these reasons, only urine and duodenal juice are suitable as sample sources. Owing to the absence of coupled reactions and auxiliary enzymes, the polarimetrically determined kinetics are generally more representative of the true kinetics of the amylase reaction, than those obtained with fully enzymic methods; in addition, single determinations by the polarimetric method are less subject to interference by sample components. With measurement times in the order of minutes, the polarimetric method shows excellent linearity, very good proportionality between analytical response and quantity of enzyme, and good precision in series (CV = 1.3%). Comparison of the polarimetric with a chromogenic and a fully enzymic method showed an acceptable correlation (r for each method was about 0.98). The advantages and disadvantages of the polarimetric method, with consideration of possible interfering factors, are discussed.

Einführung

Nach einigen neueren Arbeiten (1–3) ermöglichen Aktivitätsbestimmungen der α -Amylase im Urin bei pankreasbedingten und anderen gastrointestinalen Erkrankungen schärfere diagnostische Aussagen als die Bestimmung im Serum, besonders dann, wenn die α -Amylase im Harn auf Kreatinin bezogen wird. Das spricht dafür, bei Nierengesunden den Beitrag der α -Amylase zur Pankreasdiagnostik auf Aktivitätsbestimmungen im Urin zu beschränken. Wegen der höheren Enzymkonzentration im Urin besteht die Möglichkeit, die Amylasekinetik anhand von Änderungen der optischen Drehung zu verfolgen. Denn während die polarimetrische im Vergleich zur photometrischen Messung die Verfolgung der Hauptreak-

tion ohne störende Einflüsse erlaubt, ist andererseits ihr Meßsignal, die Drehwinkeländerung, kleiner als die Absorptionsänderung der meisten photometrischen Methoden. Im folgenden sollen die wichtigsten Grundlagen für die Anwendung der polarimetrischen Methode im klinischen Laboratorium dargestellt werden.

Methodik

Durchführung der Experimente

Oligosaccharide

Die Substrate Maltopentaose und Maltotetraose wurden aus einem Glucosesirup 01127 der Fa. Maizena, Hamburg, der 9–10% Maltotetraose und 7–7,5% Maltopentaose enthielt, durch fraktionierte Elution von einer Kohle-Kieselgur-Säule (4)

0340-076X/81/0019-1057\$02.00

© by Walter de Gruyter & Co. · Berlin · New York

als etwa 90–95 % reine Oligosaccharide gewonnen. Dünnschichtchromatographisch wurde auf Kieselgel-G Platten (Fa. Merck, Darmstadt) im Lösungsmittelsystem *n*-Butanol-Eisessig-Wasser (50 ml + 30 ml + 3 ml) (5) als Hauptverunreinigung das um jeweils eine Einheit höhere Oligosaccharid gefunden. Vorversuche mit Maltopentaose als Substrat ergaben eine wesentlich größere Drehwinkeländerung pro Minute als mit Maltotetraose. Alle weiteren Versuche wurden daher mit Maltopentaose durchgeführt.

Bestimmungsansatz

Bei allen Bestimmungen wurden 250 μ l Probe und 1000 μ l Reagenzlösung eingesetzt. Die wäßrige Reagenzlösung enthielt 20 mmol/l NaCl, 50 mmol/l Na-Phosphatpuffer (pH 6,9) und 20 mmol/l Maltopentaose.

Gerät

Die kinetischen Messungen erfolgten mit einem Perkin-Elmer-Polarimeter 241 (Na- und Hg-Lampe) bei 365 nm (Duodenalsaftverdünnungen) oder 436 nm (Urin) in einer bei 30 °C thermostatisierten Mikroküvette (10 cm Lichtweg und etwa 1 ml Volumen). Die Messungen bei kleinerer Wellenlänge liefern einen höheren Drehwert. Da es aber für die Präzision der Messung bzw. die Stabilität der Anzeige unbedingt notwendig ist, bei Intensitäten über 60 μ A zu messen, muß man bei stärker absorbierenden Proben auf größere Wellenlängen umschalten.

Zusätzliche Analytik

Der Nachweis von Ascorbinsäure im Urin wurde mit dem Teststreifen Rapignost-Glucose der Behringwerke AG, Marburg durchgeführt, der Nachweis von α -Glucosidase durch eine Drehwinkeländerung mit Maltose als Substrat. Normale (α -glucosidasefreie) Urine zeigen hierbei keine Drehwinkeländerung.

Für Methodenvergleiche wurden als Bestimmungsmethode mit einem chromogenen Substrat Amylochrome der Firma La Roche/ Basel und als NADH-abhängige Methode Monamyl-neu (Substrat Maltotetraose) der Firma Biomed/München nach den Firmenvorschriften benutzt. Meßstrahlung: 620 nm (Amylochrome) und 340 nm (Monamyl).

Theoretische Grundlagen der polarimetrischen Aktivitätsbestimmung

Tabelle 1 gibt für 2 wichtige niedermolekulare Substrate der α -Amylase die Drehwinkeländerungen bei vollständigem Umsatz gemäß den angeführten Gleichungen an (6). Die relativen Drehwinkeldifferenzen, die naturgemäß für jede beliebige Ausgangskonzentration gleich sind, vergrößern sich beträchtlich,

Tab. 1. Drehwinkel α_D^{25} (25 °C, Licht der D-Linie des Natriums, (6)) von Lösungen 0,1 mol/l Maltopentaose bzw. Maltotetraose, deren Hydrolyseprodukten bei vollständigem Umsatz und die absoluten und relativen Drehwinkeldifferenzen.

Reaktions-schritte	α_S	α_P	$\Delta\alpha$	$\frac{\Delta\alpha}{\alpha_S}$
Maltopentaose —(a)→ Maltotriose + Maltose —(b)→ 5 Glucose				
(a)	14,87	8,07 + 4,46	2,34	0,157
(a) + (b)	14,87	5 × 0,95	10,12	0,681
Maltotetraose —(a)→ 2 Maltose —(b)→ 4 Glucose				
(a)	11,80	2 × 4,46	2,88	0,244
(a) + (b)	11,80	4 × 0,95	8,00	0,678

(a): durch α -Amylase katalysierter Reaktionsschritt
(b): durch α -Glucosidase katalysierter Reaktionsschritt
Index S: Substrate Index P: Produkte

wenn der α -Amylase-Reaktion eine durch α -Glucosidase katalysierte Folgereaktion nachgeschaltet wird. Doch zeigt diese zweite Reaktion eine so starke Produkthemmung ($\frac{K_i}{K_m} = \frac{1}{7,8}$; K_i = Inhibitor-konstante, K_m = Michaeliskonstante), daß sie nur über einen sehr geringen Umsatzbereich linear verläuft (7).

Nach Saito et al. (8) sind mit menschlichen Pankreas- und Speichel- α -Amylasen die Spaltmechanismen für Maltopentaose und Maltotetraose eindeutig und entsprechen den Schemata in Tabelle 1. Mit beiden Substraten kann also nach Bestimmung der Drehwinkel für Ausgangsstoffe und Produkte aus der Drehwinkeländerung pro Minute die Enzymaktivität definitionsgemäß als Substratumsatz pro Minute beschrieben werden.

Bei der Drehwinkelbestimmung muß sich bei allen beteiligten Substanzen das Mutarotationsgleichgewicht eingestellt haben. Die Hauptreaktion (α -Amylase) muß also im Vergleich zur Folgereaktion (Mutarotation) langsam verlaufen. Wandrey et al. (7) diskutieren den Einfluß der Mutarotation auf die Gesamtreaktion an einem Modell, das unter der Annahme einer Reaktionskonstante 1. Ordnung für die Hauptreaktion bei verschiedenen

Verhältnissen von $\frac{k_2}{k_1}$ die maximalen Fehler liefert (k_2 = Geschwindigkeitskonstante der Mutarotation, k_1 = Geschwindigkeitskonstante der α -Amylasereaktion). Wenn man z. B. $\frac{k_2}{k_1}$ -Quotienten von 10:1, 50:1 und 100:1 hat, beträgt der Anteil von „Extra- α -Oligosaccharid“, d. h. noch nicht im Mutarotationsgleichgewicht befindlicher Maltose und Maltotriose 7,75, 1,80 und 0,95 %. Stellt man unterschiedliche $\frac{k_2}{k_1}$ -Quotienten mit einer

α -Amylase-Verdünnungsreihe ein, so läßt sich aus der Beziehung zwischen Enzymaktivität und relativer Enzymmenge die Güte der Gleichgewichtseinstellung ablesen. Für eine Berechnung des Umsatzes und der Enzymaktivität in internationalen Einheiten (I. E.) werden die Drehwinkel der Spaltprodukte bei vollständigem Gleichgewicht zugrundegelegt. In der vorliegenden Arbeit wird die Amylaseaktivität noch nicht in I. E. angegeben, da die Malto-Oligosaccharide nicht völlig rein zu erhalten waren. Aussagen über die Brauchbarkeit der Meßmethodik werden davon nicht betroffen.

Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung 1 sind die Einzelkinetiken für verschiedene Ansätze dargestellt. Über eine Drehwinkeldifferenz von mindestens 0,150 Grad, was einem Umsatz von etwa 15% entspricht, verläuft die Zeit-Umsatz-Kurve linear. Die Kurve c zeigt die Kinetik für einen von 20 untersuchten Urinen, die jeweils nach einer Vorinkubation von 10 Minuten (wegen geringer Linearitätsabweichung in den ersten Minuten bei allen Messungen) 20 min verfolgt wurde. Keiner der Zeit-Umsatz-Verläufe zeigte Abweichungen von der Linearität. Die Präzision in der Serie, getestet an einem Urin, ist in Tabelle 2 dargestellt.

Abbildung 2 zeigt die α -Amylaseaktivitäten einer Duodenalsaftverdünnungsreihe, ausgedrückt in Grad/min.

Die ausgezeichnete Linearität der Einzelkinetiken über einen relativ großen Umsatzbereich zeigt, daß sich eine Produkthemmung, wie sie bei der Einwirkung von α -Glucosidase auf Malto-Oligosaccharide überaus stark in Erscheinung tritt (s. Methodik), nicht bemerkbar macht. Die gute Linearität der Verdünnungsreihe weist darauf hin, daß die Abweichungen vom Mutarotationsgleichgewicht im untersuchten Aktivitätsbereich gering sind. Die

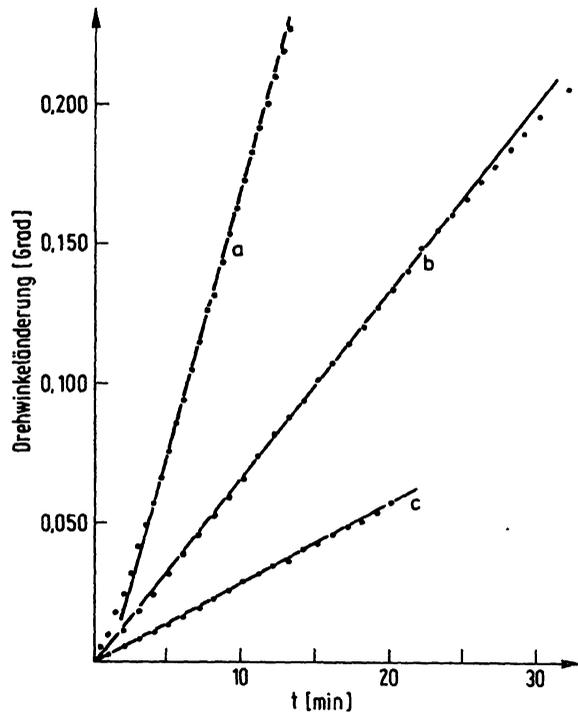


Abb. 1. Drehwinkeländerung als Funktion der Zeit für einzelne Ansätze
 (a) Probe: 10 μ l unverdünnter Duodenalsaft (Proben-
 volumen und entsprechend Gesamtvolumen abwei-
 chend von den Angaben unter „Methodik“). Meß-
 beginn nach dem Mischen
 (b) und (c): Meßbeginn nach einer Vorinkubation von
 10 Minuten
 (b) Probe: 250 μ l Duodenalsaftverdünnung (vgl. Abb. 2)
 (c) Probe: 250 μ l Urin A 26

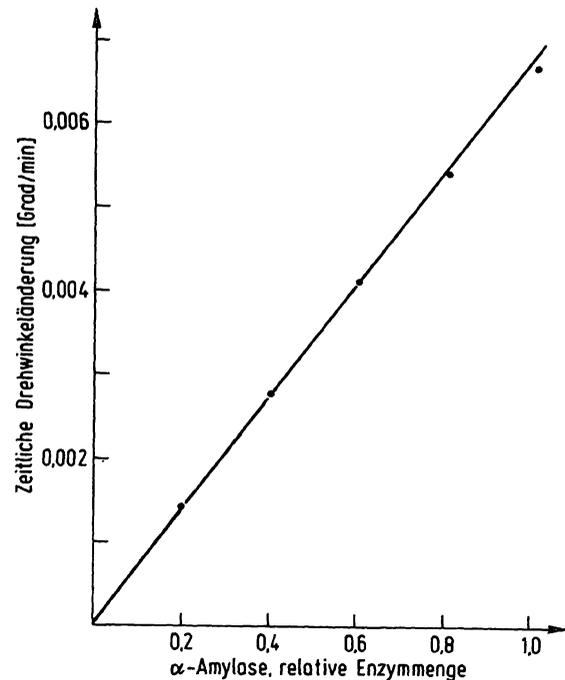


Abb. 2. Drehwinkeländerung pro Minute (Enzymaktivität) für
 Weiterverdünungen einer Duodenalsaft-Primärverdü-
 nung.
 Primärverdünnung: Duodenalsaftfraktion D₃ nach Sekre-
 tinstimulierung, 1:50 verdünnt mit Albumin 20 g/l in
 einer Natriumchloridlösung 155 mmol/l.

Aktivität der Ausgangs-Duodenalsaftverdünnung der Verdünnungsreihe betrug mit dem Amylochrome-Roche-Verfahren 2000 U/l. Der obere Normwert beträgt für dieses Verfahren etwa 1500 U/l.

Unter den modernen routineüblichen Amylasebestimmungsmethoden ist keine als echte Referenzmethode für einen Vergleich mit dem polarimetrischen Verfahren geeignet. Die vollenzymatische Methode nach *Pierre et al.* (9) wird durch hohen Pyruvatgehalt und α -Glucosidase empfindlich gestört (10, 11). Beide Störungen, die bei einer Reihe von Krankheitsbildern auftreten können, erniedrigen die NADH-Konzentration und spiegeln

Tab. 2. Präzision in der Serie für 12 polarimetrische Messungen an einem Urin. Meßbedingungen siehe Methodik. Die Tabelle zeigt die nach 20 min erhaltenen Drehwinkel-differenzen $\Delta\alpha$ in Grad und ihre Häufigkeit n.

$\Delta\alpha$	n	
-0,053	2	$\bar{x} = -0,0519$
-0,052	7	$s = \pm 0,00067$
-0,051	3	VK = $\pm 1,3\%$

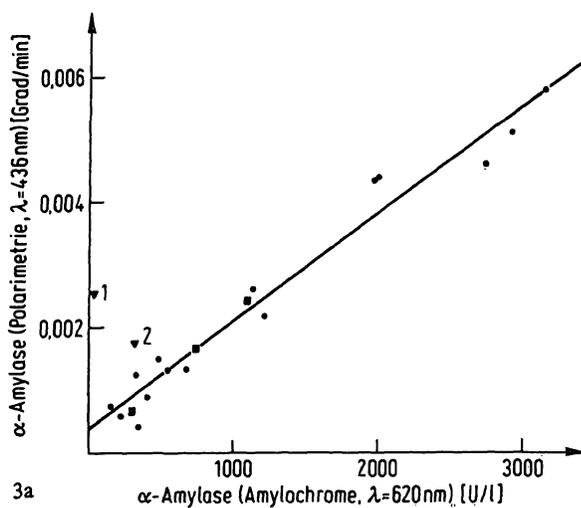
falsch-niedrige Werte vor. Bei der polarimetrischen Erfassung der α -Amylase im Urin ist die α -Glucosidase-katalysierte Sekundärreaktion der Spaltprodukte Maltose und Maltotriose möglich. Im Gegensatz zur Störung bei der Methode nach *Pierre et al.* (9) erhöht sich dadurch das Meßsignal und somit die scheinbare α -Amylase-Aktivität. Bei pathologischen α -Amylasewerten kann die Aktivität der α -Glucosidase in einem gesonderten Ansatz mit dem Substrat Maltose bestimmt und in ihrem Beitrag bei der α -Amylaseaktivität berücksichtigt werden.

Bei chromogenen Substraten mit Cibacron Blau kann die apparente α -Amylase-Aktivität durch reduzierende Substanzen, z. B. Ascorbinsäure, erniedrigt sein.

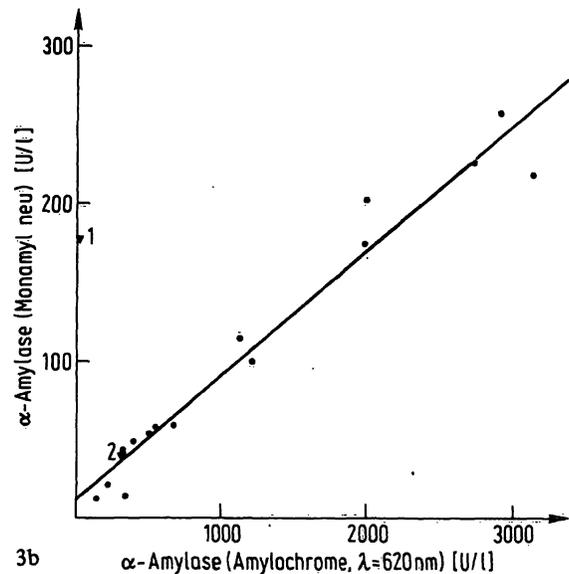
Die Abbildungen 3a, b und c zeigen einen orientierenden Methodenvergleich: 3a (Amylochrome-Polarimetrie) umfaßt 20 Werte, 3b (Amylochrome-Monamyl neu) und 3c (Monamyl neu-Polarimetrie) beziehen sich auf 17 Proben.

In der Probe 1 konnte eine Störung durch Ascorbinsäure und in der Probe 2 durch α -Glucosidase nachgewiesen werden. Die Korrelationskoeffizienten für das um diese Proben verkleinerte Kollektiv (n = 15) sind praktisch identisch.

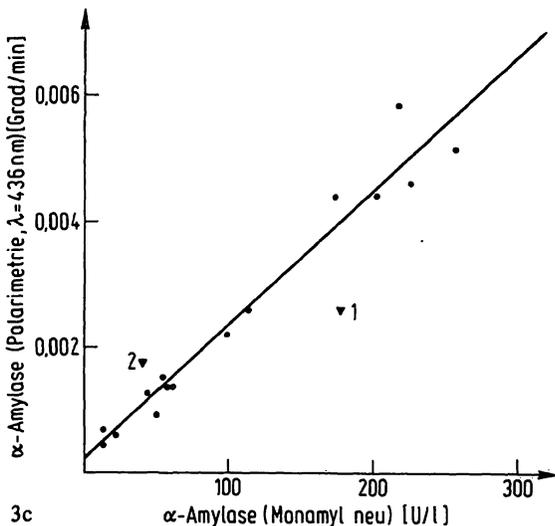
Sieht man von der konventionellen amyloklastischen ab, so ist die polarimetrische Bestimmung der α -Amylase die einzige Methode, die keine Hilfs- und Indikatorreaktionen enthält. Bei den kontinuierlich meßbaren Amylase-



3a



3b



3c

Abb. 3. Methodenvergleiche an 20 (3a) bzw. 17 (3b, 3c) Urinen
 3a: Amylochrome – Polarimetrie
 3b: Amylochrome – Monamyl-neu
 3c: Monamyl-neu – Polarimetrie
 ●: Proben in allen 3 Vergleichen enthalten (3a, 3b, 3c)
 ■: Proben nur im Vergleich Amylochrome – Polarimetrie (3a) enthalten
 ▼: Proben mit nachgewiesener erheblicher Störung mindestens eines Nachweises; (1): durch Ascorbinsäure (2): durch α -Glucosidase; weitere Störfaktoren sind möglich.
 Korrelationskoeffizienten für die mit ● bezeichneten Kollektive (n = 15): 3a: r = 0,982; 3b: r = 0,979; 3c: r = 0,979.

reaktionen mit unterschiedlichen enzymkatalysierten Folgeschritten (9, 12) bestehen neben den genannten probenspezifischen auch generelle Einflüsse der Folgereaktionen auf die Gesamtreaktion. Sie zeigen sich im verzögerten Erreichen der Maximalgeschwindigkeit der Bruttoreaktion, die notwendigerweise geringer ist als die Geschwindigkeit der Hauptreaktion („Wendepunktkinetik“). Bei der polarimetrischen Methode zeigt sich der Einfluß der Mutarotation in einem zu geringen Umsatz (Aktivität). Die Abweichungen sind für eine gegebene Aktivität pro Volumen gleich und liegen bei mittleren Aktivitäten im Urin nach theoretischen Abschätzungen und den Ergebnissen aus Abbildung 2 unter 2%. Die einzige, in vereinzelt Fällen (insbesondere bei bestimmten Nierenerkrankungen) zu berücksichtigende Störung ist somit die durch α -Glucosidase. Sie liefert falsch-hohe Werte, ist mit der gleichen Methode erkennbar und möglicherweise quantitativ bestimmbar. Die polarimetrische Methode läßt sich insgesamt folgendermaßen bewerten:

- Der zeitliche Verlauf der Einzelreaktion ist über einen großen Umsatzbereich (etwa 15%) linear.

- Die Messungen zeigen eine hohe Präzision.
- Die Störanfälligkeit ist geringer als bei den Methoden mit enzymatischen Folgereaktionen.
- Nach Bestimmung der Drehwinkeldifferenz mit reinen Substanzen liefert das Verfahren auf Grund der zu vernachlässigenden Störanfälligkeit richtige Werte. Es ist damit als Referenzmethode besser geeignet als die bekannten Verfahren.
- Die Gerätekosten sind hoch, insbesondere dadurch, daß Polarimeter gegenwärtig nicht anderweitig im klinischen Routinelabor einsetzbar sind.
- Die auf dem Markt befindlichen Geräte eignen sich nur für Einzelmessungen.
- Auf Grund des kleinen Meßsignals sind relativ lange Meßzeiten erforderlich und ist die Methode nur für Urin und Duodenalsaft, nicht aber für Serum einsetzbar.

Danksagung

Wir danken der Firma Perkin-Elmer/Überlingen herzlich für die Überlassung des Polarimeters 241 als Leihgabe zur Durchführung der Untersuchungen.

Literatur

1. Bachmann, C., Colombo, J. P. & Lorenz, E. (1979) *Schweiz. Med. Wochenschr.* **109**, 1256–1259.
2. Großberg, J., Wapnick, S., Purow, E. & Purow, J. R. (1979) *Am. J. Gastroenterol.* **72**, 41–45.
3. Lewitt, M. D. & Ellis, C. J. (1979) *Am. J. Gastroenterol.* **72**, 60–64.
4. Whistler, R. L. & Durso, D. F. (1950) *J. Amer. Chem. Soc.* **72**, 677–679.
5. Weill, C. E. & Hanke, P. (1962) *Anal. Chem.* **34**, 1736.
6. Rauen, H. M. (Hrsg.), *Biochemisches Taschenbuch*, 2. Auflage, Berlin–Göttingen–Heidelberg 1964.
7. Wandrey, Ch., Hönig, W. & Kula, M.-R. (1977) *Europ. J. Appl. Microbiol.* **3**, 257–265.
8. Saito, N., Horiuchi, T., Yoshida, M. & Imai, T. (1979) *Clin. Chim. Acta* **97**, 253–260.
9. Pierre, K. J., Tung, K. K. & Nadj, H. (1976) *Clin. Chem.* **22**, 1219.
10. Hanson, N. Q. & Yasmineh, W. G. (1978) *Clin. Chem.* **24**, 762–768.
11. Meier, H., Henkel, E. & Dankert, H. (1979) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **17**, 709–716.
12. Wilson, C. S. & Barrett, M. J. (1975) *Clin. Chem.* **21**, 947.

Dr. Werner Hönig
Abteilung für Klinische Chemie
der Universitätskliniken Köln
Joseph-Stelzmann-Str. 9
D-5000 Köln 41

