

## Eine vereinfachte Modifikation der Hydroxamatmethode zur Bestimmung der Cholinesteraseaktivität im Blut

Von H. WILLGERODT, H. THEILE und K. BEYREISS

Aus der Kinderklinik der Universität Leipzig (Direktor: Prof. Dr. med. S. Liebe)

(Eingegangen am 11. Januar 1968)

Beschreibung einer vereinfachten Modifikation der Hydroxamatmethode zur Bestimmung der Cholinesteraseaktivität im Serum. Das Verfahren ist zur Anwendung im klinischen Routinebetrieb geeignet. Die erforderliche Serummenge beträgt 25 bzw. 50  $\mu$ l. Als Substrat wird Acetylcholin verwendet. Die Normalwerte bei 50 gesunden Blutspendern betragen  $3470 \pm 600$  IU/l. Der relative Fehler der Methode beträgt 3,2%. Das Verfahren beruht auf der Bildung eines rötlich-braunen Komplexes aus  $Fe^{+++}$ -Ionen und Acetylhydroxamsäure mit einem breiten Absorptionsmaximum bei 490 nm. Zur praktischen Durchführung der Bestimmung sind lediglich ein thermokonstantes Wasserbad von 37° und ein Photometer bzw. Kolorimeter, das Ablesungen bei 490 nm gestattet, notwendig.

A method is described for the determination of serum cholinesterase activity by a simplified modification of the hydroxamate method. The method is suitable for routine determinations in the clinical laboratory. 25 or 50  $\mu$ l of serum are required. Acetylcholine is used as the substrate. The normal value determined in 50 healthy blood donors was  $3470 \pm 600$  IU/l. The relative error of the method is 3.2%. The method is based on the formation of a red-brown complex (absorption maximum 490 nm) between  $Fe^{+++}$  ions and acetylhydroxamic acid. A constant temperature water bath at 37° and a photometer or colorimeter for measurements at 490 nm are required.

Im Gegensatz zu der früher häufig geäußerten Zurückhaltung wird die Bedeutung der Cholinesteraseaktivität<sup>1)</sup> des Serums für die Beurteilung der Leberfunktion und die Diagnostik und Verlaufskontrolle verschiedener Erkrankungen der Leber durch zahlreiche neuere Mitteilungen (1, 2, 3) unterstrichen. Von besonderem Wert ist die Bestimmung der Cholinesteraseaktivität bei chronischen Leberparenchymschäden und degenerativen Erkrankungen der Leber, während die Aktivität der Serumtransaminasen hier von geringer Aussagekraft ist. Auch für die Feststellung von Vergiftungen mit organischen Phosphorsäureestern, die in zahlreichen modernen Pflanzenschutzmitteln enthalten sind, ist die Bestimmung der Cholinesteraseaktivität des Serums unerlässlich.

Die zahlreichen Methoden zur Bestimmung cholinesteraspaltender Enzyme lassen sich in zwei große Gruppen einteilen. Zur ersten Gruppe gehören Methoden wie das manometrische Verfahren von AMMON (4) und die automatische elektrometrische Titration, mit denen die Kinetik der Spaltung gut verfolgt werden kann. Sie sind die empfindlichsten und zugleich exaktesten bisher bekannten Methoden. Im klinischen Routinebetrieb konnten sich diese Methoden wegen des beträchtlichen zeitlichen und technischen Aufwandes aber nicht durchsetzen.

Bei der zweiten Gruppe von Verfahren handelt es sich im wesentlichen darum, das innerhalb einer bestimmten Zeitspanne nicht umgesetzte Substrat zu bestimmen. Das kann direkt geschehen durch Messung der nicht gespaltenen Cholinester in Form ihrer Eisenhydroxamate oder im Falle des Benzoylcholins, das ein spezifisches Absorptionsmaximum bei 240 nm besitzt, spektrophotometrisch nach KALOW (5), wobei die Extinktionsabnahme bei der enzymatischen Spaltung von Benzoylcholin registriert wird. Andere Verfahren verfolgen die bei der Hydrolyse von Acetylcholin freigesetzte Essigsäure durch direkte Messung der pH-Änderung am Ende

der Einwirkungszeit des Enzyms, was ein empfindliches pH-Meßgerät voraussetzt, da z. B. bei der von MEINECKE und OETTEL (6) kürzlich publizierten Mikromethode der Normalwert im Serum einer pH-Änderung von nur 0,74 pH-Einheiten/Std. entspricht.

Die auch von uns verwendete Hydroxamatmethode wurde erstmals von HESTRIN (7) zur Bestimmung der Cholinesteraseaktivität verwendet. Es ist das besondere Verdienst von PILZ (8), die genauen analytischen Grundlagen dieser Methode erarbeitet zu haben, die darauf beruht, daß sich im alkalischen Milieu Carbonsäureester mit Hydroxylamin zu Hydroxamsäuren umsetzen, die mit  $Fe^{+++}$ -Ionen rötlich gefärbte Verbindungen liefern. Die von PILZ (9) angegebene und mehrfach modifizierte Arbeitsvorschrift, deren Anwendung nach Angaben des Autors und anderer Untersucher (2) bei exaktem Arbeiten sehr genaue Resultate liefert, hat sich aber zumindest als Routinemethode in der Klinik nicht durchsetzen können, was offenbar durch den erheblichen Aufwand an Zeit und Arbeit zu erklären ist. Wir haben deshalb versucht, die Hydroxamatmethode weiter zu vereinfachen mit dem Ziel, die Anwendung dieses sehr genauen Verfahrens auch im klinischen Routinelabor zu ermöglichen.

### Methodik

#### Prinzip:

Hydroxylamin reagiert in alkalischer Lösung mit Acetylcholin unter Bildung von Acetylhydroxamsäure und Cholin. Acetylhydroxamsäure bildet mit  $Fe^{+++}$  eine rötlich-braune Verbindung mit einem breiten Absorptionsmaximum bei 490 nm. Zur Bestimmung der Cholinesteraseaktivität des Serums wird die Substratkonzentration am Anfang und nach beendeter Inkubation mit Serum oder Plasma gemessen.

#### Reagentien

1. Tris-Puffer pH 7,4, 0,2M: 24,3 g Tris · HCl mit bidest. Wasser ad 1000 ml auffüllen. 25 ml dieser Stammlösung und 42 ml 0,1N HCl mit bidest. Wasser ad 100 ml auffüllen. Bei 4° mehrere Monate haltbar.
2. 2,5N NaOH: 50 g NaOH p. a. in Plätzchenform mit bidest. Wasser ad 500 ml auffüllen.

<sup>1)</sup> Der Trivialname Cholinesterase wird hier gebraucht für das Enzym Acetylcholin-Acetylhydrolase (EC 3.1.1.7).

3. Hydroxylamin-Stammlösung, 7proz.: 35 g Hydroxylamin · HCl mit dest. Wasser ad 500 ml auffüllen. Nur 14 Tage haltbar.
4. Alkalische Hydroxylamin-Gebrauchslösung. Unmittelbar vor Benutzung herzustellen: Lösung 2 und Lösung 3 werden zu gleichen Teilen gemischt.
5. 0,67M FeCl<sub>3</sub>-Lösung: 188,9 g FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O, (Union Chimique Belge) in etwa 500 ml bidest. Wasser lösen und 10 g KNO<sub>3</sub> zugeben. Nach Auflösung des KNO<sub>3</sub> mit bidest. Wasser ad 1000 ml auffüllen. Die Lösung ist mehrere Monate bei Zimmertemperatur haltbar.
6. 2N HCl: 180 ml konz. HCl (D = 1,19) mit dest. Wasser ad 1000 ml auffüllen.
7. Acetylcholinsubstratlösung, 9,6 mM: 174,3 mg Acetylcholinchlorid mit bidest. Wasser ad 100 ml lösen und mit wenigen Tropfen 2N Essigsäure auf pH 4—5 einstellen. Alle 14 Tage frisch herstellen.
8. NaCl-Lösung 0,9proz.

#### Glasgeräte

Blutzuckerpipetten für 50  $\mu$ l Serum, 0,5 ml Vollpipetten, 1,0 ml Vollpipetten, 1,0 ml Stabpipetten, 10 ml Stabpipetten, Reagenzgläser.

Thermokonstantes Wasserbad von 37°, Photometer z. B. „Spekol“ VEB Carl Zeiß, Jena, oder Kolorimeter.

#### Arbeitsvorschrift

Ansetzen eines Reagenzienleerwertes, eines Haupt- und eines Blindwertes. Erforderliche Serum- oder Plasamenge 50 bzw. 25  $\mu$ l. Die einzelnen Lösungen werden, wie aus dem folgenden Schema ersichtlich ist (Tab. 1), in Reagenzgläser pipettiert.

Tab. 1

Arbeitsschema für die Bestimmung der Cholinesteraseaktivität

Reagenzien-Leerwert	Blindwert	Hauptwert
1,0 ml Trispuffer 2,15 ml 0,9proz. NaCl —	1,0 ml Trispuffer 1,15 ml 0,9proz. NaCl 1,0 ml Acetylcholin- Substratlösung —	1,0 ml Trispuffer 1,15 ml 0,9proz. NaCl 1,0 ml Acetylcholin- Substratlösung 50 $\mu$ l Serum oder Plasma
20 Min. bei 37° im Wasserbad inkubieren, mehrmals vorsichtig umschütteln		
0,5 ml alkalisches Hydroxylamin 50 $\mu$ l Serum oder Plasma	0,5 ml alkalisches Hydroxylamin 50 $\mu$ l Serum oder Plasma	0,5 ml alkalisches Hydroxylamin —
10 Min. bei Zimmertemperatur stehenlassen		
0,3 ml 2N HCl 1,0 ml FeCl <sub>3</sub>	0,3 ml 2N HCl 1,0 ml FeCl <sub>3</sub>	0,3 ml 2N HCl 1,0 ml FeCl <sub>3</sub>
30 Min. bei Zimmertemperatur stehenlassen		

Anschließend werden zu jedem Röhrchen 10 ml bidest. Wasser gegeben und vorsichtig durchgeschüttelt (zu starkes Schäumen vermeiden). Die Extinktionen von Hauptwert und Blindwert werden innerhalb der nächsten 2 Stdn. bei 490 nm und 1 cm Schichtdicke gegen den Reagenzienleerwert abgelesen.

#### Berechnung

Die Änderungen der Acetylcholinkonzentration werden aus einer Eichkurve abgelesen. Beim Aufstellen der Eichkurve geht man ebenso vor, wie für die Hauptversuche beschrieben, d. h. entsprechende Teile einer Lösung von Acetylcholinchlorid werden mit NaCl, Trispuffer, Hydroxylamin, 2N HCl und FeCl<sub>3</sub>-Lösung versetzt und die Farbentwicklung abgewartet. Danach gibt man zu jedem der 5,0 ml betragenden Ansätze 10 ml bidest. Wasser, schüttelt gut um und mißt die Extinktion bei 490 nm und 1 cm Schichtdicke in Glasküvetten gegen den Reagenzienleerwert. Für den Routinebetrieb genügt eine Eichkurve im Konzentrationsbereich von 0,08 bis 1,2  $\mu$ Mol Acetylcholin pro 1,0 ml im Meßansatz, wobei zu beachten ist, daß das ursprüngliche Volumen von 5,0 ml vor dem Ablesen der Extinktion durch Zugabe von Wasser

auf 15 ml erhöht wird (s. o.). Diese Verdünnung ist bei den Ansätzen zur Farbentwicklung zu berücksichtigen, die deshalb mit der 3fachen Konzentration an Acetylcholin anzusetzen sind, verglichen mit dem endgültigen Ansatz zur Registrierung der Extinktion.

Zur Berechnung der Acetylcholinesteraseaktivität wird die Acetylcholinkonzentration des Blindwertes E<sub>1</sub>, d. h. die Konzentration vor Beginn der Inkubation, aus der Eichkurve ermittelt und von dieser die Konzentration des Hauptwertes E<sub>2</sub>, d. h. die nach beendeter Inkubation noch vorhandene Konzentration in  $\mu$ Mol/ml Acetylcholin subtrahiert. Man erhält so den Umsatz des Substrates als  $\Delta\mu$ Mol/ml. Hieraus kann nach der Formel

$$\Delta\mu\text{Mol/ml} \cdot 15\,000 = \text{IU//} \quad (1)$$

die Acetylcholinesteraseaktivität berechnet werden, wobei eine IU// den Substratumsatz von 1  $\mu$ Mol in einer Minute durch 1000 ml Serum bei 37° bedeutet.

Ableitung der Formel (1)

$$\Delta\mu\text{Mol/ml} \triangleq \Delta E \quad (2)$$

$$\Delta E = E_1 - E_2 \quad (3)$$

$$\frac{\Delta\mu\text{Mol/ml} \cdot 15 \cdot 20\,000}{20} = \Delta\mu\text{Mol/ml} \cdot 15\,000 = \text{IU} \quad (4)$$

In Gleichung (4) entsteht der Faktor 15, da von der aus der Eichkurve ermittelten Konzentrationsabnahme in  $\mu$ Mol pro 1,0 ml auf das Gesamtvolumen des Ansatzes von 15 ml zu beziehen ist, der Faktor 20 000, da 50  $\mu$ l Serum verwendet wurden und auf 1000 ml zu beziehen ist. Mit 20 ist zu dividieren, da die Enzymeinheit auf 1 Min. bezogen wird.

Für die praktische Durchführung ist es nicht erforderlich, für jede Serumprobe einen eigenen Reagenzienleerwert anzusetzen. Es genügt, einen einzigen Leerwert mit einem beliebigen klaren, durch vorherigen Hydroxylaminzusatz inaktivierten Serum anzusetzen, gegen den alle übrigen Werte abgelesen werden.

#### Reaktionsbedingungen

Die in Abbildung 1 dargestellte Eichkurve zeigt einen linearen Verlauf. Für die verwendeten Konzentrationen bis 1,2  $\mu$ Mol Acetylcholin/ml ist das LAMBERT-BEERSche Gesetz erfüllt. Die Gerade verläuft durch den Nullpunkt. Zahlreiche mit verschiedenen Reagenzien angefertigte Eichkurven zeigten eine sehr gute Übereinstimmung. (Es wurden z. B. FeCl<sub>3</sub> der Firmen Riedel de Haën, Reanal Budapest und der Union Chimique Belge geprüft.) Die von MEINECKE und OETTEL (6) bei dem Verfahren von PILZ (9) gefundene Instabilität des Eisenreagenz wurde dabei von uns nicht beobachtet. Durch Zusatz von Serum nach dem Hydroxylamin entsprechend dem Blindwert wird der Verlauf der Eichkurve nur unwesentlich beeinflusst und bleibt streng linear.

In Abbildung 2 ist der Einfluß der Substratkonzentration auf die Aktivität der Cholinesterase dargestellt. Die Abbildung zeigt eine typische Sättigungskinetik entsprechend der Michaelis-Menten-Hypothese. Bis zu einer Substratkonzentration von 10  $\mu$ Mol/ml im Inkubationsansatz tritt keine Hemmung der Acetylcholinesteraseaktivität des Serums auf. Für die angegebene Routine-methode wählten wir eine Substratkonzentration von 3 mM.

Abbildung 3 zeigt die Abhängigkeit des Substratumsatzes von der Enzymmenge. Zur Untersuchung der Beziehung zwischen eingesetzter Enzymmenge und

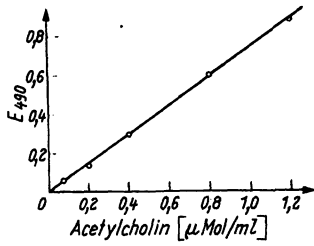


Abb. 1

Eichkurve für Acetylcholin. Reaktionsbedingungen: Tris-Puffer pH 7,4, Endkonzentration entsprechend den in der Abszisse angegebenen Endkonzentrationen, 0,9proz. NaCl ad 3,15 ml, 0,5 ml alkalisches Hydroxylamin, danach 0,05 ml Serum

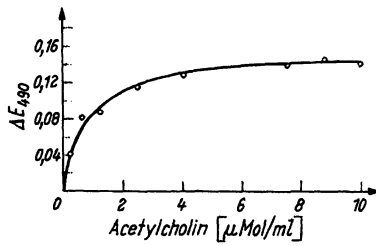


Abb. 2

Einfluß der Substratkonzentration auf die Enzymaktivität. 1,0 ml Tris (pH 7,4), 1,15 ml 0,9proz. NaCl, 0,05 ml Plasma, 1,0 ml Acetylcholinchlorid von steigender Konzentration, so daß die in der Abszisse angegebenen Endkonzentrationen erreicht werden. Ordinate: Extinktionsabnahme  $\Delta E$  (Differenz zwischen Anfangs- und Endwert bei einer Inkubationszeit von 20 Min.)

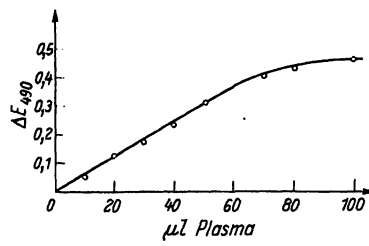


Abb. 3

Beziehung zwischen Substratspaltung und eingesetzter Enzymmenge. Reaktionsbedingungen: 62 mM Tris (pH 7,4), 2,5 mM Acetylcholin. Plasma entsprechend den in der Abszisse angegebenen Mengen, 0,9proz. NaCl ad 3,2 ml. 20 Min. Inkubation in Wasserbad bei 37°. Ordinate: Extinktionsabnahme  $\Delta E$  (vgl. Abb. 2)

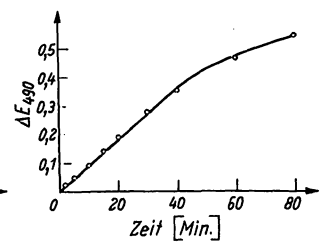


Abb. 4

Abhängigkeit des Substratumsatzes von der Inkubationszeit. Reaktionsbedingungen: 1,0 ml Tris (pH 7,4), 1,15 ml 0,9proz. NaCl, 0,05 ml Plasma, Acetylcholin 2,5 mM. Inkubation der Ansätze zwischen 2,5 und 80 Min. bei 37° im Wasserbad. Beendigung der Reaktion durch Zugabe von alkalischem Hydroxylamin. Ordinate: Extinktionsabnahme  $\Delta E$  (Differenz zwischen Anfangs- u. Endwert) zu der auf der Abszisse angegebenen Inkubationszeit

Substratumsatz wurden 10, 25, 50, 75 und 100  $\mu\text{l}$  heparinisertes Spenderplasma 20 Min. mit Acetylcholin, NaCl und Tris-Puffer pH 7,4 inkubiert und die Spaltung des Substrates als Extinktionsdifferenz zwischen Anfangs- und Endwert angegeben. Die Konzentration an Acetylcholin im Inkubationsansatz war 2,5 mM. Aus der Abbildung geht hervor, daß bis zu einer Plasamenge von etwa 70  $\mu\text{l}$  unter den gewählten Bedingungen eine lineare Zunahme der Substratspaltung mit steigendem Plasmavolumen zu verzeichnen ist. Für die Praxis heißt das, daß auch mit 25  $\mu\text{l}$  Plasma reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen sind. Wir haben dies an mehreren Seren von Patienten überprüft und mit 25  $\mu\text{l}$  exakt die Hälfte des mit 50  $\mu\text{l}$  Serum gefundenen Substratumsatzes erhalten. Die in der endgültigen Vorschrift angegebene Substratkonzentration liegt mit 3,0 mM etwas höher als die in der Abbildung verwendete. Es empfiehlt sich aber nicht, mehr als 50  $\mu\text{l}$  Serum zu verwenden, da sonst bei Zugabe von Hydroxylamin Trübungen auftreten, die regelmäßig zum Filtrieren des Ansatzes zwingen.

In Abbildung 4 ist die Abhängigkeit der Acetylcholinhydrolyse von der Inkubationsdauer dargestellt. Die Konzentration an Acetylcholin betrug hier ebenfalls nur 2,5 mM. Es wurde mit 50  $\mu\text{l}$  Serum inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von alkalischem Hydroxylamin gestoppt. Wie die Abbildung deutlich macht, steigt der Substratumsatz bis zu einer Inkubationsdauer von 40 Min. linear mit der Zeit an. Die für die Routinemethode gewählte Zeit liegt im linearen Umsatzbereich. Wie die Abbildung zeigt, biegt die Kurve dann oberhalb von 40 Min. allmählich ab.

### Ergebnisse und Diskussion

Bei 50 gesunden männlichen und weiblichen Blutspendern wurden Normalwert und Standardabweichung für die angegebene Methode mit Hilfe von Doppelbestimmungen untersucht. Der Mittelwert aller Untersuchungen ( $\bar{x}$ ) betrug 3467 IU/l, die Standardabweichung ( $s$ )  $\pm 602$ . Der Normalbereich ( $\bar{x} \pm 2s$ ) liegt demnach bei 2270 bis 4670 IU/l, da es für praktische Bedürfnisse ausreicht, mit einem Mittelwert von 3470 IU/l und einer Streuung von  $\pm 600$  IU zu rechnen. Diese Werte stim-

men gut mit den von WEBER (2) an einem größeren Patientengut mit Acetylthiocholinjodid als Substrat und einer anderen Methode ermittelten Normalwerten überein.

Die beschriebene Methode besitzt trotz ihrer Einfachheit eine gute Zuverlässigkeit. Zu ihrer Überprüfung wurde das Serum eines gesunden Spenders in 10 Parallelbestimmungen am gleichen Tage untersucht, wobei ein Mittelwert von 3060 IU/l bei einem Variationskoeffizienten ( $v$ ) von 3,2 % ermittelt wurde. Der Variationskoeffizient oder relative Fehler der Methode ist definiert als

$$v = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100.$$

Das Verfahren zeichnet sich bei guter Reproduzierbarkeit der Ergebnisse durch seine große Einfachheit aus, die seine Anwendung auch in jedem kleineren Krankenhaus gestattet, da ein Wasserbad von 37° und ein Photometer für den sichtbaren Bereich oder ein Kolorimeter allgemein zur Verfügung stehen dürften. Wie Abbildung 2 zeigt, arbeitet das Verfahren bei optimaler Substratkonzentration, die bei 3 mM liegt und damit deutlich höher ist als bei der von PILZ (9) angegebenen Methode, die eine Substratkonzentration von 1,235 mM benutzt. Aus der Abbildung 2 ist weiterhin zu entnehmen, daß durch Substratüberschuß in Übereinstimmung mit Untersuchungen von ALLES und Mitarbeitern (10) sowie BREUER und SCHÖNFELDER (11) im Gegensatz zur Acetylcholinesterase der Erythrocyten das Serumenzym nicht gehemmt wird, während PILZ (12) kürzlich über eine Hemmung der Plasmaacetylcholinesterase durch Substratüberschuß berichtete.

Aus den Abbildungen 3 und 4 geht hervor, daß lineare Proportionalität zwischen Enzymmenge bzw. Inkubationszeit besteht. Das gestattet, die verwendete Serummenge auf 25  $\mu\text{l}$  zu reduzieren. Durch das gleichzeitige Mitführen eines Blindwertes wird die Spontanhydrolyse des Substrates bei der Inkubation miterfaßt und eine gesonderte Berechnung im Gegensatz zu anderen Verfahren (4, 6) überflüssig. Allerdings ist bei unserer Methode die Spontanhydrolyse des Acetylcholins bei pH 7,4 und 37° ohnehin praktisch bedeutungslos, wovon wir

uns in Übereinstimmung mit PILZ (13) in Vorversuchen überzeugen konnten.

Im Gegensatz zu dem von PILZ (9) angegebenen Verfahren benutzen wir nur einen Puffer in Form des sehr einfach herzustellenden 0,2M Tris-Puffers. Des weiteren ist als wesentlicher Vorteil anzusehen, daß bei unserem Verfahren eine Enteiweißung entfällt. Die Reaktion wird durch Zugabe von alkalischem Hydroxylamin gestoppt, wobei der pH-Wert des Ansatzes auf über 13 ansteigt. Dabei flockt das Protein aus. Mit der Zugabe von 10 ml bidest. Wasser vor der Ablesung wird ein Gesamtvolumen von 15 ml erreicht, in dem der geringe, 50 µl Serum entsprechende Proteinniederschlag bei der Ablesung nicht stört. Dies wurde in zahlreichen Parallelbestimmungen einer wäßr. Lösung von Acetylcholin mit und ohne Zusatz von inaktiviertem Serum geprüft. Bei stark getrübbten Seren kann vor der Ablesung eine Filtration notwendig werden.

Von Vorteil gegenüber anderen Methoden ist weiterhin die Tatsache, daß der Zeitpunkt für die Ablesung zwischen 30 und 120 Min. nach der Zugabe der FeCl<sub>3</sub>-Lösung gewählt werden kann. Auch nach 24 Stdn. kann noch abgelesen werden, die Werte liegen dann 3—5% unter denen, die man innerhalb der ersten 2 Stdn. erhält, was mit den Erfahrungen von PILZ (13) übereinstimmt. Die Angabe einer Zeitspanne von 30 Min. nach Zugabe des FeCl<sub>3</sub> für die Ablesung stellt ebenfalls nur einen Richtwert dar, da bereits 15 Min. nach FeCl<sub>3</sub>-Zugabe die Reaktion mit Sicherheit abgeschlossen ist.

Abschließend sei darauf verwiesen, daß trotz zahlreicher experimenteller Untersuchungen und klinischer Arbeiten (1, 2, 3) über den besonderen Wert der Bestimmung der Cholinesteraseaktivität des Serums für die Beurteilung der Leberfunktion nicht nur über die Nomenklatur der Cholinesterasen, sondern auch über ihre physiologische Bedeutung und den Ort ihrer Bildung im menschlichen Organismus erhebliche Unklarheiten bestehen. Dies kommt u. a. in der Tatsache zum Ausdruck, daß in den letzten 20 Jahren zahlreiche sehr unterschiedliche Substrate für die Bestimmung der Cholinesteraseaktivität des Serums verwendet wurden, bei denen es sich häufig gar nicht mehr um Cholinester, sondern um andere aliphatische oder aromatische Carbonsäureester handelt (Übersichten bei AUGUSTINSSON (14), HARDEGG (15), PILZ (12)).

Die zahlreichen Substrate und die unterschiedlichen Bezeichnungen für das Serumenzym wie Cholinesterase, Pseudocholinesterase, unspezifische Cholinesterase, daneben „echte“ Cholinesterase oder „wahre“ Cholinesterase legen die Vermutung nahe, daß es sich bei der Spaltung der Cholinester durch menschliches Serum

entweder um die Wirkung eines sehr unspezifischen Enzyms oder um die einer Vielzahl von Enzymen handeln muß. So ist nach HARDEGG (15) die Verwendung der Bezeichnungen „echte“, „wahre“, „spezifische“ oder „unspezifische“ Cholinesterase und „Pseudocholinesterase“ auf Grund neuerer Forschungsergebnisse nicht mehr gerechtfertigt, da sie den Tatsachen in keiner Weise Rechnung tragen. Vielmehr sollten die Cholinesterasen auch in Übereinstimmung mit anderen Untersuchern (4) in 2 Gruppen eingeteilt werden, von denen die Enzyme der ersten Gruppe Acetylcholin schneller als länger-kettige Cholinester spalten. Für diese Gruppe, die vorwiegend im Zentralnervensystem, in Muskulatur und Erythrocyten verbreitet ist, wird von der IUB (16) der Trivialname Acetylcholinesterase vorgeschlagen und das Enzym als Acetylcholin-Acetylhydrolase (EC 3.1.1.7) registriert. Die zweite Gruppe von Enzymen spaltet Butyrylcholin schneller als Acetylcholin und kommt vorwiegend in Leber, Darm und Plasma vor. Dieses Enzym wird von der IUB (16) unter dem Trivialnamen Cholinesterase als Acylcholin-Acylhydrolase (EC 3.1.1.8) registriert. Allerdings ist auch diese Einteilung willkürlich. Die Übergänge zwischen beiden Gruppen cholinesterspaltender Fermente sind fließend, so daß eine zu strenge Trennung nicht sinnvoll erscheint.

Während früher überwiegend die Meinung vertreten wurde, daß im Serum keine „echte“ Acetylcholinesterase existiert, konnte kürzlich PILZ (17) die Existenz von 2 Enzymen im menschlichen Serum nachweisen, die spezifisch Acetylcholin und keine anderen Substrate spalten. Als Ursprungsort der Cholinesterasen des menschlichen Serums wird von den meisten Autoren (2, 3, 18 u. a.) die Leber genannt, wobei jedoch viele diese Meinung von anderen Untersuchern übernehmen. Es ist in diesem Zusammenhang interessant, daß es in neueren Untersuchungen (12) nicht gelang, eine Acetylcholin-spaltung durch Homogenate aus menschlicher Leber nachzuweisen. Neben den bereits erwähnten (3, 18) klinischen Beobachtungen und anderen Methoden, die zur Beurteilung der Leberfunktion die Acetylcholin-spaltung des Serums verwenden, sowie eigenen Erfahrungen bei Patienten mit Leberparenchymschäden, scheinen die gute Korrelation, die von zahlreichen Untersuchern (18, 19, 20) zwischen dem „Achol“-Test, einem Testpapier, das mit Acetylcholin als Substrat getränkt ist (6, 18), und mit anderen Substraten und Methoden gewonnene Ergebnisse für eine Bildung auch der Acetylcholinesterase in der Leber zu sprechen. Auf Grund der vorliegenden methodischen Mitteilung kann zu dieser Frage allerdings nicht Stellung genommen werden.

#### Literatur

1. DOENICKE, A. und S. SCHMIDINGER, *Med. Klinik* 60, 2012 (1965).  
2. WEBER, H., *Dtsch. med. Wschr.* 91, 1927 (1966). — 3. a) DIECKHOFF, J. und U. WIEGAND, *Dtsch. Gesd.wes.* 21, 305 (1966). — b) DIECKHOFF, J. und U. WIEGAND, *Pädiatr. und Grenzgeb.* 5, 141 (1966). — 4. BOCKENDAHL, H. und R. AMMON, in *Methoden der enzymatischen Analyse* S. 771, hrsg. H.-U. Bergmeyer, Verlag

Chemie, Weinheim/Bergstr. (1962). — 5. KALOW, W. und H. A. LINDSAY, *Canad. J. Biochem.* 33, 568 (1955). — 6. MEINCKE, K. H. und H. OETTEL, *Arch. Toxikol.* 21, 321 (1966). — 7. HESTRIN, S., *J. biol. Chemistry* 180, 249 (1949). — 8. PILZ, W., *Z. analyt. Chem.* 162, 81 (1958). — 9. PILZ, W., I. JOHANN und E. STELZL, *Klin. Wschr.* 43, 1227 (1965). — 10. ALLES, G. A. und

R. C. HAWES, J. biol. Chemistry 133, 375 (1944). — 11. BREUER, H. und M. SCHÖNFELDER, Clin. chim. Acta, Amsterdam 6, 515 (1961). 12. PILZ, W., diese Z. 5, 1 (1967). — 13. PILZ, W. und I. JOHANN, diese Z. 4, 215 (1966). — 14. AUGUSTINSON, K.-B., Meth. biochem. Analysis 5, 1 (1957). — 15. HARDEGG, W., in Hoppe-Seyler/Thierfelder: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, Bd. VI/B, S. 921, 10. Aufl., Springer Berlin (1966). — 16.

Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry, Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris 1961. — 17. PILZ, W., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 345, 80 (1966). — 18. HÄRTEL, A., W. GROSS und H. LANG, diese Z. 5, 26 (1967). — 19. SCHMIDINGER, St. und A. DOENICKE, diese Z. 4, 273 (1966). — 20. THOMPSON, J. C. und M. WHITTAKER, J. Clin. Path. London 18, 811 (1965).

Dr. H. Willgerodt  
X 705 Leipzig  
Oststraße 21—25

## Erfahrungen mit einer kolorimetrischen Methode zur Bestimmung der nicht veresterten Fettsäuren im Serum<sup>1)</sup>

Von P. DIETERLE, C. WÜLFERT-HELDRIICH, J. HENNER und K. SCHWARZ

Aus der II. Medizinischen Klinik der Universität München (Direktor: Prof. Dr. Dr. G. Bodechtel)

(Eingegangen am 26. Januar 1968)

Es wird über eigene Erfahrungen mit der kolorimetrischen Bestimmung der NFS nach DUNCOMBE (6, 7) berichtet. Es besteht eine gute Korrelation beim Vergleich des beschriebenen Verfahrens mit der Titrationsmethode nach DOLE (1, 2). Die Vorteile der Methode werden besprochen.

Studies are reported on the colorimetric determination of nonesterified fatty acids according to DUNCOMBE (6, 7). There is good correlation between the described method and the titration method of DOLE (1, 2). The advantages of the methods are discussed.

Eine in der klinischen Medizin gebräuchliche Bestimmungsmethode ist die Messung der nicht veresterten Fettsäuren (NFS)<sup>2)</sup> im Serum mit dem Titrationsverfahren nach DOLE bzw. DOLE und MEINERTZ (1, 2). Trotz guter Reproduzierbarkeit ist diese Methode nicht ganz frei von Nachteilen. Ein anderes Verfahren zur Bestimmung der NFS mittels Kolorimetrie hat 1956 AYERS (3) mitgeteilt, das 1959 von IWAYAMA (4) und 1961 von BARRETO und MANO (5) weiter modifiziert wurde. Von DUNCOMBE (6, 7) wurde schließlich die Methode in ihrer Empfindlichkeit so verbessert, daß sie sich gut für klinische und biochemische Fragestellungen eignet. Unsere Erfahrungen mit dieser kolorimetrischen Methode und die Vorteile gegenüber dem Titrationsverfahren sollen in dieser Arbeit anhand vergleichender Untersuchungsreihen herausgestellt und beurteilt werden.

### Methodik

#### Prinzip

Die NFS werden als Kupfersalze mit Chloroform extrahiert. Die Kupferseifen werden mit Diäthylthiocarbaminat in einen Kupferkomplex überführt und kolorimetrisch bestimmt.

#### Reagenzien

1. Chloroform p. a.
2. Kupferreagenz:
  - a)  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ , 6,45proz. Lösung,
  - b) 9 Teile 1M Triäthanolamin + 1 Teil 1N Essigsäure
 a) und b) werden im Verhältnis 1:1 gemischt.
3. Natrium-Diäthylthiocarbaminat ( $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N NaS} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ ).  
Es wird eine 0,1proz. Lösung in sek. Butanol hergestellt.  
Lösung 2 und 3 müssen im Kühlschrank aufbewahrt und jede Woche erneuert werden.

<sup>1)</sup> Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

<sup>2)</sup> *Abkürzungen:* NFS = nicht veresterte Fettsäuren.

#### Durchführung

In ein geschliffenes Reagenzglas werden 5 ml/ Chloroform (bzw. in 5 ml/ gelöster Palmitinsäurestandard), 2,5 ml/ Kupferreagenz und 0,5 ml/ Serum pipettiert. Nach sorgfältigem Verschluss der Schliffgläser (wir verwenden dafür lipoidunlösliche Kunststoffstopfen) wird das Gemisch in einer dreidimensionalen Schüttelapparatur 30 Min. gleichmäßig geschüttelt. Anschließend wird das Gemisch 15 Min. bei 2000 bis 3000 g zentrifugiert. Es bilden sich 2 Phasen. Die obere wäßr. Phase mit dem überschüssigen Kupferreagenz ist von der unteren Chloroformphase durch eine ausgefallene Eiweißschicht getrennt. Mit einer an die Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Kapillare wird nun einschließlich der an der Glaswandung haftenden Tropfen die obere Kupferphase und anschließend vorsichtig die Eiweißschicht abgesaugt. Vom Chloroformrückstand werden sofort 3 ml/ in ein kleines Schliffglas abpipettiert. Dabei ist sorgfältig darauf zu achten, daß die Pipette nicht die Glaswandung berührt und damit Kupfer überträgt. Zur Chloroformphase werden 0,5 ml/ der Diäthylthiocarbaminatlösung gegeben und der gelbgefärbte Kupferkomplex bei 436 nm (Photometer Eppendorf) gegen einen Reagenzienblindwert, der durch die gesamte Messung mitläuft, innerhalb einer Stunde gemessen.

Die Berechnung erfolgt nach der Formel

$$\text{Extinktion Probe} \cdot \frac{\mu\text{Val/ des Standards}}{\text{Extinktion Standard}} \cdot 10 = \mu\text{Val NFS/ Serum}$$

#### Diskussion der Methode

Bestimmungen von reinen Palmitinsäurelösungen zeigen, daß zwischen der Konzentration und der Extinktion strenge Proportionalität besteht (Abb. 1). Es genügt daher im allgemeinen, nur einen Palmitinsäurestandard mitlaufen zu lassen. In weiteren Versuchen wurde Natriumpalmitat an Serumalbumin gebunden und anschließend die Wiederfinderate bestimmt. Im Mittel wurden 98% des eingesetzten Palmitat-Standards wiedergefunden. Dies stimmt mit Angaben von ITAYA und U<sup>1)</sup> überein. Die geringere Wiederfinderate von DUNCOMBE (7) führen wir auf