



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤ Int. Cl.³: C 12 Q 1/40
G 01 N 33/52

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978



⑫ PATENTSCHRIFT A5

⑪

633 582

⑳ Gesuchsnummer: 8640/77

㉔ Anmeldungsdatum: 12.07.1977

③① Priorität(en): 13.07.1976 US 704976

㉔ Patent erteilt: 15.12.1982

④⑤ Patentschrift
veröffentlicht: 15.12.1982

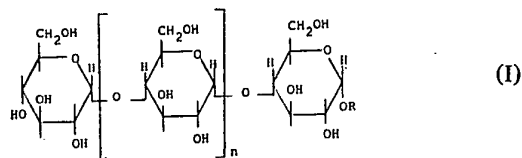
⑦③ Inhaber:
E.I. Du Pont de Nemours & Company,
Wilmington/DE (US)

⑦② Erfinder:
Robert Carroll Menson, Wilmington/DE (US)
Venkatachalam Narayanswamy, Wilmington/DE
(US)
Richard Charles Burns, Wilmington/DE (US)

⑦④ Vertreter:
Dr. A.R. Egli & Co., Patentanwälte, Zürich

⑤④ Verfahren zur Bestimmung des Amylasegehalts von Proben und Mittel zur Ausführung des Verfahrens.

⑤⑦ Zur Bestimmung des Amylasegehaltes von Proben wird zur Lösung, die eine vorgegebene Menge der Probe enthält, ein definiertes Polysaccharid-Substrat der Formel (I)



gegeben. Darin steht n für eine ganze Zahl im Bereich von 1 bis 10 und R für einen substituierten, aromatischen Rest, der als abgetrenntes Aglykon eine andere Spektral-extinktion als das Substrat aufweist.

Dabei wird die Spektralextinktion der Lösung überwacht.

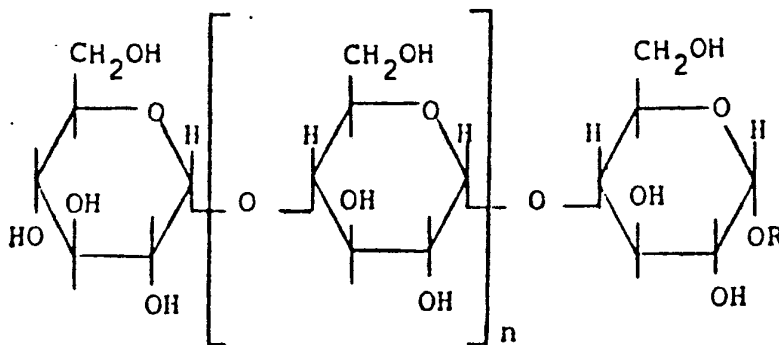
Zur Ausführung der Bestimmung dient eine Reagenz-Testpackung, die ein definiertes Polysaccharid-Substrat der Formel (I) und Maltase enthält.

Die neue Methode erlaubt die Bestimmung des Amylasegehaltes in verschiedenen Körperflüssigkeiten des Menschen.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Bestimmung des Amylasegehalts von Proben, dadurch gekennzeichnet, dass man

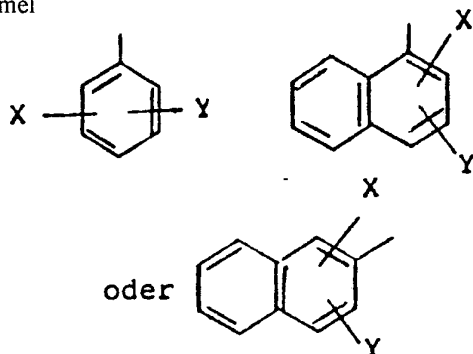
a) zu einer Lösung, die eine vorgegebene Menge an Probe enthält, ein definiertes Polysaccharid-Substrat der Formel (I)



gibt, in der n eine ganze Zahl im Bereich von 1 bis 10 und R ein substituierter aromatischer Rest ist, der als abgetrenntes Aglykon eine andere Spektralextinktion als das Substrat hat, und b) dabei die Spektralextinktion der Lösung überwacht.

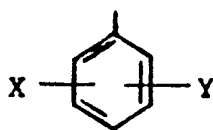
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass n in Formel (I) im Bereich von 1 bis 8 liegt und vorzugsweise den Wert 2, 3 oder 4 hat.

3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass R in Formel (I) ein substituierter aromatischer Rest der Formel



ist, worin X und Y einzeln für H , NO_2 , Halogen, Alkyl mit 1 bis 4 C-Atomen, OR' oder CO_2R' stehen, worin R' ein Alkylrest mit 1 bis 6 C-Atomen ist, und wenigstens einer der Reste X und Y eine NO_2 -Gruppe ist.

4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass R in Formel (I) ein Rest der Formel



ist.

5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass man der Lösung ausserdem eine Maltase zusetzt.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass man als Maltase α -Glucosidase verwendet.

7. Verfahren nach Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass R in Formel (I) ein 4-Nitrophenylrest ist.

8. Verfahren nach Anspruch 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass man die Lösung bei einem im wesentlichen konstanten pH-Wert im basischen Bereich und bei im wesentlichen konstanter Temperatur hält.

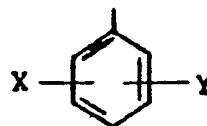
9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Maltase und ein Substrat aus der aus α -(4-Nitrophenyl)glykosiden von Maltotetraose, Maltopentaose und Maltohexaose bestehenden Gruppe zu einer Lösung gibt, die eine vorgegebene Menge der Probe enthält, und dabei die Ände-

20 rung der Spektralextinktion der Lösung überwacht, wobei die endständige Glykosideinheit im Substrat ein α -(4-Nitrophenyl)glykosid ist.

10. Mittel zur Durchführung des Verfahrens gemäss Patentanspruch 1 in Form einer Reagenz-Testpackung, enthaltend a) ein definiertes Polysaccharidsubstrat der Formel (I) und b) Maltase.

11. Reagenz-Testpackung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass sie als Maltase α -Glucosidase enthält.

12. Reagenz-Testpackung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass R in Formel (I) ein Rest der Formel



35 ist.

13. Reagenz-Testpackung nach Anspruch 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass R in Formel (I) ein 4-Nitrophenylrest ist.

14. Reagenz-Testpackung nach Anspruch 10, enthaltend eine Maltase und ein Substrat aus der aus α -(4-Nitrophenyl)glykosiden von Maltotetraose, Maltopentaose und Maltohexaose bestehenden Gruppe, wobei die endständige Glykosideinheit im Substrat α -(4-Nitrophenyl)glykosid ist.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Amylasebestimmung und eine Reagenz-Testpackung für die Ausführung dieser Bestimmung.

α -Amylase ist ein Enzym, das die α [1 $\rightarrow$ 4]-Bindungen zwischen den Glucoseeinheiten in Stärke und den niederen Polymeren und Oligomeren von Glucose hydrolysiert. Dieses Enzym wird im menschlichen Körper, in erster Linie im Pankreas und in den Speicheldrüsen gebildet, und seine Konzentration in verschiedenen Körperflüssigkeiten ist ein wertvolles diagnostisches Hilfsmittel für den Arzt. Beispielsweise sind bei gesunden Personen die α -Amylasekonzentrationen im Serum verhältnismässig konstant, jedoch steigen sie als Reaktion auf pathologische Zustände, z. B. akuter Pankreatitis.

Die US-PS 3 879 263 und die US-Patentanmeldung 542 236 (20.1.1975) beschreiben eine Methode und eine Reagenzkombination für die Verwendung bei der Bestimmung des α -Amylasegehalts einer Probe unter Verwendung der definierten Oligosaccharide Maltotetraose, Maltopentaose oder Maltohexaose als Amylasesubstrat. Durch die Reaktion zwischen α -Amylase und diesen Substraten vorzugsweise in Gegenwart einer Maltase wird eine bestimmte Menge Glucose gebildet, die mit Hilfe

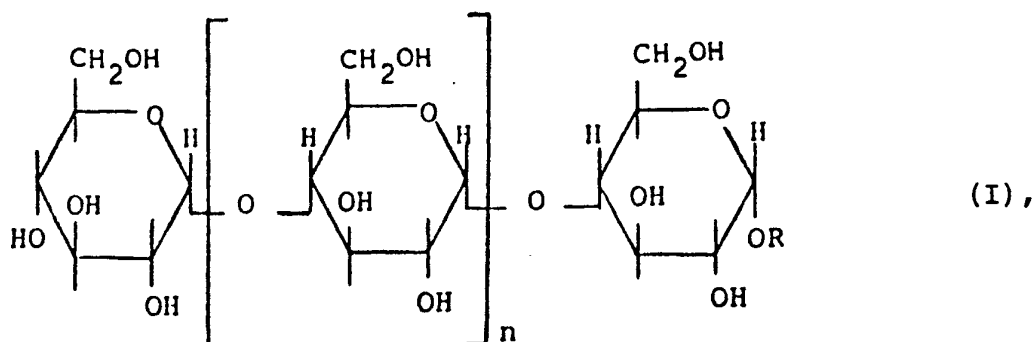
eines beliebigen üblichen Glucosenachweissystems gemessen werden kann. Der zusätzliche Schritt zum Nachweis der Glucose ist ein Nachteil. Ferner muss Glucose, die in der Probe vorhanden ist, entweder entfernt oder kompensiert werden. Zwar kann dies nach üblichen Methoden geschehen, jedoch stellt dies eine zusätzliche Stufe beim Verfahren und einen Nachteil dar.

A.P. Jansen und P.G.A.B. Wydeveld stellen in Nature 162 (1958) 525 fest, dass α -(p-Nitrophenyl)maltosid als Substrat für die Amylasebestimmung geeignet sein könnte. Diese Veröffentlichung zeigt jedoch, dass die Verfasser nie das aktive Agens, das für ihre Beobachtungen verantwortlich ist, identifizierten. Sie berichten: 1. Durch Bebrüten von menschlichen Urin- oder Speichelproben mit α -(p-Nitrophenyl)maltosid bei 37 °C für 16 Stunden wurde 4-Nitrophenol gebildet, das spektrophotometrisch durch Mischen des Hydrolysats mit 0,02n-Natriumhydroxyd identifiziert wurde. 2. Die Hydrolyse wurde

durch Fällungsmittel für Protein, z. B. 10%ige Trichloressigsäure und 0,5n-Silbernitrat, verhindert. 3. Die Hydrolyse war pH-abhängig und am wirksamsten bei pH 5,9 bis 7,0. Die Verfasser geben an, dass dies der Nachweis für «das mögliche Vorhandensein einer nicht identifizierten Carbohydase» war. Es wird nicht angenommen, dass α -(4-Nitrophenyl)maltosid für eine Amylasebestimmung bei Menschen geeignet ist, weil die Spaltung dieser Verbindung durch α -Amylase extrem langsam verläuft.

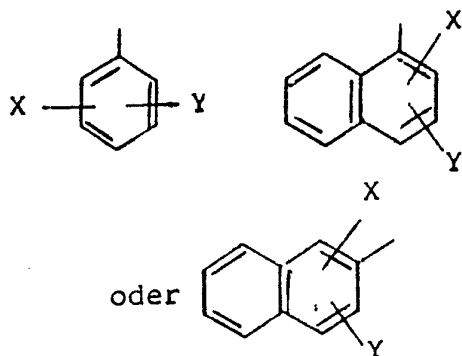
Das erfindungsgemässe Verfahren zur Bestimmung des Amylasegehaltes von Proben ist im vorangehenden Patentanspruch 1 charakterisiert; das entsprechende Mittel zur Durchführung des Verfahrens im ebenfalls vorangehenden Patentanspruch 10.

Das im erfindungsgemässen Verfahren einzusetzende Polysaccharid-Substrat weist die Formel (I) auf:



in der n eine ganze Zahl im Bereich von 1 bis 10 und R ein substituierter aromatischer Rest ist, der als abgetrenntes Aglykon eine andere Spektralextinktion als das Substrat hat.

Bei der bevorzugten Ausführungsform hat n in Formel (I) einen Wert von 2, 3 oder 4, und R, ebenfalls in Formel (I) ist ein substituierter aromatischer Rest der Formel

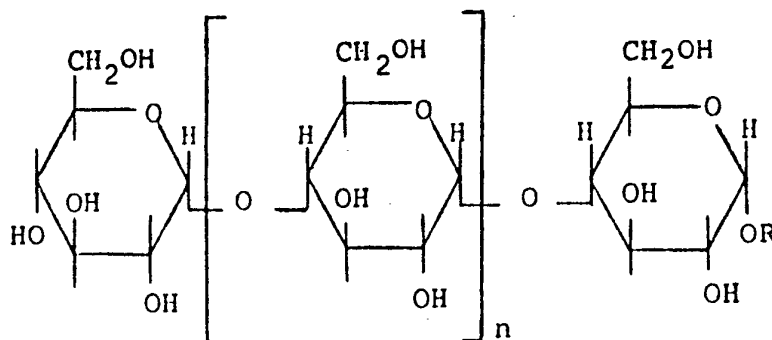


worin X und Y einzeln für H, NO₂, Halogen, Alkyl mit 1 bis 4 C-Atomen, OR' oder CO₂R' stehen, worin R' ein Alkylrest mit 1 bis 6 C-Atomen ist, und wenigstens einer der Reste X und Y eine NO₂-Gruppe ist.

Bei den bevorzugten Ausführungsformen dienen als Substrate Glykoside von Maltotetraose, Maltopentaose oder Maltotetraose, in der ein aromatischer Rest an die endständige Glykosideinheit gebunden ist. Bei der besonders bevorzugten Ausführungsform ist die endständige Glykosideinheit ein α -(4-Nitrophenyl)glykosid; ferner wird ausserdem eine Maltase der Lösung zugesetzt.

Die Erfindung umfasst wie gesagt auch eine Reagenz-Testpackung. Diese Testpackung enthält eines der vorstehend genannten Substrate und eine Maltase.

Die folgende Beschreibung bezieht sich auf Polymerisate und Oligomere von Glucose der Formel (I), die α [1→4]-verknüpft sind, und in denen ein substituierter aromatischer Rest an die endständige (reduzierende) Glukoseeinheit gebunden ist. Diese Verbindungen haben wie gesagt die Formel (I)



Darin ist n eine ganze Zahl von 1 bis 10, R ein substituierter aromatischer Rest und der verbleibende Teil der Verbindung ist der Glykosylrest. Wenn er vom Glykosylrest durch Hydrolyse abgespalten wird, wird der Rest R ein Phenol ROH oder ein Anion RO^- dieses Phenols (in Abhängigkeit vom Zustand der Lösung), die beide normalerweise als Aglykon bezeichnet werden.

Diese Verbindung, die als Substrat für Amylase wirksam ist, ist ein definiertes Polysaccharid oder, wenn $n < 8$, ein definiertes Oligosaccharid. Der Ausdruck «definiert» in der Anwendung auf Polysaccharide wurde bisher im weiten Sinne gebraucht und galt häufig für ein beliebiges Gemisch von Polysacchariden, in denen die relativen Mengenanteile der verschiedenen Polymerisate und Oligomeren bekannt sind. Im hier gebrauchten Sinne ist der Ausdruck «definiertes Polysaccharid» jedoch als Substanz zu verstehen, die wenigstens 90% eines Polysaccharids mit gegebener Kettenlänge enthält, d. h. in der n eine gegebene ganze Zahl ist.

α -Amylase wirkt als Katalysator bei der Hydrolyse von Polysacchariden zu kurzkettigen Polysacchariden und schliesslich zu Maltose. Es wurde gefunden und wird in den vorstehend genannten Patentschriften mitgeteilt, dass von allen Polysacchariden Maltotetraose (G_4), Maltopentaose (G_5) und Maltotetraose (G_6) für die Verwendung als Substrat bei einer Amylasebestimmung bevorzugt werden. Die G_n -Nomenklatur stellt eine bequeme Kurzbezeichnung für $n \alpha[1 \rightarrow 4]$ -verknüpfte Glucoseeinheiten dar.

Diese drei Substrate werden aus kinetischen und stöchiometrischen Gründen bevorzugt. Die Bindungskonstante von α -Amylase an Polysaccharide wird mit steigender Zahl der $\alpha[1 \rightarrow 4]$ -Bindungen bis etwa G_6 grösser, wo sie sich abflacht. Für Homologe unter G_4 ist die Bindungskonstante zu klein, um annehmbare Reaktionsgeschwindigkeiten zu ergeben. Bei Homologen über G_6 verläuft die Reaktion zwar schnell, jedoch sind die Ergebnisse nicht stöchiometrisch. Unproduktive Reaktionen finden statt, so dass keine n -Glucoseeinheiten gebildet werden, wenn α -Amylase mit G_n reagiert. Ferner wird die maximale Geschwindigkeit, mit der das Substrat aus der α -Amylase frei wird, mit kleiner werdendem Wert von n niedriger. Wenn zum Nachweissystem Glucose gehört und G_n als Substrat verwendet wird, müssten innerhalb annehmbarer Zeit n Glucoseeinheiten für jede Wechselwirkung von α -Amylase mit G_n gebildet werden. Andernfalls muss der prozentuale Anteil der insgesamt frei gewordenen Glucoseeinheiten im Vergleich zu den verfügbaren Einheiten geschätzt werden, und dies führt zu Fehlern. Auf Grund dieser Faktoren werden G_4 , G_5 und G_6 zu den bevorzugten Substraten.

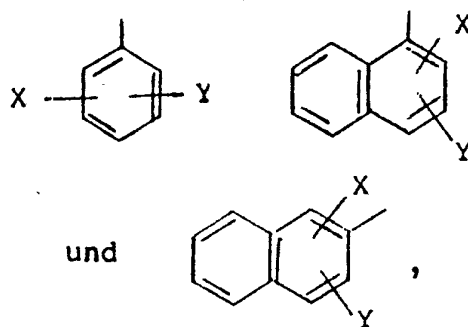
Beim System gemäss der Erfindung, bei dem das Nachweissystem von der Freigabe eines substituierten Phenols ROH und nicht von der Glucosebildung abhängt, sind stöchiometrische Erwägungen nicht sehr wesentlich, und n kann im Bereich von 1 bis 10 liegen. Vorzugsweise wird jedoch als Polysaccharid ein Oligosaccharid mit n im Bereich von 1 bis 8 verwendet.

Wie in der US-PS 3 879 263 dargelegt, ist die Verwendung einer Maltase, z. B. α -Glucosidase, bei der Messung weder der α -Amylase im Pankreassekret noch der Gesamt- α -Amylase erforderlich. Dies ist der Fall, wenn als Substrate die Substrate gemäss der Erfindung sowie G_4 , G_5 und G_6 verwendet werden. Da ferner die Erfindung nicht vom Nachweis der Glucose abhängig ist, ist Maltase bei Verwendung der Substrate gemäss der Erfindung selbst bei Bestimmungen der α -Amylase im Speichel nicht erforderlich. Durch Verwendung einer Maltase wird jedoch die Reaktionsgeschwindigkeit unter allen Umständen erhöht. Es ist besonders vorteilhaft, eine wirklich stöchiometrische Reaktion zu erreichen, weil die Geschwindigkeit der Reaktion der Maltase mit niederen Oligosacchariden höher ist als die Geschwindigkeit der Reaktion von α -Amylase mit diesen Substraten. α -Amylase bewirkt die Hydrolyse des Substrats

zu kleineren Fraktionen, und die Maltase bewirkt die Vollendung der Hydrolyse zu Glucoseeinheiten, so dass die Freigabe des substituierten Phenols stöchiometrisch stattfindet. Aus diesem Grunde werden Oligosaccharide der vorstehenden Formel, in der n einen Wert von 2, 3 oder 4 hat, als Substrate für die Zwecke der Erfindung besonders bevorzugt. Die folgende Beschreibung beschränkt sich daher auf diese Substrate, insbesondere solche, in denen n für 2 oder 3 steht. Diese Begrenzung erfolgt jedoch nur der Einfachheit halber und soll die Offenbarung nicht einschränken.

Bei Verwendung einer Maltase, z. B. α -Glucosidase, findet infolge der Reaktionsfähigkeit der Maltase mit dem Substrat eine Nebenreaktion statt, die zu einer Blindgeschwindigkeit (blank rate) führt. Dies bedeutet, dass auch in Abwesenheit von α -Amylase Phenol frei wird. Da die maximale Geschwindigkeit der Freigabe von Produkt aus Maltase mit steigendem Wert von n niedriger wird, ist der Anstieg einer Blindgeschwindigkeit langsamer als der Anstieg von n . Es ist somit zu erwarten, dass die Blindgeschwindigkeit für G_5 niedriger ist als die für G_4 . Dies wird durch Versuche bestätigt. Ein zusätzlicher Faktor spielt jedoch bei der Wahl zwischen höheren und niederen Oligosacchariden (d. h. G_4 oder G_5) als Substrat eine Rolle. Bei allen Reaktionen des Substrats mit Amylase und allen Reaktionen von Maltase mit dem Substrat steigt die Geschwindigkeit als Funktion der Substratkonzentration auf ein Optimum, bei dem sie sich abflacht. Die Substratkonzentration, bei der die Optimierung eintritt, scheint mit steigendem Wert von n zu steigen, so dass mehr Substrat (und Maltase) verwendet werden muss, um die Standardkurve zu optimieren (linearisieren). Bei teuren Chemikalien ist dies ein wichtiger Gesichtspunkt.

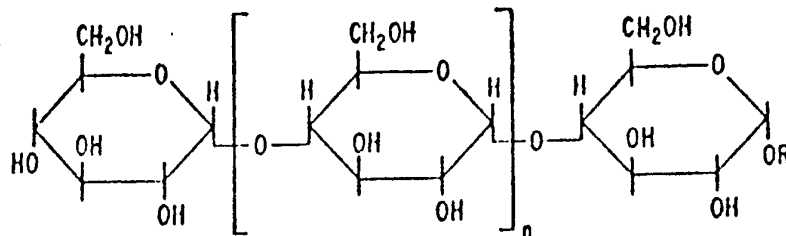
Die beschriebenen Substrate sind die definierten Polysaccharide der vorstehenden Formel, in der n eine ganze Zahl zwischen 1 und 10 und R ein substituierter aromatischer Rest ist, der, wenn er vom Polysaccharid in Form eines Phenol- oder Phenolatanions abgespalten ist, eine andere Spektralextinktion als das Substrat hat. Es gibt eine grosse Zahl solcher Reste. Die hauptsächlich von ihnen sind jedoch die Reste der Formel



worin X und Y einzeln für H , NO_2 , Halogen, Alkyl mit 1 bis 4 C-Atomen, OR' oder CO_2R' stehen, worin R' ein Alkylrest mit 1 bis 6 C-Atomen ist, und wenigstens einer der Reste X und Y eine NO_2 -Gruppe ist. Die durch Abtrennung dieser Reste vom Glykosylrest gebildeten Anionen der Phenole haben eine maximale Extinktion λ_{max} zwischen etwa 290 und etwa 600 nm.

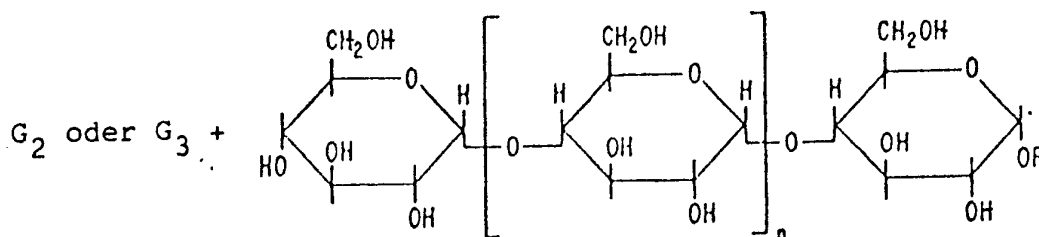
Die Einzelheiten der Verfahren zur Herstellung dieser bevorzugten Verbindungen sind in der US-Patentanmeldung 704 974/5 der Anmelderin beschrieben, so dass hier auf eine Wiederholung verzichtet werden kann.

Bei bevorzugten Ausführungsformen des erfindungsgemässen Verfahrens werden vor allem zwei Verbindungen eingesetzt, nämlich die Verbindungen, in denen n den Wert 2 oder 3 hat und R ein 4-Nitrophenylrest ist. Diese Verbindungen, α -(4-Nitrophenyl)maltotetraosid (G_4pNp) und α -(4-Nitrophenyl)maltopentaosid (G_5pNp), werden zur Bestimmung des Amylasegehalts einer Probe, z. B. Blutserum oder Urin, gemäss dem folgenden Reaktionsschema verwendet.


 $\lambda_{\text{MAX}} 290-305 \text{ nm}$

$R = 4-\text{O}_2\text{NC}_6\text{H}_4$ $n=2$ $\alpha\text{-(4-Nitrophenyl)maltotetraosid}$
 $n=3$ $\alpha\text{-(4-Nitrophenyl)maltopentaosid}$

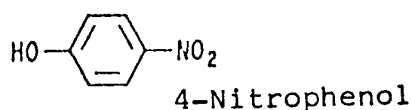
$\alpha\text{-Amylase}$



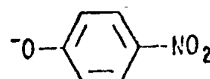
$R = 4-\text{O}_2\text{NC}_6\text{H}_4$ $n=0$ $\alpha\text{-(4-Nitrophenyl)maltosid}$

$\alpha\text{-Maltase}$

4 oder 5 $G_1 +$



OH^-



4-Nitrophenolatanion $\lambda_{\text{max}} 410 \text{ nm}$

Das als Substrat dienende definierte Oligosaccharid wird einer Lösung zugesetzt, die eine gemessene Menge der zu testenden Probe enthält, worauf die Spektralextinktion der Lösung entweder als Endpunktsbestimmung oder als Geschwindigkeitsbestimmung mit Hilfe üblicher Methoden überwacht wird. Im allgemeinen wird, wie bei allen Enzymreaktionen, die Reaktionslösung bei im wesentlichen konstantem pH-Wert und bei im wesentlichen konstanter Temperatur gehalten. Bei Verwendung dieser Substanzen ist es zweckmässig, die Bestimmung in einer Lösung durchzuführen, deren pH-Wert auf den basischen Bereich eingestellt ist, um die Extinktion bei 410 nm zu steigern. Beispielsweise haben G₄pNp und G₅pNp ($\lambda_{\text{max}} 290-305 \text{ nm}$) und 4-Nitrophenol ($\lambda_{\text{max}} 313 \text{ nm}$) bei 410 nm einen niedrigen Extinktionskoeffizienten im Vergleich zum 4-Nitrophenolatanion ($\lambda_{\text{max}} 410 \text{ nm}$).

Um dies am besten zu verwirklichen, wird eine Reagenz-Testpackung verwendet, die das vorstehend genannte definierte Substrat und eine Maltase enthält. Eine solche Testpackung wird als Beispiel in der US-PS 3 476 515 beschrieben.

50 Diese Testpackung kann in dem in der US-PS 3 770 382 beschriebenen Analysengerät verwendet werden.

Beispiel 1

Eine Probe von $\alpha\text{-(4-Nitrophenyl)maltotetraosid}$ (G₄pNp) wurde in 66,7 mMol Natriumphosphatpuffer von pH 6,5 in solchen Mengen gelöst, dass verschiedene Substratkonzentrationen von 2 bis 8 mg/3 ml erhalten wurden. Wie in der genannten Patentanmeldung beschrieben, war diese Substratprobe unter Verwendung einer Chromatographie-Säule aus «Sephadex LH-20» gereinigt worden. $\alpha\text{-Glucosidase}$ in verschiedenen Konzentrationen von 2,5 bis 12,5 Internationalen Einheiten pro 3 ml Substratlösung (IE/3 ml) wurde dann der Substratlösung zugesetzt, deren Volumen auf 3,0 ml gebracht wurde. Die Lösung wurde 1 bis 10 Minuten bei 37 °C bebrütet.

65 Nach Messung der Blindgeschwindigkeit bei 410 nm unter Verwendung eines Gilford-Spektrophotometers wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,1 ml eines «Elevated Enzyme Control Product» (hergestellt von der Anmelderin) (1150 Somo-

gyi-Einheiten pro dl (SU/dl) Amylase), das 1:1 mit «Du Pont Enzyme Diluent» (Enzym-Verdünnungsmittel) verdünnt war, ausgelöst. Diese Amylasekonzentration entspricht ungefähr der sechsfachen oberen normalen Konzentration im Serum. Die Gesamtreaktionsgeschwindigkeit wurde dann unter Verwendung des Gilford-Spektrophotometers gemessen. Durch Subtraktion der Blindgeschwindigkeit von der Gesamtgeschwindigkeit wurde die reine Reaktionsgeschwindigkeit ermittelt.

Eine statistische Optimierung mit zwei Variablen wurde für das Substrat und die α -Glucosidase vorgenommen. Die Ergebnisse dieser Bewertung sind in Tabelle I in willkürlichen Extinktionseinheiten (A) pro Minute genannt.

Tabelle I

α -Glucosidase (IE/3ml.)	Tabelle I		
	0.005 ¹	0.012	0.018
12.5	0.091 ²	0.113	0.110
	0.086 ³	0.101	0.092
	0.004	0.008	0.011
7.5	0.090	0.110	0.109
	0.086	0.102	0.098
	0.001	0.008	0.002
2.5	0.079	0.091	0.080
	0.078	0.083	0.078
	2.0	5.0	8.0
	G ₄ pNp mg/3 ml		

1. Blindgeschwindigkeit (A/Min.)

2. Gesamtgeschwindigkeit (A/Min.)

3. Reine Geschwindigkeit (A/Min.)

Diese Bewertung zeigt, dass die Blindgeschwindigkeit mit steigenden Konzentrationen sowohl von G₄pNp als auch der α -Glucosidase steigt, dass die optimale Konzentration von G₄pNp etwa 4,0 mg/3 ml beträgt, und dass die optimale Konzentration der α -Glucosidase bei etwa 7,5 IE/3 ml liegt.

Unter Verwendung dieser optimalen Werte von G₄pNp und α -Glucosidase in einer Reaktionslösung von 3 ml wurden die Reaktionsgeschwindigkeiten für verschiedene Konzentrationen der Amylase in der Probe gemessen. Mit Hilfe der Messwerte wurde eine Standardkurve gezeichnet. Aus dieser Kurve wurde die Empfindlichkeit in mA/Min./SU/dl gemessen. Die Standardkurve für diese Probe ist in Fig. 1 dargestellt. Die Blindgeschwindigkeit und die Empfindlichkeit sind für diese Probe und andere Beispiele in Tabelle II angegeben.

Tabelle 2

Beispiel	Blindgeschwindigkeit (mA/Min.)	Empfindlichkeit (mA/Min./SU/dl)
1	5,0	0,115
2	nicht gemessen	0,231
3	10,3-13,3	0,110
4	3,0	0,116

Beispiel 2

Eine geringe Menge der bei dem in Beispiel 1 beschriebenen Versuch verwendeten Substratprobe wurde durch Hochleistungs-Flüssigchromatographie (High Performance Liquid Chromatography = HPLC), ein dem Fachmann wohl bekanntes Standard-Reinigungsverfahren, weiter gereinigt. Unter Verwendung der gemäß Beispiel 1 ermittelten optimalen Werte für G₄pNp und α -Glucosidase und der in Beispiel 1 beschriebenen Amylaseprobe wurde eine Standardkurve unter Verwendung dieses gereinigten Substrats gezeichnet. Die Empfindlichkeit wurde wie in Beispiel 1 beschrieben gemessen. Die Standardkurve ist in Fig. 1 dargestellt. Die Empfindlichkeitswerte sind in Tabelle II genannt. Wie Tabelle II zeigt, wurde die Empfindlichkeit der Bestimmung durch die Reinigung wesentlich gesteigert, ein Zeichen, dass die Substratprobe von Beispiel 1 irgendeinen Inhibitor enthält.

Beispiel 3

Das bei diesem Versuch verwendete α -(4-Nitrophenyl)-malotetraosid (G₄pNp) war durch Deacetylierung des durch HPLC gereinigten Acetats hergestellt worden. Im einzelnen wurde zu einer Probe dieses Acetats eine Lösung von Natrium-methoxyd und Methanol gegeben. Die Lösung wurde 18 Stunden in einem geschlossenen Gefäß bei Raumtemperatur gerührt. Das Methanol wurde dann unter vermindertem Druck entfernt. Das in dieser Weise gebildete G₄pNp wurde in 66,7 mMol Natriumphosphatpuffer von pH 6,5 in einer solchen Menge gelöst, dass eine Substratkonzentration von 4 mg/3 ml erhalten wurde. Dann wurden 7,5 IE/3 ml α -Glucosidase der Substratlösung zugesetzt. Das Volumen der Lösung wurde auf 3,0 ml gebracht. Die Lösung wurde 1 bis 10 Minuten bei 37 °C bebrütet.

Nach der Messung der Blindgeschwindigkeit auf die in Beispiel 1 beschriebene Weise wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,1 ml «Du Pont Elevated Enzyme Control Product», das mit dem Enzymverdünnungsmittel «Du Pont Enzyme Diluent» im Verhältnis von 1:1 verdünnt war, ausgelöst. Die Reaktionsgeschwindigkeit für verschiedene Amylasekonzentrationen in der Probe wurden auf die in Beispiel 1 beschriebene Weise gemessen, worauf eine Standardkurve gezeichnet wurde. Aus dieser Kurve wurde die Empfindlichkeit in mA/Min./SU/dl ermittelt. Die Standardkurve für dieses Substrat ist in Fig. 1 dargestellt, und die Blindgeschwindigkeit und die Empfindlichkeit sind in Tabelle II genannt.

Dies ist eine rohe Probe, die noch nicht durch chromatographische Trennmethode gereinigt worden ist. Als Folge hiervon ist die Blindgeschwindigkeit sehr hoch – sie liegt im Bereich von 10,3 bis 13,3 mA/Min. – jedoch ist die Empfindlichkeit der in Beispiel 1 angegebenen Empfindlichkeit des Substrats, bei dem eine vorherige Reinigung mit einer Säule aus «Sephadex LH-20» vorgenommen worden war, gleichwertig.

Eine weitere Reihe von Reaktionen wurde unter den vorstehend genannten Bedingungen durchgeführt, wobei jedoch die Reaktion 5 Min. nach ihrer Auslösung durch Zugabe von 1,5 ml eines aliquoten Teils der Probelösung in entweder 1,5 ml 0,2 molarem Na₂CO₃ oder 5 ml 0,002n NaOH abgebrochen wurde. Bei pH 6,5 ist der Extinktionskoeffizient des 4-Nitrophenols

verhältnismässig niedrig, weil nicht das gesamte 4-Nitrophenol ionisiert ist. Der Anstieg des pH-Werts als Folge des Abbruchs der Reaktion genügt, um das 4-Nitrophenol vollständig zu 4-Nitrophenolat zu ionisieren, wodurch der Extinktionskoeffizient erhöht wird. Dies führt zu einer «Endpunktsbestimmung», für die die Standardkurven nicht geradlinig waren, wahrscheinlich weil das System für eine Geschwindigkeits- und nicht eine Endpunktsannäherung optimiert war. Eine fünf- bis zehnfache Steigerung der Empfindlichkeit wurde jedoch beobachtet.

Beispiel 4

Eine Probe von α -(4-Nitrophenyl)maltotetraosid wurde in 66,7 mMol Natriumphosphatpuffer von pH 6,5 in einer solchen Menge gelöst, dass eine Substratkonzentration von 4 mg/3 ml erhalten wurde. Dann wurden 7,5 IE/3 ml α -Glucosidase der Substratlösung zugesetzt. Das Volumen der Lösung wurde auf 3,0 ml gebracht. Die Lösung wurde 1 bis 10 Minuten bei 37 °C bebrütet.

Nach Messung der Blindgeschwindigkeit in einem Gilford-Spektrophotometer bei 410 nm wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,1 ml «Du Pont Elevated Enzyme Control Product», das mit dem Enzymverdünnungsmittel «Du Pont Enzyme Diluent» im Verhältnis von 1:1 verdünnt war, gelöst. Die Reaktionsgeschwindigkeiten für die verschiedenen Amylasekonzentrationen der Proben wurden mit dem Gilford-Spektrophotometer gemessen, worauf eine Standardkurve gezeichnet wurde. Aus dieser Kurve wurde die Empfindlichkeit in mA/Min./SU/dl gemessen. Die Standardkurve für diese Probe ist in Fig. 1 dargestellt. Die Blindgeschwindigkeit und die Empfindlichkeit sind in Tabelle II genannt.

Auch dies ist ein Substrat, das durch eine Säule aus «Sphadex LH-20» gereinigt worden war. Die Empfindlichkeit der Bestimmung unter Verwendung des Substrats dieses Beispiels ist derjenigen der in den Beispielen 1 und 3 beschriebenen Bestimmungen gleichwertig. Die Blindgeschwindigkeit ist jedoch etwas geringer als die von Beispiel 1 und merklich geringer als die von Beispiel 3.

Beispiel 5

Eine Probe von α -(4-Nitrophenyl)maltopentaosid (G_5pNp) wurde in 66,7 mMol Natriumphosphatpuffer von pH 6,5 in solchen Mengen gelöst, dass verschiedene Substratkonzentrationen im Bereich von 4,0 bis 12,0 mg/3 ml erhalten wurden. α -Glucosidase mit unterschiedlicher Aktivität im Bereich von 15 bis 45 IE/3 ml wurde dann der Substratlösung zugesetzt, deren Volumen dann auf 3,0 ml gebracht wurde. Die Lösung wurde 1 bis 10 Minuten bei 37 °C bebrütet.

Vorversuche wurden unter Verwendung von 4,0 mg/3 ml G_5pNp und drei α -Glucosidasekonzentrationen von 7,0, 14,0 und 28,0 IE/3 ml durchgeführt. Für jede dieser Konzentrationen wurden auf die in Beispiel 1 beschriebene Weise die Standardkurven unter Verwendung der in Beispiel 1 beschriebenen Amylaseprobe gezeichnet. In jedem Fall betrug die Blindgeschwindigkeit 3,0 mA/Min. Die Standardkurve für die drei α -Glucosidasekonzentrationen sind in Fig. 2 dargestellt. Alle Kurven waren nicht geradlinig, so dass eine Bestimmung der

Empfindlichkeit schwierig war. Die Empfindlichkeit wird jedoch mit mehr als 0,160 mA/Min./IE/dl geschätzt. Die Linearität stieg mit steigender α -Glucosidasekonzentration, ein Zeichen, dass die α -Glucosidasekonzentration unter dem Optimum lag.

Eine Optimierung mit zwei Variablen wurde auf die in Beispiel 1 beschriebene Weise vorgenommen. Die Ergebnisse dieser Optimierung sind in Tabelle III genannt.

Tabelle III

α -Glucosidase IE/3ml				
		G_5pNp mg/3 ml		
45	0.003 ¹	0.004	0.005	
	0.128 ²	0.139	0.145	
	0.125 ³	0.135	0.140	
30	0.003	0.004	0.012	
	0.122	0.135	0.133	
	0.119	0.131	0.121	
15	0.003	0.005	0.007	
	0.110	0.119	0.114	
	0.107	0.114	0.107	

1. Blindgeschwindigkeit (A/Min.)
2. Gesamtgeschwindigkeit (A/Min.)
3. Reine Geschwindigkeit (A/Min.)

Diese Bewertung zeigt, dass die Blindgeschwindigkeit nur wenig steigt, wenn die G_5pNp - oder α -Glucosidasekonzentrationen erhöht werden. Dies ist in Übereinstimmung mit der oben erläuterten Situation bei G_5 . Diese Analyse zeigt ferner, dass der optimale Wert für G_5pNp oder α -Glucosidase bei 12,0 mg/3 ml bzw. 45 IE/3 ml nicht erreicht worden ist. Da G_5pNp eine niedrigere oder zumindest eine stabile Blindgeschwindigkeit als Funktion der Substrat- und α -Glucosidasekonzentrationen hat, wird es als Substrat bevorzugt. Die für die Bestimmungen erforderlichen hohen Konzentrationen von G_5pNp und α -Glucosidase schränken jedoch ihren bevorzugten Status ein.

FIG. 2

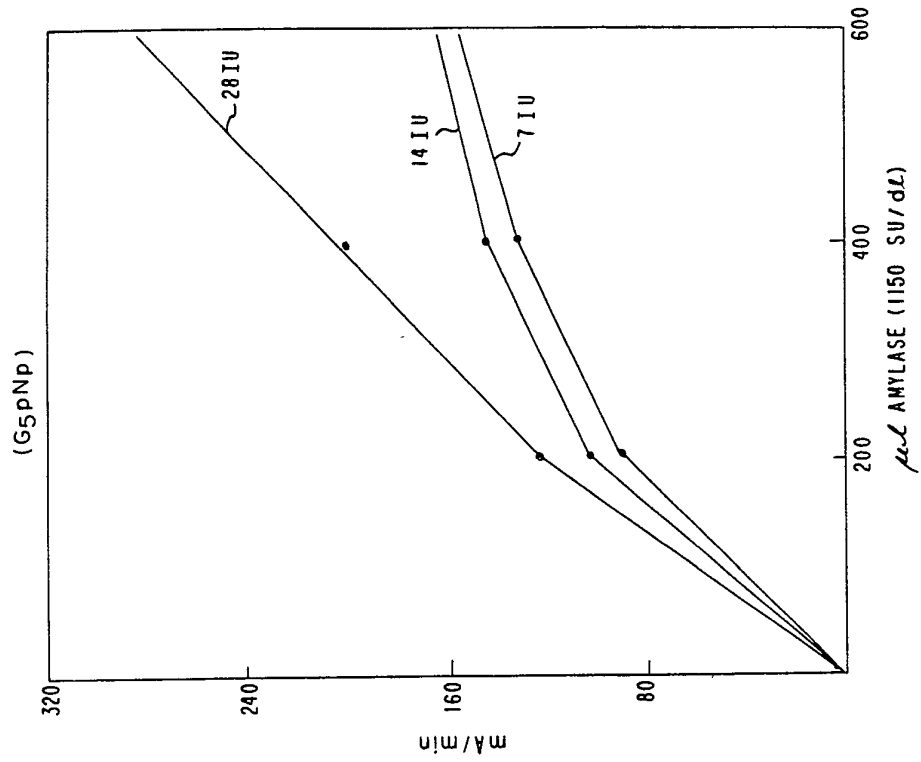


FIG. 1

