



## ПРИНЦИП МЕТОДА

α-Амилаза катализирует гидролиз 4-нитрофенил-мальтогептаозид-этилидена в меньший олигосахарид, который гидролизуется с помощью α-глюкозидазы, освобождая 4-нитрофенол. Активность α-Амилазы определяется по скорости образования 4-нитрофенола, оптическая плотность которого измеряется при 405 нм<sup>1,2,3</sup>.

## СОСТАВ

A. Реагент А: 1 x 32 мл. HEPES 50 ммоль/л, хлорид кальция 0.075 ммоль/л, хлорид магния 13 ммоль/л, α-глюкозидаза > 4 Ед/мл, рН 7.1

B. Реагент В: 1 x 8 мл. HEPES 50 ммоль/л, 4-нитрофенил-мальтогептаозид-этилиден 18 ммоль/л, рН 7.1

## ХРАНЕНИЕ

Хранить при 2-8°C.

Реагенты и стандарт стабильны до окончания срока годности, указанного на этикетке, при хранении в плотно закрытом сосуде и предотвращении загрязнения во время использования.

Признаки загрязнения:

– Реагенты: присутствие взвешенных частиц, мутность, абсорбция бланка выше 0.300 при 405 нм (1 см кювета).

– Стандарт: присутствие взвешенных частиц, мутность.

## ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАКТИВОВ

Рабочий реагент. Перенести содержимое флакона с Реагентом В в сосуд с реагентом А. Тщательно перемешать.

Если необходимы меньшие объемы, то рабочий реагент готовят следующим образом: 4 мл Реагента А + 1 мл Реагента В.

Стабильность рабочего раствора составляет 20 дней при 2-8°C

## НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

– Спектрофотометр или фотометр с термостатируемой измерительной ячейкой на 25, 30 или 37°C с фильтром 405 нм

– Кюветы с длиной оптического пути 1 см

## ОБРАЗЦЫ

Сыворотка, плазма, моча.

α-Амилаза стабильна в сыворотке, плазме или моче в течении 5 дней при 2-8°C. Гепарин и ЭДТА могут быть использованы в качестве антикоагулянта.

## ПРОЦЕДУРА

1. Нагреть Рабочий Реагент и измерительную ячейку фотометра до температуры реакции.
2. Внести в кювету (примечание 2):

	Сыворотка/плазма		Моча	
	37°C	30°C	37°C	30°C
Рабочий реагент	1.0 мл	1.0 мл	1.0 мл	1.0 мл
Образец	30 мкл	60 мкл	15 мкл	30 мкл

3. Перемешать и поместить кювету в измерительную ячейку фотометра. Начать отсчет.
4. Через 1 минуту измерить абсорбцию, и далее с интервалом в 1 минуту в течение 3 минут.
5. Рассчитать разницу между последовательными измерениями абсорбции, и среднюю оптическую разницу в минуту (ΔА/мин)

## РАСЧЕТ

Концентрация α-Амилазы и может быть рассчитана по следующей формуле:

$$\Delta A/\text{мин} \times \frac{Vt \times 10^6}{\epsilon \times l \times V_s} = \text{Ед/л}$$

Коэффициент молярной абсорбции (ε) 4-нитрофенола при 405 нм составляет 10600, оптический путь (l) составляет 1 см, общий реакционный объем (Vt) равен 1.030 при 37°C и 1.060 при 30°C, объем образца (Vs) равен 0.030 при 37°C и 0.060 при 30°C. Для образцов мочи, общий реакционный объем (Vt) равен 1.015 при 37°C и 1.030 при 30°C, объем образца (Vs) равен 0.015 при 37°C и 0.030 при 30°C. 1Ед/л равна 0.0166 мккат/л. Для расчета активности фермента используйте следующие факторы:

ΔА/мин	Сыворотка, плазма	37°C	30°C
		x 3239 = Ед/л x 53.58 = мккат/л	x 1667 Ед/л x 27.7 мккат/л
	Моча	x 6384 = Ед/л 105.9 = мккат/л	x 3239 = Ед/л x 53.8 = мккат/л

## НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Температура реакции	Сыворотка, плазма		Моча	
	Ед/л	μкат/л	Ед/л	μкат/л
30°C до <sup>1</sup>	25 - 65	0.41 - 1.08	-	-
37°C до <sup>4</sup>	28 - 100	0.47 - 1.67	16 - 491	0.26 - 8.15

Данные величины ориентировочны, каждая лаборатория должна устанавливать свои диапазоны нормальных значений.

## КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется использовать контрольную биохимическую сыворотку уровня I (код 18005, 18009 и 18042), уровня II (код 18007, 18010 и 18043) и Orina Control de Bioquímica (код 18054) чтобы подтвердить эффективность процедуры измерения.

Для каждой лаборатории должна быть разработана собственная схема контроля качества и процедуры по корректировке, если контрольные материалы выходят за пределы допустимых отклонений.

## МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

– Предел обнаружения: 3.0 Ед/л = 0.05 мккат/л.

– Предел линейности: 1300 Ед/л = 21.6 мккат/л для сыворотки и плазмы и 2600 Ед/л = 43.2 мккат/л для мочи. Для более высоких значений следует развести образец дистиллированной водой в 5 раз и повторить измерение.

– Сходимость (внутри серии):

Сыворотка и плазма: Средняя концентрация	CV	n
70 Ед/л	1.3 %	20
666 Ед/л	0.6 %	20

Моча: Средняя концентрация	CV	n
460 Ед/л	0.7%	20
950 Ед/л	0.6%	20

– Воспроизводимость (между сериями):

Сыворотка и плазма: Средняя концентрация	CV	n
70 Ед/л	1.9%	25
666 Ед/л	1.7%	25

Моча: Средняя концентрация	CV	n
460 Ед/л	0.8%	25
950 Ед/л	1.2%	25

– Чувствительность: 0.309 Δ МА• л/Ед•мин= 18.6 Δ МА• л/нкат •мин.

– Достоверность: Результаты, полученные с данными реагентами не показывали значительных отличий при сравнении с результатами, полученными с другими реагентами. Детали сравнительных экспериментов доступны по требованию.

– Интерференция: Липемия (триглицериды 10 г/л), билирубин (20 мг/дл) не влияют на результаты. Гемоглобин (10 г/л) может влиять на результаты. Некоторые вещества и лекарства могут исказить результат<sup>5</sup>.

Данные метрологические характеристики были получены при использовании анализатора, при использовании другого оборудования или ручных методов результаты могут варьировать.

## ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

α-Амилаза катализирует гидролиз α-1,4-связей углеводов, состоящих из единиц α-D-глюкозы. Результатом является образование декстранов, мальтозы и нескольких молекул глюкозы. α-Амилаза продуцируется главным образом поджелудочной железой (P-тип) и слюнными железами (S-тип), но найдена также и в других тканях.

Анализ амилазной активности в сыворотке и моче широко используются в диагностике заболеваний поджелудочной железы, таких как острый и хронический панкреатит. Гиперамилаземия может также быть вызвана почечной недостаточностью, острой абдоминальной болью, опухолями легких и яичников, поражениями слюнных желез, макроамилаземией, диабетическим кетоацидозом, болезнью желчных путей, церебральной травмой, хроническим алкоголизмом и лекарствами (опиатами)<sup>6,7</sup>.

Клинический диагноз не должен основываться на результатах отдельного теста, он должен согласовываться с результатами клинических и лабораторных данных.

## ПРИМЕЧАНИЯ

1. Слюна и кожа содержит α-Амилазу. Не насыщайте растворы ртом, нельзя допускать контакта кожи с реагентами.
2. Данные реагенты могут использоваться в различных автоматических анализаторах. Инструкции доступны по требованию при запросе.

## БИБЛИОГРАФИЯ

1. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C. Part 8. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of α-amylase. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44: 1146-1155.
2. IFCC reference procedures for measurement of catalytic concentrations of enzymes: corrigendum, notes and useful advice. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48: 615-621.
3. Lorentz K. Routine α-amylase assay using protected 4-nitrophenyl-1,4-α-D-maltoheptaoside and a novel α-glucosidase. *Clin Chem* 2000;46:644-649.
4. Junge W, Werner W, Wilke B et al. Development and evaluation of assays for the determination of total and pancreatic amylase at 37°C according to the principle recommended by the IFCC. *Clin Biochem* 2001;34:607-615.
5. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5th ed. AACC Press, 2000.
6. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 4th edition. Burtis CA, Ashwood ER. WB Saunders Co., 2005.
7. Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 4th ed. AACC Press, 2001.