

Nová referenční metoda stanovení katalytické koncentrace alkalické fosfatázy ALP (EC 3.1.3.1) J.Kratochvíla, B. Friedecký

V roce 2011 v září byla publikována nová celosvětová referenční metoda stanovení katalytické koncentrace alkalické fosfatázy [1], na kterou již dlouho odborná veřejnost čekala. Publikace vznikla na základě práce pracovní skupiny IFCC C-RSE (Committee on Reference Systems for Enzyme) "standardizace enzymů" a prošla oponenturou všech národních odborných společností v rámci IFCC. Lze proto i očekávat přípravu referenčního materiálu (ERM/IRMM/IFCC) pro stanovení kat.k. ALP právě na základě publikované referenční metody tak, jak je avizováno. Tato referenční metoda je uvedena i na webu JCTLM (Mezinárodní společná komise pro metrologickou návaznost v laboratorní medicíně – orgán BIPM) v oddíle referenční metody:

http://www.bipm.org/jctlm/viewResults.do?type=isRMP&searchString=ALP&searchStringIUPAC=&searchStringMixed=&analyteCategory=Enzymes&matrixCategory=&sortBy=Analyte_Name&status=P&id=C7RMP2R*2*14&x=42&y=12

Referenční metoda pro stanovení kat.k. ALP je dostupná např. v laboratořích RfB DGKL Bonn (pracoviště Hannover), Německo, CIRME Milano, Itálie či Aerospace Reference Laboratory Beijing, Čína. Níže uvádíme stručnou charakteristiku referenčního měřicího postupu ve třech tabulkách.

Reakční princip:

ALP katalyzuje hydrolýzu/konverzi 4-nitro-fenyl-fosfátu za vzniku 4-nitrofenolu a fosfátu. V alkalickém prostředí pak vzniká 4-nitrofenoxidový ion. AMP a voda pak slouží jednak jako pufr a pak i jako akceptor fosforečnanu.

Reakční podmínky uvádí tabulka 1.

2-amino-2-metyl-1-propanol (AMP)	750 mmol.l ⁻¹
pH (37°C)	10,20 ± 0,05 ^a
4-nitrofenylfosfát	16 mmol.l ⁻¹
Síran zinečnatý	1 mmol.l ⁻¹
Octan hořečnatý	2 mmol.l ⁻¹
HEDTA	2 mmol.l ⁻¹
Objemový poměr séra	0,0196(1/51)
^a maximální povolená rozšířená nejistota pro 95% interval spolehlivosti	

Podmínky měření uvádí tabulka 2.

Teplota měření	37°C ± 0,1°C
Vlnová délka	405 nm ± 1 nm ^a
Šíře spektrálního pásu (pološířka spektr. pásu)	≤ 2 nm
Tloušťka vrstvy	10,00 mm ± 0,01 mm ^a
Inkubační čas	60 s
Doba od startu do počátku měření (delay time)	90 s
Interval měření	120 s
Počet měřících bodů	≥ 6
^a maximální povolená rozšířená nejistota pro 95% interval spolehlivosti	

Postup měření (analytický měřicí systém pro stanovení kat.k. ALP) uvádí tabulka 3.

2,000 ml reakčního roztoku ^a
vytemperujeme na 37°C
přidáme 0,050 ml vzorku ^b
Intenzivně promícháme a inkubujeme po dobu 60 s. Na konci inkubační doby musí být teplota měřeného roztoku v kyvetě 37°C
Přidáme 0,500 ml startovacího činidla ^c
Intenzivně promícháme a počkáme 90 s a pak měříme absorbanci roztoku po dobu 120 s
^a reagenční blank - startovací činidlo a vzorek nahradíme roztokem 9 g.l ⁻¹ (154 mmol.l ⁻¹) chloridu sodného
^b blank vzorku - startovací činidlo nahradíme roztokem 9 g.l ⁻¹ (154 mmol.l ⁻¹) chloridu sodného
^c startovací činidlo je roztok 81,6 mmol.l ⁻¹ 4-nitrofenylfosfátu ve vodě

Literatura:

1. IFCC Scientific Division. Committee on Reference Systems for Enzyme. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentration of enzymes at 37° C. Part 9.: Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alkaline phosphatase. Clin Chem Lab Med 2011;49/9:1439-1446.