

# IFCC metoda za mjerenje katalitičke koncentracije alkalne fosfataze

---

Flögel, Mirna; Juretić, Dubravka

Source / Izvornik: **Biochemia Medica, 1993, 3, 75 - 89**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:282931>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and  
Biochemistry University of Zagreb](#)



# IFCC metoda za mjerenje katalitičke koncentracije alkalne fosfataze (Ortofosfat-monoester fosfohidrolaza, EC 3.1.3.1)

Mirna Floegel i Dubravka Juretić<sup>1</sup>

## 1. Uvod

Alkalna fosfataza je enzim koji katalizira hidrolizu organskih monofosfatnih estera u alkalnoj sredini. U zdravih ljudi alkalna fosfataza se nalazi u najmanje pet tkivno specifičnih izozima<sup>2</sup>, koji se u dobro podešenim uvjetima mogu elektroforetski razlučiti (1-3). Kod patoloških stanja pojavljuju se dodatni enzimske oblici. Relativni odnos pojedinih alkalnih fosfataza u bolesnikovom serumu ovisi o poluvremenima života pojedinačnih izozima te o stupnju oštećenosti organa ili tkiva iz kojega ti pojedini izozimi potječu. Zbog toga nije moguće predskazati relativne udjele pojedinih enzimske oblika u uzorku ispitanika.

Katalitička i fizička svojstva izozima alkalne fosfataze se razlikuju, pa je za definiranje valjane metode za određivanje ukupne katalitičke koncentracije alkalnih fosfataza bilo potrebno obraditi različite tipove uzoraka. Za ispitivanje valjanosti metode serumi su birani tako da obuhvaćaju uzorke bolesnika u kojih je dijagnosticirana bolest kosti, bolest jetre i trudnoća. Kod podešavanja reakcijskih uvjeta za utvrđivanje optimirane metode rabljeni su pročišćeni pripravci ljudske jetrene i koštane alkalne fosfataze te združeni uzorci seruma koji potječu od ležećih bolesnika s normalnom i povišenom katalitičkom aktivnosti alkalne fosfataze.

## 2. Načelo metode

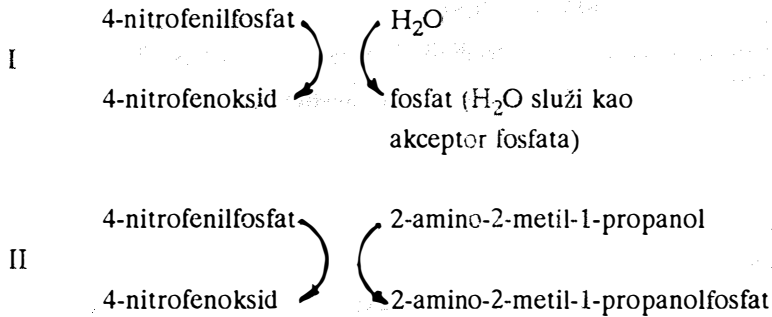
Različiti oblici alkalne fosfataze hidroliziraju niz različitih organskih monofosfatnih estera pri čemu se stvara alkohol ili fenol i fosfatni ion. Fosfatne se skupine prenose od kompleksa enzim-fosfat na vodu ili druge akceptore fosfata u reakcijskom sustavu. Pri uvjetima optimirane metode alkalna fosfataza katalizira

---

<sup>1</sup>Zavod za medicinsku biokemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

<sup>2</sup>izozim = izoenzim

dvije reakcije transfosforiliranja:



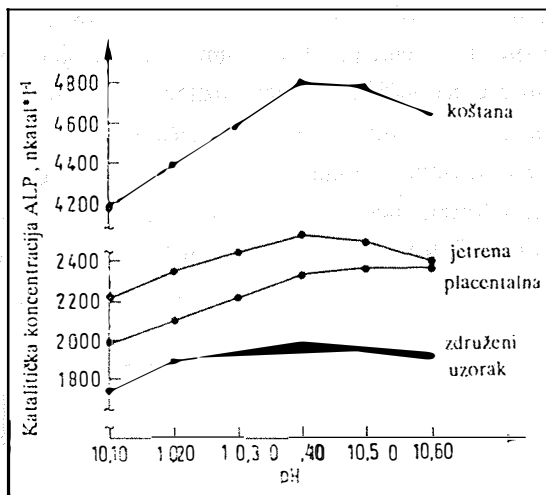
Kod radnoga pH 4-nitrofenilfosfat je praktički bezbojan, dok je 4-nitrofenoksid ion izrazito žuto obojen (molarni ekstincijski koeficijent kod 405 nm uz širinu svjetlosne vrpce manju ili jednaku 2 nm iznosi kod reakcijskih uvjeta  $1845 \pm 20 \text{ m}^2\text{mol}^{-1}$ ). To omogućuje izravno kontinuirano spektrofotometrijsko mjerenje brzine nastajanja 4-nitrofenoksid iona uz veliku osjetljivost. Za određivanje katalitičke koncentracije enzima dozvoljeno je rabiti samo one metode koje omogućuju kontinuirano (ili povremeno u malim vremenskim razmacima) praćenje brzine preobrazbe supstrata (5), pa je stoga 4-nitrofenilfosfat idealni kromogeni supstrat.

Preporučena metoda načelno se temelji na metodi Bessey, Lowrya i Brocka (6). Dakako, optimirani su pH i koncentracija supstrata. 2-amino-2-metil-1-propanol zamijenio je pufersku ulogu glicina i u reakcijski sustav unesen je metalni pufer kako bi osigurao stalnu koncentraciju cink(II) i magnezij(II) iona. Originalna metoda mjerila je krajnju točku reakcije, dok se optimiranom preporučenom metodom kontinuirano mjeri brzina katalitičke reakcije.

Mehanizam katalitičke reakcije alkalne fosfataze još nije potpuno razjašnjen. Mnogo je istraživanja vezano uz bakterijsku alkalnu fosfatazu izoliranu iz *Escherichia coli* (7,8). Taj enzim ima dvije naoko jednake podjedinice, ali kinetički pokazuje negativnu kooperativnost. Ima radova koji upućuju na nejednako ponašanje podjedinica (8,9), no kako struktura alkalne fosfataze varira od izozima do izozima, vrlo vjerojatno nije moguće postaviti jedinstven mehanizam za sve strukturne varijante.

Zbog tih razloga kinetički modeli enzimske reakcije nisu pomogli pri optimiranju metode za mjerenje katalitičke koncentracije alkalnih fosfataza.

pH kod kojega se mjeri katalitička koncentracija enzima obično je pH u kojemu enzim postiže maksimalnu aktivnost. Kako izozimi alkalne fosfataze postižu maksimalnu aktivnost kod različitih pH, izbor radnoga pH od 10.4 uspješan je kompromis (4). Slika 1 prikazuje ovisnost različitih tkivno specifičnih izozima alkalne fosfataze o pH reakcijske smjese.



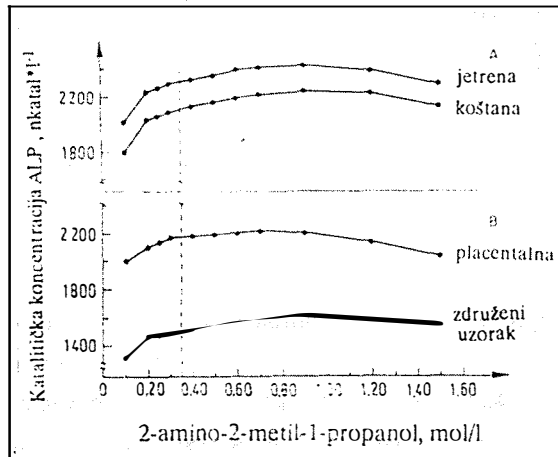
Slika 1. Ovisnost izmjerene katalitičke aktivnosti alkalne fosfataze o pH u uzorcima različitih tkivno specifičnih izozima.

Vrlo značajno pitanje pri optimiranju reakcijskih uvjeta metode odnosilo se na izbor pufera. Dok se u većini puferiranih sustava nastoji izabrati pufer koji ne utječe na tijek i brzinu reakcije, kod alkalne fosfataze to nije bilo ostvarivo. Od tri pufera u užem izboru jedan je, hidrogenkarbonat, na hidrolizu djelovao inhibicijski, a dva, dietanolamin i 2-amino-2-metil-1-propanol, aktivacijski, jer je sam puferški ion akceptor fosfata (3). Povećanjem katalitičke aktivnosti povećava se i osjetljivost metode kod niskih koncentracija enzima u uzorku, dok inhibicijsko djelovanje upravo u tom području izrazito smanjuje mogućnost detekcije i točnoga određivanja katalitičke aktivnosti, pa je daljnji uži izbor usmjeren na dietanolamin i 2-amino-2-metil-1-propanol, puferške akceptore fosfata. S druge strane, previsoka

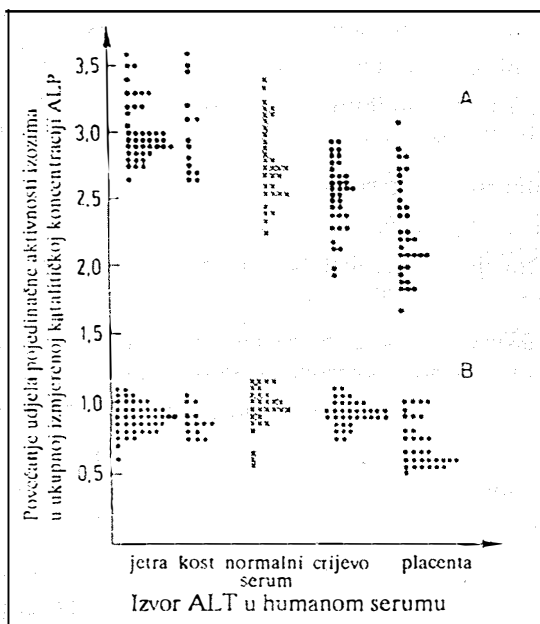
katalitička aktivnost zahtijeva pipetiranje malih količina uzorka, što dakako nepovoljno utječe na preciznost mjerenja.

Dovoljno visok kapacitet pufera za puni raspon fizioloških i patofizioloških katalitičkih koncentracija enzima nužan je zahtjev pri određivanju optimalne koncentracije pufera. Kako je uz takve koncentracije dietanolamin povećavao viskoznost uzorka za mjerenje, što može dovesti do ozbiljnih pogrešaka u praktičnoj primjeni, konačni izbor pufera za preporučenu metodu bio je 2-amino-2-metil-1-propanol (10,11).

Posebnu pozornost zahtijevalo je ispitivanje aktivacijskoga učinka pufera na različite tkivno specifične izozime. Pri optimiranju nastojali smo izabrati pufer koji podjednako utječe na aktivnost svih izozima, jer bi u protivnom ukupna katalitička koncentracija alkalne fosfataze značajno ovisila o promjenjivim relativnim udjelima pojedinih izozima. Iako nije nađen idealni pufer, ipak se i u ovom smislu 2-amino-2-metil-1-propanol pokazao kao najpovoljniji. Slike 2 i 3 prikazuju utjecaj koncentracije pufera na izmjerenu katalitičku koncentraciju alkalne fosfataze te različiti učinak pojedinih pufera na različite izozime.



**Slika 2.** Ovisnost izmjerene katalitičke koncentracije alkalne fosfataze o koncentraciji pufera u različitim uzorcima: serumi bolesnika s bolestima jetre ili kosti, serum trudnica u trećem mjesecu trudnoće te združeni uzorak ležećih bolesnika.



**Slika 3.** Relativno povećanje izmjerene katalitičke koncentracije alkalne fosfataze različitih uzoraka tkivno specifičnih izozima te njihove smjese

- a) uz dietanolamin u odnosu na karbonatni pufer  
 b) uz 2-amino-2-metil-1-propanol u odnosu na karbonatni pufer

Alkalna fosfataza je enzim koji za svoju punu katalitičku djelotvornost zahtijeva dva metalna iona, cink i magnezij. Mjesta na enzimu koja vežu magnezij pokazuju istodobno znatno veći afinitet za cink pa je osobito važno da ne dođe do zamjene magnezija cinkom, jer takva supstitucija dovodi do smanjenja katalitičke aktivnosti enzima. Potrebno je dakle optimirati ne samo koncentracije magnezija i cinka, nego i njihov međusobni omjer. Istraživanja su pokazala (12,13) kako je optimalni odnos  $Mg^{2+}/Zn^{2+}$  500/1.

U alkalnoj sredini oba metalna iona stvaraju netopljive hidrokside koji zamućuju reakcijsku smjesu i pritom se smanjuju raspoložive koncentracije slobodnih metalnih iona. Zbog toga se u reakcijsku smjesu unosi metalni pufer koji održava stalnu poželjnu koncentraciju metalnih iona. Isti pufer zaštićuje enzim od mogućih tragova drugih metalnih inhibitora. Kao metalni pufer upotrebljava se HEDTA zbog osobito velikog afiniteta za cink(II) ione.

Katalitička reakcija pri mjerenju katalitičke koncentracije alkalne fosfataze

može se otpočeti ili uzorkom ili supstratom, pa ipak se preporuča započeti reakciju uzorkom (4), kako bi se što je moguće više smanjio dodir uzorka s puferom, koji može sadržavati nečistoće - inhibitore za analizirani enzim.

### 3. Optimalni uvjeti mjerenja

U Tablici 1. prikazani su optimirani reakcijski uvjeti za određivanje katalitičke koncentracije alkalne fosfataze u serumu ispitanika (14).

**Tablica 1.** Optimirani uvjeti za mjerenje katalitičke koncentracije alkalne fosfataze u serumu

Temperatura	30.0° C
pH (30° C)	10.40
2-amino-2-metil-1-propanol	0.35 mol/l
4-nitrofenilfosfat	16.0 mmol/l
Magnezij-acetat	2.0 mmol/l
Cink sulfat	1.0 mmol/l
N-hidroksietiltilendiamintriocena kiselina HEDTA	2.0 mmol/l
Volumni udio seruma	0.0196 (1:51)

### 4. Oprema

Za izvođenje mjerenja potreban je spektrofotometar snabdjeven termostataranim pretincem za kivete koji točno mjeri apsorbancije kod 405 nm. Specifikacija opreme mora odgovarati preporukama glede širine snopa, duljine svjetlosnoga puta i točnosti temperaturne kontrole (5,14).

### 5. Reagencije

1. 2-amino-2-metil-1-propanol,  $C_4H_{11}NO$ ,  $M_r$  89.14
2. 4-nitrofenilfosfat, dinatrijeva sol, heksahidrat,  $M_r$  371.2
3. Magnezij acetat,  $Mg(C_2H_3O_2)_2 \cdot 4H_2O$ ,  $M_r$  214.5
4. Cink sulfat,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $M_r$  287.54
5. Solna kiselina, HCl,  $M_r$  36.47
6. 4-nitrofenol,  $C_6H_5NO_3$ ,  $M_r$  139.1
7. N-hidroksietiltilendiamintriocena kiselina, natrijeva sol, dihidrat (HEDTA),  $C_{10}H_{15}N_2Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ ,  $M_r$  380.24

8. Natrij hidroksid, NaOH,  $M_r$  40

### 6. Čistoća reagensija

Reagensije za određivanje katalitičke koncentracije alkalne fosfataze ne smiju sadržavati nečistoće koje bi utjecale na izmjerenu katalitičku koncentraciju enzima. 2-amino-2-metil--1-propanol može biti zagađen upravo takvim nečistoćama. Najčešće su to diamini i 5-amino-3-aza-2,2,5-trimetilheksanol koji inaktiviraju enzim vežući na sebe cink. Zbog toga valja plinskom kromatografijom provjeriti jesu li te nečistoće prisutne, a ako jesu, istodobno će se kromatografski ukloniti (15). Uporabom metalnoga pufera izbjeći će se nedostatak cinka, a otpočinjanjem reakcije uzorkom skratit će se dodir pufera i enzima, i na taj će se način umanjiti njegovo potencijalno inhibicijsko djelovanje (4).

4-nitrofenilfosfat mora biti najviše moguće čistoće koja ispunjava slijedeće kriterije:

- kod enzimske pretvorbe 4-nitrofenilfosfata u 4-nitrofenol doseg hidrolize mora biti  $>0.98$ ,
- molarna apsorbancija 4-nitrofenilfosfata pri 311 nm u otopini natrij hidroksida, 10 mmol/l kod 25°C mora biti  $986.7 \pm 7.6 \text{ m}^2\text{mol/l}$ ,
- molarni udio 4-nitrofenola u odnosu na 4-nitrofenilfosfat mora biti manji od  $0.3 \times 10^{-3}$ ,
- molarni udio anorganskog fosfata u odnosu na 4-nitrofenilfosfat mora biti manji od 0.01.

Detaljni opis provjere ovih uvjeta dali su Bowers i suradnici (16).

Kristalni 4-nitrofenol odabran za uporabu mora zadovoljavati slijedeće uvjete:

- boja: bezbojan do svijetlo-žut
- talište: 113-114°C,
- maseni udio vode u 4-nitrofenolu:  $<0.001$ ,
- molarna apsorbancija 4-nitrofenola pri 401 nm u natrij hidroksidu, 10 mmol/l na 24°C:  $1838 \pm 9 \text{ m}^2\text{mol/l}$ .

Prihvatljivi 4-nitrofenol može se pripremiti rekristalizacijom ili sublimacijom, kako je opisao Bowers (17). Zadovoljavajuće kvalitete je također pripravak SRM938 Nacionalnoga biroa za standarde, Washington.



## 7. Priprava otopina

Posude za otopine valja prije uporabe sterilizirati kako bi se spriječio rast mikroorganizama. Sve otopine priređuju se u odmjernim tikvicama s destiliranom vodom analitičke čistoće (5).

### I. Matična otopina metalnoga pufera. HEDTA, 112.2 mmol/l; ZnSO<sub>4</sub>, 56.1 mmol/l; Mg(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, 112.2 mmol/l:

Redoslijed dodavanja pojedinih sastojaka je izuzetno važan kako bi se izbjegla precipitacija: Otopi 4.266 g HEDTA u približno 70 ml vode. Zatim dodaj 1.613 g ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O i otopi potpuno. Nakon toga dodaj 2.407 g Mg(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, otopi miješajući i nadopuni do 100 ml vodom.

### II. 2-amino-2-metil-1-propanol/metalni pufer, 0.393 mol/l; HEDTA, 2.24 mmol/l; ZnSO<sub>4</sub>, 1.12 mmol/l; Mg(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, 2.24 mmol/l, pH 30° C 10.40 ± 0.05:

Zagrij 2-amino-2-metil-1-propanol na približno 37° C da sav bude u tekućem stanju. Promiješaj 17.52 g 2-amino-2-metil-1-propanola u približno 400 ml vode analitičke čistoće. Podеси pH na 10.40 kod 30° C s dodatkom HCl, 1 mol/l. Miješajući, polagano dodaj točno 10.0 ml metalnoga pufera (Otopina I) i ponovo podеси pH (30° C) na 10.40 ± 0.05 s dodatkom HCl, 1 mol/l. Nadopuni vodom točno do 500 ml i čuvaj u dobro zatvorenom spremniku kako bi se spriječila apsorpcija ugljik dioksida.

### III. 4-nitrofenilfosfat, 179.5 mmol/l:

Otopi 0.666 g 4-nitrofenilfosfata (dinatrijeva sol, heksahidrat, M<sub>r</sub> 371.2) u približno 8 ml vode i nadopuni do 10 ml. Otopina supstrata se mora pripremati svakodnevno.

### IV. 4-nitrofenol, 1 mmol/l, matični standard:

Stavi približno 400 mg 4-nitrofenola u čašu od 10 ml i ostavi na 50° C tijekom 24 h. Nakon hlađenja u desikatoru, brzo odvaži i otopi 139.1 mg 4-nitrofenola u 1 000 ml vode analitičke čistoće.

### V. 4-nitrofenol, 0.04 mmol/l, u 2-amino-2-metil-1-propanol/ metalni pufer ( Otopina II):

Pipetiraj točno 10.00 ml 4-nitrofenola, 1 mmol/l, (Otopina IV) u odmjernu tikvicu od 250 ml. Razrijedi otopinom 2-amino-2-metil-1-propanolom, 0.393 mol/l (Otopina II) i snažno promiješaj. Izmeri apsorbciju ove puferirane otopine u kivetama promjera 10 mm kod 405 nm pri 30 ± 1° C prema puferiranoj slijepoj

probi (pripremi slijepu probu razrjeđenjem 10.00 ml vode s otopinom II do 250 ml). Apsorbancija 4-nitrofenola je ovisna o temperaturi (18)). Otopine 4-nitrofenola (Otopine IV;V) trebalo bi pripremiti najmanje dvaput, a apsorbancije tih otopina izmjeriti po tri puta. Sve izmjerene vrijednosti trebale bi biti unutar 0.99 i 1.01 izračunate srednje vrijednosti.

**VI. Alkalna puferirana otopina supstrata za ukupnu reakciju:**

Pomiješaj 10 dijelova otopine II i 1 dio otopine III, za dnevnu potrebu. Apsorbancija ove otopine na 405 nm trebala bi biti manja od 0.5.

**VII. Alkalna puferirana otopina za pojedinačne slijepu uzorka:**

Pomiješaj 10 dijelova otopine II i 1 dio vode analitičke čistoće, za dnevnu potrebu.

### **8. Postojanost otopina**

Sve otopine treba čuvati kod 2-6° C u začepljenim bocama. Otopine I, II i VII su stabilne najmanje tri mjeseca. Otopine II i VII moraju biti dobro začepljene kako bi se spriječila apsorpcija ugljik dioksida koja može uzrokovati promjene u pH. Otopina 4-nitrofenilfosfata (otopina III) mora se pripremiti svježa prije uporabe, a pogodna je za mjerenje katalitičke aktivnosti najviše 8 sati na sobnoj temperaturi (20-26° C). Matični standard 4-nitrofenola (Otopina IV) stabilan je najmanje tri mjeseca ako je zaštićen od svjetla i isparavanja (8). Puferirana otopina supstrata (Otopina VI) može se rabiti do 5 dana, ako je spremljena na 2-6° C. Ovaj reagens može se čuvati zamrznut na -20° C u prikladnim alikvotima, a ako se samo jednom odmrzava, stabilan je tri mjeseca.

### **9. Uzorak (uzimanje, rukovanje i pohranjivanje)**

Venska se krv prikuplja uz minimalnu stazu. Osim svježega seruma bez tragova hemolize, može se rabiti i heparinizirana plazma. Citrat, oksalat ili etilendiamintetraoctena kiselina ne smiju se koristiti kao antikoagulansi. Serum se odvoji nakon centrifugiranja krvi u trajanju od 10 minuta pri 900 g. Uočeno je kako promjene katalitičke aktivnosti alkalne fosfataze ovise o uvjetima u kojima se ljudski serum pohranjuje. Katalitičke aktivnosti veće za 1% do 2% u nekim serumima su uočene već 4 sata nakon venepunkcije ako su uzorci stajali na sobnoj temperaturi (19). Katalitičke aktivnosti su osobito povećane nakon zagrijavanja prethodno zamrznutoga seruma ili nakon čuvanja kod 4-8° C. Intenzitet porasta

katalitičke aktivnosti alkalne fosfataze ovisan je o vremenu, temperaturi i reakcijskim uvjetima (19-22). Slični su učinci primijećeni u liofiliziranim serumima nakon rekonstitucije. Ova se pojava objašnjava disocijacijom kompleksa alkalne fosfataze i lipoproteina na nižim temperaturama (23) ili tijekom liofilizacije. Zbog navedenih razloga, svježe uzeti uzorci seruma trebali bi se držati na sobnoj temperaturi i analizirati najkasnije 4 sata nakon uzimanja krvi.

## 10. Mjerenje

### 10.1. Uvjeti mjerenja

Valna duljina: 405 nm ( $\pm 1$  nm)

Duljina svjetlosnog puta: 10.0mm  $\pm$  0.01 mm

Konačni volumen reakcijske smjese: 2.55 ml

Temperatura: 30  $\pm$  0.05°C (u termostatanom pretincu za kivete)

### 10.2. Rukovanje otopinama

Prije pipetiranja temperaturu uzorka i otopina s reagensima treba dovesti na kalibracijsku temperaturu pipeta.

Za vrijeme inkubacije otopine u kivetama moraju doseći temperaturu od 30°C prije otpočinjanja reakcije s dodatkom uzorka.

### 10.3. Postupci od kojih se sastoji jedno mjerenje

#### 10.3.1. Reakcije koje se mjere

**Tablica 2.** Tri reakcijske smjese (A,B,C) potrebne su za jedno mjerenje brzine reakcije alkalne fosfataze

Vrsta reakcije	Uzorak	Reagens
(A) Ukupna reakcija	Serum	Otopina VI
(B) Reakcija slijepe probe reagensa	Destilirana voda	Otopina VI
(C) Reakcija slijepe probe uzorka	Serum	Otopina VII

Sva mjerenja izvode se prema kiveti koja sadrži vodu analitičke čistoće

## 10.3.2. Ukupna reakcija

Tablica 3. Analitički sustav za mjerenje ukupne brzine reakcije alkalne fosfataze

Pipetiraj u kivete	Volumen (ml)	Sadržaj konačne reakcijske smjese	
Otopina VI	2.50	2-amino-2-metil-1-propanol 4-nitrofenil-fosfat HEDTA Magnezij acetat Cink acetat	0.35 mol/l 16 mmol/l 2 mmol/l 2 mmol/l 1 mmol/l
Serum	0.050	Volumni udio	0.0196 (1:51)
Pomiješaj i prati promjenu apsorbancije u trajanju od najmanje 300 s, a nakon što je poprimila temperaturu od 30°C kontinuirano prati $\Delta A/\Delta t$ za svaki uzorak.			

## 10.3.3. Slijepa proba reagensa

Isti se postupak izvodi za mjerenje reakcije slijepa probe reagensa tako da se umjesto seruma dodaje voda analitičke čistoće, kako je prikazano u Tablici 2. Promjene apsorbancije slijepa probe reagensa moraju se odrediti za svaku pripremljenu smjesu (Otopina VI), kako bi se ustanovio doseg moguće spontane, neenzimske hidrolize supstrata. Općenito, zamijećena brzina reakcije u slijepoj probi reagensa manja je od 16 nkat/l, što je u uvjetima mjerenja zanemarivo.

## 10.3.4. Slijepa proba uzorka

Brzina reakcije slijepa probe uzorka mora se odrediti za svaki uzorak tako da se otopina VII zamijeni otopinom VI i provede postupak. Reakcija može pokazati porast ( $+\Delta A/\Delta t$ ) ili smanjenje ( $-\Delta A/\Delta t$ ). U utvrđenim uvjetima mjerenja, moguće su promjene apsorbancije slijepih proba seruma od  $+0.000013$  A/s (36 nkat/l) u lipemičnim serumima do  $-0.000170$  A/s (468 nkat/l) za izrazito ikterične uzorke. Većina slijepih proba seruma daje promjenu apsorbancije manju od  $\pm 0.000012$  A/s (33 nkat/l).

#### 10.4. Trajanje mjerenja

Vrijednosti ( $\Delta A/\Delta t$ ) za ukupnu reakciju alkalne fosfataze stalne su za vrijeme od barem 300 sekundi kod seruma s katalitičkom koncentracijom enzima do 13.3 nkat/l. Ako je vrijednost ( $\Delta A/\Delta t$ ) veća od 0.0048 A/s ili se smanjuje tijekom praćenja, uzorak treba razrijediti 5 do 10 puta otopinom natrij klorida, 154 mmol/l, i ponoviti mjerenje.

Trajanje promatranja brzine reakcije u slijepim probama neka bude isto kao za ukupnu reakciju.

#### 10.5. Korekcije za reakcije slijepih probi

Ukupna brzina reakcije alkalne fosfataze (A) ispravlja se za reakcije slijepih proba reagensa (B) i seruma (C). Ispravljena vrijednost iznosi:

$$(\Delta A/\Delta t)_{\text{korigirano}} = (\Delta A/\Delta t)_A - (\Delta A/\Delta t)_B - (\Delta A/\Delta t)_C$$

Oznake A, B i C upućuju na sastav reakcijskih smjesa prikazanih u Tablici 2. Ispravljena vrijednost  $(\Delta A/\Delta t)_{\text{korigirano}}$  odgovara početnoj brzini preobrazbe koju katalizira alkalna fosfataza i ta se vrijednost koristi u daljnjem računu.

### 11. Računska obrada

Katalitička koncentracija enzima (b) računa se prema slijedećem izrazu:

$$b = \frac{V}{e \times l \times v} \times (\Delta A/\Delta t)_{\text{korigirano}}, \text{ kat/l}$$

gdje je V volumen reakcijske smjese (l), v je volumen uzorka (l), t je reakcijsko vrijeme (s), e je molarni apsorpcijski koeficijent ( $\text{m}^2\text{mol}^{-1}$ ) 4-nitrofenola, l je duljina svjetlosnoga puta kroz kivetu (mm).

U predloženoj metodi:  $V = 2.55 \times 10^{-3}\text{l}$

$v = 0.05 \times 10^{-3}\text{l}$

$l = 10 \text{ mm}$

Vrijednost molarnoga apsorpcijskoga koeficijenta za 4-nitrofenol može se odrediti u svakom laboratoriju kao  $A_{(0.04\text{mmol/l})} \times 25 \times 100$ , a izračunata vrijednost mora biti unutar raspona od 1827 do 1860  $\text{m}^2\text{mol}^{-1}$ .

Ako na taj način određeni  $\epsilon$  iznosi primjerice 1845, izračunat će se katalitička koncentracija  $b$  uvrštavanjem odgovarajućih vrijednosti u izraz za  $b$ :

$$\begin{aligned}
 b &= \frac{2.55 \times 10^{-3}}{\epsilon \times 10^2 \times 0.05 \times 10^{-3}} \times (\Delta A/\Delta t)_{\text{korigirano}}, \text{ kat/l} = \\
 &= (5.1/1845) \times (\Delta A/\Delta t)_{\text{korigirano}}, \text{ kat/l} \\
 &= 2.75 \times 10^6 (\Delta A/\Delta t), \text{ nkat/l}
 \end{aligned}$$

## 12. Analitička varijabilnost

Koeficijent varijacije unutar skupa mjerenja provjeravan je u devet zasebnih laboratorija. Za dvadeset uzastopce ponovljenih mjerenja u uzorcima katalitičke koncentracije alkalne fosfataze od 1930 nkat/l i 3880 nkat/l izračunate relativne standardne devijacije (koeficijenti varijacije) iznosili su 0.015 i 0.011. Relativna standardna devijacija iz dana u dan iznosila je 0.013, a između laboratorija 0.057 u uzorku seruma katalitičke koncentracije alkalne fosfataze od 1930 nkat/l.

U hrvatskim se laboratorijima rabe brojne metode (11 različitih metoda) za određivanje katalitičke koncentracije alkalne fosfataze. Čak su i referentne vrijednosti određene metodom koja nije IFCC metoda. Dakako da uz takvu različitost primjenjivanih metoda varijabilnost rezultata prelazi željene granice. Nema razloga da hrvatski medicinski biokemičari dosljedno ne provode preporuke Međunarodne federacije za kliničku kemiju i ovaj napis neka je poticaj za uporabu IFCC metode kod određivanja katalitičke koncentracije alkalne fosfataze.

## Literatura

1. Fishman WH, Ghosh NK. Isoenzymes of human alkaline phosphatase. *Adv Clin Chem* 1967; 10:255.
2. McComb RB, Bowers GN, Posen S. Alkaline phosphatase. Plenum Press, New York, NY, 1979.
3. Bowers Jr GN, Bergmeyer HU, Moss DW. Provisional recommendations (1974) on IFCC methods for the measurements of catalytic concentration of enzymes, Part 1. General consideration concerning the determination of the catalytic concentration of an enzyme in the blood serum or plasma of

- man. *J Clin Chem Clin Biochem* 1975; 13:471-478.
4. Tietz NW, Rinker AD, Shaw LM. IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes. Part 5. IFCC Method for Alkaline Phosphatase. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983; 21:731-748.
5. Floegel M, Juretić D. IFCC metode za mjerenje katalitičkih koncentracija enzima I dio. *Glasnik HDMB* 1992; 2-3:9-23.
6. Bessey OA, Lowry OH, Brock MJ. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J Biol Chem* 1946; 164:321-329.
7. Lazdunski M, PetitClerc C, Chappelet D, Lazdunski C. Flip-flop mechanisms in enzymology-A model: the alkaline phosphatase of *Escherichia coli*. *Europ J Biochem* 1971; 20:124-139.
8. Bale JR, Chock PB, Huang CY. The nature of negative cooperativity in alkaline phosphatase: kinetic patterns contrary to the flip-flop model. *J Biol Chem* 1980; 255:8424-8430.
9. Orhanović S, Pavela-Vrančić M, Floegel M. Active site conformations of alkaline phosphatases. *Biochem Biol Acta* 1993, u tisku.
10. McComb RB, Bowers GN Jr. Study of optimum buffer conditions for measuring alkaline phosphatase activity in human serum. *Clin Chem* 1972; 18:97-104.
11. PetitClerc C, Delisle M, Martel M, Fecteau C, Briere M. Mechanism of action of Mg and Zn on rat alkaline phosphatase. I. Studies on the soluble Zn and Mg alkaline phosphatase. *Can J Biochem* 1975; 53:1089-1100.
12. Wolf HU. Divalent metal ion buffers with low pH-sensitivity. *Experientia* 1973; 29:241-249.
13. Rej R, Bretauiere JP. Effects of metal ions on the measurement of alkaline phosphatase activity. *Clin Chem* 1979; 25:1110.
14. Bowers Jr GN, Bergmeyer HU, Horder M, Moss DW. Approved recommendations of IFCC for the measurements of catalytic concentration of enzymes, part 1. General consideration concerning the determination of the catalytic concentration of an enzyme in the blood serum or plasma of man. *J Clin Chem Clin Biochem* 1980; 18:89-95.
15. Rej R, Bretauiere JP, Jenney RW, Jackson KY. Measurement of alkaline phosphatase activity: characterisation and identification of an inactivator in 2-amino-2-methyl-1-propanol. *Clin Chem* 1981; 24:1611-1613.
16. Bowers GN Jr, McComb RB, Upreti A. 4-nitrophenyl phosphate - characterization of high-purity materials for measuring alkaline phosphatase activity in human serum. *Clin Chem* 1981; 27:135-143.
17. Bowers GN Jr, McComb RB, Christensen RG, Schaffer R. High purity 4-nitrophenol: Purification, characterization and specification for use as a spectrophotometric reference material. *Clin Chem* 1980; 26:724-729.
18. Burtis CA, Seibert LE, Baird MA, Sampson EJ. Temperature dependence of the absorbance of alkaline solutions of 4-nitrophenyl phosphate-A

- potential source of error in the measurement of alkaline phosphatase activity. *Clin Chem* 1977; 23:1541-1547.
19. Bowers GN Jr, McComb RB. Measurement of total alkaline phosphatase activity in human serum. *Clin Chem* 1975; 21:1988-1995.
  20. Bodansky A. Paradoxical increase of phosphatase activity in preserved serum. *Proc Soc Exp Biol Med* 1931-1932; 29:1292-1293.
  21. Brojer B, Moss DW. Changes in the alkaline phosphatase activity of serum samples after thawing and after reconstitution from the lyophilized state. *Clin Chim Acta* 1971; 35:511-513.
  22. Massion CG, Frankenfeld JK. Alkaline phosphatase: lability in fresh and frozen human serum and lyophilized control material. *Clin Chem* 1972; 18:366-373.
  23. Smith AF, Fogg BA. Possible mechanisms for the increase in alkaline phosphatase activity of lyophilized control material. *Clin Chem* 1972; 18:1518-1523.