

Aanbevelingen Enzymcommissie NVKC

Aanbevelingen voor het meten van de katalytische activiteitsconcentratie van de enzymen L-alanine-aminotransferase (ALAT), L-aspartaataminotransferase (ASAT), creatinekinase (CK), alkalische fosfatase (AF), γ -glutamyltransferase, (γ -GT) α -amylase en lactaatdehydrogenase (LD) in serum en/of plasma bij 37 °C

C. van der HEIDEN¹, R. OOSTEROM², F.P.A.M.N. PETERS³, J.H.M. SOUVERIJN⁴, E.M. SMIT⁵,
L.W.J.J.M. WESTERHUIS⁶, B.E.P.B. BALLIEUX⁷, S.C. ENDENBURG⁸, Y.Y. van der HOEK⁹, Y.B. de RIJKE¹⁰
en A. WOLTHUIS¹¹

Inleiding

Tot op heden gingen de aanbevelingen voor het meten van de katalytische activiteitsconcentraties van enzymen nog steeds uit van een meettemperatuur van 30 °C. Omdat in vele laboratoria de enzymactiviteiten niet bij deze temperatuur werden gemeten maar bij een temperatuur van 37 °C, werden uiteenlopende temperatuurscoëfficiënten gebuikt om enzymactiviteiten om te rekenen van een waarde gemeten bij 37 °C naar waarden die behoren bij een meettemperatuur van 30 °C. Om velerlei redenen leidde dit tot een brede range van enzymactiviteiten in Combi-enquêtes van de SKZL. Deze brede range heeft ook tot gevolg dat de referentiewaarden, die in de diverse laboratoria werden vastgesteld, onderling grote verschillen lieten zien. Het resultaat was dat het tegenovergestelde werd bereikt ten opzichte van het doel waarvoor aanbevelingen worden opgesteld. Met instrumenten voor het automatisch meten van componenten in bloed, inclusief enzymactiviteiten, wordt steeds meer uitsluitend gemeten bij een temperatuur van 37 °C. De beheersbaarheid van deze temperatuur is eenvoudiger. Dit was het signaal om aanbevelingen voor het meten van katalytische activiteitsconcentraties op te stellen, die gelden voor een temperatuur van 37 °C. Daarnaast wordt thans nagenoeg algemeen aanvaard dat aanbevelingen alleen niet leiden tot het produceren van vergelijkbare referentiewaarden. De introductie

van kalibratoren in de enzymologie wordt zeer gewenst geacht, mits deze commercieel beschikbaar zijn. Onderzoek heeft aangetoond dat dit vaak niet het geval is (1). Omdat in de voorliggende aanbevelingen voor de enzymen AF en LD het gebruik van een andere dan thans gebruikte buffer wordt aanbevolen en voor LD het meetsysteem, waarbij lactaat wordt omgezet in pyruvaat, werd voor deze enzymen enig oriënterend onderzoek gedaan, waaronder het effect van het gebruik van een kalibrator. De resultaten van dit oriënterend onderzoek zijn weergegeven in de appendix van de aanbeveling van het betreffende enzym.

In het onderstaande wordt voor elk van de zeven enzymen in een op zich zelf staand artikel de aanbeveling beschreven voor het meten van de katalytische activiteitsconcentratie. Bij ieder enzym is aangegeven aan welke publicatie de beschreven methode werd ontleend. Tevens worden voorlopige referentiewaarden vermeld, die met deze methoden verkregen zijn. De eenheden waarin deze voorlopige referentiewaarden worden uitgedrukt zijn zowel U/l als katal/l, voorzien van het juiste prefix. De katal is de SI eenheid om katalytische activiteitsconcentraties uit te drukken. Hierbij wordt de seconde als basiseenheid voor de tijd gebruikt. De μ katal/l is gemakkelijk te berekenen uit de U/l door in de U/l de tijdsbasis te wijzigen in seconden. Dit houdt in dat de U/l vermenigvuldigd moet worden met een factor 16,67, waarbij dan het prefix van de katal met een dimensie verlaagd wordt. Een U/l is gedefinieerd als één μ mol/min/l; dit is gelijk aan nmol/sec/l x 1000/60 (= 16,63). Derhalve is één U/l x 16,67 gelijk aan één nkat/l.

Ieder laboratorium dient de voorlopige referentiewaarden zelf te verifiëren.

Bij de enzymen AF en LD wordt enige additionele informatie gegeven over de kwaliteit van de buffer en over de stabiliteit van het monster, gebruikt bij de analyse. Dergelijke gegevens zijn niet algemeen voorhanden voor alle enzymen.

Analytico Medinet B.V, Breda¹; Ikazia Ziekenhuis, Rotterdam²; Ziekenhuis Bernhoven, Oss³; LUMC, Leiden⁴; IJsselmeerziekenhuizen, Lelystad⁵; Atrium Medisch Centrum, Heerlen⁶; Spaarne Ziekenhuis, Haarlem⁷; Slingeland Ziekenhuis, Doetinchem⁸; Slotervaart Ziekenhuis, Amsterdam⁹; Academisch Kinderziekenhuis Sophia, Rotterdam¹⁰; Medisch Centrum Leeuwarden, loc. Zuid, Leeuwarden¹¹.
Enzymcommissie NVKC

Correspondentieadres: Dr. C. van der Heiden, Analytico Medinet B.V., Bergschot 71, 4871 PA Breda.
Ingekomen: 08.09.00

De nieuwe aanbevelingen zullen naast het gebruik van kalibratoren moeten bijdragen tot een harmonisatie van resultaten van de enzymmetingen bij Combienquêtes (2, 3). Met deze aanbevelingen wordt weer een stap voorwaarts gezet bij het streven te komen tot onderling vergelijkbare referentiewaarden. Met behulp van kalibratoren kunnen verschillen, die niet met aanbevelingen te corrigeren zijn, gecompenseerd worden. Dit geldt in het bijzonder voor verschillen veroorzaakt door het type instrument, andere meettechnieken en onvoldoende temperatuursbeheersing.

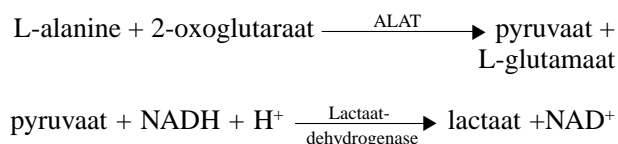
Ned Tijdschr Klin Chem 2001; 26: 162-164

Methodie voor het meten van de katalytische activiteitsconcentratie van alanine aminotransferase (L-alanine: 2-oxoglutarataminotransferase, EC 2.6.1.2) in serum bij 37 °C

Het enzym L-alanine: 2-oxoglutarataminotransferase (ALAT) wordt hoofdzakelijk aangetroffen in het cytoplasma van de hepatocyten. In veel geringere mate is het aanwezig in weefsel van skeletspier, hart, nier en pancreas en in erythrocyten. De activiteit van ALAT in bloed neemt toe bij ziekten die gepaard gaan met beschadiging van levercellen zoals bij infecties (o.a. hepatitis B) en intoxicaties (o.a. voeding, medicamenten). Een verhoogde ALAT wordt ook aangetroffen wanneer de balans tussen het intracellulaire en extracellulaire medium verstoord is. In dat geval kunnen enzymen weglekken uit de levercellen en in de bloedsomloop terecht komen. ALAT heeft een korte halfwaardetijd (63-88 uur). Hiermee dient rekening gehouden te worden wanneer studies worden verricht, waarin de ernst van de leveraandoening wordt gevolgd. Van ALAT zijn geen iso-enzymen bekend.

Principe

ALAT katalyseert de overdracht van de aminogroep van alanine naar 2-oxoglutarat. Hierbij ontstaat glutamaat en pyruvaat. Via een indicatorreactie wordt het gevormde pyruvaat gereduceerd tot lactaat met behulp van lactaat dehydrogenase (EC 1.1.1.27). Tegelijkertijd wordt het NADH geoxydeerd tot NAD⁺. De afname van de concentratie van NADH, die fotometrisch gevolgd kan worden door de absorptie te registreren bij 340 of 334 nm, is stoichiometrisch gerelateerd aan de katalytische activiteitsconcentratie van ALAT. De methode is ontleend aan die beschreven door de enzymcommissie van de Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie (1).



Literatuur

1. Ballieux BEPB, Rijke YB de, Wolthuis A, Hoek YY van der, Endenburg SC, Heiden C van der. Commercially available enzyme calibrators, an overview. Ned Tijdschr Klin Chem 2000; 25: 125-130.
2. Baadenhuijsen H, Keijzer R de, Ballieux B, Jansen R, Treskes M, Bekers O, Franck P. "Position Paper" harmonisatie enzymresultaten. Ned Tijdschr Klin Chem 1999; 24: 258-261.
3. Baadenhuijsen H, Scholten R, Willems HL, Weykamp CW, Jansen RTP. A model for harmonization of routine clinical chemistry results between clinical laboratories. Ann Clin Biochem 2000; 37: 330-337.

Alvorens de reactie te starten door toevoegen van 2-oxoglutarat dient het apo-enzym van ALAT geactiveerd te worden door het te verzadigen met pyridoxal 5'-fosfaat. Ook pyruvaat, aanwezig in het serum, wordt voorafgaand aan de start van de reactie omgezet in lactaat door lactaatdehydrogenase in aanwezigheid van NADH.

Optimale reactiecondities

De condities zijn geoptimaliseerde reactiecondities, die gedefinieerd zijn als de condities die het gunstigst zijn zowel voor de kinetische reacties als voor de technische aspecten van de meting. Dit houdt in dat deze condities niet noodzakelijkerwijze maximale activiteit garanderen. Deze condities zijn de volgende:

Tris(hydroxymethyl)-aminomethaan	100 mmol/l
pH (37 °C)	7,15
L-alanine	500 mmol/l
NADH	0,18 mmol/l
Pyridoxal 5'-fosfaat	0,10 mmol/l
Lactaatdehydrogenase	1700 U/l (28,3 µkat/l)
2-Oxoglutarat	12 mmol/l
Volume fractie	0,0833 (1 : 12)

Meetcondities

De technisch meest gunstige meetcondities, rekening houdend met oplosbaarheid, stabiliteit en preincubatie van de diverse componenten zowel als de aanpasbaarheid aan automatische uitvoeringen ervan zijn hieronder weergegeven.

Temperatuur	37 ± 0,1 °C
Golf lengte (bandbreedte)	334, 340 nm (≤ 2 nm)
Lichtweg	10 ± 0,01 mm
Preincubatietijd	300 sec.
Tijd eerste aflezing	60 sec.
Meetperiode	180 sec.

Instrumentarium en uitrusting

Een spectrofotometer, bij voorkeur een zelfregistre-
rende, met een bij 37 °C gethermostreerd cuvetten-
huis is vereist voor een nauwkeurige meting bij 334
of 340 nm. Specificaties van de uitrusting (b.v. mon-
ster- en reagensbehandeling, criteria gesteld aan de
spectrofotometer en de wijze van temperatuurcon-
trole) moeten voldoen aan de criteria zoals beschre-
ven in de aanbeveling van de IFCC (2).

Reagentia

1. Tris(hydroxymethyl)aminomethaan, C₄H₁₁NO₃, M_r 121,14
2. L-alanine, C₃H₇NO₂, M_r 89,09
3. 2-Oxoglutaraat, di-Na zout, C₅H₄O₅N₂, M_r 189,6
4. β-Nicotinamide adeninedinucleotide, gereduceerd, C₂₁H₂₇N₇O₁₄P₂N₂, M_r 709,4
5. L-lactaat: NAD⁺ oxidoreductase, EC 1.1.1.27 (lac-
taatdehydrogenase uit skeletspier van varkens in
waterige glycerol; zie reagens 8)
6. Pyridoxal 5'-fosfaat, monohydraat (pyridoxalfos-
faat), C₈H₁₀O₆NP. H₂O, M_r 265,2
7. Hydrochloride, HCl, M_r 36,47 (1 mol/l)
8. Glycerol, C₃H₈O₃, M_r 92,10; verdund 1 + 1 (v/v)
met water (gebruikt als verdunningsvloeistof voor
het lactaatdehydrogenase)
9. Natriumchloride, NaCl, M_r 58,45

Oplossingen

1. Oplossing I

Tris(hydroxymethyl)- aminomethaan	120 mmol/l
L-Alanine	600 mmol/l
NADH	0,216 mmol/l
Pyridoxal 5'-fosfaat	0,120 mmol/l
Lactaatdehydrogenase	2040 U/l (33,9 µkat/l)
pH 7,15 bij 37 °C (bijstellen met HCL)	

2. Oplossing II

2-Oxoglutaraat, di-Na zout, 144 mmol/l

3. Verdunningsvloeistof

Natriumchloride 154 mmol/l

Monstername

Bloed moet worden afgenomen door middel van een
venapunctie, waarbij de stuwing slechts minimaal
mag zijn. De bloedcellen dienen binnen 2 uur verwij-
derd te zijn van het serum. Bij voorkeur dient serum
te worden gebruikt.

Meetprocedure

Er worden twee metingen verricht: de snelheid van de
verandering van de absorptie van de reagensblanco
($\Delta A/\Delta t$)_{reagensblanco} en de snelheid van de verandering
van de absorptie van het uiteindelijke reactiemengsel
($\Delta A/\Delta t$)_{totale meting}.

Wanneer de snelheid van de verandering van de ab-
sorptie van de reagensblanco, gemeten bij 340 nm, de
waarde 0,002 overschrijdt dan moet reagens oplos-
sing I opnieuw gemaakt worden.

Het verschil tussen de omzettingssnelheid gemeten in
het monster en in de reagensblanco is representatief
voor de omzettingssnelheid veroorzaakt door ALAT.

$$(\Delta A/\Delta t)_{\text{totale mengsel}} - (\Delta A/\Delta t)_{\text{reagensblanco}} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{enzym}}$$

Pipetteer in de cuvet	µl	Concentraties in het uiteindelijke reactiemengsel
Oplossing I	500	Tris(hydroxymethyl)- aminomethaan 100mmol/l L-alanine 500 mmol/l NADH 0,18 mmol/l Pyridoxal 5'-fosfaat 0,10 mmol/l Lactaatdehydrogenase 1700 U/l

Monster 50 Volumefractie 0,0833 (1 : 12)

Meng goed en pre-incubeer tenminste 5 minuten. Na deze pre-
incubatie moet de meettemperatuur 37 ± 0,1 °C hebben bereikt.

Oplossing II 50 2-Oxoglutaraat 12 mmol/l

Meng goed. Na 60 seconden de afname van de absorptie regi-
streren over een periode van 180 seconden.

Meetcriteria

Wanneer de afname van de reactiesnelheid bij 340
nm een absorptiedaling van 0,15 min⁻¹ corresponde-
rend met 286 U/l (4,8 µkat/l) overschrijdt, dan moet
het monster in een bepaalde verhouding verdund wor-
den met verdunningsvloeistof. Het in het verdunde
monster verkregen resultaat zal dan met de verdun-
ningsfactor vermenigvuldigd moeten worden. Bij ver-
dunning van het monster wordt ook de reagensblanco
onder gelijke condities gemeten, waarbij verdunnings-
vloeistof gebruikt dient te worden in plaats van se-
rum.

Berekening

Onder de gegeven reactiecondities is:

- de molaire absorptiecoëfficiënt, ε, van NADH
bij 340 nm, 37 °C 630 m²/mol
334 nm, 37 °C 618 m²/mol
- de lichtweg, (l) 0,01 m
- het totale reactievolume (V_t) 0,60 x 10⁻³ l
- het monstervolume (v_m) 0,05 x 10⁻³ l
- de toename van de absorptie ($\Delta A/\Delta t$)_{enzym}
(Δt in min of sec)

Uit de volgende vergelijking kan de katalytische acti-
viteitsconcentratie (K_{ac}) worden berekend.

$$K_{ac} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{enzym}} * \frac{V_t}{\epsilon * l * V_m}$$

$$K_{ac} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{enzym}} * 1942 \text{ U/l (334 nm)}$$

$$K_{ac} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{enzym}} * 1905 \text{ U/l (340 nm)}$$

$$K_{ac} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{enzym}} * 32,36 \text{ µkat/l (334 nm)}$$

$$K_{ac} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{enzym}} * 31,75 \text{ µkat/l (340 nm)}$$

De kat/l is gedefinieerd als de katalytische activiteitsconcentratie waarbij de snelheid van de vorming van het product gelijk is aan 1 mol. l⁻¹. sec⁻¹. Hierbij komt 1 U/l (1 μmol. l⁻¹. min⁻¹) overeen met 16,67 nkat. l⁻¹ (1 nmol. l⁻¹. sec⁻¹).

Voorlopige referentiewaarden

Voor volwassenen in leeftijd variërend van 20 - 60 jaar werden voorlopige referentiewaarden vastgesteld. Ieder laboratorium dient deze voorlopige referentiewaarden zelf te verifiëren.

Mannen: 10 - 50 U/l 170 - 830 nkat/l
Vrouwen: 10 - 35 U/l 170 - 580 nkat/l

Ned Tijdschr Klin Chem 2001; 26: 164-166

Methoden voor het meten van de katalytische activiteitsconcentratie van aspartaat aminotransferase (L-aspartaat: 2-oxoglutarataminotransferase, EC 2.6.1.1) in serum bij 37 °C

Het enzym L-aspartaat: 2-oxoglutarataminotransferase (ASAT) wordt voor een deel aangetroffen in het cytoplasma van de levercellen, voor een ander deel in de mitochondriën. Het is een belangrijke indicator voor de ernst van leveraandoeningen. Wanneer bij een infectie of een intoxicatie de activiteit van ASAT die van ALAT overstijgt, zijn ook de mitochondriën betrokken bij de celdestructie. Dit kan worden aangetroffen bij ziekten die gepaard gaan met beschadiging van levercellen zoals bij infecties (o.a. hepatitis B) en intoxicaties (o.a. voeding, medicamenten). Behalve in de lever komt ASAT in belangrijke mate voor in de hart- en skeletspieren. In aflopende mate in hersenen, nieren, pancreas, longen en erythrocyten. Een verhoogde ASAT wordt ook aangetroffen wanneer de balans tussen het intracellulaire en extracellulaire medium verstoord is en in dat geval kunnen enzymen weglekken uit de cellen en in de bloedcirculatie terecht komen. ASAT heeft een korte halfwaardetijd (46 - 58 uur). Hiermee dient rekening gehouden te worden wanneer studies worden verricht waarin de ernst van de hart- of leveraandoening wordt gevolgd.

ASAT afkomstig uit het cytoplasma en de mitochondriën zijn met immunochemische technieken van elkaar te onderscheiden. De reactiecondities voor het meten van de katalytische activiteitsconcentratie van ASAT afkomstig uit beide celcompartimenten zijn niet verschillend. Diagnostisch zijn deze "iso-enzymen" van weinig betekenis gebleken.

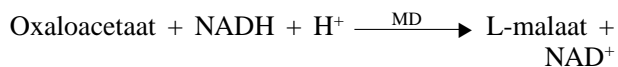
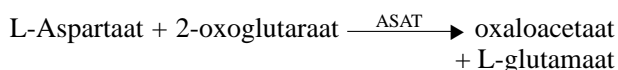
Principe

ASAT katalyseert de overdracht van de aminogroep van aspartaat naar 2-oxoglutaraat met als resultaat de vorming van glutamaat en oxaloacetaat. Met behulp

Literatuur

1. Gerhardt W, Henkel E, Klauke K, Liese W, Lorentz K, Schmidt E, Sonntag O, Stein W, Weidemann G. Recommendation: Standard ECCLS procedures for enzyme assays at 37 °C. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1993; 31: 901 - 909.
2. Bowers jr GN, Bergmeyer HU, Hørdler M, Moss DW. Approved recommendations of IFCC methods for the measurements of catalytic concentrations of enzymes, Part 1. General considerations 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.

van een hulpreactie wordt daarna oxaloacetaat via malaatdehydrogenase (MD, EC 1.1.1.37) gereduceerd tot L-malaat. Deze reductie is gekoppeld aan een oxidatie van NADH tot NAD⁺. De snelheid van de afname van de NADH-concentratie, gemeten bij 340 nm of 334 nm, is stoichiometrisch gerelateerd aan de katalytische activiteitsconcentratie van ASAT. Deze methode is ontleend aan die beschreven door de enzymcommissie van de Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie (1).



Alvorens de reactie te starten door toevoeging van 2-oxoglutaraat dient het apo-enzym van ASAT verzadigd te worden met pyridoxal 5'-fosfaat. Om het meten van een vals verhoogde ASAT activiteit te voorkomen dient pyruvaat, aanwezig in serum, omgezet te worden in lactaat door lactaatdehydrogenase (EC 1.1.1.27) in de aanwezigheid van NADH, alvorens de reactie te starten door het toevoegen van 2-oxoglutaraat.

Optimale reactiecondities

De condities zijn geoptimaliseerde reactiecondities, die gedefiniëerd zijn als de condities die het gunstigst zijn zowel voor de kinetische reacties als voor de technische aspecten van de meting. Dit houdt in dat deze condities niet noodzakelijkerwijze maximale activiteit garanderen. Deze condities zijn de volgende:

Tris(hydroxymethyl)-aminomethaan	80 mmol/l
pH (37 °C)	7,65
L-Asparaat	240 mmol/l
NADH	0,18 mmol/l
Pyridoxal 5'-fosfaat	0,10 mmol/l
Malaatdehydrogenase	600 U/l (10 µkat/l)
Lactaatdehydrogenase	900 U/l (15 µkat/l)
2-Oxoglutaraat	12 mmol/l
Volumefractie monster	0,0833 (1 : 12)

Meetcondities

De technisch meest gunstige meetcondities, rekening houdend met oplosbaarheid, stabiliteit en preïncubatie van de diverse componenten zowel als de aanpasbaarheid aan automatische uitvoeringen ervan zijn in onderstaande tabel weergegeven.

Temperatuur	37 ± 0,1 °C
Golflengte (bandbreedte)	334, 340 nm (≤ 2 nm)
Lichtweg	10 ± 0,01 mm
Preïncubatietijd	300 seconden
Tijd eerste aflezing	60 seconden
Meetperiode	180 seconden

Instrumentarium en uitrusting

Een spectrofotometer, bij voorkeur een zelfregistre- rende, voorzien van een bij 37 °C gethermostreerd cuvettenhuis is vereist voor een nauwkeurige meting bij 340 nm. Specificaties voor de uitrusting (b.v. monster- en reagensbehandeling, criteria gesteld aan de spectrofotometer en de wijze van temperatuur- controle) moeten voldoen aan de criteria zoals be- schreven in de aanbevelingen van de IFCC (2).

Reagentia

1. Tris(hydroxymethyl)aminomethaan, C₄H₁₁NO₃, M_r 121,14
2. L-Asparaginezuur, vrije zuur, C₄H₇NO₄, M_r 133,1
3. 2-Oxoglutaarzuur, di-Na zout, C₅H₄O₅Na, M_r 189,6
4. β-Nicotinamide adeninedinucleotide, di-Na zout, C₂₁H₂₇N₇O₁₄P₂Na₂, M_r 709,4
5. L-malaat: NAD⁺ oxidoreductase, EC 1.1.1.37 (malaatdehydrogenase uit varkenshart, in glyce- rol, zie reagens 9)
6. L-lactaat: NAD⁺ oxidoreductase, EC 1.1.1.27 (lactaatdehydrogenase uit varkensskeletspier in waterige glycerol; zie reagens 9)
7. Pyridoxal 5'-fosfaat, monohydraat (pyridoxalfos- faat), C₈H₁₀O₆NP.H₂O, M_r 265,2
8. Hydrochloride, HCl, M_r 36,47 (1 mol/l)
9. Glycerol, C₃H₈O₃, M_r 92,10; verdund 1 + 1 (op volumebasis) met water (als voorverdunding van lactaatdehydrogenase en malaatdehydrogenase)
10. Natriumchloride, NaCl, M_r 58,45
11. Natriumhydroxide, NaOH, M_r 40,00 (waterige oplossing bevattende 5 mol/l).

Oplossingen

1. Oplossing I

Tris(hydroxymethyl)-aminomethaan	96 mmol/l
L-Asparaat	288 mmol/l
NADH	0,216 mmol/l
Pyridoxal 5'-fosfaat	0,120 mmol/l
Malaatdehydrogenase	720 U/l (12 µkat/l)
Lactaatdehydrogenase	1080 U/l (18 µkat/l)
pH	7,65 bij 37 °C (bijstellen met HCl)

2. Oplossing II

2-Oxoglutaraat, di-Na zout	144 mmol/l
----------------------------	------------

3. Verdunningsoplossing

Natriumchloride (NaCl)	154 mmol/l
------------------------	------------

Monstername

Bloed moet worden afgenomen door middel van een venapunctie, waarbij de stuwings slechts minimaal mag zijn. De bloedcellen dienen binnen 2 uur verwij- derd te zijn van het serum of het plasma. Bij voorkeur dient serum te worden gebruikt.

Meetprocedure

Er worden twee metingen verricht: de snelheid van de verandering van de absorptie van de reagensblanco ($\Delta A/\Delta t$)_{reagensblanco} en de snelheid van de verandering van de absorptie van het uiteindelijke reactiemengsel ($\Delta A/\Delta t$)_{totale mengsel}. Wanneer de snelheid van de ver- andering van de absorptie van de reagensblanco, ge- meten bij 340 nm, de waarde 0,002 overschrijdt moet reagens oplossing I opnieuw gemaakt worden.

Het verschil tussen de omzettingssnelheid gemeten in het monster en in de reagensblanco is representatief voor de omzettingssnelheid veroorzaakt door ASAT.

$$(\Delta A/\Delta t)_{\text{totale mengsel}} - (\Delta A/\Delta t)_{\text{reagensblanco}} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{enzym}}$$

Pipetteer in de cuvet	µl	Concentraties in het uiteindelijke reactiemengsel
Oplossing I	500	Tris(hydroxymethyl)-aminomethaan 80 mmol/l L-Asparaat 240 mmol/l NADH 0,18 mmol/l Pyridoxal 5'-fosfaat 0,10 mmol/l Malaatdehydrogenase 600 U/l Lactaatdehydrogenase 900 U/l
Monster	50	Volumefractie 0,0833 (1 : 12)
Oplossing II	50	2-Oxoglutaraat 12 mmol/l

Meng goed en pre-incubeer tenminste 5 minuten. Na deze pre- incubatie moet de meettemperatuur 37 ± 0,1 °C hebben bereikt.

Meng goed. Na 60 seconden de afname van de absorptie regi- streren over een periode van 180 seconden.

Meetcriteria

Wanneer de reactiesnelheid bij 340 nm een absorptiedaling van $0,15 \text{ min}^{-1}$ corresponderend met 286 U/l ($4,8 \text{ } \mu\text{kat/l}$) overschrijdt, moet het monster exact verdund worden met verdunningsvloeistof. Het in het verdunde monster verkregen resultaat zal dan met de verdunningsfactor vermenigvuldigd moeten worden. Ook de reagensblanco zal gemeten moeten worden onder vergelijkbare condities, waarbij verdunningsvloeistof gebruikt dient te worden in plaats van serum.

Berekening

Onder de gegeven reactiecondities is:

- de molaire absorptiecoëfficiënt, ϵ , van NADH
 - bij 334 nm, 37°C $630 \text{ m}^2/\text{mol}$
 - bij 340 nm, 37°C $618 \text{ m}^2/\text{mol}$
- de lichtweg (l), $0,01 \text{ m}$.
- het totale reactievolume (V_t) $0,60 \times 10^{-3} \text{ l}$
- het monstervolume (v_m) $0,05 \times 10^{-3} \text{ l}$
- de toename van de absorptie $\Delta A/\Delta t_{\text{enzym}}$
(Δt in min. of sec)

Uit de volgende vergelijking kan de katalytische activiteitsconcentratie (K_{ac}) worden berekend.

$$K_{ac} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{enzym}} * \frac{V_t}{\epsilon * l * v_m}$$

$$K_{ac} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{enzym}} * 1905 \text{ U/l (340 nm)}$$

$$K_{ac} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{enzym}} * 1942 \text{ U/l (334 nm)}$$

Ned Tijdschr Klin Chem 2001; 26: 166-169

Methodie voor het meten van de katalytische activiteitsconcentratie van creatinekinase (ATP: creatine N-fosfotransferase, EC 2.7.3.2) in serum bij 37°C

Creatinekinase is een dimeer. Het is opgebouwd uit twee verschillende subunits M(uscle) en B(brain), hetgeen resulteert in de vorming van 3 iso-enzymen MM, MB, en BB. Naast deze drie iso-enzymen komt ook het mitochondriële CK voor, dat in het iso-enzym-spectrum te zien is als een aparte band. Er zijn ook een tweetal macro-CK's beschreven, combinaties van immunoglobulines en een CK-iso-enzym. Bekend zijn het macro-CK₁ (IgM-CK-BB) en het macro-CK₃ (IgG-CK-MM). In het spierweefsel wordt hoofdzakelijk CK-MM aangetroffen, geringe hoeveelheden zijn aanwezig in nier, milt en schildklier. CK-BB is bijna uitsluitend aanwezig in de hersenen, maar ook in het pancreas, maagdarmlkanaal, de uterus en de prostaat. CK-MB komt voor in het myocard. De iso-enzymen verschillen voornamelijk door (a) aminozuursamenstelling: CK-MM bevat veel basische aminozuren (histidine en lysine) terwijl CK-BB veel cysteine, tyrosine, leucine, alanine en proline bevat, (b) hitte-

$$K_{ac} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{enzym}} * 31,75 \text{ } \mu\text{kat/l (340 nm)}$$

$$K_{ac} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{enzym}} * 32,36 \text{ } \mu\text{kat/l (334 nm)}$$

De kat/l is gedefinieerd als de katalytische activiteitsconcentratie waarbij de snelheid van de vorming van het product gelijk is aan $1 \text{ mol. l}^{-1} \text{ sec}^{-1}$. Hierbij komt 1 U/l ($1 \mu\text{mol. l}^{-1} \text{ min}^{-1}$) overeen met $16,67 \text{ nkat. l}^{-1}$ ($1 \text{ nmol. l}^{-1} \text{ sec}^{-1}$).

Voorlopige referentiewaarden

Voor volwassenen in leeftijd variërend van 20 - 60 jaar werden voorlopige referentiewaarden vastgesteld. Ieder laboratorium dient deze voorlopige referentiewaarden zelf te verifiëren.

Mannen: 10 - 50 U/l 170 - 830 nkat/l
Vrouwen: 10 - 35 U/l 170 - 580 nkat/l

Literatuur

1. Gerhardt W, Henkel E, Klauke K, Liese W, Lorentz K, Schmidt E, Sonntag O, Stein W, Weidemann G. Recommendation: Standard ECCLS procedures for enzyme assays at 37°C . Eur J Clin Chem Clin Biochem 1993; 31: 901 - 909.
2. Bowers jr GN, Bergmeyer HU, Hørder M, Moss DW. Approved recommendations of IFCC methods for the measurements of catalytic concentrations of enzymes, Part 1. General considerations 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.

stabiliteit: CK-MM is meer hittestabiel dan CK-BB, (c) pH-stabiliteit: CK-BB denatureert sneller bij een zure pH, (d) halveringstijden in vivo: de halveringstijd van CK-MM bedraagt 15 uur, van CK-BB 13 uur en van CK-MB 3 uur en (e) elektroforetische mobiliteit: CK-BB loopt tesamen met albumine, CK-MB met α_2 -globuline en CK-MM met γ -globuline. De activiteit in serum is afhankelijk van leeftijd en geslacht. CK speelt een belangrijke rol bij het vaststellen van de diagnose myocardinfarct, Duchenne-myopathiën, (dermato)myositis, fibrilleringen, maligne hypothermiën (rhabdomyolyse), chronische nierinsufficiëntie, beschadiging van de bloed/hersenbarriere en bij neoplasmen.

De iso-enzymen van CK kunnen op meerdere manieren gemeten worden:

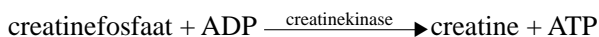
1. Na scheiding met behulp van elektroforese worden de hierna beschreven reacties toegepast. De fluorescentie van NADPH wordt gemeten bij een

excitatiegolflengte van 365 nm en een emissie-golflengte van 460 nm. Ook kan het gevormde NADPH geoxideerd worden met nitroblauw-tetrazolium onder vorming van het blauwpaars gekleurde formazan. De kleur van het formazan wordt densitometrisch gemeten bij 546 nm. In beide gevallen wordt uit de oppervlakten onder de pieken het percentage van ieder iso-enzym berekend.

2. Kwantitatief kan CK-MB gemeten worden met behulp van een immunochemische inhibitiemethode of met een immunochemische sandwichmethode. Immunoinhibitie is gebaseerd op het feit dat de CK-activiteit wordt gemeten vóór en na het toevoegen van een antilichaam gericht tegen CK-MM. Aangezien er geen of nauwelijks CK-BB in bloed aanwezig is wordt aangenomen dat het verschil in activiteit gelijk is aan het CK-MB. Ook kan van CK-MB de massa gemeten worden met de z.g. "sandwich". Het B-eiwitgedeelte wordt gebonden aan een antilichaam. Aan dit complex wordt een conjugaat toegevoegd dat bestaat uit een antilichaam gericht tegen het M-eiwitdeel van het CK-MB, en een hieraan gekoppelde detector. De hoeveelheid gebonden detector wordt gemeten en is een maat voor de hoeveelheid CK-MB, uitgedrukt in µg/l.

Principe

Creatinekinase katalyseert de overdracht van de fosfaatgroep van creatinefosfaat naar adenosine 5'-difosfaat (ADP) in de aanwezigheid van Mg²⁺-ionen. Deze overdracht resulteert in de vorming van creatine en adenosine 5'-trifosfaat (ATP). Deze methode is ontleend aan die beschreven door de enzymcommissie van de Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie (1).



De vorming van ATP wordt gemeten met behulp van het hulpenzym hexokinase (EC 2.7.1.1) en het indicatorenzym glucose-6-fosfaatdehydrogenase (EC 1.1.1.49).



Het ATP gevormd tijdens de eerste reactie wordt in aanwezigheid van glucose met behulp van hexokinase weer omgezet in ADP onder vorming van glucose-6-fosfaat. Dit glucose-6-fosfaat wordt in aanwezigheid van NADP⁺ geoxideerd in 6-fosfogluconaat, waarbij het NADP⁺ wordt gereduceerd tot NADPH. De vorming van NADPH wordt tijdens de reactie kinetisch gemeten bij 334 of 340 nm. De snelheid waarmee de absorptie bij 340 nm verandert is representatief voor de CK-activiteit.

Na bloedafname wordt CK gedeeltelijk geïnactiveerd door oxidatie, waarbij disulfidebruggen worden gevormd. Alvorens de CK-reactie te starten, moeten de

disulfidebruggen weer gereduceerd worden tot het volledig actieve CK, met behulp van de SH-component N-acetylcysteïne. EDTA wordt toegevoegd om de inhibitie door Ca²⁺ en Fe³⁺ te voorkomen en het reactiemedium te stabiliseren. Door adenylaatkinase (EC 2.7.4.3) in het monster kan ADP omgezet worden in ATP, hetgeen zou leiden tot te hoge CK-waarden. Daarom wordt de activiteit van dit enzym afgeremd door toevoeging van P¹,P⁵-di(adenosine-5') pentafosfaat (P¹, P⁵ - dAP) en adenosine 5'-monofosfaat (AMP) aan het reactiemengsel.

Optimale reactiecondities

De condities zijn geoptimaliseerde reactiecondities, gedefinieerd als de condities die het gunstigst zijn zowel voor de kinetische reacties als voor de technische aspecten van de meting. Dit houdt in dat deze condities niet noodzakelijkerwijze maximale activiteit garanderen. Deze condities zijn de volgende:

Imidazol	100 mmol/l
pH (37 °C)	6,50
EDTA	2,0 mmol/l
N-Acetylcysteïne	20 mmol/l
NADP ⁺	2 mmol/l
Mg-acetaat	10 mmol/l
ADP	2,0 mmol/l
AMP	5,0 mmol/l
P ¹ ,P ⁵ -di(adenosine-5') pentafosfaat	10 µmol/l
D-glucose	20 mmol/l
Hexokinase	4000 U/l (65 µkat/l)
Glucose-6-fosfaatdehydrogenase	2800 U/l (46 µkat/l)
Creatinefosfaat	30 mmol/l
Volume fractie monster	0,0435 (1:23)

Meetcondities

De technisch meest gunstige meetcondities, rekening houdend met oplosbaarheid, stabiliteit en preincubatie van de diverse componenten zowel als de aanpasbaarheid aan automatische uitvoeringen ervan zijn hieronder weergegeven.

Temperatuur	37 ± 0,1 °C
Golflengte (bandbreedte)	334, 340 nm (≤ 2nm)
Lichtweg	10 ± 0,01 mm
Preincubatietijd*	180 seconden
Tijd van eerste meting	60 seconden
Meettijd	180 seconden

Instrumentarium en uitrusting

Een spectrofotometer, bij voorkeur een zelfregistre-rende, voorzien van een bij 37 °C gethermostreerd cuvettenhuis is vereist voor een nauwkeurige meting bij 340 nm. Specificaties voor de uitrusting (b.v. monster- en reagensbehandeling, criteria gesteld aan de spectrofotometer en de wijze van temperatuurcontrole) moeten voldoen aan de criteria zoals beschreven in de aanbevelingen van de IFCC (2).

* Voldoende voor serum dat gedurende maximaal 3 dagen opgeslagen is geweest.

Reagentia

1. Imidazol $C_3H_4N_2$, M_r 68,1
2. Creatinefosfaat $4H_2O$, di-Na zout, $C_4H_8N_3O_5$ $PNa_2 \cdot 4H_2O$, M_r 327,2
3. Magnesiumacetaat $4H_2O$, $C_2H_3O_2Mg \cdot 4H_2O$, M_r 214,5
4. D-glucose, $C_6H_{12}O_6$, M_r 180,2
5. Ethyleendiaminetetra-acetaat $2H_2O$, di-Na zout, $C_{10}H_{14}O_8N_2Na_2 \cdot 2H_2O$, M_r 372,2
6. Adenosine 5'-monofosfaat. $6H_2O$, di-Na zout (AMP), $C_{10}H_{12}N_5O_7PNa_2 \cdot 6H_2O$, M_r 499,2
7. Adenosine 5'-difosfaat. $2H_2O$, mono-K zout (ADP), $C_{10}H_{13}N_5O_{10}P_2K \cdot 2H_2O$, M_r 503,1
8. N-Acetyl-L-cysteïne, $C_5H_9NO_3S$, M_r 163,2
9. P^1, P^5 - di(adenosine 5')pentafosfaat, tri-Li zout, (P^1, P^5 -diAP) $C_{20}H_{26}N_{10}O_{22}P_5Li_3$, M_r 934,2
10. β -Nicotinamide adeninedinucleotidofosfaat di-Na zout (NADP), $C_{21}H_{26}N_7O_{17}P_3Na_2$, M_r 787,4.
11. ATP: D-hexose-6-fosfotransferase (hexokinase), EC 2.7.1.1, uit gist (gelyofiliseerd of in glycerol)
12. D-glucose-6-fosfaat: $NADP^+$ 1-oxidoreductase (glucose-6-fosfaatdehydrogenase), EC 1.1.1.49, uit gist (gelyofiliseerd of in glycerol)
13. Azijnzuur, $C_2H_4O_2$, M_r 60,1 (1 mol/l)
14. Natriumchloride, NaCl, M_r 58,45
15. Glycerol, $C_3H_8O_3$, M_r 93,10
16. Glycerol/water 1/1, v/v voor de reconstitutie van gelyofiliseerde enzymen.

Oplossingen

1. Oplossing I

Imidazol	115 mmol/l
EDTA	2,30 mmol/l
N-Acetylcysteïne	23,0 mmol/l
Mg-acetaat	11,5 mmol/l
ADP	2,30 mmol/l
AMP	5,75 mmol/l
P^1, P^5 - di-AP	11,5 μ mol/l
D-glucose	23,0 mmol/l
$NADP^+$	2,3 mmol/l
Hexokinase	4600 U/l (76,5 μ kat/l)
G-6-PD	3220 U/l (53,5 μ kat/l)

Bij 37 °C met azijnzuur brengen op pH 6,5.

2. Oplossing II

Creatinefosfaat 345 mmol/l

3. Verdunningsvloeistof

Natriumchloride 154 mmol/l

Monstername

Bloed moet worden afgenomen door middel van een venapunctie, waarbij de stuwing slechts minimaal mag zijn. De bloedcellen dienen binnen 2 uur verwijderd te zijn van het serum. Bij voorkeur dient serum te worden gebruikt.

Meetprocedure

Er worden twee metingen verricht: de snelheid van de absorptieverandering van de reagensblanco $(\Delta A/\Delta t)_{\text{reagensblanco}}$ en de snelheid van de absorptieverandering van het totale reactiemengsel

$(\Delta A/\Delta t)_{\text{totale mengsel}}$. Het verschil tussen de omzettingssnelheid gemeten in het monster en in de reagensblanco is representatief voor de omzettingssnelheid, veroorzaakt door creatinekinase.

$$(\Delta A/\Delta t)_{\text{totale mengsel}} - (\Delta A/\Delta t)_{\text{blanco}} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{enzym}}$$

Pipetteer in de μ l cuvet	Concentraties in het uiteindelijke reactiemengsel
Oplossing I 1000	Imidazol 100 mmol/l EDTA 2,0 mmol/l N-Acetylcysteïne 20 mmol/l Mg-acetaat 10,0 mmol/l ADP 2,0 mmol/l AMP 5,0 mmol/l P^1, P^5 - di-AP 10,0 μ mol/l D-glucose 20 mmol/l NADPH 2,0 mmol/l Hexokinase 4000 U/l (65 μ kat/l) G-6-PD 2800 U/l (46 μ kat/l)

Monster 50 volumefractie 0,0435 (1:23)

Meng krachtig en incubeer gedurende tenminste 3 minuten; aan het einde van de preincubatie moet de temperatuur 37 °C zijn.

Oplossing II 100 Creatinefosfaat 30 mmol/l

Meng krachtig. Meet na 60 seconden de toename van de extinctie over een periode van 180 seconden.

Meetcriteria

Wanneer de reactiesnelheid een absorptiestijging van $0,60 \text{ min}^{-1}$ corresponderend met 2233 U/l (36,5 μ kat/l) laat zien, moet het monster exact verdund worden met verdunningsvloeistof en dient de dan gemeten reactiesnelheid vermenigvuldigd te worden met de verdunningsfactor. In dit geval dient ook de reagensblanco op dezelfde wijze behandeld te worden, d.w.z. verdunnen en in de verdunde oplossing meten.

Berekening

Onder de gegeven reactiecondities is:

- de molaire absorptiecoëfficiënt, ϵ , van NADH
 - bij 340 nm, 37 °C 630 m^2/mol
 - bij 334 nm, 37 °C 618 m^2/mol
- de lichtweg (l), 0,01 m.
- het totale reactievolume (V_t) $1,150 \times 10^{-3} \text{ l}$
- het monstervolume (V_m) $0,05 \times 10^{-3} \text{ l}$
- de toename van de absorptie $(\Delta A/\Delta t)_{\text{gecorrigeerd}}$ (Δt in min of sec)

Uit de volgende vergelijking kan de katalytische activiteitsconcentratie (K_{ac}) worden berekend.

$$K_{ac} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{enzym}} * \frac{V_t}{\epsilon * l * V_m}$$

$$K_{ac} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{enzym}} * 3722 \text{ U/l (334 nm)}$$

$$K_{ac} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{enzym}} * 3651 \text{ U/l (340 nm)}$$

$$K_{ac} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{enzym}} * 60,85 \mu\text{kat/l (340 nm)}$$

$$K_{ac} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{enzym}} * 62,03 \mu\text{kat/l (334 nm)}$$

De kat/l is gedefinieerd als de katalytische activiteitsconcentratie waarbij de snelheid van de vorming van het product gelijk is aan 1 mol. l⁻¹. sec⁻¹. Hierbij komt 1 U/l (1mmol. l⁻¹. min⁻¹) overeen met 16,67 nkat. l⁻¹ (1mmol. l⁻¹. sec⁻¹).

Referentiewaarden

In onderstaande tabel zijn referentiewaarden gegeven, gedifferentieerd naar geslacht en leeftijd. Ieder laboratorium dient deze referentiewaarden zelf te verifiëren.

Mannen (20 – 60 jaar):	< 270 U/l	< 4,5 µkat/l
Jongens (12 – 14 jaar):	< 370 U/l	< 6,2 µkat/l
Vrouwen (20 – 60 jaar):	< 150 U/l	< 2,5 µkat/l
Meisjes (12 - 14 jaar):	< 250 U/l	< 4,2 µkat/l

Ned Tijdschr Klin Chem 2001; 26: 169-172

Methodie voor het meten van de katalytische activiteitsconcentratie van alkalische fosfatase (orthofosforzure-monoester fosfohydrolase, alkalisch optimum, EC 3.1.3.1) in serum en heparineplasma bij 37 °C

Alkalische fosfatase (AF) katalyseert zowel de hydrolyse van orthofosfaat mono-esters als de overdracht van anorganisch fosfaat. De mate van transfosforylering varieert met de iso-enzymdistributie en hangt af van het type acceptor. Er zijn thans tenminste vier humane iso-enzymen bekend: niet-weefsel-specifieke (lever-, bot-, niertype, tezamen met de verschillende posttranslationale modificaties), darm-, placenta- en placenta-achtige (kiemcel-) alkalische fosfatase naast de foetale vormen, die voorkomen bij kwaadaardige ziekten. Dit is de reden dat de gemeten katalytische concentratie bij een onbekende iso-enzymdistributie sterk afhankelijk is van het type buffer dat gebruikt wordt en minder van het substraat. In bijna alle thans gebruikte methoden wordt 4-nitrofenylfosfaat gebruikt als het meest geschikte substraat voor het continu monitoren van de reactie.

In vergelijking met de HCO₃⁻-buffer, of met de 2-amino-2-methyl-propanolbuffer, aanbevolen in de door de IFCC voorgestelde referentiemethode (1) en ook aanbevolen door de American Association for Clinical Chemistry (AACC) (2) en de Société Française de Biologie Clinique (3), verhoogt diethanolamine, de buffer geselecteerd door de Scandinavische (4) en Duitse Verenigingen (5), duidelijk de bot- en leverfosfatase t.o.v. de darm- en placenta-isotypen (1). Beide aminoalcoholen bevatten vaak onzuiverheden zoals 5-amino-3-azo-2,2,5-trimethylhexanol (6) in 2-amino-2-methyl-1-propanol en monoethanolamine (7) in diëthanolamine, die AF remmen. Daarom werd N-methylglucamine, een zuivere component met matige fosfaatacceptoreigenschappen, door Chromy

Zwangere vrouwen

(laatste trimester): < 265 U/l < 4,4 µkat/l

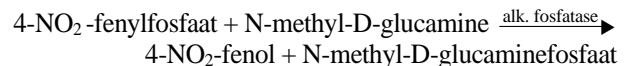
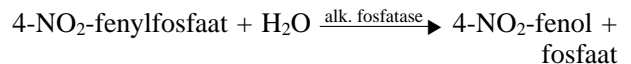
Literatuur

1. Gerhardt W, Henkel E, Klauke K, Liese W, Lorentz K, Schmidt E, Sonntag O, Stein W, Weidemann G. Recommendation: Standard ECCLS procedures for enzyme assays at 37 °C. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1993; 31: 901 - 909.
2. Bowers jr GN, Bergmeyer HU, Hørdler M, Moss DW. Approved recommendations of IFCC methods for the measurements of catalytic concentrations of enzymes, Part 1. General considerations 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.

at al. (8) aanbevolen als buffer voor het meten van AF. Dit is geëffectueerd door de Italian Society for Clinical Chemistry (9). Ook de Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie heeft N-methylglucamine als buffer geëvalueerd en aanbevolen in hun recent gepubliceerde aanbevelingen (10) voor het meten van AF bij 37 °C.

Principe

Onder de beschreven condities voor het meten van AF vormt N-methyl-D-glucamine een fosfaatester en het kleurloze 4-nitrofenylfosfaat wordt omgezet in het intens geel gekleurde 4-nitrofenol volgens onderstaande reacties.



De reactie wordt continu gevolgd door het meten van de toename van de extinctie van het gele product 4-nitrofenol bij 405 nm.

Optimale reactiecondities

De condities zijn geoptimaliseerde reactiecondities, die gedefinieerd zijn als de condities die het gunstigst zijn zowel voor de kinetische reacties als voor de technische aspecten van de meting. Dit houdt in dat deze condities niet noodzakelijkerwijze maximale activiteit garanderen. Deze condities zijn de volgende:

N-methyl-D-glucamine	500	mmol/l
pH (37 °C)	10,1	
4-nitrofenylfosfaat	20	mmol/l
Magnesiumacetaat	0,5	mmol/l
Natriumchloride (NaCl)	110	mmol/l
Volume fractie monster	0,0179	(1:56)

Meetcondities

De technisch meest gunstige meetcondities, rekening houdend met oplosbaarheid, stabiliteit en preïncubatie van de diverse componenten zowel als de aanpasbaarheid aan automatische uitvoeringen ervan zijn hieronder weergegeven.

Temperatuur	37 ± 0,1 °C
Golflengte (bandbreedte)	405 nm (≤ 2nm)
Lichtweg	10,0 ± 0,01 mm
Preïncubatietijd	tijd nodig om temp. van 37 °C te bereiken
Start van reactie	4-nitrofenylfosfaat
Tijd voor eerste meting	60 seconden
Meettijd	90 seconden

Instrumentarium en uitrusting

Een spectrofotometer, bij voorkeur een zelfregistre-rende, voorzien van een bij 37 °C gethermostreerd cuvettenhuis is vereist voor een nauwkeurige meting bij 405 nm. Specificaties voor de uitrusting (b.v. monster- en reagensbehandeling, criteria gesteld aan de spectrofotometer en de wijze van temperatuurcontrole) moeten voldoen aan de criteria zoals beschreven in de aanbevelingen van de IFCC (11).

Reagentia

1. N-methyl-D-glucamine, C₇H₁₇NO₅, M_r 195,22
2. Natriumchloride, NaCl, M_r 58,45
3. Magnesiumacetaat, Mg(CH₃COO)₂ · 4H₂O, M_r 214,5
4. Hydrochloride, HCl, M_r 36,47 (2 mol/l)
5. 4-nitrofenylfosfaat dinatriumzout, C₆H₄NNa₂O₆P · 6H₂O, M_r 371,14

Zuiverheidscriteria

Specificaties met betrekking tot de zuiverheid van de reagentia moeten conform de criteria zijn zoals gegeven in de IFCC-methode (10). N-methyl-D-glucamine moet de hoogste zuiverheid hebben die thans beschikbaar is (massafractie boven 0,99, een enkele piek geven bij gaschromatografie als trifluoro- en silylderivaten geanalyseerd met OV 1701 [0,2 mm x 25 m] fused silica capillaire kolom, temperatuurgradient: 100 - 200 °C, 4 °C · sec⁻¹). Commercieel verkrijgbaar N-methyl-D-glucamine voldoet over het algemeen aan deze criteria. Het witte kristallijne poeder is enigszins hygroscopisch en moet worden bewaard onder N₂-gas, wanneer het voor een langere tijd wordt opgeslagen.

Oplossingen en stabiliteit

Om de groei van micro-organismen te voorkomen, is het raadzaam om de reagentia te bereiden in steriel glaswerk. Alle oplossingen dienen gemaakt te worden in maatkolven, gekalibreerd bij de kalibratietempera-

tuur, met dubbel gedeïoniseerd water (steriel met een geleidbaarheid van ≤ 2 mS).

1. Oplossing I

N-methyl-D-glucamine	560 mmol/l
Magnesiumacetaat	0,56 mmol/l
Natriumchloride	78,4 mmol/l

Op pH 10,6 (20 °C)/10,1 (37 °C) brengen met HCl 2 mol/l. Mits bewaard in een goed afgesloten fles, is deze oplossing tenminste stabiel gedurende 2 maanden bij 20 °C. Oplossingen blootgesteld aan de lucht (250 ml met een oppervlak van 38,5 cm² in een open propyleen fles) laten een daling zien van 0,02 pH-eenheden per dag bij 4 °C.

2. Oplossing II

4-nitrofenylfosfaat,	224 mmol/l
----------------------	------------

Deze oplossing dient bereid te worden direct voor gebruik en moet worden gebruikt binnen 8 uur indien bewaard bij 20 - 25 °C of binnen 24 uur indien bewaard bij 3 - 5 °C.

3. Oplossing III

Natriumchloride	154 mmol/l
-----------------	------------

Deze oplossing is lang houdbaar bij kamertempera-tuur.

Monstername, -stabiliteit en -opslag

Bloed moet worden afgenomen door middel van een venapunctie, waarbij de stuwings slechts minimaal mag zijn. De bloedcellen dienen binnen 2 uur verwijderd te zijn van het serum of het plasma. Bij voorkeur dient serum te worden gebruikt; heparineplasma mag ook gebruikt worden. Het gebruik van andere anticoagulantia (EDTA, citraat, oxalaat) dient vermeden te worden.

AF in serum is stabiel gedurende ten minste 2 dagen bij 20 °C, één week bij 4 °C, 3 maanden bij - 28 °C en 6 maanden bij - 75 °C. Wanneer sera na ontdooien op 4 °C worden gebracht, dan verliest AF geen activiteit binnen 2 dagen; sommige gekoelde of ingevroren sera laten een lichte verhoging van de activiteit zien na opwarmen tot kamertemperatuur. Verse sera dienen bewaard te worden bij 20 °C en indien mogelijk, dient de activiteit ervan bepaald te worden binnen 4 uur na bloedafname (1).

Meetprocedure

Er worden twee metingen verricht: de snelheid van de verandering van de absorptie van de reagensblanco ($\Delta A/\Delta t$)_{reagensblanco} en de snelheid van de verandering van de absorptie van het uiteindelijke reactiemengsel ($\Delta A/\Delta t$)_{totale meting}. Voor het meten van de reagensblanco wordt dezelfde procedure gevolgd als voor het meten van de activiteit, met dien verstande dat het monster vervangen wordt door oplossing III. De beginabsorptie mag niet hoger zijn dan 0,500 en de toename van de absorptie moet minder zijn dan 0,004 min⁻¹ bij 405 nm. Indien dit niet het geval is, dan dient de substraatoplossing vervangen te worden. Het verschil tussen de omzettingssnelheid gemeten in het monster en in de reagensblanco is representatief voor de omzettingssnelheid veroorzaakt door AF.

$$(\Delta A/\Delta t)_{\text{totale mengsel}} - (\Delta A/\Delta t)_{\text{reagensblanco}} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{enzym}}$$

Pipetteer in de cuvet	µl	Concentraties in het uiteindelijke reactiemengsel	
Oplossing I	500	N-Methyl-D-glucamine	500 mmol/l
		Mg-acetaat	0,50 mmol/l
		Chloride (Cl ⁻)	171,0 m
		Natrium Na ⁺	110,0 m
		pH	1
Monster	10	Volumefractie	0,0179

Meng goed en zorg ervoor dat er geen vloeistof verloren gaat. Incubeer bij 37 °C tot het reactiemengsel de temperatuur van 37 °C bereikt heeft (tenminste 300 seconden).

Oplossing II	50	4-NO ₂ -fenylfosfaat	20 mmol/l
--------------	----	---------------------------------	-----------

Meng goed en volg de toename van de absorptie na 60 seconden gedurende een periode van 90 seconden met behulp van een zelfregistrerende recorder of ander geschikt instrument.

Meetcriteria

Wanneer de reactiesnelheid een absorptiestijging van 0,300 min⁻¹, corresponderend met 900 U/l (15 µkat/l), overschrijdt, dan dient het monster verdund te worden met oplossing III. Bij de berekening dient dan rekening gehouden te worden met de verdunningsfactor. Indien de absorptietoename kleiner is dan 0,008 min⁻¹ dan dient de activiteit gemeten te worden met een monstervolume van 20 µl. Hiermee dient rekening gehouden te worden bij de berekening van de activiteit.

Berekening

Onder de gegeven reactiecondities is

- de molaire absorptiecoëfficiënt, ϵ , van 4-NO₂-fenol, 405 nm, 37 °C $1875 \pm 5,4 \text{ m}^2/\text{mol}$
- de lichtweg, (l) $0,01 \text{ m}$
- het totale reactievolume (V_t) $0,56 \times 10^{-3} \text{ l}$
- het monstervolume (V_m) $0,01 \times 10^{-3} \text{ l}$
- de toename van de absorptie $(\Delta A/\Delta t)_{\text{enzym}}$
(Δt in min of sec)

Uit de volgende vergelijking kan de katalytische activiteitsconcentratie (K_{ac}) worden berekend.

$$K_{ac} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{enzym}} * \frac{V_t}{\epsilon * l * V_m}$$

$$K_{ac} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{enzym}} * 2987 \text{ U/l}$$

$$K_{ac} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{enzym}} * 49,78 \text{ µkat/l}$$

De kat/l is gedefinieerd als de katalytische activiteitsconcentratie waarbij de snelheid van de vorming van het product gelijk is aan 1 mol. l⁻¹. sec⁻¹. Hierbij komt 1 U/l (1 µmol. l⁻¹. min⁻¹) overeen met 16,67 nkat. l⁻¹ (1 nmol. l⁻¹. sec⁻¹)

Analytische variabiliteit

Gegevens met betrekking tot de performance van de test zijn hieronder beschreven:

Gegevens over de imprecisie van 12 manueel uitgevoerde tests

U/l	Katalytische conc. mkat/l	Relatieve standaarddeviatie	
		intra-assay	inter-assay
76,2	1,3	0,0224	0,0427
123	2,1	0,0095	0,0264
221	3,7	0,0080	0,0196

Voorlopige referentiewaarden

Hieronder zijn voorlopige referentiewaarden gegeven voor AF berekend uit enzymactiviteitsmetingen van 200 gezonde volwassen personen bij 37 °C. Ieder laboratorium dient deze voorlopige referentiewaarden zelf te verifiëren.

Mannen(n=106)	44 – 155 U/l	0,7 – 2,6 µkat/l
Vrouwen(n=94)	45 – 145 U/l	0,7 – 2,4 µkat/l

Literatuur

1. Tietz NW, Rinker AD, Shaw LM. IFCC methods for measurement of catalytic concentration of enzymes, Part 5. IFCC method for alkaline phosphatase. J Clin Chem Clin Biochem 1983; 21: 731 - 748.
2. Alkaline Phosphatase Study Group of the subcommittee on Enzymes of the American Association for Clinical Chemistry. Selection of reaction conditions for the measurement of alkaline phosphatase activity. In: Second International Symposium on Clinical Enzymology, Tietz NW, Weinstock A and Rogerson D eds. American Association for Clinical Chemistry, Washington DC 1976; 51-66.
3. Société Française de Biologie Clinique, Commission Enzymologie. Enzymologie courante en chimie clinique et recommandations pour la mesure des activités catalytiques dans le sérum à 30° C. Ann Biol Clin 1977; 35: 271-273.
4. Committee on Enzymes of the Scandinavian Society for Clinical Physiology (1974) Recommended methods for the determination of four enzymes in blood. Scand J Clin Lab Invest 1974; 33: 291 -306.
5. Recommendations of the German Society for Clinical Chemistry. Standard method for determination of alkaline phosphatase (AP) activity. Z Klin Chem Klin Biochem 1972; 10: 190.
6. Rej R, Bretauière J-P, Jenny RW and Jackson KY. Measurement of alkaline phosphatase activity: characterization and identification of an inactivator in 2-amino-2-methyl-1-propanol. Clin Vhem 1981; 27: 1401 -1409.
7. Jung K, Pergande M, Reichmann G, Sitte A, Egger E. Influence of monoethanolamine on activity measurements of the isoenzymes of alkaline phosphatase. J Clin Chem Clin Biochem 1978; 16: 223-224.
8. Chromy V, Zahradnicek L, Voznicek J. Use of N-methyl-D-glucamine as buffer in the determination of serum alkaline phosphatase activity. Clin Chem 1981; 2: 1729-1732.
9. Ceriotti G, Bonvicine P, Ceriotti F, Franzine C, Prencipe I, Spandrio L. Valutazione di un metodo per la determinazione dell'attività della fosfatasi alcalina (ALP) con il tampone N-metilglucammina (MEG). Proposta del suo uso come metodo raccomandato. Giron It Chim Clin 1984; 9: 167-181.

10. Recommendations of the German Society for Clinical Chemistry. Proposal of Standard Methods for the Determination of Enzyme Catalytic Concentrations in serum and plasma at 37 °C. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1992; 30: 247-256.
11. Bowers jr GN, Bergmeyer HU, Hørder M, Moss DW. Approved recommendations of IFCC methods for the measurements of catalytic concentrations of enzymes, Part 1. General considerations 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.

APPENDIX

Enkele eigenschappen en andere gegevens van de buffer N-methyl-D-glucamine zijn gegeven in onderstaand schema.

Status	Kristallijn wit poeder van zeer hoge zuiverheid (smeltpunt: 128-131 °C)
Zuivering	Niet noodzakelijk; gemakkelijk om te kristalliseren uit water
Beschikbaarheid	Gemakkelijk leverbaar product bij vele leveranciers
Metaalioncontrole	Niet nodig om metaalchela-tors toe te voegen om zeker te zijn van een optimale concentratie van zink en magnesium
Oplosbaarheid	Groot (583 g/l bij 20 °C in water)
pK-waarde	9,63 (37 °C) met een temperatuurafhankelijkheid van -0,027 pH- eenheden /°C
Fosforylering	Matig; 75 % van de mate van fosforylering veroorzaakt door diethanolamine
Concentratie	Optimale condities zijn te realiseren
Iso-enzymbias	Identiek aan 2-amino-2-methyl-1-propanol
Initiëring van de reactie	Serum- en substraatstart geven dezelfde resultaten
Conversiesnelheid	Lineair in de tijd bij 37 °C

Lineariteit bij verdunning van het monster

Monsters met een pathologische activiteitsconcentratie van tenminste 1500 U/l kunnen nog direct gemeten worden. Bij verdunning van dergelijke monsters wordt een lineair verband gevonden tussen de verdunningsfactor en de gemeten activiteit in het verdunde monster. Deze relatie geldt zowel voor monsters die verdund zijn met een normaal serummonster (na correctie voor de activiteit vastgesteld in het normale monster) als voor verdunning met een fysiologische zoutoplossing.

Wijziging van het monstervolume

Experimenten werden uitgevoerd waarbij het monstervolume varieerde van 2 µl t/m 18 µl. Een monstervolume van 2 µl is niet aan te bevelen aangezien de herhaalbaarheid en/of reproduceerbaarheid van de analyse dan sterk afhangt van het type meetinstrument. Met een monstervolume variërend van 9 tot 18 µl wordt ook in sera met een normale activiteitsconcentratie een relatieve standaarddeviatie (RSD) gevonden die varieert tussen 0,3 en 3,4 %. Voor sera met een pathologische activiteitsconcentratie kunnen wel lagere monstervolumina vanaf 4 µl worden gebruikt. Voor monstervolumina variërend tussen 4 en 18 µl werden, voor een serummonster met een activiteitsconcentratie van ca 1500 U/l, RSD's vastgesteld die variëren tussen 0,3 en 1,9 %.

Effect van het gebruik van een kalibrator

Voor de gebruikte kalibrator (Cfas, Calibrator for automated systems, Boehringer Mannheim) werd een zeer goede reproduceerbaarheid gevonden. Bij gebruik van monstervolumina variërend van 2 µl t/m 18 µl werden de gemeten activiteiten berekend op grond van de molaire absorptiecoëfficiënt (MAC) en op grond van activiteit van de kalibrator, die gemeten werd onder dezelfde omstandigheden. De experimenten werden uitgevoerd in twee verschillende laboratoria. Wanneer de activiteit berekend wordt op grond van de MAC-waarde, dan werd bij gebruik van een normaal (ca. 100 U/l) en een pathologisch plasma (ca. 1600 U/l) in het ene laboratorium een relatieve standaarddeviatie gevonden van 2,4 resp. 2,6 %, in het andere 5,9 resp. 6,6 %. Wanneer de activiteit berekend werd op de kalibratoractiviteit dan bedroegen deze percentages in het ene laboratorium 1,4 en 1,4 %, in het andere 5,5 en 6,5 %. Het verschil tussen de resultaten van beide laboratoria kan veroorzaakt zijn door de wijze van meten. In het ene laboratorium werd de analyse handmatig uitgevoerd met gebruik van een spectrofotometer, terwijl in het andere laboratorium de analyse werd uitgevoerd met gebruik van een analyseautomaat. Ook het gebruik van een vastgestelde MAC-waarde beschreven in de literatuur in vergelijking met een zelf gemeten MAC-waarde zou bij kunnen dragen tot een dergelijk verschil. Daarbij mag opgemerkt worden dat het berekenen van een MAC-waarde uit meetresultaten van een oplossing van 4-NO₂-fenol niet altijd leidt tot de MAC-waarde, opgegeven in de literatuur. Ook dat is een reden om bij het vaststellen van enzymactiviteiten een kalibrator te gebruiken.

Advies

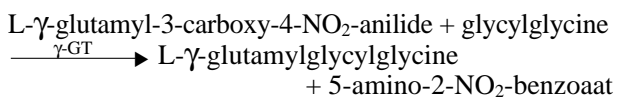
Het is aan te raden om voor het betreffende analytische instrument, dat in het betreffende laboratorium gebruikt wordt, de statistische parameters zoals reproduceerbaarheid, herhaalbaarheid, lineariteit, imprecisie etc. vast te stellen.

Methode voor het meten van de katalytische activiteitsconcentratie van γ -glutamyltransferase (γ -glutamyl-peptide: aminozuur γ -glutamyltransferase, EC 2.3.2.2) in serum bij 37 °C

γ -Glutamyltransferase (γ -GT) is een enzym dat hoofdzakelijk wordt aangetroffen op de buitenmembraan van de cel. Het speelt een belangrijke rol bij het transport van aminozuren over de membraan van de cel waarbij glutathion via de γ -glutamylcyclus als substraat voor γ -GT een belangrijke rol speelt. Als gevolg van celdestructie, vooral van die van de kleine canaliculi in de lever, komt het γ -GT in de circulatie. Het γ -GT is sterk verhoogd bij galgangatresie en galstuwings in de lever als gevolg van pathologische processen. De verhoging van het γ -GT is reeds in een vroeg stadium te zien aangezien het γ -GT aanwezig is in membranen van de kleine canaliculi. Ook wordt een verhoogd γ -GT niet alleen aangetroffen bij alcoholisten maar ook bij mensen die een regelmatig gebruik maken van alcohol. Er zijn meerdere iso-enzymen van γ -GT beschreven. Deze iso-enzymen blijken niet meer te zijn dan γ -GT dat gekoppeld is met stukken membraan van diverse lengtes. In een electrisch veld zijn deze gebonden γ -GT-fragmenten van elkaar te onderscheiden.

Principe

Bij de bepaling van de katalytische activiteitsconcentratie katalyseert γ -GT de overdracht van de γ -glutamylgroep van L- γ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide op glycylglycine, waarbij L- γ -glutamylglycylglycine en 5-amino-2-nitrobenzoesaat worden gevormd. De methode is ontleend aan die beschreven door de enzymcommissie van de Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie (1).



De vorming van 5-amino-2-nitrobenzoesaat wordt fotometrisch geregistreerd bij 405 of bij 410 nm en is stoichiometrisch gerelateerd aan de katalytische activiteitsconcentratie van γ -GT.

Optimale reactiecondities

De condities zijn geoptimaliseerde reactiecondities, die gedefinieerd zijn als de condities die het gunstigst zijn zowel voor de kinetische reacties als voor de technische aspecten van de meting. Dit houdt in dat deze condities niet noodzakelijkerwijze maximale activiteit garanderen. Deze condities zijn de volgende:

Glycylglycine	150 mmol/l
pH (37 °C)	7,70
L- γ -Glutamyl-3-carboxy-4-NO ₂ -anilide	6 mmol/l
Volumefractie monster	0,0909 (1 : 11)

Meetcondities

De technisch meest gunstige meetcondities, rekening houdend met oplosbaarheid, stabiliteit en preïncubatie van de diverse componenten zowel als de aanpasbaarheid aan automatische uitvoeringen ervan zijn hieronder weergegeven.

Temperatuur	37 ± 0,1 °C
Golflengte (bandbreedte)	405, 410 nm (≤ 2 nm)
Lichtweg	10 ± 0,01 mm
Pre-incubatietijd	180 seconden, nodig om de temperatuur van 37 °C te bereiken
Tijd eerste aflezing	60 seconden
Meetperiode	180 seconden

Instrumentarium en uitrusting

Een spectrofotometer, bij voorkeur een zelfregistre- rende, voorzien van een bij 37 °C gethermostreerd cuvettenhuis is vereist voor een nauwkeurige meting bij 405 nm. Specificaties voor de uitrusting (b.v. monster- en reagensbehandeling, criteria gesteld aan de spectrofotometer en de wijze van temperatuur- controle) moeten voldoen aan de criteria zoals beschreven in de aanbevelingen van de IFCC (2).

Reagentia

- L- γ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide, monoammoniumzout, monohydraat, C₁₂H₁₂N₃O₇NH₄.H₂O, M_r 346,30
- N-glycylglycine, C₄H₈N₂O₃, M_r 132,12
- Natriumchloride, NaCl, M_r 58,45
- Natriumhydroxide, NaOH, M_r 40,0 (waterige oplossing van 2 mol/l)

Oplossingen

- Oplossing I*
Glycylglycine 206 mmol/l
pH (37 °C) 7,70 (bijstellen met NaOH)
- Oplossing II*
L- γ -Glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide 33 mmol/l
- Verduunningsoplossing*
Natriumchloride 154 mmol/l

Monstername

Bloed moet worden afgenomen door middel van een venapunctie, waarbij de stuwings slechts minimaal mag zijn. De bloedcellen dienen binnen 2 uur verwijderd te zijn van het serum. Bij voorkeur dient serum te worden gebruikt.

Meetprocedure

Er worden twee metingen verricht: de snelheid van de verandering van de absorptie van de reagensblanco $(\Delta A/\Delta t)_{\text{reagensblanco}}$ en de snelheid van de verandering van de absorptie van het uiteindelijke reactiemengsel $(\Delta A/\Delta t)_{\text{totale mengsel}}$. Ook de reagensblanco zal gemeten moeten worden onder vergelijkbare condities, waarbij verdunningsvloeistof gebruikt dient te worden in plaats van serum. Het verschil tussen de omzettingssnelheid gemeten in het monster en in de reagensblanco, is representatief voor de omzettingssnelheid, veroorzaakt door γ -GT.

$$(\Delta A/\Delta t)_{\text{totale mengsel}} - (\Delta A/\Delta t)_{\text{reagensblanco}} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{enzym}}$$

Pipetteer in de cuvet	μl	Concentratie in het uiteindelijke reactiemengsel	
Oplossing I	400	Glycylglycine	150 mmol/l
Monster	50	Volumefractie	0,0909 (1 : 11)
Meng goed en preincubeer totdat de meettemperatuur van 37 °C bereikt is.			
Oplossing II	100	L- γ - Glutamyl-3-carboxy-4-NO ₂ -anilide	6 mmol/l

Meng goed. Na 60 seconden wordt de toename van de absorptie gemeten over een periode van 180 seconden.

Meetcriteria

Wanneer de reactiesnelheid bij 405 nm een absorptiestijging van 0,352 min⁻¹ corresponderend met 407 U/l (6,8 $\mu\text{kat/l}$) overschrijdt, moet het monster exact verdund worden met verdunningsvloeistof. Het in het verdunde monster verkregen resultaat zal dan met de verdunningsfactor vermenigvuldigd moeten worden.

Berekening

Onder de gegeven reactiecondities is:

- de molaire absorptie coëfficiënt, ϵ , van 4-NO₂-aniline
 - bij 405 nm, 37 °C 949 m²/mol
 - bij 410 nm, 37 °C 796 m²/mol
- de lichtweg, (l) 0,01 m.
- het totale reactievolume, (V_t) 0,55 x 10⁻³ l
- het monstervolume (V_m) 0,05 x 10⁻³ l
- de toename van de absorptie $(\Delta A/\Delta t)_{\text{gecorrigeerd}}$ (Δt in min of sec)

Uit de volgende vergelijking kan de katalytische activiteitsconcentratie (K_{ac}) worden berekend.

$$K_{ac} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{enzym}} * \frac{V_t}{\epsilon * l * V_m}$$

$$K_{ac} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{enzym}} * 1159 \text{ U/l (405 nm)}$$

$$K_{ac} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{enzym}} * 1382 \text{ U/l (410 nm)}$$

$$K_{ac} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{enzym}} * 19,32 \text{ mkat/l (405 nm)}$$

$$K_{ac} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{enzym}} * 23,03 \text{ mkat/l (410 nm)}$$

De kat/l is gedefinieerd als de katalytische activiteitsconcentratie waarbij de snelheid van de vorming van het product gelijk is 1 mol. l⁻¹. sec⁻¹. Hierbij komt 1U/l (1mmol. l⁻¹. min⁻¹) overeen met 16,67 nkat. l⁻¹ (1nmol. l⁻¹. sec⁻¹).

Voorlopige referentiewaarden

Voor volwassenen in leeftijd variërend van 20 - 60 jaar, werden voorlopige referentiewaarden vastgesteld. Ieder laboratorium dient deze voorlopige referentiewaarden zelf te verifiëren.

Mannen	9 - 40 U/l	150 - 670 nkat/l
Vrouwen	9 - 35 U/l	150 - 580 nkat/l

Optimalisering van de reactiecondities

De grote oplosbaarheid van L- γ -glutamyl-3-carboxy-4-NO₂-anilide maakt het mogelijk de reactie te starten door toevoegen van substraat. Dit is te prefereren boven het starten van de reactie met serum omdat reacties tussen serum en reagensblanco waarden kunnen veroorzaken. Dergelijke blancowaarden kunnen in geval van problematische sera bij een substraatstart gemeten worden voorafgaande aan de toevoeging van substraat.

Literatuur

1. Gerhardt W, Henkel E, Klauke K, Liese W, Lorentz K, Schmidt E, Sonntag O, Stein W, Weidemann G. Recommendation: Standard ECCLS procedures for enzyme assays at 37 °C. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1993; 31: 901 - 909.
2. Bowers jr GN, Bergmeyer HU, Hørder M, Moss DW. Approved recommendations of IFCC methods for the measurements of catalytic concentrations of enzymes, Part 1. General considerations 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.

Instrumentarium en uitrusting

Een spectrofotometer, bij voorkeur een zelfregistre-
rende, voorzien van een bij 37 °C gethermostreerd
cuvettenhuis is vereist voor een nauwkeurige meting
bij 405 nm. Specificaties voor de uitrusting (b.v.
monster- en reagensbehandeling, criteria gesteld aan
de spectrofotometer en de wijze van temperatuur-
controle) moeten voldoen aan de criteria zoals be-
schreven in de aanbevelingen van de IFCC (2).

Reagentia

Natriumchloride, NaCl, M_r 58,44

Calciumchloride, dihydraat, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, M_r 147,02

N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-ethaansulfonzuur,
 $\text{C}_6\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$, M_r 238,31

Natriumhydroxide, NaOH, M_r 40,00 (0,2 mol/l)

α -glucosidase (EC 3.2.1.20) uit *Bacillus stearother-*
mophilus (gelyophiliseerd); specifieke activiteit hoger
dan 500 $\mu\text{kat/g}$ (37 °C)

4,6-ethylideen(G₇)-4- nitrofenyl(G₁)- α -(1→4)-D-mal-
toheptaoside, $\text{C}_{50}\text{H}_{77}\text{NO}_{38}$, M_r 1300,2

Zuiverheid van de reagentia

4,6-Ethylideen(G₇)-4- nitrofenyl(G₁)- α -(1→4)-D-mal-
toheptaoside moet de hoogste zuiverheidsgraad heb-
ben die beschikbaar is ($\geq 0,95$ op grond van een
HPLC-analyse, de massafractie $\geq 0,90$, bij pH 6,20 in
waterige oplossingen). α -Glucosidase (EC 3.2.1.20)
moet een activiteit bezitten van ≥ 667 mkat/g (40kU/g
bij 37 °C). De relatieve contaminatie met α -amylase
mag niet meer zijn dan 1×10^{-4} kat/kat.

CaCl_2 , NaCl, NaOH en N-2-hydroxyethylpiperazine-
N'-ethaansulfonzuur moeten een analytische zuiver-
heidsgraad bezitten (Analytical Reagent Grade).

Oplossingen

Om groei van micro-organismen in oplossingen te
voorkomen, moeten steriele flessen en potten worden
gebruikt. Oplossingen moeten gemaakt worden in volu-
metrisch glaswerk met een klasse-A-specificatie bij de
kalibratietemperatuur met dubbel gedestilleerd water
(steriel, geleidbaarheid beneden de 2 mS; pH 6 - 7, sili-
caten < 0,1 mg/l). De pH van de oplossingen moet bij-
gesteld worden bij 37°C met een pH-meter gekalibreerd
bij 37°C met gestandaardiseerde referentiebuffers (2).

1. Stockoplossing van CaCl_2 (310 mmol/l)

Los 4,56 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ op in ongeveer 80 ml water
en vul aan tot 100 ml met dubbel gedestilleerd water.
Zeer lang houdbaar, indien opgeslagen bij 20 °C.

2. Oplossing van effectors in buffer

NaCl 86,8 mmol/l, CaCl_2 1,24 mmol/l, N-2-hydroxy-
ethylpiperazine-N'-ethaansulfonzuur 51,7 mmol/l,
pH 7,15 bij 37 °C. Los 1,268 g NaCl en 3,078 g N-2-
hydroxyethylpiperazine-N'-ethaansulfonzuur op in ca
200 ml dubbel gedestilleerd water, voeg 1 ml van op-
lossing 1 toe; stel de pH op 7,15 bij 37 °C met ca. 24
ml NaOH, 0,2 mol/l, en vul aan met dubbel gedestil-
leerd water tot precies 250 ml. Indien deze oplossing
niet gesteriliseerd is door koken, is deze oplossing
houdbaar gedurende tenminste vier weken bij 20 °C
of vijf weken bij 5 °C.

3. Werkoplossing van buffer, effector en enzym

NaCl 86,8 mmol/l; CaCl_2 1,24 mmol/l; α -glucosidase
125 mkat/l (7,4 kU/l); N-2-hydroxyethylpiperazine-
N'-ethaansulfonzuur 51,7 mmol/l; pH 7,15 bij 37 °C.
Deze oplossing is tenminste twee weken houdbaar bij
5 °C. Los 12,5 μkat (750 U) α -glucosidase uit micro-
organismen, b.v. 25 mg van een preparaat dat 500
 $\mu\text{kat/g}$ bevat, op in 100 ml van oplossing 2.

4. N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-ethaansulfonzuur oplossing 51,7 mmol/l (pH 7,15 bij 37 °C)

Los 3,078 g N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-ethaan-
sulfonzuur op in ca. 200 ml dubbel gedestilleerd wa-
ter, stel de pH op 7,10 bij 37 °C met ca. 24 ml NaOH
0,2 mol/l en vul aan met dubbel gedestilleerd water
tot precies 250 ml.

5. Substraatoplossing

Startreagens: 4,6-Ethylideen(G₇)-4- nitrofenyl(G₁)- α -
(1→4)-D-maltoheptaoside 21,7mmol/l; N-2-hydroxy-
ethylpiperazine-N'-ethaansulfonzuur 51,7 mmol/l; pH
7,10 bij 37 °C. Los hiertoe 564 mg 4,6-ethylideen(G₇)-
4- nitrofenyl(G₁)- α -(1→4)-D-maltoheptaoside (massa-
fractie $\geq 0,90$) op in 20 ml oplossing 4. Deze oplossing
is houdbaar tenminste twee weken bij 5 °C.

6. Verdunningsoplossing

NaCl, 154 mmol/l. Los 0,9 g NaCl op in 100 ml ge-
destilleerd water. Zeer lang houdbaar, indien opgesla-
gen bij 20 °C.

Opmerking: bacteriële of schimmelcontaminatie be-
perkt de stabiliteit van de reagentia. Gebruik geen na-
triumazide (NaN_3) als antibactericide.

Monstername, -stabiliteit en -opslag

Serum en heparineplasma zijn geschikte monsters.
Fluoride en EDTA moeten niet gebruikt worden als
anticoagulantia. Neem bloed af met behulp van een
venapunctie met een zo gering mogelijke stuw-
ing. Verwijder de bloedcellen binnen twee uur na de vena-
punctie. In bepaalde gevallen kan ook urine als mon-
ster gebruikt worden.

α -Amylase is een redelijk stabiel enzym. Een enkele
maal vriezen en dooien vermindert de activiteit van
het enzym niet. De activiteit blijft bij 20 °C volledig
stabiel gedurende vier dagen, bij 5 °C twee weken,
bij -28 °C een jaar en vijf jaar bij -75 °C. Urine moet
niet worden ingevroren maar moet binnen 12 uur
worden geanalyseerd, mits bewaard bij 20 °C of bin-
nen vijf dagen mits bewaard bij 5 °C. Preservatieven
mogen niet worden toegevoegd.

Meetprocedure

Indien een reagensblanco gemeten moet worden, dan
dient in de meetprocedure uitsluitend het serum ver-
vangen te worden door oplossing 5. Een reagens-
blancoabsorptie moet voorafgaande aan de meting
van een serie van monsters worden gemeten. De
beginabsorptie mag niet boven de waarde van 0,120
komen en de verandering van de absorptie mag de
waarde van $0,0005 \text{ min}^{-1}$ bij 405 nm niet te boven
gaan. Indien dit het geval mocht zijn, dan dient de

zuiverheid van de reagentia opnieuw te worden vastgesteld.

Het verschil tussen de omzettingssnelheid gemeten in het monster en in de reagensblanco is representatief voor de omzettingssnelheid, veroorzaakt door α -amylase.

$$(\Delta A/\Delta t)_{\text{reactiemengsel}} - (\Delta A/\Delta t)_{\text{reagensblanco}} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{enzym}}$$

Pipetteer in de cuvet	μl	Concentratie in het uiteindelijke reactiemengsel	
Oplossing 3	500	CaCl ₂	1,0 mmol/l
		NaCl	70 mmol/l
		α -glucosidase	100 $\mu\text{kat/l}$
		N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-ethaansulfonzuur	50 mmol/l
Monster	20	volumefractie	0,03226 (1:31)

Meng goed. Wacht totdat het mengsel de temperatuur van 37 °C bereikt heeft.

Oplossing 4	100	4,6-ethylideen(G ₇)-4-nitrofenyl(G ₁)- α -(1 \rightarrow 4)-D-maltoheptaoside	3,5 mmol/l
		N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-ethaansulfonzuur	50 mmol/l

Meng weer en wacht 120 sec. tot het einde van de lagfase. Registreer daarna de toename van de absorptie bij 405 nm als een functie van de tijd over een periode van ≤ 180 sec.

Opmerking. De uiteindelijke pH van 7,15 is het gevolg van een iets zuurdere oplossing 5, die wordt toegevoegd aan het mengsel van oplossing 3 en het monster.

Meetcriteria

Een lagfase van 120 sec. moet in acht worden genomen. De waarden van de $\Delta A/\Delta t$ van de overall reactie zijn constant over een periode van tenminste 180 sec. volgend op de lagfase voor monsters met een katalytische concentratie van α -amylase tot en met 11,5 $\mu\text{kat/l}$ of 12,5 $\mu\text{kat/l}$ voor sera. Indien de toename van de absorptie groter is dan 0,235 min^{-1} , overeenkomend met een activiteit van 11,5 $\mu\text{kat/l}$ (689 U/l), dient het monster verdund te worden met oplossing 5. De dan gemeten $\Delta A/\Delta t$ dient dan vermenigvuldigd te worden met de verdunningsfactor.

Berekening

Onder de gegeven reactiecondities is:

- de molaire absorptie coëfficiënt ϵ van 4-nitrofenoxide bij 405 nm, 30 °C en

eiwitvrije oplossing	1200,5 m^2/mol
menselijke sera	1120,0 m^2/mol
- de lichtweg, (l)
- het totale reactievolume (V_t)
- het monstervolume (V_m)
- de toename van de absorptie

$$(\Delta A/\Delta t)_{\text{gecorrigeerd}} \quad (\Delta t \text{ in min of sec})$$

Uit de volgende vergelijking kan de katalytische activiteitsconcentratie (K_{ac}) worden berekend.

$$K_{ac} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{gecorrigeerd}} * \frac{V_t}{\epsilon * l * V_m}$$

$$K_{ac} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{gecorrigeerd}} * 2582.3 \text{ U/l (405 nm, t = minuten) (eiwitvrije monsters)}$$

$$K_{ac} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{gecorrigeerd}} * 2767.9 \text{ U/l (405 nm, t = minuten) (menselijke sera)}$$

$$K_{ac} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{gecorrigeerd}} * 43,047 \mu\text{kat/l (405 nm, t = seconden) (eiwitvrije monsters)}$$

$$K_{ac} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{gecorrigeerd}} * 46,141 \text{ mkat/l (405 nm, t = seconden) (menselijke sera)}$$

De kat/l is gedefinieerd als de katalytische activiteitsconcentratie waarbij de snelheid van de vorming van het product gelijk is 1 mol. $\text{l}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$. Hierbij komt 1 U/l (1 mmol. $\text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) overeen met 0,01667 $\mu\text{kat} \cdot \text{l}^{-1}$ (1 mmol. $\text{l}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$).

Analytische variabiliteit

Imprecisiegegevens verkregen uit 15 handmatig geanalyseerde α -amylase bepalingen in menselijke sera.

Katalytische concentratie		Relatieve standaarddeviatie %	
U/l	$\mu\text{kat/l}$	intra-assay	interassay
35,3	0,6	5,8	8,0
88,9	1,5	1,3	2,0
302	5,0	0,4	0,5

Voorlopige referentiewaarden

Voorlopige range van referentiewaarden werd verkregen door in 100 sera van at random gekozen gezonde personen (leeftijd: 20-69 jaar, telkens acht personen van ieder geslacht over een leeftijdsinterval van 10 jaar) α -amylase te bepalen. Voor de selectie van gezonde personen werden de volgende exclusiecriteria gehanteerd: postprandiaal glucose van $> 6,1$ mmol/l, kreatinine < 95 mmol/l, γ -glutamyltransferase $> 0,33$ $\mu\text{kat/l}$ (20 °C); totaal eiwit 58-76 g/l. Uit de verkregen resultaten werd het 0,95 referentie-interval berekend.

Voorlopig 0,95 referentie-interval voor α -amylase

Populatie	n	U/l	mkat/l
Vrouwen	40	34 - 96	0,6 - 1,6
Mannen	40	34 - 96	0,6 - 1,6

Er werd geen verschil gevonden tussen mannen en vrouwen.

Literatuur

1. 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.
2. Bowers jr GN, Bergmeyer HU, Hørder M, Moss DW. Approved recommendations of IFCC methods for the measurements of catalytic concentrations of enzymes, Part 1. General considerations 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.

Methode voor het meten van de katalytische activiteitsconcentratie van lactaatdehydrogenase (L-lactaat: NAD⁺ oxidoreductase, EC 1.1.1.27) in serum bij 37 °C

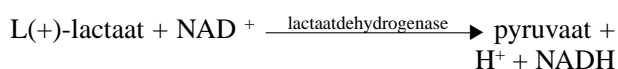
Humaan lactaatdehydrogenase (LD) bestaat uit een tetrameer, opgebouwd uit twee typen subunits, H (heart) en M (muscle). Combinaties van deze subunits geven vijf iso-enzymen te zien, die in humane weefsels worden aangetroffen. De verhouding van de diverse iso-enzymen, die in serum van patiënten wordt aangetroffen, zijn gerelateerd aan de ernst van de schade aan het orgaan- of weefsel waar zij vandaan komen en de halfwaardetijd van de individuele weefselspecifieke enzymen. Voorspelling van de verhouding van de verschillende iso-enzymen in een patiëntenserum is dus niet mogelijk.

Lactaatdehydrogenase katalyseert de oxidatie van lactaat naar pyruvaat en de reductie van pyruvaat naar lactaat. Ieder van beide reacties is goed meetbaar. In deze methode heeft de reactie van lactaat naar pyruvaat de voorkeur om de volgende redenen: de lineariteit gemeten in de tijd is beter en de reactie resulteert in een toename van de extinctie. De substraatconcentratie is goed te optimaliseren.

Humaan serum en weefselextracten zijn gebruikt als bronnen van het enzym. De eindconcentraties van (co)substraten en de pH zijn geselecteerd op grond van experimentele resultaten en empirische optimalisatietechnieken en zijn bevestigd met behulp van vergelijkingen van reactiesnelheden. De katalytische en fysische eigenschappen van de iso-enzymen verschillen. Vanwege de grote betekenis van het hartspecifieke iso-enzym (LD₁) bij het vaststellen van coronaire hartziekten en het gebruik als tumormarker is deze methode geoptimaliseerd op basis van LD₁. De methode is echter ook geschikt, zij het minder optimaal, voor de bepaling van de andere LD-iso-enzymen die in serum aanwezig zijn.

Principe

De onderstaande methode voor het meten van de katalytische activiteitsconcentratie van LD in serum is gebaseerd op de methode van Bais en Philcox (1). De methode is geoptimaliseerd voor wat betreft de substraatconcentratie, de pH en de keuze van N-methyl-D-glucamine als buffer. De reactie katalyseert de oxydatie van L(+)-lactaat in pyruvaat bij pH 9,4, gekoppeld aan een reductie van NAD⁺ in NADH.



De reactie wordt gevolgd door het monitoren van de toename van de absorptie van NADH bij 334 of 340 nm. Het evenwicht van de reactie ligt in de richting

van pyruvaat bij een pH groter dan 9. Het enzym vertoont absolute specificiteit voor de L(+)-isomeer. L(+)- α -OH-butyraat is ook een substraat, evenals sommige hogere α -OH-zuren.

Optimale reactiecondities

De condities zijn geoptimaliseerde reactiecondities, die gedefinieerd zijn als de condities die het gunstigst zijn zowel voor de kinetische reacties als voor de technische aspecten van de meting. Dit houdt in dat deze condities niet noodzakelijkerwijze maximale activiteit garanderen. Deze condities zijn de volgende:

N-methyl-D-glucamine	325	mmol/l
pH (37 °C)	9,40	
L(+)-lactaat	50	mmol/l
NAD ⁺	10	mmol/l
Volume fractie monster	0,0179	(1:56)

Meetcondities

De technisch meest gunstige meetcondities, rekening houdend met oplosbaarheid, stabiliteit en preïncubatie van de diverse componenten zowel als de aanpasbaarheid aan automatische uitvoeringen ervan zijn in onderstaande tabel weergegeven.

Temperatuur	37 ± 0,1 °C
Golflengte (bandbreedte)	334, 340 nm (≤ 2nm)
Lichtweg	10 ± 0,01 mm
Preïncubatietijd	180 seconden
Eerste meting na start	90 seconden.
Meetperiode	180 seconden.

Instrumentarium en uitrusting

Een spectrofotometer, bij voorkeur een zelfregistre- rende, met een bij 37 °C gethermostreerd cuvetten- huis is vereist voor een nauwkeurige meting bij 334 of 340 nm.

Specificaties van de uitrusting (b.v. monster- en reagensbehandeling, criteria gesteld aan de spectrofoto- meter en de wijze van temperatuurcontrole) moeten voldoen aan de criteria zoals beschreven in de aanbe- veling van de IFCC (3).

Reagentia

1. N-methyl-D-glucamine, C₇H₁₇NO₅, M_r 195,22
2. L(+)-lactaat, Li-zout, C₃H₅O₅Li, M_r 96,01
3. β -Nicotinamide adeninedinucleotide (vrije zuur), NAD⁺, C₂₁H₂₇N₇O₁₄P₂, M_r 663,4
4. Hydrochloride, HCl, M_r 36,46
5. Natriumchloride, NaCl, M_r 58,44

Zuiverheidscriteria

Specificaties met betrekking tot de zuiverheid van de reagentia moeten conform de criteria zijn, zoals gegeven in de IFCC-methode (3). N-methyl-D-glucamine moet de hoogste zuiverheid hebben die thans beschikbaar is (massafractie boven 0,99, een enkele piek geven bij gaschromatografie als trifluoro- en silylderivaten geanalyseerd met OV 1701 [0,2 mm x 25 m] fused silica capillaire kolom, temperatuurgradiënt 100 - 200 °C, 4 °C/seconde). Commercieel verkrijgbaar N-methyl-D-glucamine voldoet over het algemeen aan deze criteria. Het witte kristallijne poeder is enigszins hygroscopisch en moet worden bewaard onder N₂-gas, wanneer het voor langere tijd wordt opgeslagen.

Oplossingen en stabiliteit

Om de groei van micro-organismen te voorkomen, is het raadzaam om de reagentia te bereiden in steriel glaswerk. Alle oplossingen dienen gemaakt te worden in maatkolven, gekalibreerd bij de kalibratietemperatuur, met dubbel gedestilleerd water (steriel met een geleidbaarheid van 2 mS).

1. Oplossing I

N-Methyl-D-glucamine 364 mmol/l
L(+)-lactaat 56 mmol/l
Op pH 9,40 (37 °C) brengen met HCl 1 mol/l.
Deze oplossing is stabiel gedurende tenminste 5 weken bij 3 - 5 °C.

2. Oplossing II

NAD⁺ 112 mmol/l.
Deze oplossing is stabiel gedurende één week bij 3 - 5 °C.

3. Verdunningsoplossing

Natriumchloride 154 mmol/l
Deze oplossing lang houdbaar bij kamertemperatuur.

Monstername, -stabiliteit en -opslag

Bloed moet worden afgenomen door middel van een venapunctie, waarbij de stuwning slechts minimaal mag zijn en het ontstaan van hemolyse moet worden voorkomen in verband met de hoge LD-concentratie in erythrocyten. De bloedcellen dienen binnen 2 uur verwijderd te zijn van het serum. Het gebruik van plasma wordt ontraden aangezien plasma bloedplaatjes kan bevatten. Bloedplaatjes hebben een hoge concentratie van LD.

Meetprocedure

Bij iedere serie metingen dient de verandering van de absorptie van de reagensblanco ($\Delta A/\Delta t$)_{reagensblanco} afgetrokken te worden van de verandering van de absorptie van het totale reactiemengsel ($\Delta A/\Delta t$)_{totale mengsel}. De reagensblanco wordt gemeten onder dezelfde condities, waarbij oplossing III gebruikt wordt in plaats van het monster. Indien de toename van de absorptie van de reagensblanco hoger wordt dan 0,004 min⁻¹, dan dient oplossing II vernieuwd te worden. Het-

zelfde dient te gebeuren als de absorptie van de reagensblanco de waarde van 0,200 overschrijdt bij 340 of 334 nm.

Het verschil tussen de totale omzettingssnelheid en die van de reagensblanco is gelijk aan de gecorrigeerde omzettingssnelheid veroorzaakt door LD:

$$(\Delta A/\Delta t)_{\text{totale mengsel}} - (\Delta A/\Delta t)_{\text{reagensblanco}} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{enzym}}$$

Pipetteer in de cuvet	µl	Concentraties in het uiteindelijke reactiemengsel	
Oplossing I	500	N-methyl-D-glucamine L-lactaat pH	325 mmol/l 50 mmol/l 9,4
Monster	10	Volumefractie	0,0179 (1:56)
Meng goed zonder verlies van materiaal en incubeer tot de temperatuur van 37 ± 0,1 °C is bereikt (tenminste 3 minuten).			
Oplossing II	50	NAD ⁺	10 mmol/l
Meng goed. Meet na 90 seconden de toename van de absorptie gedurende 180 seconden.			

Meetcriteria

Wanneer de reactiesnelheid een absorptiestijging van 0,165 min⁻¹ bij 340 nm overeenkomend met een activiteit van 1800 U/l (30 µkat/l) overschrijdt, dan dient het monster exact verdund te worden met oplossing III. Bij de berekening dient dan rekening gehouden te worden met deze verdunningsfactor. Indien de verandering van de absorptie kleiner is dan 0,0007 min⁻¹ dient het monstervolume verhoogd te worden naar 20 µl. Hiermee dient rekening gehouden te worden bij de berekening van de activiteit.

Berekening

Onder de gegeven reactiecondities is:

- de molaire absorptiecoëfficiënt, ϵ , van NADH
 - bij 340 nm, 37 °C 630 m²/mol
 - bij 334 nm, 37 °C 618 m²/mol
- de lichtweg, (l) 0,01 m
- het totale reactievolume (V_t) 0,56 x 10⁻³ l
- het monstervolume (V_m) 0,01 x 10⁻³ l
- de toename van de absorptie ($\Delta A/\Delta t$)_{enzym} (Δt in min of in sec)

Uit de volgende vergelijking kan de katalytische activiteitsconcentratie (K_{ac}) worden berekend.

$$K_{ac} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{enzym}} * \frac{V_t}{\epsilon * l * V_m}$$

$$K_{ac} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{enzym}} * 9061 \text{ U/l (334 nm)}$$

$$K_{ac} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{enzym}} * 8889 \text{ U/l (340 nm)}$$

$$K_{ac} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{enzym}} * 151 \text{ µkat/l (334 nm)}$$

$$K_{ac} = (\Delta A/\Delta t)_{\text{enzym}} * 148 \text{ µkat/l (340 nm)}$$

De kat/l is gedefinieerd als de katalytische activiteitsconcentratie waarbij de snelheid van de vorming van het product gelijk is 1 mol. l⁻¹. sec⁻¹. Hierbij komt 1 U/l (1 μmol. l⁻¹. min⁻¹) overeen met 0,01667 μkat. l⁻¹ (1 μmol. l⁻¹. sec⁻¹).

Voorlopige referentiewaarden

In onderstaande tabel zijn voorlopige referentiewaarden gegeven voor de leeftijdsgroep van 20 - 60 jaar. Ieder laboratorium dient deze voorlopige referentiewaarden zelf te verifiëren.

Mannen	135 - 225 U/l	2,3 - 3,8 μkat/l
Vrouwen	135 - 215 U/l	2,3 - 3,6 μkat/l

Literatuur

1. Bais R, Philcox M. Approved Recommendation on IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes. Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem 1994; 32: 639-655.
2. NCCLS Document C3-A2, Approved Guideline. Preparation and testing of reagent water in the Clinical Laboratory Villanova, PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards 1991; 11(13).
3. Bowers jr GN, Bergmeyer HU, Hørder M, Moss DW. Approved recommendations of IFCC methods for the measurements of catalytic concentrations of enzymes, Part 1. General considerations 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.

Appendix

Enkele eigenschappen en andere gegevens van de buffer N-methyl-D-glucamine zijn gegeven in onderstaand schema

Status	Kristallijn wit poeder van zeer hoge zuiverheid (smeltpunt: 128-131 °C)
Zuivering	Niet noodzakelijk; gemakkelijk om te kristalliseren uit water
Beschikbaarheid	Gemakkelijk leverbaar product bij vele leveranciers
Metaalioncontrole	Niet nodig om metaalchelators toe te voegen om zeker te zijn van een optimale concentratie van zink en magnesium
Oplosbaarheid	Groot (583 g/l bij 20 °C in water)
PK-waarde	9,63 (37 °C) met een temperatuurafhankelijkheid van - 0.027 pH-eenheden / °C
Fosforylering	Matig; 75 % van de mate van fosforylering veroorzaakt door diethanolamine
Concentratie	Optimale condities zijn te realiseren
Iso-enzymbias	Identiek aan 2-amino-2-methyl-1-propanol
Initiëren van de reactie	Serum- en substraatstart geven dezelfde resultaten
Conversiesnelheid	Lineair in de tijd bij 37 °C

Lineariteit bij verdunning van het monster

Het meetbereik van de hierboven beschreven methode is lineair bij gebruik van een volume van 10 μl van een monster met een katalytische activiteitsconcentratie van 1800 U/l. Boven deze waarde moet het monster verdund worden of kan voor het gebruik van een kleiner monstervolume gekozen worden.

Bij een stapsgewijze verdunning van monsters met de hierbovengenoemde activiteit wordt tot en met een verdunningsfactor van 128 nog een lineair verband gevonden tussen de verdunningsfactor en de gemeten activiteit in het verdunde monster. Deze relatie geldt zowel voor monsters die verdund zijn met een normaal serummonster (na correctie voor de activiteit vastgesteld in het normale monster) als voor verdunning met een fysiologische zoutoplossing.

Het is niet raadzaam een monstervolume te kiezen dat kleiner is dan 6 μl.

Wijziging van het monstervolume

Experimenten zijn verricht waarbij het monstervolume gevarieerd werd van 6 μl tot en met 40 μl in een monster met een katalytische activiteitsconcentratie van ca. 2250 U/l. Een monstervolume van 40 μl is niet aan te bevelen aangezien de terugvinding slechts 81% bedraagt. Met een monstervolume variërend van 10 tot 40 μl wordt ook in sera met een normale katalytische activiteitsconcentratie een relatieve standaarddeviatie (%) gevonden, die varieert tussen de 1 en 6%. Voor sera met een pathologische activiteitsconcentratie van ca 2300 U/l is het aan te raden het monster te verdunnen i.p.v. een monstervolume te gebruiken kleiner dan 6 μl. Bij gebruik van bovengenoemd monster (ca. 2300 U/l) kon voor monstervolumina variërend tussen 6 en 40 μl uit de gemeten katalytische activiteitsconcentraties een relatieve standaarddeviatie worden berekend, die gelijk is aan 1%. Uit experimenten is vast komen te staan, dat bij gebruik van monsters met een katalytische activiteitsconcentratie tot ca. 1000 U/l, monstervolumina mogen variëren tussen 10 en 20 μl zonder dat dit resulteert in significante verschillen van de gemeten enzymactiviteit. Voor monsters die meer dan 1000 U/l bevatten kunnen ook volumina kleiner dan 10 μl worden gebruikt. Het is niet aan te bevelen veel lager te gaan dan een monstervolume van 6 μl.

Effect van het gebruik van een kalibrator

Meting van de LD-activiteit in de gebruikte kalibrator (Cfas, Calibrator for automated systems, Boehringer Mannheim) gaf een zeer goede reproduceerbaarheid te zien. In een monster met een normale activiteit en een met pathologische activiteit werden de gemeten activiteiten berekend op grond van de molaire absorptiecoëfficiënt en op grond van de activiteit van de kalibrator, gemeten onder dezelfde omstandigheden. De metingen werden uitgevoerd in twee verschillende laboratoria. Wanneer de activiteit gemeten wordt op grond van de molaire absorptiecoëfficiënt, dan werd bij gebruik van een normaal (ca. 120 U/l) en een pathologisch serum (ca. 2300 U/l) uit de gemeten activiteiten een relatieve standaarddeviatie berekend

variërend van 3,6 resp. 2,7 %. Wanneer de activiteiten berekend werden met behulp van de kalibratoractiviteit dan bedroegen deze percentages 2,4 en 0,6 %. Op grond hiervan zou geconcludeerd mogen worden dat gebruik van een kalibrator kan leiden tot verbetering van resultaten.

Advies

Het is aan te raden om voor het betreffende analytische instrument, dat in het betreffende laboratorium gebruikt wordt, de statistische parameters zoals reproduceerbaarheid, herhaalbaarheid, lineariteit, imprecisie etc. vast te stellen.