

# Kalibrace katalytických koncentrací enzymových aktivit rutinních enzymů v klinické biochemii pomocí primárních standardních roztoků na autoanalyzátoch (s příkladem pro ALP)

## Zpracoval:

Ing. Pavel Sedlák  
OKB MN Čáslav, Jeníkovská 348, 286 01 Čáslav

## Editor:

RNDr. Josef Kratochvíla  
SEKK, Za Pasáží 1609, 530 02 Pardubice

**Publikováno:** 27.4.2001

**Revize:** Minimalistická, dílčí revize provedena **2019** autorem v oblasti použitých jednotek, aktualizace použitých souprav výrobce ERBA-Lachema

## Obsah

Teoretický úvod, základní pojmy a zkratky, návrh řešení, literatura

Obecný návod postupu kalibrace

Praktický příklad pro analyzátor HITACHI 911

## Teoretický úvod

Přes nespornou přínosnou roli sérových enzymových kalibrátorů pro stanovení enzymů se stále více jeví nutností mít k dispozici jiný, firemně nezávislý a analyticky exaktní prostředek k získání kalibrační závislosti stanovení katalytické koncentrace enzymů, či k ověření deklarace atestu sérového enzymového kalibrátoru. Ve značení a atestech deklarací sérových firemních enzymových kalibrátorů nepanuje pořádek, systém a jednoznačnost, tyto většinou jen zohledňují úzké firemní zájmy vztahováním deklarací atestů k firemním kitům či přístrojům, a ne **jednoznačně k použité metodě stanovení**. Možné následky zásadního charakteru jsou již dokumentované např. organizátory SEKK. "Kauzy" jako  $\alpha$ -amyláza a nově i alkalická fosfatáza (ALP) jsou toho dokladem.

Klasický postup kalibrace výpočtem kalibračního faktoru přímo z molárního absorpčního koeficientu je sice exaktní, nicméně jeho platnost je podmíněna splněním optimalizačních podmínek (viz kalibrační faktor) a tyto podmínky není možno při práci na automatických analyzátoch běžně splnit. Popsaný variantní postup pro praxi eliminuje použití "přibližné" měřící vlnové délky, bichromatickou fotometrii a všechny vlivy zahrnutelné do "Instrument Factor", tj. zejména vlivy fotometru, kyvet a pipetovací a dávkovací jednotky. Princip spočívá v jednotném "hardwarovém" provedení kalibrace i vlastní analýzy a k získání kalibračního faktoru pak poslouží pouze "softwarová" modifikace kalibračního postupu. Jako příklady jsou uvedeny dva samostatné materiály. První představuje zjednodušený postup použitelný pro různé enzymy a metodické postupy jejich stanovení na různých typech biochemických analyzátorů, druhý naopak konkrétní praktický algoritmus kalibrace stanovení katalytické koncentrace ALP pro metodu DGKC "new 94" (ECCLS) s MEG puřem.

## Teoretická východiska

1. Lambert-Beerův zákon
2. Kinetické stanovení enzymatické aktivity
3. Pracovní, měřící a kalibrační režim konkrétního analyzátoru

## Seznam a vysvětlení použitých pojmů a zkratk

ALP = alkalická fosfatáza

$$F = \text{kalibrační faktor} = \frac{TV}{SV} \cdot \frac{10^{-3}}{\varepsilon \cdot 10^{-6}} \cdot \frac{1}{PL}$$

$\Delta A$  = změna (nárůst či úbytek) absorbance

$\Delta t$  = časový interval

TV = celkový reakční objem (objem vzorku + objem činidel) [ $\mu\text{L}$ ]

SV = objem vzorku [ $\mu\text{L}$ ]

$\varepsilon$  = molární absorpční koeficient [ $\text{m}^2/\text{mol}$ ]

PL = tloušťka kyvety (optická délka) [mm]

$\lambda$  = vlnová délka [nm]

MEG = N-metyl-D-glukamin

SW = software analyzátoru

$\rho\text{NP}$  = 4-nitrofenol

Klasický postup získání kalibračního faktoru (F) výpočtem pomocí molárního absorpčního koeficientu je sice teoreticky dostupný, prakticky je to ale v současné "éře biochemických analyzátorů" jen velmi těžko použitelný postup.

**Kalibrační faktor (F)** je faktor, kterým se násobí změna absorbance ( $\Delta A$ ) měřeného reakčního roztoku v daném časovém intervalu ( $\Delta t$ ) s cílem stanovit konečnou katalytickou koncentraci enzymu (ALP):

$$A = (\Delta A / \Delta t) [\text{min}^{-1}]$$

Katalytická koncentrace "K" v [ $\mu\text{kat/L}$ ]  $ALP = F \cdot A$ ; kde  $\Delta A$  je v případě ALP přírůstek absorbance v daném časovém intervalu ( $\Delta t$ ) nejčastěji 1 minuta či lépe 60 sekund.

**Teoretický kalibrační faktor** pro metodu s pufrém N-metyl-D-glukaminem (ECCLS či DGKC "new" 94) odpovídající vlnové délce 405 nm a optimálním reakčním podmínkám (1):

N-metyl-D-glukamin	500 mmol/L
pH (37 °C)	10,1
4-nitrofenylfosfát	20 mmol/L
Octan hořečnatý	0,5 mmol/L
Chlorid sodný	110 mmol/L
Objemový poměr séra (1 : 56)	0,0179

a měrným podmínkám (1):

Teplota měření	37 °C $\pm$ 0,1 °C
Vlnová délka	405 nm (spektrální pološířka $\leq$ 2 nm)
Tloušťka kyvety	10,0 $\pm$ 0,01 mm
Startér	4 nitrofenylfosfát
Preinkubace	do dosažení rovnováhy (> 300 s)
Čas prodlevy	60 s
Čas měření	90 s
Reagenční blank	nutný
Blank vzorku	není nutný

je roven

$$F = \frac{TV}{\varepsilon \cdot PL \cdot SV} = \frac{0,56 \cdot 10^{-3}}{1875 \cdot 0,01 \cdot 0,01 \cdot 10^{-3}} \cdot 16,67 = 49,78$$

(čísla uvedená výše určují objemové poměry a 1875 [ $\text{m}^2/\text{mol}$ ] je  $\varepsilon$  pro 4-nitrofenol při 405 nm a 37 °C a 16,67 přepočtový faktor na [ $\mu\text{kat/L}$ ])

Potom je určitá katalytická koncentrace ALP "K" = A . 49,78 [ $\mu\text{kat/L}$ ]

Pro hlubší podrobnosti viz původní citaci normalizace metody stanovení ALP (1). Většina optimálních metodických modifikací a firemních diagnostických souprav přibližně pracuje s kalibračním faktorem  $F = 50$  pro výše uvedené optimální podmínky (2).

#### Kritický rozbor

**TV, SV:** O aktuálním kvalitativním stavu pipetovacích a dávkovacích jednotek analyzátorů toho víme zpravidla méně, než je pro tento účel práce v objemech [ $\mu\text{L}$ ] nutné. Údaje o správnosti jsou pouze obecným údajem výrobce pro daný typ analyzátoru (často nejsou vůbec či jsou nedostatečně specifikované), kritický je zejména parametr SV, kdy pracujeme v objemech o řád nižších než pro dávkované objemy činidel R1 a R2, navíc se jedná o objem figurující ve fyzikálním rozměru jednotky stanovené katalytické koncentrace. Jakákoliv odchylka v SV se tedy dramaticky promítá do celkové chyby stanovení. Reprodukovatelnost (opakovatelnost) pipetování a dávkování analyzátoru však může být trvale pod naší kontrolou, čehož se v dalším pokusíme využít.

**e:** Hodnotu molárního absorpčního koeficientu příslušného substrátu, standardního roztoku či reakčního produktu sice lze tabelárně poměrně snadno a přesně zjistit, nicméně zpravidla pro poněkud jinou vlnovou délku, než při které je schopen měřit námi používaný analyzátor. Často též i pro jiné pH a vlastní teplotu stanovení. Navíc z praktických důvodů většinou používáme při práci na analyzátoch bichromatické měření (měření při dvou vlnových délkách), které výpočetní vztah jednak komplikuje a dále pak nám i prakticky znemožňuje exaktně určit hodnoty molárního absorpčního koeficientu při tabelárně nezajímavé vlnové délce či poměru vlnových délek.

**PL:** Ani znalost hodnot optické tloušťky kyvet analyzátoru není dostatečná, podezřelá je už i deklarace výrobce plastové kyvety např. "s přesností na celé milimetry i až na desetiny milimetru", navíc často bez uvedení přesné teploty měření, roztažnosti plastu aj. (v tomto ohledu jsme na tom u legendárního SPEKOLU byli lépe).

**I:** Platnost zákona pro měření je podmíněna monochromatickým světlem s přesností  $\lambda$  (spektrální pološířka  $\leq$  2 nm). O kvalitě monochromátoru fotometru analyzátoru máme k dispozici zpravidla opět pouze těžko prakticky ověřitelná technická data výrobce. Většina analyzátorů by navíc v případě přímého výpočtu F vyžadovala polychromatickou korekci.

#### Závěr

Dosazování číselných hodnot výše uvedených veličin do vzorce k výpočtu kalibrace pomocí molárního absorpčního koeficientu 4-nitrofenolu (pro ALP) se tedy nejvíce v našem případě jako použitelný postup vedoucí k získání věrohodného kalibračního faktoru s dostatečnou spolehlivostí.

#### Návrh řešení

Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem se nabízí jako schůdnější postup kalibrace použitím kalibračního roztoku substrátu či reakčního produktu v takovém režimu práce analyzátoru, který nám umožní eliminovat nesprávnost pipetovaných a dávkovaných objemů, nesprávnost funkce monochromátoru při použitých vlnových délkách, nesprávnost určení optické tloušťky kyvety atd. Jediným problémem je docílit potřebného složení měřeného roztoku v kyvetě analyzátoru, tj. činidel R1 + R2 a standardního roztoku (4–nitrofenolu) v odpovídajících objemových poměrech, jako jsme to dříve prováděli při manuálních postupech měření. Dále též přepočítat koncentraci měřeného substrátu či reakčního produktu (4–nitrofenolu) na odpovídající jednotky katalytické koncentrace stanoveného enzymu (ALP) a dále pokud

možno využít SW analyzátoru tak, aby toto nejen analyzátor sám provedl, ale vypočítal i výsledný kalibrační faktor korigovaný na tento právě použitý analyzátor faktorem přístroje "Instrument Factor".

Dále prezentovaný postup má tedy obecnou platnost, nejdůležitější podmínkou ale je získání základní chemikálie pro přípravu kalibračního roztoku v nejvyšším možném stupni čistoty (roztok 4-nitrofenolu či pevný 4-nitrofenol). Níže uvedený postup je vypracován a ověřen na řadě analyzátorů typu HITACHI (704, 705, 911), Abbott ARCHITECT i dalších, nicméně lze jej obecně uplatnit na většině u nás rutinně používaných typů "otevřených" analyzátorů\*.

Tento postup nemá být pokusem o náhradu či "vyloučení" současných sérových enzymových kalibrátorů, alespoň ne těch kvalitních. Nicméně je určité vhodné mít k dispozici pracovní nástroj pro naplnění hesla "Důvěřuj, ale prověřuj!", zvláště v současné době, kdy v řadě případů často převažují úzké firemní zájmy nad danými objektivními fakty.

Uvedené praktické příklady nejsou voleny náhodně. Stanovení katalytické koncentrace ALP metodou s MEG puřrem je typickým příkladem z rutinní praxe, kdy nedůslednost a nejednoznačnost ve značení metodických postupů v rámci systémů interního řízení jakosti na straně uživatelů a stejné nedostatky ve značení diagnostických kitů pro stanovení katalytické koncentrace ALP (zejména deklarací atestovaných hodnot v kalibračních a kontrolních materiálech) na straně výrobců vede ke zmatkům s možným přímým dopadem na zdraví pacienta.

Přitom metoda stanovení katalytické koncentrace ALP s MEG puřrem si oprávněně zaslouží důstojnější roli než do jaké se ne vlastní vinou v poslední době dostala (je to původní metoda českých autorů). Vznikla v Československu, byla oficiálně standardizována v Německu (DGKC "new 94") a Itálii (Ceriotti, Franzini), certifikována Americkou asociací klinické chemie (AACC). Vždy přitom byla i zdůrazněna její mimořádná robustnost (porovnejte problémy "IFCC metody" s puřrem 2-amino-2-metyl-1-propanolem ve Velké Británii (3)). Metodu poškozují absence atestovaných deklarací v sérových enzymových kalibrátorech a kontrolních materiálech, časté záměny s metodou "DGKC 72" či "metodou IFCC" a tím i nezodpovědné zařazování do metodické skupiny na straně účastníků mezilaboratorních porovnávacích zkoušek SEKK. Uvedený návod poskytuje možnost plné rehabilitace této metody.

## Literatura

1. Working Group on Enzymes: 1.Alkaline Phosphatase, Eur.J.Clin.Chem.Clin.Biochem., (1992) 30 247 – 256.
2. Friedecký B, Kratochvíla J, Malý M, Lapin A.: Diagnostic Kits Derived from Standard Method "DGKC 94" as a Potential Tool for Improvement of Analytical Standardization of Alkaline Phosphatase. Clin.Chem.Lab.Med., (1998) 36/6 405 – 406.
3. Lamb EJ, Browne H, John WG, Price CP: Alkaline Phosphatase activity measurement in the UK by AMP-buffered method. Ann.Clin.Biochem., (1998) 35 120 – 127.
4. Kolektiv autorů: Doporučené metody v klinické biochemii (Kap. 4 Enzymy – L.Zahradníček), Zdravotnické aktuality, Avicenum 1992.
5. Friedecký B: Katalytické koncentrace enzymů, FONS, 4/2000, 44 - 47.

---

## Obecný návod postupu kalibrace "otevřeného" analyzátoru při stanovení katalytické koncentrace enzymů (např. ALP) pomocí primárního kalibračního roztoku

### 1. Příprava kalibrace dvoučinnidlových postupů s R1, R2 (start substrátem)

#### A) Úprava aplikačního programu (SW):

Aplikační program dosud užívaný pro stanovení příslušného enzymu (ALP) musí splňovat co nejvíce podmínky definované pro manuální postup, popsány v metodice původní práce (IFCC, DGKC 94 atp.)

Není-li tomu tak, upravte všechny volitelné parametry automatizovaného pracovního postupu. Kompromisní volbu lze připustit jen v případech snížené flexibility použité instrumentace, a to pouze u parametrů, které neovlivňují zásadním způsobem vlastní měření, nebo jejich vliv eliminujeme zvoleným specifickým postupem kalibrace.

Kontrola reakční teploty je prvořadá (viz poznámka č. 9).

Obecně i v případě ALP je nutno dodržet objemový poměr sérum/reakční směs.

Takto korigovaný aplikační program užívaný pro stanovení příslušného enzymu v režimu kalibrace se sérovým kalibrátorem upravíme následovně:

1. Režim měření změníme z kinetiky (RATE) na END POINT.
2. Pipetované objemy vzorku i kalibrátoru, stejně jako dávkované objemy činidel R1 a R2 ponecháme beze změn.
3. Beze změn ponecháme i vlnovou délku fotometrie. (Nejlépe absorpční maximum či vynucený kompromis dle bodu A, v případě bichromatického měření primární i vhodně volenou sekundární).
4. U komfortnějších SW zvážíme úpravu kritérií pro absorbance BLANKu, SD, DUPLICAT LIMIT, SENZITIVITY LIMIT atp.

#### B) Přepočítání koncentrace kalibračního roztoku na vyjádření odpovídající aktivity stanovovaného enzymu:

Vyjdeme ze znalosti dvou premis:

1. Definice jednotky – katal (kat) a z ní odvozené jednotky  $\mu\text{kat}$
2. Znalosti měřicího režimu konkrétního analyzátoru (vyjadřování a použití  $\Delta A$  v kalibračním režimu)

#### Příklad pro ALP:

(Jako kalibrační roztok bude použit roztok 4-nitrofenolu, coby reakční produkt)

Pokud jako standard použijeme roztok pNP o koncentraci 2,4 mmol/L 4-nitrofenolu (pNP) (vlastní příprava:

0,006677 g 4-nitrofenolu a 0,01 g disodné soli kyseliny etyléndiamintetraoctové (EDTA) rozpustíme v destilované vodě, doplníme do 200 mL), platí:

ad 1)  $\mu\text{kat} = \mu\text{mol/s}$

ad 2) použitý analyzátor např. při režimu RATE vyjadřuje  $\text{DA} \cdot \text{min}^{-1}$

pak:  $2,4 \text{ mmol/L} = 2400 \text{ } \mu\text{mol/L}$  pNP, a to odpovídá katalytické koncentraci  $2400/60 = 40,00 \text{ } \mu\text{kat/L}$   
Do SW analyzátoru tedy zadáme koncentraci standardu jako: S2 CONC. = 40,00 ( $\mu\text{kat/L}$ )

### C) Úprava konfigurace činidel a kalibračních roztoků v analyzátoru:

Zásadně použijeme v analyzátoru čerstvě připravená činidla (viz poznámka č. 12), totéž platí o standardním roztoku pNP (viz poznámka č. 2)!

- Činidlo R1 (pufr) ponecháme stejně jako pro rutinní provoz.
- Činidlo R2 (substrát) nahradíme destilovanou vodou (nejlépe totožnou s vodou použitou pro přípravu substrátu).
- Blank: 0,9 % NaCl.
- Jako standardní roztok použijeme v našem případě roztok pNP o koncentraci 2,4 mmol/L 4-nitrofenolu (pNP).

## 2. Vlastní kalibrace dvoučinidlových postupů s R1, R2 (start substrátem)

### D) Dvoubodová kalibrace (Blank + Standard) v režimu END POINT:

- Spustíme dvoubodovou kalibraci analyzátoru (BLANK-S1 a STANDARD-S2).
- Analyzátor poskytne hodnotu kalibračního faktoru F. Takto získaný F lze použít pro rutinní provoz, zohledňuje všechny vlivy použité instrumentace (zahrnuje Instrument Factor) (pipetování, dávkování, objemové poměry, fotometrii - vlnovou délku(y), optickou dráhu - kyvetu atd.).

### E) Korekce kalibrace:

- Aplikační program upravíme zpět do původního stavu (tj. režim RATE, + odstraníme případné další provedené změny dle bodu A 4).
- Vrátime substrát jako R2.
- Spustíme jednobodovou kalibraci analyzátoru (pouze BLANK!). Analyzátor poskytne hodnotu korekce na samovolný rozpad substrátu. Touto hodnotou  $\Delta A/\Delta t$  pro BLANK bude korigovat všechna rutinní měření, proto tuto kalibraci opakujeme v rutinním provozu např. denně, zatímco kalibrační faktor F získaný v bodě D) neměníme.

## 3. Rutinní stanovení dvoučinidlovým postupem s R1, R2 (start substrátem)

### F) Úprava aplikačního programu pro rutinní provoz:

- Nutná je zpětná úprava aplikace, tj. dle bodu E.
- Je vhodné upravit aplikační SW do modifikace jednobodového kalibračního režimu (pouze BLANK).
- Kalibrační funkce získaná tímto modifikovaným postupem je vhodná pro rutinní provoz, kontrolu nejasných a blíže nespecifikovaných deklarací katalytických koncentrací (aktivit) enzymů v neproverěných kontrolních a kalibračních materiálech. Je individuálně platná pro použitý analyzátor. Správně provedená se může stát nástrojem unifikace s některými přednostmi oproti použití sérového enzymového kalibrátoru.

### Upozornění (závislé na typu analyzátoru):

Je nutno dodržet zadání koncentrace BLANKU (0,00) i pNP při kalibraci na stejný počet desetinných míst jako při rutinním provozu (řídíme se pravidlem, která koncentrace určuje u daného analyzátoru počet desetinných míst ve výsledku). Jinak obdržíme faktor F s řádovou odlišností!

### Poznámky:

1. Kalibrace s kalibračním roztokem je sice provedena v dubletu, tripletu či dle volby u konkrétního typu analyzátoru, přesto je vhodné kalibraci provést opakovaně, z obdržení F použít průměr.
2. Pozor, standardní roztok pNP se na vzduchu oxiduje, proto při kalibraci používejte jen čerstvý roztok pNP, právě otevřenou ampuli pNP, minimalizujte časovou expozici standardního roztoku v otevřeném kepu.
3. Kalibraci s kalibračním roztokem je vhodné či nutné opakovat v případě servisních zásahů do fotometrické, pipetovací či dávkovací jednotky (výměna halogenové lampy, čištění optiky atp.), rovněž při případné SW změně pipetovaných a dávkovaných objemů v aplikaci.
4. Podmínkou nutnou pro získání adekvátní kalibrační funkce je, stejně jako v případě kalibrace pomocí sérových kalibrátorů, dobrý technický stav analyzátoru ve smyslu opakovatelnosti (reprodukovatelnosti) měření. Nástroje pro kontrolu tohoto parametru máme u analyzátorů běžně k dispozici.
5. Kalibraci s kalibračním roztokem není nutné opakovat v poměrně dlouhém časovém intervalu, ve kterém analyzátor vykazuje dobrou reprodukovatelnost.
6. Ke kalibraci lze, kromě komerčních roztoků dodávaných některými výrobci, použít i vlastní roztoky připravené pomocí vlastních navážek.
7. Dostatečně čistá surovina pro přípravu kalibračního roztoku je nutnou podmínkou (4-nitrofenol by měl mít molární absorpční koeficient  $1838,0 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{m}^2$ , měřeno jako jeho absorbance v 10 mmol/L roztoku NaOH při 401 nm, 20 °C). Je nutno počítat s omezenou stabilitou, disociačními konstantami, pH a dalšími limitujícími vlivy v jednotlivých konkrétních případech kalibračních roztoků. Z tohoto důvodu lze i preferovat komerčně dodávané přípravky (je zde zohledněn účel použití; v přípravě je i plnění pod dusíkovou atmosférou, bezuzávěrové obaly - ampule).
8. Nutná je i vhodná volba koncentrace použitého kalibračního roztoku tak, aby v daném režimu kalibrace poskytoval optimální odezvu fotometrického signálu. (Pro stanovení katalytické koncentrace ALP např. 2,4 mmol/L pNP – ampule ERBA-Lachema; méně vhodný je naopak SOLUNORM FOTO ERBA-Lachema.)
9. Podmínkou platnosti kalibrace je dodržení reakční teploty shodné pro kalibraci kalibračním roztokem i rutinní stanovení a současně deklarovanou hodnotu teploty pro referenční interval, tj.  $T = 37 \text{ } ^\circ\text{C}$ . Je nutné prověřit teplotu měření v kyvetě (inkubační lázni) nejen na obrazovce analyzátoru, ale i vlastním měřením pomocí přesného teploměru s požadovanou přesností na minimálně  $\pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$  ( $\pm 0,05 \text{ } ^\circ\text{C}$  dle DGKC), což je plně v našich možnostech i možnostech analyzátorů. Teplota má vliv nejen na rychlost reakce (pro RATE), ale i na molární

- absorpční koeficient pNP (pro END POINT i RATE), rovněž na pH reakční směsi v obou případech. Případný větší rozdíl reakční teploty je nepřijatelný a je nutno jej řešit servisním zásahem.
10. Pokud systém vnitřního řízení jakosti signalizuje trend v odchylce od cílových hodnot, opakujeme kalibraci.
  11. Pokud opakovaná kalibrace neřeší problémy vnitřního řízení jakosti, jedná se zpravidla o závadu v kvalitě používaných činidel (viz [poznámka č. 12](#)).
  12. V případě ALP DGKC "new 94":  
U R1-MEG pufru dochází v otevřených nádobkách analyzátoru ke snižování pH o cca 0,02 jednotek za den s odpovídajícím dopadem na změnu rychlosti reakce, u R2-substrátu dochází k samovolnému rozpadu na 4-nitrofenol (žloutnutí) a fosfát, který je jinak významným inhibátorem průběhu reakce. Proto jsou údaje výrobce o stabilitě činidel závazné, i když zdánlivá použitelnost se jeví delší (viz [poznámka č. 13](#))!
  13. Systém interního řízení jakosti v případě použití této kalibrační metody s relativně dlouhodobě neměnným F podstatně citlivěji signalizuje měnící se kvalitu činidel (viz [poznámka č. 12](#)), než jsme byli zvyklí při kalibraci přes sérový kalibrátor. Tam jsme častou rekalibrací "zdánlivě vylepšili" kalibrační funkci. Jakákoliv změna činidel však představuje stav, kdy již nepracujeme standardizovanou metodou, ale její blíže nedefinovanou modifikací!  
Změna kalibračního faktoru, nepodložená změnou reakční teploty (viz [poznámka č. 9](#)) či změněným technickým stavem analyzátoru, signalizuje zpravidla změnu (viz [poznámka č. 12](#)) reakčních podmínek (pH, atp. pro R1, rozložený substrát pro R2) a je jasným signálem obrátit naši pozornost tímto směrem. Stabilita substrátu (pro ALP) je kritická i z jiného pohledu, poněvadž během jeho stárnutí se snižuje měrný rozsah stanovení. Tento problém lze ošetřit v SW většiny analyzátorů kontrolou absorbance REAGENT BLANKU, kontrola kvality pufru ale zůstává vždy jen na obsluze.
  14. \*Ani "uzavřené" analytické systémy nejsou bez šance aplikovat tento modifikovaný postup kalibrace. V zásadě jsou dvě možnosti:
    - a. K výpočtu kalibračního faktoru použít výpis naměřených absorbancí z režimu kalibrace, kdy ponecháme firemní SW aplikaci (včetně režimu RATE) a provedeme pouze potřebnou výměnu činidel (R2, standard pNP), výpočet F manuálně, korekci na BLANK již na rutinní aplikaci.
    - b. Ve firemních aplikacích vyhledáme vhodnou aplikaci END POINT pro jiný analyt, kde zajistíme shodu pipetovaných a dávkovaných objemů, vlnových délek atd., kterou využijeme pro pomocnou kalibraci.

## Závěr

- Z uvedeného jasně vyplývá poměrně univerzální použitelnost kalibračního postupu za použití primárního kalibračního roztoku. Univerzálnost jde dokonce tak daleko, že např. pro stanovení katalytické koncentrace ALP lze získat při použití stejného pipetovacího, dávkovacího a měřicího fotometrického schématu aplikací na totožném analyzátoru, identický kalibrační faktor F pro metodiky ALP "IFCC", DGKC "new 94" i DGKC 72 (pouhou výměnou činidel můžeme přecházet z metodiky na metodiku bez nutnosti kalibrace). Postup je i nástrojem řešení např. pro zajištění "souběhu" dvou analyzátorů v rutinním provozu s paralelním spektrem prováděných metod (statimový a rutinní přístroj), poněvadž takto lze určit obecně platný korekční Instrument Factor atd.
- Cílem není náhrada dnes již zavedených rutinních sérových enzymových kalibrátorů, nýbrž získání na nich nezávislého exaktního kalibračního postupu pro analyzátor, který nám umožňuje provedení kalibrace tak, jak jsme to mohli provádět jen v době převážně manuálních postupů měření.
- Je na každém analytikovi, aby se znalostí "svého" analyzátoru aplikoval výše uvedený obecný postup kalibrace a využil tak získanou "částečnou nezávislost" na sérových enzymových kalibrátorech ku prospěchu svého pracoviště. Výše uvedený postup pak též umožňuje vhodně kombinovat oba kalibrační postupy (kalibrace pomocí standardního roztoku a kalibrace pomocí sérových enzymových kalibrátorů).
- Eventuální další informace k postupům kalibrace rád poskytne autor textu.

---

## Praktický příklad pro analyzátor HITACHI 911

Kit: ERBA-Lachema, BLT Alkalická fosfatáza MEG (ALP MEG 500), Kat.č.00005

(Normovaná metoda dle DGKC "new 94")

Princip metody: Alkalická fosfatáza štěpí v prostředí glukaminového pufru 4-nitrofenylfosfát na fosfát a 4-nitrofenol, jehož nárůst absorbance je měřen kineticky.

Princip kalibrace: Jedná se o variantu kalibrace standardním roztokem *p*-nitrofenolu, při které není nutné znát jeho tabelární hodnotu molárního absorpčního koeficientu pro použitou vlnovou délku, faktické pipetované a dávkované objemy a konkrétní parametry fotometru při vlastním stanovení. Výpočet kalibračního faktoru F je proveden automaticky pomocí SW.

Postup kalibrace:

1. Aplikáční program ([tabulka 1](#)) pro ALP upravíme do následujícího tvaru ([tabulka 2](#))
2. Provozní činidlo R3 (substrát) nahradíme destilovanou vodou.
3. Pokud jako standard použijeme roztok pNP z BLT ALP 120. Kat.č. 10003197 (ERBA-Lachema) o koncentraci 2,4 mmol/L pNP, zadáme S2 CONC. = 40,00 [μkat/L]  
Pokud jako standard použijeme roztok č.3 pNP z SOLUNORM FOTO o koncentraci 62,9 μmol L<sup>-1</sup> pNP, zadáme S2 CONC = 1,0483 [μkat/L]
4. Blank: Destilovaná voda systému H911 nebo 0,9 % NaCl.
5. Spustíme dvoubodovou kalibraci v režimu END POINT ([tabulka 2](#)), H911 poskytne hodnotu kalibračního faktoru F. Takto získaný F lze použít pro rutinní provoz ALP, zohledňuje všechny vlivy použité instrumentace H911 (pipetování, dávkování, objemové poměry, fotometrii-vlnovou délku, květu atd.).

6. Aplikační program vrátíme do tvaru (tabulka 1), případně upravíme viz (tabulka 3)
7. Vrátime substrát jako R3.
8. Spustíme jednobodovou kalibraci v RATE A režimu (tabulka 3) a to pouze pro BLANK. Tímto provedeme korekci na samovolný rozpad substrátu, BLANK - kalibraci opakujeme např. denně, zatímco kalibrační faktor F, získaný dle bodu 5. neměníme.

#### Upozornění:

Je nutné dodržet zadání koncentrace BLANKU (0,00) na stejný počet desetinných míst jako při rutinním stanovení katalytické koncentrace ALP! Jinak obdržíme kalibrační faktor F s řádovou odlišností!!

**Tabulka 1:** Příklad rutinní aplikace kalibrace s pomocí sérového kalibrátoru:

HITACHI 911										
CHEMISTRY PARAMETERS										
TEST	[ALP]	[##]	TEST NAME				[ALP]	UNIT	[ukat/l]	
DATA MODE			[ON BOARD]	REPORT	NAME	[Alkalická Fosfatasa]				
QC RUN INTERVALL		[#]				Instrument Factor	(Y=aX+b) a	[1.000]		
							b	[0.000]		
EXPECTED VALUE			< SERUM >			EXPECTED VALUE < URINE >				
AGE			M		F					
[100]	[Y]	[0]	- [100]	[0]	- [100]	[0]				- [0]
[100]	[Y]	[0]	- [100]	[0]	- [100]					
		[0,73]	- [2,60]	[0,62]	- [2,40]					
TECHNICAL LIMIT			< SERUM >		< URINE >					
			[0]	- [18,00]	[0]	- [0]				
STD	CONC	POS.	SAMPLE PRE.		DIL. CALIB.		Lot.No.	QUALITATIVE [NO]		
(1)	[0.00]	#	[5]	[0]	[0]	[017]	000001	(1)	[0]	[■]
(2)	[*]	#	[5]	[0]	[0]	[#]	000002	(2)	[0]	[■]
(3)	[ ]		[10]	[0]	[0]	[##]	000000	(3)	[0]	[■]
(4)	[ ]		[10]	[0]	[0]	[##]	000000	(4)	[0]	[■]
(5)	[ ]		[10]	[0]	[0]	[##]	000000	(5)	[0]	[■]
(6)	[ ]		[10]	[0]	[0]	[##]	000000	(6)	[0]	[■]

TEST	[ALP]									
ASSAY CODE	[RATE-A]	[10]	[■]		WAVELENGTH	(2nd / Primary)	[660] / [415]			
ASSAY POINT	[19]- [31]	-[0] - [0]			Diluent/Rgt/Stability	[017]	/ [#]			
		< SERUM >			< URINE >					
S.VOL (NORMAL)	[5]	[0]	[0]	[10]	[0]	[0]				
S.VOL (DECREASE)	[3]	[0]	[0]	[10]	[0]	[0]				
S.VOL (INCREASE)	[10]	[0]	[0]	[10]	[0]	[0]				
ABS.LIMIT	[19000]			[0]						[INCREASE]
PROZONE LIMIT	[32000]			[0]						[UPPER]
REAGENT	R1	[250]	[0]	[##]	[0]					
	R2	[0]	[0]	[##]	[0]					
	R3	[25]	[0]	[##]	[0]					
	R4	[0]	[0]	[##]	[0]					
Calibration Type	[LINEAR]	[2]	[2]	[0]	[■]					
AUTO TIME OUT BLANK		[0]			SD LIMIT	[0.1]				
	SPAN	[0]			DUPLICATE LIMIT	[20]				
	2 POINT	[0]			SENSITIVITY LIMIT	[0]				
	FULL	[0]			S1 ABS. LIMIT	[-32000] [32000]				
AUTO CHANGE OF LOT		[CANCEL]			COMPENSATED LIMIT	[ ]				
CHANGE OF BOTTLE		[CANCEL]								

# Volí uživatel

\* Zadáme deklarovanou hodnotu použitého sérového enzymového kalibrátoru

## Volí uživatel v rozsahu 00361-00400 pro volně programovatelné metody

**Tabulka 2: Modifikace pro kalibraci s pNP (2,4 mmol/L)**

HITACHI 911											
CHEMISTRY PARAMETERS											
TEST	[ALP]	[##]	TEST NAME				[ALP]	UNIT	[ukat/l]		
DATA MODE			[ON BOARD]	REPORT	NAME	[Alkalická Fosfatasa]					
QC RUN INTERVALL		[#]				Instrument Factor	(Y=aX+b) a	[1.000]			
							b	[0.000]			
EXPECTED VALUE			< SERUM >			EXPECTED VALUE < URINE >					
AGE			M		F						
[100]	[Y]	[0]	[100]	[0]	- [100]	[0]				- [0]	
[100]	[Y]	[0]	[100]	[0]	- [100]						
		[0,73]	[2,60]	[0,62]	- [2,40]						
TECHNICAL LIMIT			< SERUM >			< URINE >					
			[0]	[18,00]	[0]	[0]					
STD	CONC	POS.	SAMPLE PRE.		DIL. CALIB.		Lot.No.	QUALITATIVE [NO]			
(1)	[0,00]	#	[5]	[0]	[0]	[017]	000001	(1)	[0]	[#]	
(2)	[40,00]*	#	[5]	[0]	[0]	[#]	000002	(2)	[0]	[#]	
(3)	[ ]		[10]	[0]	[0]	[##]	000000	(3)	[0]	[#]	
(4)	[ ]		[10]	[0]	[0]	[##]	000000	(4)	[0]	[#]	
(5)	[ ]		[10]	[0]	[0]	[##]	000000	(5)	[0]	[#]	
(6)	[ ]		[10]	[0]	[0]	[##]	000000	(6)	[0]	[#]	

TEST	[ALP]									
ASSAY CODE	[1 Point]	[10]	[#]			WAVELENGTH	(2 <sup>nd</sup> / Primary)	[660] / [415]		
ASSAY POINT	[31]- [0]	-[0] - [0]				Diluent/Rgt/Stability	[017]	/ [#]		
		< SERUM >			< URINE >					
S.VOL (NORMAL)	[5]	[0]	[0]	[10]	[0]	[0]				
S.VOL (DECREASE)	[3]	[0]	[0]	[10]	[0]	[0]				
S.VOL (INCREASE)	[10]	[0]	[0]	[10]	[0]	[0]				
ABS.LIMIT	[32000]			[0]					[INCREASE]	
PROZONE LIMIT	[32000]			[0]					[UPPER]	
REAGENT	R1 [250]	[0]	[#]	[0]						
	R2 [0]	[0]	[#]	[0]						
	R3 [25]	[0]	[#]	[0]						
	R4 [0]	[0]	[#]	[0]						
Calibration Type	[LINEAR]	[2]	[2]	[0]	[#]					
AUTO TIME OUT BLANK		[0]				SD LIMIT	[0,1]			
	SPAN	[0]				DUPLICATE LIMIT	[200]			
	2 POINT	[0]				SENSITIVITY LIMIT	[0]			
	FULL	[0]				S1 ABS. LIMIT	[-32000] [32000]			
AUTO CHANGE OF LOT	[CANCEL]					COMPENSATED LIMIT	[ ]			
CHANGE OF BOTTLE	[CANCEL]									

# Volí uživatel

\* Zadáme přepočtenou hodnotu použitého roztoku pNP (př. pro 2,4 mmol/L pNP)

## Volí uživatel v rozsahu 00361-00400 pro volně programovatelné metody

**Tabulka 3: Modifikace pro následný rutinní provoz**

HITACHI 911										
CHEMISTRY PARAMETERS										
TEST	[ALP]	[###]	TEST NAME				[ALP]	UNIT	[ukat/l]	
DATA MODE	[ONBOARD]		REPORT	NAME		[Alkalická Fosfatasa]				
QC RUN INTERVALL	[#]		Instrument Factor				(Y=aX+b) a	[1.000]		
EXPECTED VALUE		< SERUM >			EXPECTED VALUE < URINE >					
AGE		M			F					
[100]	[Y]	[0]-	[100]	[0]	- [100]	[0]	-[0]			
[100]	[Y]	[0]-	[100]	[0]	- [100]					
		[0,73]-	[2,60]	[0,62]	- [2,40]					
TECHNICAL LIMIT		< SERUM >			< URINE >					
		[0]-	[18,00]	[0]-	[0]					
STD	CONC	POS.	SAMPLE PRE.		DIL. CALIB.		Lot.No.	QUALITATIVE [NO]		
(1)	[0.00]	#	[5]	[0]	[0]	[017]	000001	(1)	[0] [■]	
(2)	[ ]		[10]	[0]	[0]	[##]	000000	(2)	[0] [■]	
(3)	[ ]		[10]	[0]	[0]	[##]	000000	(3)	[0] [■]	
(4)	[ ]		[10]	[0]	[0]	[##]	000000	(4)	[0] [■]	
(5)	[ ]		[10]	[0]	[0]	[##]	000000	(5)	[0] [■]	
(6)	[ ]		[10]	[0]	[0]	[##]	000000	(6)	[0] [■]	

TEST	[ALP]					WAVELENGTH	(2nd / Primary)	
ASSAY CODE	[RATE- A]	[10]	[■]			[660]	/	[415]
ASSAY POINT	[19]- [31]	[-0] - [0]			Diluent/Rgt/Stability	[017]	/	[#]
		< SERUM >			< URINE >			
S.VOL (NORMAL)	[5]	[0]	[0]	[10]	[0]	[0]		
S.VOL (DECREASE)	[3]	[0]	[0]	[10]	[0]	[0]		
S.VOL (INCREASE)	[10]	[0]	[0]	[10]	[0]	[0]		
ABS.LIMIT	[19000]			[0]	[INCREASE]			
PROZONE LIMIT	[32000]			[0]	[UPPER]			
REAGENT	R1	[250]	[0]	[##]	[0]			
	R2	[0]	[0]	[##]	[0]			
	R3	[25]	[0]	[##]	[0]			
	R4	[0]	[0]	[##]	[0]			
Calibration Type	[LINEAR]	[1]	[0]	[0]	[■]			
AUTO TIME OUT BLANK			[0]			SD LIMIT	[0.1]	
	SPAN			[0]	DUPLICATE LIMIT		[20]	
	2 POINT			[0]	SENSITIVITY LIMIT		[0]	
	FULL			[0]	S1 ABS. LIMIT		[-32000] [32000]	
AUTO CHANGE OF LOT			[CANCEL]			COMPENSATED LIMIT	[ ]	
CHANGE OF BOTTLE			[CANCEL]					

# Volí uživatel

## Volí uživatel v rozsahu 00361-00400 pro volně programovatelné metody