

JCCLS による酵素活性測定 of 標準操作法(SOP) (Ver.1.1) -IFCC 基準測定操作法準拠-

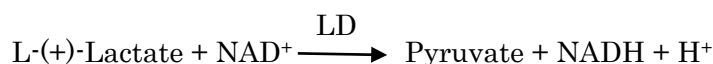
乳酸脱水素酵素 (LD)

[L-Lactate: NAD⁺ Oxidoreductase (LD), EC 1.1.1.27]

文 献

- 1) IBais R, Philcox M. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) : Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. Part 8. IFCC method for lactate dehydrogenase, Eur J Clin Chem Clin Biochem, 32:639-55, 1994.
- 2) International Federation Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) : IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C . Part 3. Reference Procedure for the Measurement of Catalytic Concentration of Lactate Dehydrogenase, Clin Chem Lab Med, 40(6):643-648, 2002.
- 3) International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) – IFCC Scientific Division : IFCC reference procedures for measurement of the catalytic concentrations of enzymes: corrigendum, notes and useful advice, Clin Chem Lab Med, 48(5):615-621, 2010.

反応原理



試 料

常用参照標準物質 : JSCC 常用酵素 CRM-001

反応混合液最終濃度

N-Methyl-D-glucamine	325 mmol/L
pH (37°C)	9.40 ± 0.05 ^(注)
L-(+)-Lactate	50 mmol/L
β-NAD ⁺	10 mmol/L
(free acid : 3.15 mmol/)	
(lithium salt : 6.85 mmol/l)	
試料対試薬容量比	0.0435 (1:23)

注 : 拡張不確かさ(k=2)

測定条件 (用手法)

反応温度	37.0 °C ± 0.1°C
波 長	339 nm ± 1 nm ^(注)
スペクトル半値幅	≤ 2 nm
光路長	10.00 mm ± 0.01 mm ^(注)
加温時間	180 秒
ディレイタイム	90 秒
測光時間	180 秒
測光ポイント数	≥ 6

注 : 拡張不確かさ(k=2)

試薬調製

(1) 試薬 I

373.8 mmol/L の N-Methyl-D-glucamine と 57.50 mmol/L の乳酸（単リチウム塩）を含む溶液 100 mL の調製。

- ・ N-Methyl-D-glucamine 7.30 g と乳酸単リチウム塩 0.552 g を秤量し、ビーカーに入れる。
- ・ 約 80 mL の脱イオン水で溶解する。
- ・ 37°C に保った状態で 2 mol/L HCL 溶液で pH9.4 に調整する。
- ・ 100 mL のメスフラスコに移す。
- ・ メスフラスコと水を 20°C にする。
- ・ 20°C でメスフラスコの標線まで脱イオン水を加える。

2~8°Cでの安定性：3ヶ月

(3) 試薬 II

36.23 mmol/L の NAD (free acid) と 78.78 mmol/L の NAD (lithium salt, dihydrate) を含む溶液 10 mL の調整。

- ・ NAD (free acid) 0.240g と NAD (lithium salt, dihydrate) 0.556 g を秤量し、ビーカーに入れる。
- ・ 脱イオン水約 6mL で溶解する。
- ・ 10 mL のメスフラスコに移す。
- ・ メスフラスコと水を 20°C にする。
- ・ 20°C でメスフラスコの標線まで脱イオン水を加える。

2~8°Cでの安定性：1週間

コメント：NAD (lithium salt, dihydrate) の入手が困難な場合は NAD (free acid) を用いて次のように調製する³⁾。

- ・ 78.78 mmol/L 水酸化リチウム 1 水和物 (LiOH·H₂O、分子量 41.96) 溶液の調製：LiOH·H₂O 66.11 mg を秤量して脱イオン水で溶解して 20 mL とする。
- ・ NAD (free acid) 0.763g を秤量し、脱イオン水の代わりに 78.78 mmol/L 水酸化リチウム溶液で溶解して全量を 10 mL とする。

分析パラメーター

表 1 に分析パラメーターを示す。

表 1 分析パラメーター

	用手法	自動分析法
	日立 U3900 の場合	日立 7180 の場合
測定温度 (°C)	37.0±0.1	37.0±0.1
試料 (μl)	100	10
試薬 I (μl)	2000	200
試薬 II (μl)	200	20
総量 (μl)	2300	230
S/V	1/23	1/23
波長(nm)	339	(主/副)：340/405
測光ポイント	90 秒待ったのち 180 秒間吸光度変化測定	22-27

注：自動分析法では、必要に応じて試薬に界面活性剤トリトン X-100 などを終濃度で 0.05% 程度添加する。

測定操作法（用手法）

表 2 に測定操作法（用手法）を示す。

表 2 測定操作法

試薬 I	2.000 mL
	攪拌しながら37℃になるまで予備加温
検体	0.100 mL
	攪拌しながら180秒間加温
試薬 II (37.0℃に予備加温)	0.200 mL
	37℃±0.1℃で攪拌し90秒間の待ち時間
	波長399nmで180秒間吸光度変化を測定 (ΔA 1 / 分)

試薬ブランク (ΔA 2 / 分) は生理食塩水を検体として同様に測定

活性値算出

測定された ΔA 1 / 分および ΔA 2 / 分を次式に代入して、Ld 活性を計算する。
ただし、試薬・試料容量は実測値を代入して計算する。

$$\text{LD 活性(U/L)} = \frac{(\Delta A 1 / \text{分} - \Delta A 2 / \text{分})}{6300} \times \frac{2.300}{0.100} \times 10^6$$