

kód 11003 20 testů

VANILMANDELIC ACID

SKLADOVÁNÍ PŘI 15-30°C

Reagenty pro měření koncentrace Vanilmandlové kyseliny
Pouze pro laboratorní *in vitro* diagnostiku**VANILMANDLOVÁ KYSELINA**
Chromatografie-spektrofotometrie**PRINCIP METODY**Kyselina vanilmandlová (VMA) je zachycena na anexové – pryskyřici, interferující látky se promýváním vyplaví a navázaná VMA je poté uvolněna z povrchu pryskyřice. VMA se stanovuje spektrofotometricky jako vanilin po předchozí oxidaci v alkalickém prostředí^{1,2,3}.**OBSAH A SLOŽENÍ**

- Reagent 1.** 1 x 25 ml. Fosforečnan sodný - pufr 0,6 mol/L, azid sodný 15 mmol/L, pH 7,0.
- Reagent 2.** 1 x 120 ml. Octan sodný - pufr 0,2 mol/L, pH 6,1, azid sodný 15 mmol/L.
- Reagent 3.** 1 x 170 ml. Chlorid sodný 2 mol/L, azid sodný 15 mmol/L.
- Mikrokolony** 1 x 20 kusů. Obsahují navážené množství pufovaného anexu- pryskyřice a azid sodný 1,5 mmol/L.

- A. Reagent A.** 1 x 30 ml. Uhlíčan draselný 3 mol/L.
Škodlivý (Xn). R 22: Škodlivý při požití - Nepipetujte ústy. R 36 / 37 / 38: Dráždí oči, dýchací cesty a pokožku. S 22: Nedýchejte prachové částice. S 26: V případě zasažení očí, nebo potřísnění pokožky, omyjte postižené místo pod tekoucí vodou a vyhledejte neprodleně lékařské ošetření
- B. Reagent B.** Pro přípravu 10 ml. Jodistan sodný (m-periodát) práškový, 0,12 mol/l - po rekonstituci.
Oxidující (O): R8: Při kontaktu s hořlavými materiály může způsobit požár.
- C. Reagent C.** Pro přípravu 10 ml. Siřičitan sodný (metabisulfid) práškový, 0,67 mol/L - po rekonstituci.
Reagent je zdraví škodlivý (Xn).
R 22: Škodlivý při požití - Nepipetujte ústy. R 31: Při kontaktu s kyselinami vyvíjí toxické plyny. R 41: Riziko vážného poškození očí. S 26: V případě zasažení očí nebo potřísnění pokožky, omyjte postižené místo pod tekoucí vodou a vyhledejte neprodleně lékařské ošetření. S 39: Používejte ochranné brýle nebo štít. S 46: V případě požití vyhledejte neprodleně lékařské ošetření.
- S. Standard S.** VMA standard. 1 x pro 5 ml.
Lahvička obsahuje 0,1 mg standardu VMA, který je v lahvičce téměř nezatelný. Koncentrace po rekonstituci je uvedena na lahvičce. Hodnota koncentrace standardu je ověřena podle Standardního referenčního materiálu 925 (National Institute of Standards and Technology, USA).

SKLADOVÁNÍSkladujte při teplotě 15-30°C. Reagenty jsou stabilní do data expirace uvedené na štítku pokud jsou těsně uzavřené a je zabráněno jejich kontaminaci během jejich použití.
Známky zhoršení kvality: Reagencie: přítomnost částic, zákal, absorbance blanku větší jak 0,050 při 360 nm v 1 cm kyvetě. Mikrokolony: ztráta (nepřítomnost) pufru nad pryskyřici.**PŘÍDAVNÉ REAGENCIE**

Koncentrovaná kyselina chlorovodíková (kvalita p.a.).

PŘÍPRAVA REAGENTŮ

Reagenty B a C: Rozpusťte obsah lahvičky (suchý prach) v 10 ml destilované vody. Roztok je stabilní po dobu 5 měsíců při 2-8°C.

VMA standard: Rozpusťte obsah lahvičky (suchý prach) v 5 ml reagentu 3 a přidejte 1 kapku koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Roztok je stabilní po dobu 5 měsíců při 2-8°C.

PŘÍDAVNÁ ZAŘÍZENÍ

- Spektrofotometr nebo fotometr s filtrem 360 nm (358-362) a Termostabilní vodní lázeň

VZORKY

Moč sebraná ke stanovení za 24 h standardním způsobem (skladovaná při 2-8°C). Vzorek je stabilní při 2-8°C maximálně 5 dní a nebo až 1 měsíc při -20°C, jestliže je upraveno pH vzorku koncentrovanou HCl na pH=1-2. Před testováním vzorek centrifugujte nebo přefiltrujte.

POSTUP**Příprava vzorku**

- Pipetujte do zkumavky (Poznámka 1):

Vzorek	1,0 ml
Reagent (1)	1,0 ml

Chromatografická separace:

- Nejdříve odstraňte horní uzávěr mikrokolony (4), (Poznámka 3) a poté uzávěr její spodní části. Zatlačte horní disk, který uzavírá pryskyřici tupým předmětem (skleněnou tyčinkou) těsně nad její povrch. Nestlačte pryskyřici! Kapalínu nad pryskyřici nechejte prokapat přes spodní uzávěr.
- Obsah zkumavky (vzorek) přelijte do kolony a prokapejte jej.
- Promyjte zkumavku 2 - 3 ml destilované vody a obsah přelijte do kolony. Prokapejte jej.
- Do kolony přidejte:

Reagent (2)	5,0 ml	prokapejte
-------------	--------	------------

- Umístěte kolonu nad zkumavku a pipetujte:

Reagent (3)	6,0 ml	zachyťte eluát do stejné zkumavky
-------------	--------	-----------------------------------

- Jestliže jste separovali eluáty odděleně, smíchejte je a důkladně promíchejte. (Poznámka 2)

Kolorimetrie

- Pipetujte do označených zkumavek:

	Reagent blank	Standard	Vzorkový blank	Vzorek
Eluát	-	-	1 ml	1 ml
Reagent (3)	1 ml	0,9 ml	-	-
Standard (S)	-	0,1 ml	-	-
Reagent (A)	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml
Reagent (B)	0,1 ml	0,1 ml	-	0,1 ml

- Zkumavky protřepějte, inkubujte je 30 min při 37°C. Poté přidejte:

Reagent (C)	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Reagent (B)	-	-	0,1 ml	-

- Odečtěte absorbanci (A) vzorkového blanku, vzorku a standardu proti reagent blanku při 360 nm. Absorbance je stabilní nejméně po dobu 2 hodin.

VÝPOČET

Koncentrace VMA ve vzorku se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_{\text{vzorku}} - A_{\text{blank vzorku}}}{A_{\text{standardu}}} \times \frac{V_E}{V_S} \times \frac{V_{\text{SIC}}}{V_{\text{EC}}} \times C_{\text{St}} \times \frac{1}{R_{\text{EC}}} = C_{\text{vzorku}}$$

Objem vzorku (V_S) je 1 ml, objem eluátu (V_E) 6 ml, objem eluátu při kolorimetrickém stanovení (V_{EC}) je 1 ml, objem standardu při kolorimetrickém stanovení (V_{SIC}) je 0,1 ml, koncentrace standardu (C_{St}) je uvedena na lahvičce a průměrná výtěžnost (R_{EC}) = 0,888. Koncentrace se vypočte:

$\frac{A_{\text{vzorku}} - A_{\text{blank vzorku}}}{A_{\text{standardu}}}$	$\times C_{\text{St}}$	$\times 0,676 = C_{\text{vzorku}}$
--	------------------------	------------------------------------

Množství VMA kyseliny ze 24 h vzorku moči se vypočítá podle vzorce:

$\frac{\text{mg/l VMA} \times V_{\text{moče/24h}}}{\mu\text{mol/l VMA} \times V_{\text{moče/24h}}}$	$= \text{mg VMA} / 24\text{-h}$
$\frac{\text{mg/l VMA} \times V_{\text{moče/24h}}}{\mu\text{mol/l VMA} \times V_{\text{moče/24h}}}$	$= \mu\text{mol VMA} / 24\text{-h}$

NORMÁLNÍ HODNOTYMoč⁶: < 13,6 mg/24 h = < 68,6 umol/24 h. Tyto hodnoty jsou pouze orientační. Každá laboratoř by si měla stanovit své vlastní srovnávací hodnoty.**KONTROLA KVALITY:**

Pro ověření správnosti měření se doporučuje použít močová kontrola (kat.č. 18036 nebo 18037). Každá laboratoř by si měla stanovit svoji vlastní vnitřní kontrolu kvality a postupy pro nápravná jednání, jestliže kontroly nejsou v tolerančním rozpětí.

METROLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA

- Detekční limit: 1,9 mg / l = 9,7 umol/l
- Linearita: Do 300 mg/l = 1.500 umol/l. Při vyšších hodnotách zředte vzorek 1/2 destilovanou vodou a opakujte měření.
- Opakovatelnost (jednoho vzorku)

Průměrná koncentrace	CV	n
11,2 mg / l = 56 umol/l	5,0%	25
43,2 mg / l = 216 umol/l	2,5%	25

- Reprodukovatelnost:

Průměrná koncentrace	CV	n
11,2 mg / l = 56 umol/l	8,6%	25
43,2 mg / l = 216 umol/l	8,2%	25

- Citlivost: 7,50 mA . l/mg = 1,50 mA . l/umol
- Správnost: Výsledky získané těmito reagenty neukazují systematické rozdíly ve srovnání s teoretickými hodnotami. Podrobnosti o těchto srovnávacích studiích jsou na vyžádání k dispozici.
- Interference: Kyselina gentisová do 1.000 mg/l, kyselina homogentisová do 2.000 mg/l a kyselina 5-hydroxyindolacetic do 50 mg/l neinterferují. P-hydroxymandlová kyselina nad 12,5 mg/l interferuje. Některé potravinové doplňky, substance a léky mohou interferovat během oxidačního stupně, což může mít za následek falešně zvýšené hodnoty⁵.

DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKAVanilmandlová kyselina je hlavním konečným produktem catecholaminového metabolismu a je vylučována močí. Její měření odráží celkovou produkci adrenalinu a noradrenalinu v těle. Zvýšené denní hodnoty vylučování VMA jsou spojeny se sekrecí catecholaminů z neurochromafinových tumorů jako jsou pheochromocytomy, neuroblastomy, či paragangliomy^{4,6}. Klinická diagnóza by však neměla být uzavřena jen na základě tohoto výsledku, ale měly by být propojeny klinické a laboratorní výsledky.**POZNÁMKY**

- Poznámka 1. Jestliže byl vzorek skladován v kyselém prostředí upravte pH zředěným hydroxidem sodným na 6,5 - 7,5.
- Poznámka 2. Test je možné v tomto kroku stanovení přerušit. V tomto případě uchovejte eluát v uzavřené zkumavce při 2-8°C, maximálně však po dobu 24 hodin.
- Poznámka 3. Dlouhé uskladnění kolonek vede k utlačení pryskyřice a tím i ke zpomalení jejich průtoků. Pro obnovu jejich funkce obraťte kolonu před stanovením na 10 minut tak, aby se pryskyřice přesypala. Poté kolonu umístěte do pracovní polohy a pryskyřici nechejte usadit.

LITERATURA

- Wybenga D, Pileggi VJ. Quantitative determination of 3-methoxy-4-hydroxy-mandelic acid (VMA) in urine. *Clin Chim Acta* 1966; 16: 147-154.
- Farnon JR, Davidson HA, Johnson IDA, Wells SA. VMA excretion in patients with Pheochromocytoma. *Ann Surg* 1980; 191: 259-263.
- John J. Pisano , J. Richard Crout, David Abraham. Determination of 3-methoxy-4-hydroxy-mandelic acid in urine. *Clin Chim Acta* 1962; 7: 277-284.
- Tietz NW. Clinical guide to laboratory tests, 3rd ed. Saunders Co, 1999.
- Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 4th ed. AACC Press, 1995.
- Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3rd ed. AACC Press, 1997.

UPOZORNĚNÍ**Překlad změněn k datu: 28.5.2009**Vzhledem k možné inovaci výrobku Vám doporučujeme překontrolovat český překlad s originálním příbalovým letákem. Více informací naleznete na internetové adrese: www.biosystems-sa.com nebo na adrese výhradního distributora pro ČR: www.iktrading.cz
BioSystems S.A. Costa Brava 30, Barcelona (Spain)
ISO 13485 - TÜV Rheinland - Reg.: SX 60010383 0001
ISO 9001 - TÜV CERT - Reg.: 01 100 6696