



kód 11010 40 Testů
SKLADOVÁNÍ PŘI 15-30°C
Reagenty pro měření koncentrace 5-hydroxyindolctové kyseliny Pouze pro laboratorní <i>in vitro</i> diagnostiku

## 5-HYDROXYINDOLOCTOVÁ KYSELINA

Chromatografie-spektrofotometrie

### PRINCIP METODY

Produkty tryptofanového metabolismu ve vzorku jsou zachyceny neutrální pryskyřicí. Serotonin (5-HT) a 5-hydroxytryptofan (5-HTP) jsou eluovány společně v první fázi a poté 5-hydroxyindolctová kyselina (5-HIAA). Tyto metabolity jsou kvantitativně stanoveny spektrofotometricky jako komplex vzniklý reakcí s 1-nitroso-2-naftolem<sup>1,2</sup>.

### OBSAH A SLOŽENÍ

- Reagent.** 1 x 500 mL. Kyselina chlorovodíková 0,1 mol/L.
- Reagent.** 1 x 200 mL. Amoniak 20 mmol/L.
- Mikrokolony.** 2 x 20. Obsahují přesně navážené množství pufované neutrální pryskyřice.
  - Reagent.** 1 x 100 mL. Kyselina sírová 1 mol/L.  
Dráždivý (Xi): R36/38: Dráždivý pro oči a pokožku. S26: V případě kontaktu s očima, vypláchněte je neprodleně pod tekoucí vodou a vyhledejte lékařskou pomoc. S45: V případě nehody, nebo když se necítíte v pořádku, vyhledejte okamžitě lékařskou pomoc.
  - Reagent.** 1 x 100 mL. 1-Nitroso-2-naftol 6 mmol/L, etanol 99%.  
Vysoce hořlavý (F): R11: Vysoce hořlavý. S7: Skladujte nádobu pevně uzavřenou. S16: Zabraňte kontaktu s otevřeným ohněm – nekuřte.
  - Reagent.** 1 x 5 mL. Dusitan sodný 0,7 mol/L.  
Škodlivý (Xn), Nebezpečný pro životní prostředí (N): R22: Škodlivý při požití. R51: Toxický pro vodní organismy. S45: V případě nehody, nebo když se necítíte v pořádku, vyhledejte okamžitě lékařskou pomoc. S61: Tato látka se nesmí do běžného odpadu. Pro likvidaci použijte speciální instrukce v bezpečnostních listech - k dispozici na [www.jktrading.cz](http://www.jktrading.cz)
  - Reagent.** 1 x 280 mL. Dichloreten.  
Vysoce hořlavý (F), Toxický (T): R11: Vysoce hořlavý. R22: Škodlivý při požití. R36/37/38: dráždí oči, dýchací cesty a pokožku. R45: Může vyvolat rakovinu. S45: V případě nehody, nebo když se necítíte v pořádku, vyhledejte okamžitě lékařskou pomoc. S53: Pro likvidaci použijte speciální instrukce v bezpečnostních listech - k dispozici na [www.jktrading.cz](http://www.jktrading.cz)
  - S. Standard.** 1 x 20 mL. Serotonin 46,1 mg/L ekvivalentní 50 mg/L = 261 μmol/L 5-HIAA, Kyselina chlorovodíková 0,1 mol/L, stabilizátor. Vodný primární standard.

### SKLADOVÁNÍ

Składujte při 15-30°C. Reagenty a standard jsou stabilní do data expirace uvedeného na štítku, jestliže jsou skladovány uzavřené a je zabráněno kontaminaci v průběhu jejich užívání.

#### Známky zhoršení kvality:

- Reagenty: Přítomnost sraženiny, zákalu, absorbance reagent blanku nad 0,060 při 540 nm (1 cm kyvetě).
- Mikrokolony: Nepřítomnost pufru nad krycím diskem pryskyřice.

### PŘÍDAVNÁ ZAŘÍZENÍ

- Spektrofotometr nebo fotometr s filtrem 540 nm (510-570)
- Stolní centrifuga

### VZORKY

Moč. 24 hodinový vzorek odebraný standardním postupem, který byl uchován při 2-8°C a stanoven do 24 h od odběru.

Vzorek může být skladován maximálně 15 dní při 2-8°C, nebo 1 měsíc při -20°C, jestliže bylo upraveno pH na 3-6 koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou. Vzorek před testováním odstředte nebo zfiltrujte.

### POSTUP

#### Chromatografická separace

- Odstraňte jako první horní uzávěr (3) a poté spodní uzávěr kolony. Pomocí okrouhlého konce pipety zatlačte horní filtr směrem dolů k povrchu pryskyřice tak, abyste ji příliš nestlačili. Ponechte kapalinu volně protékat kolonou ven. (Pozn.1)

- Přidejte do kolony:

Reagent (1)	2,0 mL	Ponechte volně protékat ven
Vzorek	2,0 mL	Ponechte volně protékat ven
Reagent (1) (Pozn. 2)	10,0 mL	Ponechte volně protékat ven
Reagent (2)	1,0 mL	Ponechte volně protékat ven

- Kolonu umístěte nad centrifugační šroubovací zkumavku (o objemu 10 ml) a pipetujte:

Reagent (2)	2,0 mL	Sbírejte eluát
-------------	--------	----------------

- Pořádně promíchejte.

#### Kolorimetrie

- Pipetujte do označené 10 mL šroubovací centrifugační zkumavky:

	Blank	Standard	Vzorek
	—	—	Eluát
Reagent (2)	2,0 mL	1,5 mL	—
Standard (S)	—	0,5 mL	—
Reagent (A)	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Reagent (B)	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Reagent (C)	1 kapka	1 kapka	1 kapka

- Pořádně promíchejte a ponechte 10 minut stát v klidu při pokojové teplotě (15-30°C), pak přidejte:

Reagent (D)	3,0 mL	3,0 mL	3,0 mL
-------------	--------	--------	--------

- Uzavřené zkumavky 10 sekund pořádně promíchej na mixeru a pak 2 minuty centrifugujte při 3000 ot./min.
- Odečtěte absorbance (A) vrchní fáze vzorku a standardu proti blanku při 540 nm. (Poznámka 3)

### VÝPOČET

Koncentrace 5-HIAA ve vzorku se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{A_{\text{Vzorku}}}{A_{\text{Standardu}}} \times \frac{V_E}{V_S} \times \frac{V_{\text{STC}}}{V_{\text{EC}}} \times C_{\text{ST}} \times \frac{1}{\text{Rec}} = C_{\text{Vzorku}}$$

Objem vzorku ( $V_S$ ) je 2 mL, objem eluátu ( $V_E$ ) je 2 mL, objem eluátu při kolorimetrii ( $V_{\text{EC}}$ ) je 2 mL, objem Standardu při kolorimetrii ( $V_{\text{STC}}$ ) je 0,5 ml, koncentrace Standardu ( $C_{\text{ST}}$ ) je 50 mg/L nebo 261 μmol/L a průměrná výtěžnost (Rec) je 0,87. Následující vzorec je pro výpočet koncentrace:

$\frac{A_{\text{Vzorku}}}{A_{\text{Standardu}}}$	x 14,4 = mg/L 5-HIAA
	x 75,1 = μmol/L 5-HIAA

Množství 5-HIAA ve 24 h vzorku moče se vypočítá:

mg/L	$\times V_{\text{Moče}/24 \text{ h}} (\text{L}) =$	mg/24 h
$\mu\text{mol/L}$		$\mu\text{mol}/24 \text{ h}$

## REFERENČNÍ HODNOTY

Moč<sup>3</sup>: 2 - 6 mg/24-h = 10,4 – 31,2  $\mu\text{mol}/24\text{-h}$

Tyto hodnoty<sup>3</sup> jsou pouze orientační; Každá laboratoř by si měla stanovit svá vlastní normální rozmezí.

## KONTROLA KVALITY

Pro ověření správnosti měření se doporučuje použít Kontrolní moč (kód. 18036 a 18037). Každá laboratoř by si měla stanovit svojí vlastní vnitřní kontrolu kvality a postupy pro nápravná jednání, jestliže kontroly nejsou v tolerančním rozpětí.

## METROLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA

- Detekční limit: 0,9 mg/L = 4,9  $\mu\text{mol/L}$ .
- Linearita: 200 mg/L = 1.050  $\mu\text{mol/L}$ . Při vyšších hodnotách zředte vzorek 1/2 destilovanou vodou a opakujte měření.

- Opakovatelnost (jednoho vzorku):

Průměrná koncentrace	CV	n
1,5 mg/L = 8,1 $\mu\text{mol/L}$	5,2 %	25
12,9 mg/L = 67,9 $\mu\text{mol/L}$	3,6 %	25

– Reprodukovatelnost (run to run):

Průměrná koncentrace	CV	n
1,5 mg/L = 8,1 $\mu\text{mol/L}$	7,7 %	25
12,9 mg/L = 67,9 $\mu\text{mol/L}$	7,2 %	25

- Citlivost: 2,29 mA·L/mg = 11,98 mA·L/ $\mu\text{mol}$ .
- Správnost: Výsledky získané touto soupravou nevykazovaly systematické rozdíly při porovnání teoretickými hodnotami. Podrobnosti o porovnávací zkoušce jsou k dispozici na vyžádání.
- Interference: Některé potraviny, jako jsou banány, ananasy, avokáda, kiwi, švestky, rajčata, vlašské ořechy a čokoláda zvyšují vylučování 5-HIAA. Proto by se neměly jíst 3-4 dny před odběrem. Léky a další látky mohou interferovat<sup>4</sup>.

## DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

5-hydroxyindolactová kyselina (5-HIAA) je konečným produktem tryptofanového metabolismu a je vylučována močí. Je výsledkem stálé oxidativní deaminace serotoninu (5-hydroxytryptaminu).

Serotonin, silný stimulant hladkého svalstva je produkován ve velkém množství karcinoidními tumory a tak vysoké hladiny 5-HIAA se nacházejí v moči pacientů s těmito tumory<sup>3,5</sup>.

Klinická diagnóza by neměla být stanovena jen na základě výsledku jednoho testu, ale měly by být propojeny klinické a laboratorní údaje.

## POZNÁMKY

1. Někdy se ve vrtvě pryskyřice mohou objevit tmavé partikule. Jejich výskyt neovlivňuje stanovení.
2. **Volitelné vymytí serotoninu:** (tento výsledek je orientační).

Po aplikaci vzorku pipetujte do kolony:

Reagent (1)	4,0 mL	Ponechte volně protékat ven
Reagent (1)	6,0 mL	Sbírejte eluát

Chromatografická separace může pokračovat přidáním reagentu 2 (pro získání 5-HIAA eluátu).

Protřepejte eluát (obsahující serotonin a 5-hydroxytryptofan), napipetujte 2 ml do 10 ml centrifugační zkumavky se šroubovacím víčkem a pokračujte kolorimetrií tak, jak je popsáno pro stanovení 5-HIAA.

Koncentrace Serotoninu+ 5-hydroxytryptofanu se vypočítá podle vzorce:

$\frac{A_{\text{Vzorku}}}{A_{\text{Standardu}}}$	$\times 45,4 = \text{mg/L Serotoninu}$
	$\times 258 = \mu\text{mol/L Serotoninu}$

3. Jestliže se v horní fázi objeví zákal, odstraňte tuto část, přidejte kousek bezvodého síranu sodného, protřepejte a odstředte.

4. Pozn. distributora: Dlouhé uskladnění kolonek vede k utlačení pryskyřice a tím i ke zpomalení jejich průtoku. Pro obnovu jejich funkce obraťte kolonu před stanovením na 10 minut tak, aby se pryskyřice přesypala. Poté kolonu umístěte do pracovní polohy a pryskyřici nechte usadit.

## LITERATURA

1. Udenfriend S, Titus E, Weissbach H. The identification of 5-hydroxy-3-indoleacetic acid in normal urine and a method for its assay. *J Biol Chem* 1955; 216:499-505.
2. Contractor SF. A rapid quantitative method for the estimation of 5-hydroxyindoleacetic acid in human urine. *Biochem Pharm* 1966; 15:1701-1706.
3. Tietz NW. *Clinical guide to laboratory tests*, 3rd ed. Saunders Co, 1999.
4. Young DS. *Effects of drugs on clinical laboratory tests*, 4th ed. AACC Press, 1995.
5. Friedman and Young. *Effects of disease on clinical laboratory tests*, 3rd ed. AACC Press, 1997.

## UPOZORNĚNÍ

Překlad revidován k datu: 3.1.2011

Vzhledem k možné inovaci výrobku Vám doporučujeme překontrolovat český překlad s originálním příbalovým letákem. Více informací můžete nalézt na internetové adrese: [www.biosystems-sa.com](http://www.biosystems-sa.com) nebo na adrese výhradního distributora pro ČR: [www.jktrading.cz](http://www.jktrading.cz)

## VÝROBCE

**BioSystems S.A.** Costa Brava 30, Barcelona (Spain)  
 ISO 13485 - TÜV Rheinland - Reg.: SX 60010383 0001  
 ISO 9001 - TÜV CERT - Reg.: 01 100 6696