

|  |          |
|--|----------|
| Kód 11010  | 40 testů |
| Skladování při 2 - 30°C  |          |
| Reagencie pro měření koncentrace kyseliny 5-hydroxyindolactové.<br>Pouze pro in vitro diagnostiku v klinických laboratořích. |          |

# Kyselina 5-hydroxyindol octová (5-HIAA)



## Kyselina 5-hydroxyindolactová (5-HIAA) chromatografie

### 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-hydroxyindolactová 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

- Reagencie.** 1 x 500 mL. Kyselina chlorovodíková 0,1 mol/L.
  - Reagencie.** 1 x 200 mL. Amoniak 20 mmol/L.
  - Mikrokolony.** 2 x 20. Obsahují přesně navážené množství pufované neutrální pryskyřice.
- A. Reagencie.** 1 x 100 mL. Kyselina sírová 1 mol/L.  
**Varování :** **H315** – Dráždí kůži. **H319** – Způsobuje vážné podráždění očí. **P305 + P351 + P338** – PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování. **P332 + P313** – Při podráždění kůže: Vyhleďte lékařskou pomoc/ošetření.
- B. Reagencie.** 1 x 100 mL. 1-Nitroso-2-naftol 6 mmol/L, etanol 99%.  
**Nebezpečí :** **H225** – Vysoce hořlavá kapalina a páry. **P420** – Skladujte odděleně od ostatních materiálů.
- C. Reagencie.** 1 x 5 mL. Dusitan sodný 0,7 mol/L.  
**Varování :** **H302** – Zdraví škodlivý při požití. **H411** – Toxický pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky. **P330** – Vypláchněte ústa. **P301 + P312** – PŘI POŽITÍ: Necítíte-li se dobře, volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO **P391** – Uniklý produkt seberte.
- D. Reagencie.** 1 x 280 mL. Dichlorethan.  
**Nebezpečí :** **H225** – Vysoce hořlavá kapalina a páry. **H302** – Zdraví škodlivý při požití. **H315** – Dráždí kůži. **H319** – Způsobuje vážné podráždění očí. **H335** – Může způsobit podráždění dýchacích cest. **H350** – Může vyvolat rakovinu **P210** – Chraňte před teplem/jiskrami/otevřeným plamenem/horkými povrchy. – Zákaz kouření. **P261** – Zamezte vdechování prachu/dýmu/plynu/mlhy/par/aerosolů. **P305 + P351 + P338** – PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování. **P308 + P313** – PŘI expozici nebo podezření na ni: Vyhleďte lékařskou pomoc/ošetření. **P420** – Skladujte odděleně od ostatních materiálů.
- S. Standard.** 1 x 20 ml. Kyselina 5-hydroxyindolactová 50 mg / l = 261 μmol / l, kyselina chlorovodíková 0,1 mol / l, stabilizátor. Vodný primární standard.

Pro další varování a bezpečnostní opatření čtěte bezpečnostní list (SDS)

### SKLADOVÁNÍ

Skladujte při 2-30°C. Reagencie 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:

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

### PŘIDAVNÁ 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:

|                      |         |                             |
|----------------------|---------|-----------------------------|
| Reagencie (1)        | 2,0 mL  | Ponechte volně protékat ven |
| Vzorek               | 2,0 mL  | Ponechte volně protékat ven |
| Reagencie(1)(Pozn.2) | 10,0 mL | Ponechte volně protékat ven |
| Reagencie (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  |
|---------------|---------|----------|---------|
| Reagencie (2) | —       | —        | Eluát   |
| Standard (S)  | —       | 0,5 mL   | —       |
| Reagencie (A) | 1,0 mL  | 1,0 mL   | 1,0 mL  |
| Reagencie (B) | 1,0 mL  | 1,0 mL   | 1,0 mL  |
| Reagencie (C) | 1 kapka | 1 kapka  | 1 kapka |

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

|               |        |        |        |
|---------------|--------|--------|--------|
| Reagencie (D) | 3,0 mL | 3,0 mL | 3,0 mL |
|---------------|--------|--------|--------|

- Uzavřené zkumavky 10 sekund pořádně promíchej na mixuru 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 17-OH ve vzorku se vypočítá:

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

Objem vzorku ( $V_S$ ) je 2 mL, objem eluátu ( $V_E$ ) je 2 mL, objem eluátu při kolorimetrii ( $V_{EC}$ ) je 2 mL, objem Standardu při kolorimetrii ( $V_{StC}$ ) je 0,5 mL, koncentrace Standardu ( $C_{St}$ ) je 50 mg/L nebo 261 μmol/L a průměrná výtěžnost ( $R_{EC}$ ) 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   | x $V_{\text{Moče}/24 \text{ h}} (L) =$ | mg/24 h   |
| μmol/L |  | μmol/24 h |

|  |          |
|--|----------|
| Kód 11010  | 40 testů |
| Skladování při 2 - 30°C  |          |
| Reagencie pro měření koncentrace kyseliny 5-hydroxyindolactové.<br>Pouze pro in vitro diagnostiku v klinických laboratořích. |          |

## Kyselina 5-hydroxyindolactová (5-HIAA)



## Kyselina 5-hydroxyindolactová (5-HIAA) chromatografie

### REFERENČNÍ HODNOTY

Moč<sup>3</sup>: 2 - 6 mg/24-h = 10,4 – 31,2 μmol/24h  
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 svoji 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 μmol/L.
- Linearita: 200 mg/L = 1050 μmol/L. Při vyšších hodnotách zředit vzorek 1/2 destilovanou vodou a opakujte měření.
- Opakovatelnost (jednoho vzorku):

| Průměrná koncentrace    | CV    | n  |
|-------------------------|-------|----|
| 1,5 mg/L = 8,1 μmol/L   | 5,2 % | 25 |
| 12,9 mg/L = 67,9 μmol/L | 3,6 % | 25 |

- Reprodukovatelnost (run to run):

| Průměrná koncentrace    | CV    | n  |
|-------------------------|-------|----|
| 1,5 mg/L = 8,1 μmol/L   | 7,7 % | 25 |
| 12,9 mg/L = 67,9 μmol/L | 7,2 % | 25 |

- Citlivost: : 11,98 mA.L/mg = 2,29 mA.L/μmol.
- 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 vzorku. 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 částice. Jejich výskyt neovlivňuje stanovení.
2. **Volitelné vymytí serotoninu:** (získaný výsledek bude pouze orientační).  
Po aplikaci vzorku pipetujte do kolony:

|               |        |                             |
|---------------|--------|-----------------------------|
| Reagencie (1) | 4,0 mL | Ponechte volně protékat ven |
| Reagencie (1) | 6,0 mL | Sbírejte eluát              |

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

Protřeptejte 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:

|             |                           |
|-------------|---------------------------|
| A vzorku    | x 45,4 = mg/L Serotoninu  |
| A standardu | x 258 = μmol/L Serotoninu |

3. Jestliže se v horní fázi eluátu objeví zákal, odstraňte tuto část, přidejte kousek bezvodého síranu sodného, protřeptejte a odstředěte.
4. Pozn. distributora: **Pozn. distributora:** Dlouhodobé uskladnění kolonek vede k utlačení pryskyřice a tím i ke zpomalení průtoku kapaliny přes pryskyřici. Pro obnovu funkce obraťte kolonu před stanovením na 10 minut tak, aby se pryskyřice přesypala. Poté kolonu umístěte do pracovní polohy a pryskyřici nechejte 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 Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 4th ed. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, WB Saunders Co, 2005.
4. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5th ed. AACC Press, 2000.
5. Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 4rd ed. AACC Press, 2001.

### UPOZORNĚNÍ

Překlad revidován k datu: 2.9.2019  
Vzhledem k možné inovaci výrobku Vám doporučujeme překontrolovat český překlad s originálním příbalovým letákem porovnáním podle identifikačního čísla návodu uvedeném v zápatí. Originální návod najdete v soupravě a na internetové adrese: [www.biosystems.es](http://www.biosystems.es).

Český návod je k dispozici na: [www.iktrading.cz](http://www.iktrading.cz)

#### Výhradní distributor:

**ČR** : JK-Trading spol.s.r.o., Křivatcová 421/5, 150 21 Praha5, tel.: +420 257 220 760  
**SK** : JK-Trading spol.s.r.o., Mečíkova 30, 841 07 Bratislava, tel.: + 421 264 774 591

V případě mimořádných událostí:

**ČR** : Toxikologické informační středisko (TIS), klinika pracovního lékařství VFN a LF UK, tel.: +420 224 91 92 93 a +420 224 91 54 02  
**SK** : Toxikologické informačné centrum Bratislava, 833 05, Limbová 5, tel.: +421 254 774 166