



Kyselina 5-hydroxyindoloctová (5- HIAA)



Kód 11010	40 testov	Kyselina 5- hydroxyindoloctová
Skladovanie pri 2 - 30°C		
Reagencie na meranie koncentrácie kyseliny 5-hydroxyindoloctovej Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku		
		Chromatografia - spektrofotometria

PRINCÍP METÓDY

Produkty tryptofanového metabolizmu vo vzorke sú zachytené neutrálnou živcou. Serotonin (5-HT) a 5- hydroxytryptofan (5-HTP) sú spoločne eluované v prvej fáze, potom nasleduje kyselina 5 – hydroxyindoloctová. Tieto metabolity sa stanovujú kvantitatívne spektrofotometricky ako komplex, ktorý vznikol reakciou s 1–nitrozo-2-naftolom^{1,2}.

OBSAH A ZLOŽENIE

- 1. Reagencia.** 1X500 ml. Kyselina chlorovodíková 0,1mol/l.
- 2. Reagencia.** 1X200 ml. Amoniak 20 mmol/l.
- 3. Mikrokolóny.** 2X20. Obsahujú presne navážené množstvo pufrovanej neutrálnej živice.

A. Reagencia . 1X100ml. Kyselina sírová 1mol/l.

Výstraha :

H315 – Dráždi kožu

H319 – Spôsobuje vážne podráždenie očí

Upozornenie :

P305 + P351+ P338 - Po zasiahnutí očí : Niekoľko minút opatrne oplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní.

P332 + P313 – Ak sa objaví podráždenie pokožky :

Vyhľadajte lekársku pomoc/ošetrovanie.

B. Reagencia. 1X100ml. 1-nitrozo-2-naftol 6ml/l, etanol 99%.

Výstraha :

H225 – Veľmi horľavá kvapalina a pary

Upozornenie :

P420 – Skladujte oddelene od ostatných materiálov.

C. Reagencia. 1X5ml. Dusitan sodný 0,7mol/l.

Výstraha :

H302 – Zdraviu škodlivý pri požití

H411 – Jedovatý pre vodné organizmy, s dlhodobými účinkami

Upozornenie :

P330 – Vypláchnite ústa

P301 + P312 – Pri požití : Ak sa necítite dobre, volajte

Toxikologické informačné stredisko

P391 – Uniknutý produkt odstráňte

D.Reagencia. 1X280ml. Dichlóretán.

Výstraha :

H225 – Veľmi horľavá kvapalina a pary

H302 – Zdraviu škodlivý pri požití

H315 – Dráždi kožu

H319 – Spôsobuje vážne podráždenie očí

H335 – Môže spôsobiť podráždenie dýchacích ciest

H350 - Môže vyvolať rakovinu

Upozornenie :

P210 - Chráňte pred teplom/iskrami/otvoreným palmeňom /horúcimi povrchmi. Zákaz fajčenia.

P261 – Zabráňte vdychovaniu prachu/dymu/plynu/hmly/pár/ aerosólov

P305 + P351+ P338 - Po zasiahnutí očí : Niekoľko minút opatrne oplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní.

P308 +P313 – Pri expozícii alebo podozrení na ňu :

Vyhľadajte lekársku pomoc/ošetrovanie.

P420 – Skladujte oddelene od ostatných materiálov.

S.Štandard. 1 x 20 mL. Kyselina 5-hydroxyindoloctová 50 mg/L = 261 µmol/L, kyselina chlorovodíková 0,1 mol/L, stabilizátor. Vodný primárny štandard.

Ďalšie varovania a upozornenia – viď bezpečnostný list.

SKLADOVANIE

Skladujte pri 2 – 30°C.

Reagencie a štandard sú stabilné do dátumu uvedeného na štítku v prípade, že sú skladované uzatvorené a je zabránené kontaminácii v priebehu používania.

Príznačky zhoršenia kvality :

- Reagencie : Prítomnosť zrazeniny, zákalu , absorbancia blanku nad 0,060 pri 540nm (1cm kvjeta)
- Mikrokolóny : neprítomnosť pufry nad krycím diskom živice.

PRÍDAVNÉ ZARIADENIA

- Spektrofotometer alebo fotometer s filtrom 540nm (510 – 570)
- Stolná centrifúga

VZORKY

Moč. 24 hodinové vzorky odobrané štandardným spôsobom.

Udržujte pri 2-8°C a použite do 24 hodín. Vzorky môžu byť skladované pri 2-8°C po dobu max. 15 dní, alebo pri -20°C po dobu 1 mesiaca pri pH upravenom na hodnotu 3 – 6 pomocou koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej. Pred testovaním vzorku odstredte alebo prefiltrujte.

POSTUP

Chromatografická separácia

1. Najprv odstráňte horný uzáver kolóny (3), potom uzáver v jej spodnej časti. Pomocou okrúhleho konca pipety zatlačte horný filter smerom dole k povrchu živice tak, aby ste ju príliš nestlačili. Všetku kvapalinu nechajte voľne vytečť von. (Poznámka 1).

2. Do kolóny pridajte :

Reagencia (1)	2,0 ml	nechajte voľne vytečť von
Vzorka	2,0 ml	nechajte voľne vytečť von
Reagencia (1) (Poznámka2)	10 ml	nechajte voľne vytečť von
Reagencia (2)	1,0 ml	nechajte voľne vytečť von

3. Kolónu umiestnite nad uzavierateľnú 10 ml skúmavku a pipetujte :

Reagencia (2)	2,0 ml	Zachyťte eluát
---------------	--------	----------------

4. Eluát dôkladne zamiešajte.



Kyselina 5-hydroxyindoloctová (5- HIAA)



Kód 11010	40 testov	Kyselina 5- hydroxyindoloctová
Skladovanie pri 2 - 30°C		
Reagencie na meranie koncentrácie kyseliny 5-hydroxyindoloctovej Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku		
		Chromatografia - spektrofotometria

REFERENČNÉ HODNOTY

Kolorimetria

5. Pipetujte do označenej 10 ml uzavierateľnej skúmavky :

	blank	štandard	vzorka
			eluát
Reagencia (2)	2,0 ml	1,5 ml	-
Štandard (S)	-	0,5 ml	-
Reagencia (A)	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
Reagencia (B)	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
Reagencia (C)	1 kvapka	1 kvapka	1 kvapka

6. Poriadne premiešajte a nechajte v kľude 10 minút stáť pri izbovej teplote (15 – 30°C), potom pridajte :

Reagencia (D)	3,0ml	3,0ml	3,0ml
---------------	-------	-------	-------

7. Uzatvorené skúmavky 10 sekúnd mixujte v mixéri a potom centrifugujte 2 minúty pri 3000 ot/min.

8. Odčítajte absorbancie (A) vrchnej fázy vzorky a štandardu oproti blanku pri 540nm. (Poznámka 3)

VÝPOČET

Koncentrácia 5- HIAA vo vzorke sa vypočíta :

$$\frac{A_{\text{vzorky}}}{A_{\text{štandardu}}} \times \frac{V_E}{V_S} \times \frac{V_{\text{št}}}{V_{\text{EC}}} \times \frac{1}{R_{\text{EC}}} \times C_{\text{št}} = C_{\text{vzorky}}$$

Objem vzorky (V_S) je 2ml, objem eluátu (V_E) je 2ml, objem eluátu pri kolorimetrii (V_{EC}) je 2 ml, objem štandardu pri kolorimetrii (V_{št}) je 0,5ml, koncentrácia štandardu (C_{št}) je 50mg/l alebo 261 μmol/l a priemerná výťažnosť (R_{EC}) je 0,87. Nasledujúci vzorec slúži pre výpočet koncentrácie :

$\frac{A_{\text{vzorky}}}{A_{\text{štandardu}}} \times 14,4 = \text{mg/l 5- HIAA}$
$\frac{A_{\text{vzorky}}}{A_{\text{štandardu}}} \times 75,1 = \mu\text{mol/l 5-HIAA}$

Množstvo 5-HIAA v 24 hodinovej vzorke moči sa vypočíta :

mg/l	x V moča/24 h (L)	mg/24 h
μmol/l		μmol/ 24 h

Moč³: 2 – 6 mg/24 h = 10,4 – 31,2 μmol/24 h. Tieto hodnoty³ sú iba orientačné. Každé laboratórium by si malo stanoviť svoje vlastné, normálne rozmedzie.

KONTROLA KVALITY

Pre overenie správnosti merania sa odporúča použiť Kontrolný moč (kód 18036 a 18037). Každé laboratórium by si malo stanoviť svoju vlastnú vnútornú kontrolu kvality a postupy pre nápravu pre prípad, že kontroly nie sú v tolerančnom rozpätí.

METROLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA

- detekčný limit : 0,9mg/l = 4,9 μmol/l
- linearita : 200mg/l = 1050 μmol/l ; pri vyšších hodnotách vzorku nariedte na 1/2 destilovanou vodou a meranie opakujte.
- opakovateľnosť (jednej vzorky) :

Priemerná koncentrácia	CV	n
1,5mg/l = 8,1 μmol/l	5,2%	25
12,9mg/l = 67,9 μmol/l	3,6%	25

- reprodukovateľnosť (run to run) :

Priemerná koncentrácia	CV	n
1,5mg/l = 8,1 μmol/l	7,7%	25
12,9mg/l = 67,9 μmol/l	7,2%	25

- citlivosť : 11,98 mA.L/mg = 2,29 mA.L/μmol

- správnosť : výsledky získané touto súpravou pri porovnaní s teoretickými hodnotami nevykazovali systematické rozdiely. Podrobnosti o porovnávačej skúške sú k dispozícii na vyžiadanie .

- interferencie : niektoré potraviny, ako sú banány, ananásy, avokáda, kiwi, slivky, paradajky, vlašské orechy a čokoláda zvyšujú vylučovanie 5- HIAA, preto by sa nemali jesť 3 – 4 dni pred odberom. Interferovať môžu aj niektoré lieky a ďalšie látky⁴.

DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

Kyselina 5- hydroxyindoloctová je konečným produktom tryptofanového metabolizmu a vylučuje sa močom. Je výsledkom stálej oxidatívnej deaminácie serotonínu (5- hydroxytryptaminu). Serotonín, silný stimulant hladkého svalstva, je produkovaný vo veľkom množstve karcinoidnými tumormi a preto sa vysoké hladiny 5-HIAA nachádzajú v moči pacientov, ktorí majú tieto tumory.^{3,5} Klinická diagnóza by nemala byť stanovená len na základe výsledku jediného testu,



Kyselina 5-hydroxyindoloctová (5- HIAA)



Kód 11010	40 testov	Kyselina 5- hydroxyindoloctová Chromatografia - spektrofotometria
Skladovanie pri 2 - 30°C		
Reagencie na meranie koncentrácie kyseliny 5-hydroxyindoloctovej Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku		

je potrebné zhodnotiť klinické i ďalšie laboratórne údaje.

POZNÁMKY

- Niekedy sa vo vrstve živice môžu objaviť tmavé častice. Ich výskyt výsledok stanovenia neovplyvní.
- Voliteľné vymytie serotonínu (získaný výsledok bude iba orientačný) :
Po aplikácii vzorky pipetujte do kolóny :

Reagencia (1)	4,0ml	Ponechajte voľne vytečť von
Reagencia (1)	6,0ml	Zachyťte eluát

Pre získanie 5-HIAA eluátu môže chromatografická separácia pokračovať pridaním Reagencie (2) . Eluát obsahujúci serotonín a 5-hydroxytryptofan pretrepte a napipetujte 2ml do 10ml centrifugačnej uzavierateľnej skúmavky a pokračujte kolorimetrickým stanovením tak, ako je to popísané pre stanovenie 5-HIAA. Koncentrácia serotonínu+ 5-hydroxytryptofanu sa vypočíta podľa vzorca :

$$A_{\text{vzorky}} \times 45,4 = \text{mg/l serotonínu}$$

$$A_{\text{standardu}} \times 258 = \mu\text{mol/l serotonínu}$$

- V prípade, že sa v hornej fáze eluátu objaví zákal, odstráňte túto časť, pridajte trochu bezvodého síranu sodného, pretrepte a odstredte.
- Poznámka distribútora : Dlhodobé skladovanie kolón vedie k utlačeniu živice, čím sa spomalí prietok kvapaliny cez túto živicu. Pre obnovu funkcie obráťte kolónu pred stanovením tak, aby sa živica presypala a ponechajte tak cca 10 minút. Potom kolónu umiestnite do pracovnej polohy a živicu nechajte usadiť.

LITERATÚRA

- 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.
- Contractor SF. A rapid quantitative method for the estimation of 5-hydroxyindoleacetic acid in human urine. Biochem Pharm 1966; 15:1701-1706.
- Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 4th ed. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. WB Saunders Co, 2005.
- Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5th ed. AACC Press, 2000.
- Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 4th ed. AACC Press, 2001.

UPOZORNENIE

Slovenský preklad k 17.7.2020.

Vzhľadom k novej inovácii výrobku sa odporúča

prekontrolovať slovenský preklad s originálnym príbalovým letákom tak, že sa porovnajú identifikačné čísla uvedené v zápätí. Originálny návod nájdete v súprave a na internetovej adrese www.biosystems.es. Slovenský návod je k dispozícii na www.jktrading.cz

Výhradný distribútor:

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., Dlhá 43, 900 31, Stupava tel.: + 421 264 774 591

V prípade mimoriadnych udalostí:

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