

5-АМИНОЛЕВУЛЕНОВАЯ КИСЛОТА (ALA)/ ПОРФОБИЛИНОГЕН (PBG) Хроматография- спектрофотометрия

КОД 11017 40 определений
Хранить при 15-30° С
Реагенты для измерения концентрации 5-аминолевулиновой кислоты и порфибилиногена. Использовать только для работы «in vitro» в клинических лабораториях

ПРИНЦИП МЕТОДА

Образец проходит последовательно через две хроматографические колонки, содержащие ионообменные смолы: первая - задерживает порфибилиноген (ПБГ), в то время как вторая – задерживает 5-аминолевулиновую кислоту (АЛК). Побочные субстанции удаляются промыванием, ПБГ и АЛК элюируют и их количество определяют реакцией Эрлиха фотометрически при 555 нм^{1,2}.

СОСТАВ

- 1 Реагент 1.** 2x350 мл. Ацетат натрия 1 моль/л.
2 Реагент 2. 1x175 мл. Уксусная кислота 1 моль/л.
3 PBG-микроколонки. 2x20 Содержат предварительно взвешенное количество анионно-обменной смолы.
4 ALA-микроколонки. 2x20 Содержат предварительно взвешенное количество катионно-обменной смолы
A Реагент. 1x17 мл. Ацетилацетон.
Осторожно (Хп): R10: Воспламеняется. R22: Опасно при глотании. S21: Не курить при работе. S23.2: Не вдыхать испарения. S24/25: Не вдыхать испарения.
B1 Реагент. 2x50 мл. 4-Диметиламинобензолдегид 6 ммоль/л, после разведения.
Осторожно (Хп): R22: Опасно при глотании. R36/37/38: Вызывает раздражение глаз, верхних дыхательных путей и кожи. S26: В случае контакта с глазами, немедленно промыть глаза большим количеством проточной воды и обратиться за медицинской помощью. S36/37/39: Предпочтительна защитная одежда, перчатки, очки/маска.
B2 Реагент. 2x50 мл. Уксусная кислота 18 моль/л.
Едко (С): R10: Воспламеняется. R35: Вызывает ожоги. S23.2: Не вдыхать испарения. S26: В случае контакта с глазами, немедленно промыть глаза большим количеством проточной воды и обратиться за медицинской помощью. S45: В случае недомогания обратиться за медицинской помощью (по возможности сохранить и показать врачу ярлык реагента)
S ALA Стандарт. 2 для 5 мл. Концентрация восстановленного стандарта указана на этикетке флакона.

ХРАНЕНИЕ

Хранить при 15-30° С.
 Реагенты и стандарты стабильны до срока годности, указанного на этикетках, при хранении плотно

закрытыми и предупреждении загрязнения во время работы.

Показатели загрязнения:

- Реагенты: присутствие взвешенных частиц, мутность, абсорбция бланка реагента выше 0,060 (ALA) и 0.025 (PBG) при 555 нм.
- Микроколонки (3 и 4): Отсутствие буфера над верхним фильтром.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ РЕАГЕНТЫ

- Перхлорная кислота 70% (ч.д.а)

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТА

Реагент В: Перенести содержимое флакона В2 в В1 и встряхивать до полного растворения. Стабильность составляет 6 месяцев при 2-8° С.

Стандарт (S): Растворить в 5 мл дистиллированной воды. Стабилен 12 месяцев при 2-8° С.

Реагент Эрлиха: Добавить 1,9 мл перхлорной кислоты (70%) к 10 мл Реагента В, перемешать до получения гомогенной смеси. Стабильность составляет 7 часов при комнатной температуре (15 – 30° С). Большие количества могут быть приготовлены с соблюдением соответствующих пропорций.

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

- Кипящая водяная баня
- Спектрофотометр или фотометр с фильтром 555 нм (520 – 570).
- Кювета с 1см оптическим путем

ОБРАЗЦЫ

Моча. Образцы суточной мочи, собранные по стандартной процедуре.

Образцы суточной мочи доводятся до pH>6 концентрированной HCl. Защищать от света. ALA стабильна в течение 1 месяца, а PBG максимум в течение 24 часов при 2-8° С. PBG стабилен 1 месяц при замораживании -20° С. Перед тестированием образцы отцентрифугировать или профильтровать.

ПРОЦЕДУРА

Хроматографическое разделение.

1. Взять одну ALA-микроколонку (3) и одну PBG-колонку (4) на одну пробу. Снять верхние крышки и открыть нижнюю часть колонки. Удалить элюаты и разместить колонку для PBG над колонкой для ALA
2. Расположить колонку PBG над колонкой ALA

3. Внести в верхнюю колонку (PBG)

Дистиллированная вода	10,0 мл	Дать колонке полностью стечь
Образец	1,0 мл	Дать колонке полностью стечь
Дистиллированная вода	20,0 мл	Дать колонке полностью стечь

4. Снять верхнюю колонку (PBG) и поместить в темноту, для дальнейшего количественного определения PBG (шаг 9).

Определение ALA

5. Разместить ALA-колонку над пробиркой и внести:

Реагент 1	10,0 мл	Собрать элюат
-----------	---------	---------------

6. Перемешать элюат и разлить:

	Бланк	Стандарт	Образец
Стандарт ALA	-	-	Элюат
Реагент (1)	10 мл	9,9 мл	-
Реагент (A)	0,2 мл	0,2 мл	0,2 мл

7. Тщательно перемешать и инкубировать в кипящей водяной бане в течение 10 минут.
 8. Охладить пробирки под проточной водой, тщательно перемешать и внести в промаркированные пробирки:

	Образец	Бланк	Стандарт
Инкубированная смесь	1,0 мл	1,0 мл	1,0 мл
Реагент Эрлиха	1,0 мл	1,0 мл	1,0 мл

9. Тщательно перемешать, подождать 15 минут (15-30° C) и измерить абсорбцию (A) Образца и стандарта при 555 нм против Бланка. Окраска стабильнее не менее 30 мин.

Определение PBG (результаты теста ориентировочные)

10. Расположить PBG колонку над пробиркой и налить:

Реагент 2	4,0 мл	Собрать элюат
-----------	--------	---------------

11. Тщательно перемешать и налить в промаркированные пробирки:

	Образец	Бланк
Элюат	-	1,0 мл
Дистиллированная вода	1,0 мл	-
Реагент Эрлиха	1,0 мл	1,0 мл

12. Тщательно перемешать, подождать 10 минут (15 - 30° C) и измерить абсорбцию (A) Образца при 555 нм против Бланка. Окраска стабильнее не менее 30 мин.

РАСЧЕТ

Расчет ALA концентрации:

$$\frac{A_{\text{обр}}}{A_{\text{ст}}} \times \frac{V_E}{V_{\text{обр}}} \times \frac{V_{\text{стс}}}{V_{\text{EC}}} \times C_{\text{ст}} \times \frac{1}{\text{REC}} = C_{\text{обр}}$$

Где объем образца ($V_{\text{обр}}$) 1 мл, объем элюата (V_E) 10 мл, объем элюата для колориметрии (V_{EC}) 10 мл, объем стандарта в колориметрии ($V_{\text{стс}}$) 0,1 мл, концентрация стандарта, указанная на этикетке флакона ($C_{\text{ст}}$) и средняя воспроизводимость (REC) 0,81. Полученная формула для расчета концентрации выглядит так:

$\frac{A_{\text{обр}}}{A_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}} = C_{\text{обр}}$	$\times 0,123 = C_{\text{обр}}$
--	---------------------------------

Количество ALA в суточной моче рассчитывается по следующим общим формулам:

мг/дл	$\times 10 \times V_{\text{мочи/24 ч (л)}}$	мг/24 ч
мкмоль/л	$\times V_{\text{мочи/24 ч (л)}}$	мкмоль/24 ч

Расчет PBG концентрации:

$$\frac{A_{\text{обр}}}{\epsilon \times l} \times \frac{V_E}{V_{\text{обр}}} \times \frac{V_T}{V_{\text{EC}}} \times \frac{1}{\text{REC}} = C_{\text{обр}}$$

Где морьяная абсорбция продуктов реакции с реагентом Эрлиха (ϵ) при 555 нм $0,062 \text{ Л} \times \text{мкмоль}^{-1} \times \text{см}^{-1}$, длина светового пути (l) 1 см, объем образца ($V_{\text{обр}}$) 1 мл, объем элюата (V_E) 4 мл, общий реакционный объем (V_T) 2 мл, объем элюата в колориметрии (V_{EC}) 1 мл, и средняя воспроизводимость (REC) 0,66. Полученная формула для расчета концентрации выглядит так:

$A_{\text{обр}}$	$\times 4,42 = \text{мг/дл PBG}$
	$\times 196 = \text{мкмоль/л PBG}$

Количество PBG в суточной моче рассчитывается по следующим общим формулам:

мг/дл	$\times 10 \times V_{\text{мочи/24 ч (л)}}$	мг/24 ч
мкмоль/л	$\times V_{\text{мочи/24 ч (л)}}$	мкмоль/24 ч

НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Моча³: ALA 1,5 – 7,5 мг/24ч = 11,4 – 57,2 мкмоль/24ч

Моча⁴: PBG 0 – 3,4 мг/24ч = 0 – 15 мкмоль/24ч

Данные величины ориентировочны, каждая лаборатория должна устанавливать свои диапазоны нормальных значений.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для проведения контроля качества теста и процедуры исследования рекомендуется использовать Контроль МОЧИ (код 180,36, 18037).

Каждая лаборатория должна выработать собственную схему внутреннего контроля качества и процедуры для коррекции действий в случае, если контроль качества не укладывается в приемлемые диапазоны.

МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Определение ALA

- Предел чувствительности: 0,03 мг/дл = 2,5 мкмоль/л
- Линейность не менее 6,03 мг/дл = 460 мкмоль/л

- Сходимость (внутри серии):

Средняя концентрация	CV	n
0,41 мг/дл = 31 мкмоль/л	4,2%	25
2,65 мг/дл = 202 мкмоль/л	2,2%	25

- Воспроизводимость (между сериями):

Средняя концентрация	CV	n
0,41 мг/дл = 31 мкмоль/л	5,9%	25
2,65 мг/дл = 202 мкмоль/л	3,7%	25

- Чувствительность: $20,6 \text{ mA} \times \text{dL/mg} = 2.7 \text{ mA} \times \text{L/mkmol}$
- Достоверность: Результаты полученные с добавлением ALA не показали систематических отклонений от теоретических концентраций. Детали эксперимента доступны по запросу.
- Интерференция: Некоторые продукты, вещества и лекарства могут исказить результат⁵.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Порфирии являются генетическими аномалиями регуляции синтеза гема при которых большое количество предшественников гема, таких, как 5-аминолевуленовая кислота (5-ALA) и порфобилиноген (PBG) определяются в моче.

При отравлении свинцом, концентрация ALA в моче возрастает в связи с блокированием свинцом путей метаболизма ALA.

Отравление свинцом и Порфирии могут быть дифференцированы друг от друга при совместном измерении уровней ALA и PBG^{4,6}.

Клинический диагноз не должен основываться на результатах отдельного теста, он должен согласовываться с результатами клинических и лабораторных данных.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Davis JR, Andelman SL. Urinary Delta-Aminoilevulinic Acid (ALA) Levels in Lead poisoning. Arch Environ Health 1967; 15:53-59.
2. Mauzerall, D, and Granick, S.: The occurrence and determination of aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine, J. Biol. Chem. 1956, 219:435-446/
3. Jacques W, clinical Interpretation of the laboratory tests. 4 ed. Masson. 2002
4. Tietz NW. Clinical guide to laboratory tests, 3rd ed. Saunders Co, 1999.
5. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 4th ed. AACC Press, 1995
6. Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3rd ed. AACC Press, 1997.