

5-ГИДРОКСИИНДОЛУКСУСНАЯ КИСЛОТА Хроматография - спектрофотометрия

КОД 11010 40 определений
Хранить при 15-30° С
Реагенты для определения концентрации 5-Гидроксииндолуксусной кислоты. Использовать только для работы «in vitro» в клинической лаборатории

ПРИНЦИП МЕТОДА

Продукты метаболизма триптофана пробы удерживаются нейтральной смолой. Серотонин (5-НТ) и 5-гидроксириптофан (5-НТР) элюируют вместе в первую очередь, а следом – 5 гидроксииндолуксусная кислота (5-НИАА). Эти метаболиты определяются количественно спектрофотометрически, путем измерения оптической плотности образованного в результате реакции с 1-нитрозо-2-нафтолом комплекса^{1,2}.

СОСТАВ

1. **Реагент.** 1 x 500 мл. Соляная кислота 0,1 моль/л.
2. **Реагент.** 1 x 200 мл. Гидроксид аммония 20 ммоль/л.
3. **Микроколонки.** 2x20. Содержат предварительно взвешенное количество нейтральной смолы в буфере.

А. Реагент. 1 x 100 мл. Серная кислота 1 моль/л.
Едко (Xi): R36/38: Вызывает раздражение при попадании на кожу и в глаза. S26: в случае контакта с глазами немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь за медицинской помощью. S45: При несчастном случае или недомогании немедленно обратитесь за медицинской помощью.

В. Реагент. 100 мл. 1-Нитрозо-2-нафтол 6 ммоль/л, этанол 99%.

Легковоспламеняемый (F): R11: Легковоспламеняем. S7: Держите контейнер плотно закрытым. S16: Держите далеко от источников пламени – Не курить.

С. Реагент. 1 x 5 мл. Нитрит натрия 0,7 моль/л.
Вредно (Xn), опасно для окружающей среды (N): R22: Опасно при глотании. R51: Опасен для водных организмов. S45: При несчастном случае или недомогании немедленно обратитесь за медицинской помощью. S61: Избегать попадания в окружающую среду. Следовать специальным инструкциям/предписаниям безопасности.

Д. Реагент 150 мл. Дихлорэтан.
Легковоспламеняемый (F). Токсично (T): R11: Легковоспламеняем. R22: Опасно при глотании. R36/37/38: Раздражающий для глаз, кожи и дыхательной системы. R45: Может являться канцерогеном. S45: При несчастном случае или недомогании немедленно обратитесь за медицинской помощью. S53: избегать распространения вещества, ознакомиться со специальными инструкциями перед использованием.

С. Стандарт. Серотонин 41,6 мг/л эквивалентно 50 мг/л = 261 мкмоль/л 5-НИАА, соляная кислота 0,1 моль/л, консервант. Первичный водный стандарт.

ХРАНЕНИЕ

Хранить при температуре 15 – 30° С. Реагенты и стандарт хранить до срока годности, указанного на этикетке при хранении плотно закрытыми и предохранении загрязнения во время использования

Показатели загрязнения:

- Реагенты: Присутствие взвешенных частиц или мутность, абсорбция бланка реагента свыше 0,600 при 540 нм (1 см кювета)
- Микроколонки: Отсутствие буфера выше верхнего фильтра колонки.

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

- Настольная центрифуга
- Спектрофотометр или фотометр с фильтром 540 нм (510 – 570).

ОБРАЗЦЫ

Моча. Суточная моча, собранная по стандартной процедуре.

Хранить при 2 – 8°С в течение 24 часов. Стабильность образца не более 15 дней при 2 – 8°С или 1 месяц при -20°С в случае, если их рН довести до 3-6 концентрированной соляной кислотой (HCl). Перед определением мочу следует отцентрифугировать или профильтровать.

ПРОЦЕДУРА

Хроматографическое разделение

1. Удалить крышку с верхней части колонки (3), а затем открыть нижнюю часть колонки. Продвинуть диск до соприкосновения его со смолой, стараясь не надавливать на смолу. Дать колонке полностью стечь.
2. Добавить в колонку:

Реагент 1	2,0 мл	Дать колонке полностью стечь
Образец	2,0 мл	Дать колонке полностью стечь
Реагент 1 (прим. 1)	10,0 мл	Дать колонке полностью стечь
Реагент 2	1,0 мл	Дать колонке полностью стечь

3. Поставить колонку над 10 мл центрифужной пробиркой с закручивающейся крышкой и налить:

4. Тщательно перемешать элюат.

Колориметрия

5. Внести в промаркированные 10 мл пробирки с закручивающимися крышками:

	Бланк	Стандарт	Образец
Реагент (2)	-	-	элюат
Стандарт	2,0 мл	1,5 мл	-
Реагент (А)	-	0,5 мл	-
Реагент (В)	1,0 мл	1,0 мл	1,0 мл
Реагент (С)	1,0 мл	1,0 мл	1,0 мл
	1 капля	1 капля	1 капля

6. Тщательно перемешать и оставить стоять при комнатной температуре (15 – 30° С) в течение 10 минут. Затем добавить:

Реагент D	3,0 мл	3,0 мл	3,0 мл
-----------	--------	--------	--------

7. Тщательно перемешать закрытые пробкой пробирки в течение 10 секунд (миксер) и центрифугировать при 3000 об/мин в течение 2 минут.

8. Измерить абсорбцию (А) верхней фазы Образца и Стандарта против Бланка при 540 нм (примечание 2).

РАСЧЕТ

Концентрацию 5-Н1АА в образце можно рассчитать по следующей общей формуле:

$$\frac{A_{\text{образца}}}{A_{\text{стандарта}}} \times \frac{V_E}{V_S} \times \frac{V_{\text{SIC}}}{V_{\text{EC}}} \times \frac{1}{C_{\text{st}}} \times \text{Rec} = C_{\text{образца}}$$

Принимая во внимание, что объем образца (V_S) 2 мл, объем элюата (V_E) 2 мл, объем элюата для колориметрии (V_{EC}) 2 мл, объем стандарта в колориметрии (V_{SIC}) 0,5 мл, концентрация стандарта (C_{st}) 261 мкмоль/л или 50 мг/л, значение воспроизводимости (Rec) 0,87, для расчета концентрации может использоваться следующая формула:

$\frac{A_{\text{образца}}}{A_{\text{стандарта}}}$	$\times 14.4 = \text{мг/л 5-Н1АА}$
	$\times 75.1 = \text{мкмоль/л 5-Н1АА}$

Количество 5-Н1АА в суточной моче рассчитывается по следующей формуле:

мг/л 5-Н1АА	$\times V_{\text{мочи/24 часа}} (\text{л})$	мг /24 часа
мкмоль/л 5-Н1АА		мкмоль/л /24 часа

НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Моча: 2-6 мг/24 часа = 10,4-31,2 мкмоль/24 часа

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

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется использовать Контрольную мочу (код 18036, 18037) для верификации измерительных процедур

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

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

- Предел обнаружения: 0,9 мг/л = 4,9 мкмоль/л.
- Предел линейности: 200 мг/л = 1050 мкмоль/л. Для более высоких значений следует развести образец дистиллированной водой 1/2 и повторить измерение.
- Сходимость (внутри серии):

Средняя концентрация	CV	n
1,5 мг/л=8,1 мкмоль/л	5,2%	25
12,9 мг/л=67,9 мкмоль/л	3,6%	25

- Воспроизводимость (между сериями):

Средняя концентрация	CV	n
1,5 мг/л=8,1 мкмоль/л	7,7%	25
12,9 мг/л=67,9 мкмоль/л	7,2%	25

Чувствительность:

$$11,98 \text{ мА} \cdot \text{л/мкмоль} = 2,29 \text{ мА} \cdot \text{л/мг}$$

- Достоверность: Результаты, полученные с образцами с добавлением 5-Н1АА не показывали значительных отличий при сравнении с теоретически рассчитанными результатами. Детали сравнительных экспериментов доступны по требованию.
- Интерференция: Некоторая пища, такая как бананы, авокадо, ананасы, киви, красные сливы, помидоры, орехи и шоколад увеличивают выделение 5-Н1АА, поэтому их нельзя употреблять в течение 3-4 дней перед сбором мочи для исследования.
- Некоторые вещества и лекарства могут искажать результат⁴.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

5-гидроксииндолуксусная кислота (5-Н1АА) является конечным продуктом метаболизма триптофана и экскретируется с мочой. 5-Н1АА формируется в результате окислительного дезаминирования из серотонина (5-гидрокситриптамин).

Серотонин является мощным стимулятором гладкой мускулатуры, продуцируется в больших количествах карциноидными опухолями и таким образом, высокие уровни 5-Н1АА могут выявляться у пациентов с опухолями такого рода^{3,5}.

Клинический диагноз не должен основываться только лишь на результатах единичного теста, а должен устанавливаться на основе как клинических, так и лабораторных данных.

ПРИМЕЧАНИЕ

1. По выбору – элюция серотонина (результаты этого теста ориентировочны): после внесения пробы в колонку:

Реагент 1	4,0 мл	Дать колонке полностью стечь
Реагент 1	6,0 мл	Собрать элюат

Хроматографическое разделение может быть продолжено добавлением реагента 2 для выделения 5-Н1АА элюата.

Тщательно перемешать элюат (содержащий серотонин и 5-гидрокситриптофан), налить 2 мл в 10 мл центрифужную пробирку с закручивающейся пробкой и измерить, так же, как описано для 5-Н1АА.

Расчет концентрации серотонина + 5-гидрокситриптофана может производиться следующим образом:

$A_{\text{образца}}$	$\times 45.5 = \text{мг/л Серотонина}$

$A_{\text{стандарта}}$	$\times 258 = \text{мкмоль/л Серотонина}$

2. Если окажется, что верхняя фаза стала мутной, удалите ее и добавьте щепотку безводного сульфата натрия. Взболтать и поставить отстаиваться или отцентрифугировать.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Udenfriend S, Ninus E, Weissbach H, The identification of 5-hydroxy-3-indolacetic 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 estimation of 5-hydroxyindolacetic 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