

ВАНИЛМИНДАЛЬНАЯ КИСЛОТА Хроматография- спектрофотометрия

КОД 11003 20 определений
Хранить при 15-30 С
Реагенты для измерения концентрации ванилминдальной кислоты. Использовать только для диагностики «in vitro» в клинической лаборатории

ПРИНЦИП МЕТОДА

Ванилминдальная кислота (ВМА) образца удерживается анионно-обменной смолой и элюируется после промывания побочных субстанций. ВМА определяется количественно спектрофотометрически как ванилин после окисления периодатом в щелочных условиях^{1,2,3}.

СОСТАВ НАБОРА

1. **Реагент.** 1x25 мл. Буфер Фосфатный натриевый 0,6 моль/л, рН 7,0, азид натрия 15 ммоль/л.
 2. **Реагент.** 1x120 мл. Ацетатный натриевый буфер 0,2 моль/л, рН 6,1, азид натрия 15 ммоль/л.
 3. **Реагент.** 1x170 мл. Хлорид натрия 2 моль/л, азид натрия 15 ммоль/л.
 4. **1x20 Микроколонки.** Содержат предварительно взвешенное количество забуференной анионно-обменной смолы, азид натрия 15 ммоль/л.
- A. Реагент.** 1x30 мл. Карбонат натрия 4 моль/л.
Вредно (Хп): R22: Опасно при попадании в полость рта. R41: Опасность серьезного повреждения глаз. S26: В случае попадания в глаза немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь за медицинской помощью. S39: пользуйтесь защитой для глаз и кожи. S46: При проглатывании немедленно обратитесь за медицинской помощью.
- B. Реагент.** 1 на 10 мл. Порошок m-периодат натрия 0,12 моль/л, после разведения.
Окислитель (O): R8: Огнеопасен при контакте с легковоспламеняемыми материалами.
- C. Реагент.** 1 на 10 мл. Порошок метабисульфита натрия 0,67 моль/л, после разведения.
Вредно (Хп): R22: Опасно при попадании в полость рта. R31: При контакте с кислотами вызывает высвобождение токсичного газа. R41: Опасность серьезного повреждения глаз. S26: В случае попадания в глаза немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь за медицинской помощью. S39: пользуйтесь защитой для глаз и кожи. S46: При проглатывании немедленно обратитесь за медицинской помощью.
- S. Стандарт.** 1 на 5 мл. Дозировка ВМА 0,1 мг не видима во флаконе. Концентрация после разведения указана на этикетке флакона. Значение концентрации проверено по Стандартным Референсным Материалам 925 (Национальный институт Стандартов и Технологии, США).

ХРАНЕНИЕ

Хранить при 15-30°С
Реагенты и Стандарт стабильны до срока годности, указанного на этикетке. Хранить плотно закрытыми, предотвращая загрязнение во время пользования

Показатели ухудшения свойств:

- Реагент: присутствие взвешенных частиц, мутность, абсорбция бланка реагента свыше 0,050 при 360 нм
- Микроколонки: Отсутствие буфера, покрывающего смолу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ РЕАГЕНТЫ

- концентрированная соляная кислота (аналитическая степень чистоты)

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Реагент (B) и (C): растворить сухой порошок в 10 мл дистиллированной воды. Стабильно 5 месяцев при 2-8°С.

Стандарт (S): растворить сухой порошок в 5 мл Реагента (3) и добавить одну каплю концентрированной соляной кислоты. Стабильно 5 месяцев при 2-8°С.

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

- Спектрофотометр или фотометр с фильтром 360 (358 – 362 нм).

ОБРАЗЦЫ

Моча. Образцы, собранные в течение 24 часов по стандартной процедуре.
Хранить при 2-8°С в течение 24 часов. Образцы могут храниться при 2-8°С максимально в течение 5 дней или 1 месяц при - 20°С и доведении рН до 1 – 2 концентрированной соляной кислотой (HCl). Перед началом работы образцы следует отцентрифугировать.

ПРОЦЕДУРА

Приготовление образца.

1. Налить в пробирки:

Образец	1,0 мл
Реагент (1)	1,0 мл

Хроматографическое разделение

2. Снять крышку с верхней части микроколонки (4) и затем открыть нижнюю часть колонки. Протолокнуть верхний диск на поверхность смолы, стараясь не давить на него. Дать колонке полностью стечь.
3. Поместить содержимое пробирок (обработанные исследуемые образцы) в колонку и дать им стечь.
4. Промыть пробирки 2-3 мл дистиллированной воды и перенести в колонку. Дать стечь.
5. Добавить в колонки:

Реагент (2)	5,0 мл	Дать колонке полностью стечь
-------------	--------	------------------------------

6. Поместить колонки над пробирками и налить:

Реагент (3)	6,0 мл	Собрать элюат
-------------	--------	---------------

7. Тщательно перемешайте элюат (примечание 2).

Колориметрия

8. Налить в подписанные пробирки:

	Реагент Бланк	Стандарт	Образец Бланк	Образец	Образец
Элюат	-	-	-	1,0 мл	1,0 мл
Реагент (3)	1,0 мл	0,9 мл	-	-	-
Стандарт (S)	-	0,1 мл	-	-	-
Реагент (A)	0,4 мл	0,4 мл	0,4 мл	0,4 мл	0,4 мл
Реагент (B)	0,1 мл	0,1 мл	-	-	0,1 мл

9. Тщательно перемешать и инкубировать пробирки в течение 30 минут при 37° С. Затем добавить:

Реагент (C)	0,1 мл	0,1 мл	0,1 мл	0,1 мл
Реагент (B)	-	-	0,1 мл	-

10. Считать абсорбцию (A) Бланка для образца, Образца и Стандарта против Реагент Бланка при 360 нм (примечание 2). Абсорбция стабильна не менее 2 часов.

РАСЧЕТ

$$\frac{A_s - A_{sb}}{A_{st}} \times \frac{V_E}{V_S} \times \frac{V_{StC}}{V_{EC}} \times \frac{1}{C_{St}} \times \frac{1}{Rec} = C_s$$

Объем образца ВМА (V_S) – 1 мл, объем элюата (V_E) – 6 мл, объем элюата для колориметрии (V_{EC}) – 1 мл, объем Стандарта для колориметрии (V_{StC}) – 0,1 мл, концентрация Стандарта (C_{St}) указан на этикетке флакона и значение воспроизводимости (Rec) – 0,825. Для расчета концентрации ВМА используется следующая формула:

$\frac{A_s - A_{sb}}{A_{st}} \times C_{St}$	$\times 0,727 = C_s$
---	----------------------

Количество ВМА в 24-час. моче рассчитывается по следующим формулам:

мг/л ВМА	$\times V_{24\text{час мочи}} (\text{л})$	мг ВМА/24-час
мкмоль/л ВМА		мкмоль ВМА/24-час

НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Моча⁴: <13,6 мг/24-час < 68,6 мкмоль/24-час

Данные величины ориентировочны, каждая лаборатория должна устанавливать собственные приемлемые значения нормы.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для проведения контроля качества теста и процедуры исследования рекомендуется использовать Контрольную мочу (код 18036 и 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

- Предел обнаружения: 1,9 мг/л = 9,7 мкмоль/л
- Предел линейности: 300 мг/л = 1500 мкмоль/л. Для более высоких значений разведите образец ½ дистиллированной водой и повторите измерение.
- Сходимость (внутри серии):

Средняя концентрация	CV	n
11,2 мг/дл = 56 мкмоль/л	5,0%	25
43,2 мг/дл = 216 мкмоль/л	2,5%	25

- Воспроизводимость (между сериями):

Средняя концентрация	CV	n
11,2 мг/дл = 56 мкмоль/л	8,6%	25
43,2 мг/дл = 216 мкмоль/л	8,2%	25

- Чувствительность: 7,50 мА · л/мг = 1,50 мА · л/мкмоль
- Достоверность: результаты проб с добавлением ВМА не показывали значительных отличий от расчетных теоретических концентраций. Детали сравнительных экспериментов доступны по запросу.
- Интерференция: Гентизиновая кислота (1000 мг/л), гомогентизиновая кислота (2000 мг/л) и 5-гидроксиндолюксусная кислота (50 мг/л) не влияют на результат. p-Гидроксиминдальная кислота ($\geq 12,5$ мг/л) может влиять на исследование. Некоторые продукты, химические вещества и лекарства могут исказить результат⁵.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Ванилинминдальная кислота является основным конечным продуктом метаболизма катехоламинов и выводится с мочой. Измеренные уровни ВМА отражают общую продукцию адреналина и норадреналина в организме.

Увеличение значений суточной экскреции ВМА связываются с катехоламин секретирующими нейрохромаффинными опухолями, такими как феохромоцитома, нейробластома или параганглиома^{4,6}. Клинический диагноз не должен основываться на результатах отдельного теста, он должен согласовываться с результатами клинических и лабораторных данных.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Перед началом работы с длительно хранившимися подкисленными избытком соляной кислоты образцами, проверьте pH и доведите ее до 6,5 – 7,5 разведенной щелочью (NaOH).
2. Тест может быть прерван в этой точке. Храните элюат в запечатанной пробирке при 2-8°С не более 24 часов.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Wybenga D, Pileggi VJ. Qualitative determination of 3-methoxy-4-hydroxy-mandelic acid (VMA) in urine. *Clin Chim Acta* 1966;16:147-154.
2. Farndon JR, Davidson HA, Johnson IDA, Wells SA. VMA excretion in patients with Pheochromocytoma. *Ann Surg* 1980;191:259-263
3. John J. Pisano, J. Richard Crout, David Abraham. Determination of 3-methoxy-4-hydroxy-mandelic acid in urine. *Clin Chim Acta* 1962; 7: 277-284
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

