

Kód 11003	20 testů
Skladovat při 2 - 30°C	
Reagenty pro měření koncentrace kyseliny vanilmandlové Výhradně pro profesionální in vitro diagnostiku	

## Kyselina vanilmandlová

Chromatografie - spektrofotometrie

### PRINCIP METODY

Kyselina vanilmandlová (VMA) je zachycena na aniontové – pryskyřici, interferující látky se promýváním vyplaví a navázaná VMA je poté uvolněna z povrchu pryskyřice. VMA se stanovuje spektrofotometricky jako vanilin po předchozí oxidaci v alkalickém prostředí<sup>1,2,3</sup>.

### OBSAH A SLOŽENÍ

- Reagent 1** x 25 ml. Fosforečnan sodný - pufr 0,6 mol/L, azid sodný 15 mmol/L, pH 7,0.
  - Reagent 1** x 120 ml. Octan sodný - pufr 0,2 mol/L, pH 6,1, azid sodný 15 mmol/L.
  - Reagent 1** x 170 ml. Chlorid sodný 2 mol/L, azid sodný 15 mmol/L.
  - Mikrokolony** 1 x 20 kusů. Obsahují navážené množství pufovaného aniontu - pryskyřice a azid sodný 1,5 mmol/L.
- A. Reagent 1** x 30 ml. Uhlíčitán draselný 3 mol/L.  
**Varování** : **H302** – Zdraví škodlivý při požití.  
**H315** – Dráždí kůži.  
**H319** – Způsobuje vážné podráždění očí.  
**P302 + P352** – PŘI STYKU S KŮŽÍ: Omyjte velkým množstvím vody a mýdla. **P304 + P340** – PŘI VDECHNUTÍ: Přeneste postiženého na čerstvý vzduch a ponechte jej v klidu v poloze usnadňující dýchání. **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. **P333 + P313** – Při podráždění kůže nebo vyrážce: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.

**B. Reagent** Pro přípravu 10 ml. Jodistan sodný (m-periodát) práškový, 0,12 mol/l - po rekonstituci.  
**Nebezpečí** : **H272** – Může zesílit požár; oxidant.  
**H301** – Toxický při požití.  
**H315** – Dráždí kůži.  
**H319** – Způsobuje vážné podráždění očí.  
**H335** – Může způsobit podráždění dýchacích cest.  
**P301 + P310** – PŘI POŽITÍ: Okamžitě volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO nebo lékaře. **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.

**C. Reagent** Pro přípravu 10 ml. Siřičitan sodný (metabisulfid) práškový, 0,67 mol/L - po rekonstituci.  
**Nebezpečí** : **H302** – Zdraví škodlivý při požití.  
**H318** – Způsobuje vážné poškození očí.  
**EUH 031** – Uvolňuje toxický plyn při styku s kyselinami.  
**S. Standard** VMA standard. 1 x pro 5 ml.  
 Lahvička obsahuje 0,1 mg standardu VMA, který je v lahvičce téměř nezatelný. Koncentrace po rekonstituci je uvedena na lahvičce. Hodnota koncentrace standardu je ověřena podle Standardního referenčního materiálu 925 (National Institute of Standards and Technology, USA).  
 Pro další varování a doporučení viz sds.

### SKLADOVÁNÍ

Skladujte při teplotě 2-30°C.  
 Reagenty jsou stabilní do data expirace uvedené na štítku pokud jsou těsně uzavřené a je zabráněno jejich kontaminaci během jejich použití.  
**Známky zhoršení kvality**: Reagencie: přítomnost částic, zákal, absorbance blanku větší jak 0,050 při 360 nm v 1 cm kyvetě.  
 Mikrokolony: ztráta (nepřítomnost) pufru nad pryskyřicí.

### PŘÍDAVNÉ REAGENCIE

Koncentrovaná kyselina chlorovodíková (kvalita p.a.).

### PŘÍPRAVA REAGENTŮ

Reagenty B a C: Rozpusťte obsah lahvičky (suchý prach) v 10 ml destilované vody. Roztok je stabilní po dobu 5 měsíců při 2-8°C.

VMA standard: Rozpusťte obsah lahvičky (suchý prach) v 5 ml reagentu 3 a přidejte 1 kapku koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Roztok je stabilní po dobu 2 měsíce při 2-8°C.

### PŘÍDAVNÁ ZAŘÍZENÍ

- Spektrofotometr nebo fotometr s filtrem 360 nm (358-362)
- Termostabilní vodní lázeň

### VZORKY

Moč. 24 hodinový vzorek odebraný standardním způsobem. Vzorek je stabilní při 2-8°C maximálně 5 dní a nebo až 1 měsíc při -20°C, jestliže je upraveno pH vzorku koncentrovanou HCl na pH=1-2. Vzorek před testováním centrifugujte, nebo přefiltrujte.

### POSTUP

#### Příprava vzorku

- Pipetujte do zkumavky (Poznámka 1):

Vzorek	1,0 ml
Reagent (1)	1,0 ml

#### Chromatografická separace:

- Nejdříve odstraňte horní uzávěr mikrokolony (4) a poté uzávěr její spodní části. Zatláčte horní disk, který uzavírá pryskyřici tupým předmětem (skleněnou tyčinkou) těsně nad její povrch. Nestlačujte pryskyřici! Kapalínu nad pryskyřicí nechejte prokapat přes spodní uzávěr ven.
- Obsah zkumavky (upravený vzorek) přelijte do kolony a nechte vykat ven.
- Promyjte zkumavku 2 - 3 ml destilované vody a obsah zkumavky přelijte do kolony. Kapalínu z mikrokolony nechte volně vykat ven.
- Do kolony přidejte:

Reagent (2)	5,0 ml	Nechte vykat ven.
-------------	--------	-------------------

- Umístěte kolonu nad zkumavku a pipetujte:

Reagent (3)	6,0 ml	Zachyťte eluát do stejné zkumavky
-------------	--------	-----------------------------------

- Jestliže jste separovali eluáty odděleně, smíchejte je a důkladně promíchejte. (Poznámka 2)

#### Kolorimetrie

- Pipetujte do označených zkumavek:

	Reagent blank	Standard	Vzorek blank	Vzorek
Eluát	-	-	1 ml	1 ml
Reagent (3)	1 ml	0,9 ml	-	-
Standard (S)	-	0,1 ml	-	-
Reagent (A)	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml
Reagent (B)	0,1 ml	0,1 ml	-	0,1 ml

- Zkumavky protřepejte, inkubujte je 30 min při 37°C. Poté přidejte:

Reagent (C)	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Reagent (B)	-	-	0,1 ml	-

- Odečtěte absorbanci (A) vzorkového blanku, vzorku a standardu proti reagent blanku při 360 nm. Absorbance je stabilní nejméně po dobu 2 hodin.

### VÝPOČET

Koncentrace VMA ve vzorku se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_{\text{vzorku}} - A_{\text{blank vzorku}}}{A_{\text{standard}}} \times \frac{V_E}{V_S} \times \frac{V_{Stc}}{V_{Ec}} \times \frac{1}{R_{Ec}} \times C_{St} = C_{\text{vzorku}}$$

Objem vzorku ( $V_S$ ) je 1 ml, objem eluátu ( $V_E$ ) 6 ml, objem eluátu při kolorimetrickém stanovení ( $V_{Ec}$ ) je 1 ml, objem standardu při kolorimetrickém stanovení ( $V_{Stc}$ ) je 0,1 ml, koncentrace standardu ( $C_{St}$ ) je uvedena na lahvičce a průměrná výtěžnost ( $R_{Ec}$ ) = 0,888. Koncentrace se vypočte:

$$\frac{A_{\text{vzorku}} - A_{\text{blank vzorku}}}{A_{\text{standard}}} \times C_{St} \times 0,676 = C_{\text{vzorku}}$$

Kód 11003	20 testů
Skladovat při 2 - 30°C	
Reagenty pro měření koncentrace kyseliny vanilmandlové Výhradně pro profesionální in vitro diagnostiku	

## Kyselina vanilmandlová

### Chromatografie - spektrofotometrie

Množství VMA kyseliny ze 24 h vzorku moči se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{\text{mg/l VMA}}{\mu\text{mol/l VMA}} \times \frac{V_{\text{moče /24-h}}}{V_{\text{moče /24-h}}} = \frac{\text{mg VMA / 24-h}}{\mu\text{mol VMA / 24-h}}$$

#### REFERENČNÍ HODNOTY

Moč<sup>6</sup>: < 13,6 mg/24 h = < 68,6 μmol/24 h. Tyto hodnoty jsou pouze orientační. Každá laboratoř by si měla stanovit své vlastní srovnávací hodnoty.

#### KONTROLA KVALITY:

Pro ověření správnosti měření se doporučuje použít močová kontrola (kat.č. 18036 nebo 18037).

Každá laboratoř by si měla stanovit svojí vlastní vnitřní kontrolu kvality a postupy pro nápravná jednání, jestliže kontroly nejsou v tolerančním rozpětí.

#### METROLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA

- Detekční limit: 1,9 mg / l = 9,7 μmol/l
- Linearita: Do 300 mg/l = 1500 μmol/l. Při vyšších hodnotách zředte vzorek 1/2 destilovanou vodou a opakujte měření.
- Opakovatelnost (jednoho vzorku)

Průměrná koncentrace	CV	n
11,2 mg / l = 56 μmol/l	5,0%	25
43,2 mg / l = 216 μmol/l	2,5%	25

- Reprodukovatelnost:

Průměrná koncentrace	CV	n
11,2 mg / l = 56 μmol/l	8,6%	25
43,2 mg / l = 216 μmol/l	8,2%	25

- Citlivost: 7,50 mA . L/mg = 1,50 mA . L/μmol
- Správnost: Výsledky získané těmito reagenty neukazují systematické rozdíly ve srovnání s teoretickými hodnotami. Podrobnosti o těchto srovnávacích studiích jsou na vyžádání k dispozici.
- Interference: Kyselina gentisová do 1000 mg/l, kyselina homogentisová do 2000 mg/l a kyselina 5-hydroxyindolactová do 50 mg/l neinterferují. P-hydroxymandlová kyselina nad 12,5 mg/l interferuje. Některé potravinové doplňky, substance a léky mohou interferovat během oxidačního stupně, což může mít za následek falešně zvýšené hodnoty<sup>5</sup>.

#### DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

Vanilmandlová kyselina je hlavním konečným produktem katecholaminového metabolismu a je vylučována močí. Její měření odráží celkovou produkci adrenalinu a noradrenalinu v těle. Zvýšené denní hodnoty vylučování VMA jsou spojeny se sekrecí katecholaminů z neurochromafinových tumorů jako jsou pheochromocytomy, neuroblastomy, či paragangliomy<sup>4,6</sup>. Klinická diagnóza by však neměla být uzavřena jen na základě tohoto výsledku, ale měly by být propojeny klinické a laboratorní výsledky.

#### POZNÁMKY

1. Jestliže byl vzorek skladován v kyselém prostředí upravte pH zředěným hydroxidem sodným na 6,5 - 7,5.
2. Test je možné v tomto kroku stanovení přerušit. V tomto případě uchovávejte eluát v uzavřené zkumavce při 2-8°C, maximálně však po dobu 24 hodin.
3. Dlouhé uskladnění kolonek vede k utlačení pryskyřice a tím i ke zpomalení jejich průtoku. Pro obnovu jejich funkce obraťte kolonu před stanovením na 10 minut tak, aby se pryskyřice přesypala. Poté kolonu umístěte do pracovní polohy a pryskyřici nechte usadit.

#### LITERATURA

1. Wybenga D, Pileggi VJ. Quantitative determination of 3-methoxy-4-hydroxy-mandelic acid (VMA) in urine. *Clin Chim Acta* 1966; 16: 147-154.
2. Fardon JR, Davidson HA, Johnston 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-hydroxymandelic acid in urine. *Clin Chim Acta* 1962; 7: 277-284.
4. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 4th ed. Burtis CA, Ashwood ER, Brunis DE, WB Saunders Co, 2005.
5. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5th ed. AACC Press, 2000.
6. Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 4rd ed. AACC Press, 2001.

#### UPOZORNĚNÍ

Překlad revidován k datu: 11.8.2016.

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-sa.com](http://www.biosystems-sa.com).

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

#### Výhradní distributor:

ČR : JK-Trading spol.s.r.o., Křivatcová 421/5, 150 21 Praha 5,  
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