

Praktické cvičení č. _____ datum _____ jméno _____

Téma praktika:

Stanovení kyseliny vanilmandlové, homovanilové a hydroxyindolactové v moči metodou HPLC.

Přístroje a pomůcky:

Kapalinový chromatograf (HPLC) ...BIO-RAD
Elektrochemický (vodivostní) detektor
Pipety, laboratorní sklo
VMA/HVA/5-HIAA by HPLC Reagent Kit Bio-Rad

Úkoly:

- 1) Seznámit se s preanalytickou přípravou vzorku moče
- 2) Seznámit se s hlavními částmi chromatografu a jejich funkcemi
- 3) Vyhodnocení chromatografického záznamu (standard, vzorek)
- 4) Vypočítat odpad kyseliny vanilmandlové, homovanilové a hydroxyindolactové v moči

1) preanalytická příprava vzorku moče na SPE kolonkách

a) příprava směsného vnitřního standardu

100 μ l INT STND 1 + 100 μ l INT STND 2 + 0,9 ml REAG 1 – promíchat

b) příprava vzorku (kalibrátoru, kontroly)

50 μ l moče + 50 μ l směsného vnitřního standardu + 1 ml REAG 1 – promíchat

c) příprava SPE kolonky

- 1 ml REAG 1 - centrifugace 1 min. 2000 otáček/min.
- 500 μ l připraveného vzorku - centrifugace 1min./2000 ot./min.
- 1 ml REAG 1 - - centrifugace 1 min. 2000 otáček/min. – **promytí 2x** – eluát vylít
- kolonku vložit do čisté zkumavky
- 1 ml REAG 2 - centrifugace 1 min. 2000 otáček/min.
- 1 ml REAG 2 - centrifugace 1 min. 2000 otáček/min.

d) promíchaný eluát aplikovat do přístroje - 20 μ l

2) seznámit se s hlavními částmi chromatografu a jejich funkcí demonstrace přístroje

3) vyhodnocení chromatografického záznamu (standard, vzorek)
Identifikujte jednotlivé píky ve vzorku podle retenčního času daného analytu ve standardu.

4) vypočítat obsah kyseliny vanilmandlové (VMK), homovanilové (HVK) a hydroxyindolactové (HIOK) v moči z výšky píku

Vysvětlivky:

- c = koncentrace standardu příslušného analytu
- IS1 = vnitřní standard pro VMK/HVK
- IS2 = vnitřní standard pro HIOK
- f1 = faktor pro VMK/HVK
- f2 = faktor pro HIOK
- RT = retenční čas
- V = objem moče v litrech

Standard

analyt	RT (min.)	výška píku peak hight (mm)		koncentrace st ($\mu\text{mol/l}$)
VMK				
HVK				85
HIOK				94
IS1 – VMK/HVK				164
IS2 - HIOK				-----

Vzorek diuréza

analyt	RT (min)	výška píku peak hight (mm)	faktor	koncentrace ($\mu\text{mol}/24 \text{ hod}$)
VMK				
HVK				
HIOK				
IS1 – VMK/HVK				
IS2 - HIOK			-----	-----
			-----	-----

$$f1 = \frac{\text{výška píku IS1(VMK, HVK) ve standardu}}{\text{výška píku IS1(VMK,HVK) ve vzorku}}$$

$$f2 = \frac{\text{výška píku IS2(HIOK) ve standardu}}{\text{výška píku IS2(HIOK) ve vzorku}}$$

$$\text{VMK} = \frac{\text{výška píku VMK ve vzorku}}{\text{výška píku VMK ve standardu}} \times c \times f1 \times V$$

$\mu\text{mol}/24 \text{ hod}$

$$\text{HVK} = \frac{\text{výška píku HVK ve vzorku}}{\text{výška píku HVK ve standardu}} \times c \times f1 \times V$$

$\mu\text{mol}/24 \text{ hod}$

$$\text{HIOK} = \frac{\text{výška píku HIOK ve vzorku}}{\text{výška píku HIOK ve standardu}} \times c \times f2 \times V$$

$\mu\text{mol}/24 \text{ hod}$