

Porphyrins HPLC Kit

Zur Bestimmung der Porphyrine (freie Säuren) im Urin
For the determination of porphyrins (free acids) in urine

Gültig ab / Valid from 2023-01-12

REF **KC2601**

Σ
100

+2°C ±8°C

-20°C
CAL
CTRL 1
CTRL 2

IVD **CE**



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

| | |
|---|-----------|
| 1. VERWENDUNGSZWECK | 2 |
| 2. EINLEITUNG | 2 |
| 3. TESTPRINZIP | 2 |
| 4. INHALT DER TESTPACKUNG | 3 |
| 5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL | 4 |
| 6. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN | 4 |
| 7. PROBENVORBEREITUNG | 4 |
| 8. TESTDURCHFÜHRUNG | 5 |
| <i>Arbeitsschema</i> | 5 |
| <i>Chromatographische Bedingungen</i> | 5 |
| 9. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE | 6 |
| 10. AUSWERTUNG | 6 |
| <i>Berechnung</i> | 6 |
| <i>Musterchromatogramm</i> | 6 |
| 11. EINSCHRÄNKUNGEN | 7 |
| 12. QUALITÄTSKONTROLLE | 7 |
| <i>Referenzbereiche</i> | 7 |
| <i>Kontrollen</i> | 7 |
| 13. TESTCHARAKTERISTIKA | 8 |
| <i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i> | 8 |
| <i>Linearität</i> | 8 |
| <i>Nachweisgrenze</i> | 8 |
| 14. ENTSORGUNG | 8 |
| 15. MASSNAHMEN BEI STÖRUNGEN | 9 |
| 16. VORSICHTSMASSNAHMEN | 10 |
| 17. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST | 10 |
| 18. LITERATUR | 11 |

1. VERWENDUNGSZWECK

Diese HPLC-Applikation ist für die Bestimmung der Porphyrine aus Urin geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Die Porphyrine sind Vorstufen der Hämproteine, dazu gehören Hämoglobin, Myoglobin und Cytochrome. Sie spielen im menschlichen wie im tierischen Organismus eine wichtige Rolle im Sauerstoff-Stoffwechsel. Die beiden Hauptorte der Häm-Biosynthese sind erythroide Zellen, die ca 85 % der Häm-Gruppen des Körpers synthetisieren, und die Hepatozyten. In einer Kondensationsreaktion werden Succinyl-CoA und Glycin zu δ -Aminolävulinsäure umgesetzt. Durch einen intramolekularen Ringschluss entsteht Porphobilinogen, wovon vier Moleküle zu einem Porphyrin-Ring kondensieren.

Es gibt mehrere genetische Defekte der Häm-Biosynthese von Leber- und erythroiden Zellen. Bei allen kommt es zu einer Anhäufung von Porphyrinen. Diese Krankheitsbilder werden daher als Porphyrien bezeichnet.

Um eine Porphyrie zu diagnostizieren, bestimmt man quantitativ die Porphyrine im Urin. Bei den autosomal dominanten akuten Porphyrien dominieren Uro-, Copro-, Penta- und Tricarboxyporphyrin. Bei den chronischen Porphyrien, einschließlich der *Porphyria cutanea tarda*, sind dagegen Uro- und Heptaporphyrin erhöht. Die erythropoetischen Porphyrien (z.B. Morbus Günther) zeigen eine stark erhöhte Ausscheidung des Coproporphyrin-I-Isomers. Die chronische Bleiintoxikation ist durch eine mäßiggradige Coproporphyrinurie (0,5–2 $\mu\text{mol}/24\text{h}$), die akute Bleivergiftung hingegen durch eine z.T. extrem hohe Gesamtporphyrinausscheidung (bis zu 15 $\mu\text{mol}/24\text{h}$) gekennzeichnet.

Indikationen

- Hereditäre hepatische Porphyrien (z. B. *Porphyria variegata*)
- *Porphyria cutanea tarda* bei chronischem Leberschaden und Alkohol-Lebersyndrom
- Hepatische Porphyrie bei Prostata- und Lebertumoren
- Akute und chronische Bleivergiftung

3. TESTPRINZIP

Zur Bestimmung der Porphyrine wird im ersten Schritt eine sehr einfache Probenvorbereitung durchgeführt. Die Probe und der Kalibrator werden mit 20 μl Salzsäure auf einen pH < 2,5 eingestellt und zentrifugiert. Von dem klaren Überstand werden 100 μl in die HPLC injiziert.

Die Trennung mittels HPLC erfolgt durch Anlegen eines Gradienten aus Laufmittel A und B bei 30 °C auf einer reversed-phase-Säule. Die Aufnahme der Chromatogramme erfolgt mit einem Fluoreszenzdetektor. Die Trennung benötigt ca. 25 Minuten für einen Lauf. Die Quantifizierung erfolgt über den mitgelieferten Kalibrator und die Berechnung der Ergebnisse wird über die externe Standard-Methode anhand der Integration der Peakflächen/-höhen durchgeführt.

Zusammenfassung

Der hier vorliegende Komplettkit zur Bestimmung der Porphyrine ermöglicht eine einfache, schnelle und präzise quantitative Bestimmung. Dieser Komplettkit enthält gebrauchsfertig alle Reagenzien und Verbrauchsmaterialien für die Aufbereitung der Proben und die analytische HPLC-Trennung.

Wie auch bei vielen anderen Parametern liegt der Vorteil der HPLC-Analytik in der gleichzeitigen Abarbeitung vieler Analyten in einem Test. Die HPLC-System-Komplettlösung ermöglicht auch Laboratorien, die bislang noch keine Erfahrung mit Hochdruckflüssigkeitschromatographie haben, diese Technik schnell und problemlos für klinisch-chemische Routinezwecke einzusetzen. Für die Kalibrierung des Testsystems ist meist eine Einpunkt-Kalibrierung ausreichend, im Gegensatz zu Immunoassays mit bis zu 6 Kalibratoren pro Testansatz. Eine Automatisierung der Probenaufgabe und der Auswertung ist möglich, sodass auch größere Probenzahlen fast unbeaufsichtigt abgearbeitet werden können. Bei kurzen Serienlängen ist die Einpunktkalibrierung sehr viel wirtschaftlicher gegenüber der 6-Punkt-Kalibrierung bei Immunassays.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

| Art.-Nr. | Bezeichnung | Kit-Komponenten | Menge |
|-----------|-------------|--|--------------|
| K 0005.15 | RECSOL | Rekonstitutionslösung | 1 x 15 ml |
| KC2601 | MOPHAA | Laufmittel A | 1 000 ml |
| | MOPHAB | Laufmittel B | 2 x 1 000 ml |
| | CAL | Kalibrator; lyophilisiert (Konzentration siehe Spezifikationsdatenblatt) | 4 x |
| | HCL | Salzsäure | 3 ml |
| | CTRL1 | Kontrolle1; lyophilisiert | 4 x |
| | CTRL2 | Kontrolle2; lyophilisiert | 4 x |

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

Die HPLC-Trennsäule (KC2601RP), kann separat bei Immundiagnostik bestellt werden. Um die Lebensdauer Ihrer HPLC-Trennsäule zu verlängern, sollten idealerweise Vorsäulen (KC2601VS) verwendet werden. Diese und auch die Vorsäulenhalter (KC2601VH) können ebenfalls bei Immundiagnostik bestellt werden. Neben den kompletten Kits können auch alle Komponenten einzeln bestellt werden. Bitte fordern Sie unsere Einzelkomponentenpreisliste an.

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- 1,5-ml-Reaktionsgefäße (z. B. Eppendorf)
- Zentrifuge
- Vortex-Mischer
- diverse Pipetten
- HPLC-Gradientenanlage mit Fluoreszenzdetektor
- reversed phase C₁₈-Säule

6. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- **Der lyophilisierte Kalibrator (CAL)** ist bei **-20°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor Gebrauch wird er in **x µl (x = genaues Volumen der beiliegenden Produktspezifikation entnehmen) Rekonstitutionslösung (RECSOL)** resuspendiert. Der Gehalt der Porphyrine ändert sich geringfügig von Charge zu Charge, der genaue Gehalt ist dem Spezifikationsdatenblatt zu entnehmen.
- **Die lyophilisierten Kontrollen 1 und 2 (CTRL1 und 2)** sind bei **-20°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor Gebrauch werden sie in je **x µl (x = genaues Volumen der beiliegenden Produktspezifikation entnehmen) Rekonstitutionslösung (RECSOL)** resuspendiert. Der Gehalt der Porphyrine ändert sich geringfügig von Charge zu Charge, der genaue Gehalt ist dem Spezifikationsdatenblatt zu entnehmen.
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig, bei **2–8°C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. PROBENVORBEREITUNG

Als Patientenprobe ist Urin geeignet. Porphyrine sind licht- und temperaturempfindlich, daher sollte die Probe sofort nach der Abnahme kühl und dunkel gelagert werden.

8. TESTDURCHFÜHRUNG

Arbeitsschema

| | |
|---|---|
| Kalibrator und Kontrolle 1 oder 2 je 20 µl Salzsäure (HCL) im Originalgebinde zufügen und gut mischen. 250 µl in ein Reaktionsgefäß pipettieren. | 250 µl eines kühl und dunkel gelagerten 24-Stunden-Urins (ohne Zusatz) mit 20 µl Salzsäure (HCL) versetzen (pH soll < 2,5 sein) und gut mischen. |
| 5 min bei 10000 g zentrifugieren. | |
| 100 µl Überstand ins HPLC-System injizieren | |

Chromatographische Bedingungen

| | | |
|------------------------|--|--------|
| Säulenmaterial: | Bischoff Prontosil 120-5-C18 ace EPS; 5 µm | |
| Säulendimension: | 125 mm × 4 mm | |
| Fluss: | 0,75 ml/min | |
| Fluoreszenz-Detektion: | Exzitation: | 400 nm |
| | Emission: | 620 nm |
| Temperatur: | 30 °C | |
| Auftragsvolumen: | 100 µl | |
| Laufzeit: | 25 Minuten | |
| Gradient: | | |

| Zeit | % B | % A |
|----------|-----|-----|
| 0 min | 38 | 62 |
| 1,5 min | 38 | 62 |
| 9,5 min | 80 | 20 |
| 11,5 min | 80 | 20 |
| 11,6 min | 95 | 5 |
| 15 min | 95 | 5 |
| 15,1 min | 38 | 62 |
| 24 min | 38 | 62 |

9. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE

Wir empfehlen die Verwendung einer Vorsäule; um die Säulenhaltbarkeit zu verlängern.

Nach der Analyse sollte die Trennsäule mit ca. 30 ml Reinstwasser bei einem Fluss von 1 ml/min gespült werden. Anschließend wird die Säule in 50% Methanol in Wasser gelagert (ca. 30 ml, Fluss 0,7 ml/min).

Zur Wiederinbetriebnahme wird das ganze System mit ca. 30 ml Laufmittel (MOPHA) äquilibriert.

10. AUSWERTUNG

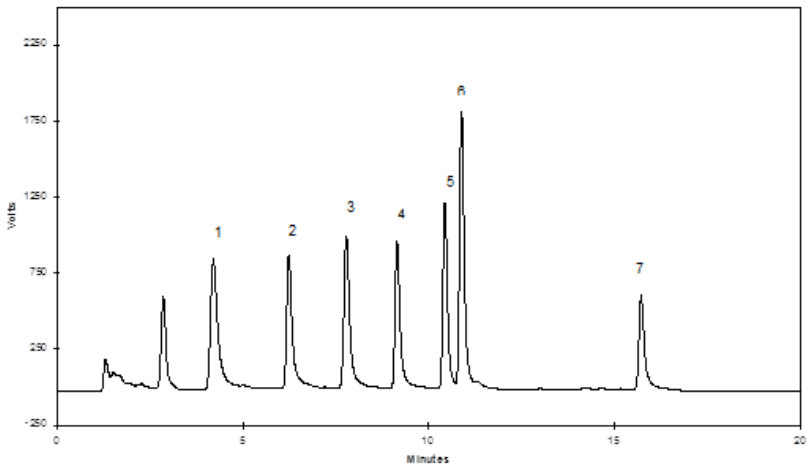
Berechnung

$$\text{Probenkonzentration} = \frac{\text{Peakhöhe Probe} \times \text{Kalibratorkonzentration}^*}{\text{Peakhöhe Kalibrator}}$$

* siehe Spezifikationsdatenblatt

Hinweis: Alternativ zur Peakhöhe kann auch die Peakfläche zur Auswertung herangezogen werden.

Musterchromatogramm



Peakreihenfolge (von links nach rechts)

- 1) 8-carboxyl Porphyrin (Uro-)
- 2) 7-carboxyl Porphyrin (Hepta-)
- 3) 6-carboxyl Porphyrin (Hexa-)
- 4) 5-carboxyl Porphyrin (Penta)
- 5) 4-carboxyl Porphyrin (Copro) I
- 6) 4-carboxyl Porphyrin (Copro) III
- 7) Mesoporphyrin IX

11. EINSCHRÄNKUNGEN

Blutproben können nicht bestimmt werden.

12. QUALITÄTSKONTROLLE

Referenzbereiche

| | Mittelwert (µg/24 h) | Bereich (µg/24 h) |
|--|----------------------|-------------------|
| 8-carboxyl Porphyrin (Uro-) | 7,0 | 0–33 |
| 7-carboxyl Porphyrin (Hepta-) | < Nachweisgrenze | 0–10 |
| 6-carboxyl Porphyrin (Hexa-) | < Nachweisgrenze | 0–7 |
| 5-carboxyl Porphyrin (Penta) | < Nachweisgrenze | 0–5 |
| 4-carboxyl Porphyrin (Copro) Coprop. I 17 – 31 % (Lit. 3) Coprop. III 69 – 83 % (Lit. 3) | 44,8 | 0–120 |

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren. Die Angabe des Referenzbereichs dient lediglich der Orientierung und kann von anderen publizierten Daten abweichen.

Kontrollen

Wir empfehlen, bei jedem Testansatz Kontrollen mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

13. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay-VK:

| | | |
|--------------------|-------------------|----------|
| Uroporphyrin | 5,6 % (35,8 µg/l) | [n = 10] |
| Heptaporphyrin | 2,5 % (25,3 µg/l) | [n = 10] |
| Hexaporphyrin | 2,6 % (27,0 µg/l) | [n = 10] |
| Pentaporphyrin | 2,6 % (31,7 µg/l) | [n = 10] |
| Coproporphyrin I | 2,5 % (24,9 µg/l) | [n = 10] |
| Coproporphyrin III | 2,6 % (57,1 µg/l) | [n = 10] |

Inter-Assay-VK:

| | | |
|--------------------|-------------------|---------|
| Uroporphyrin | 6,6 % (52,5 µg/l) | [n = 5] |
| Heptaporphyrin | 6,0 % (30,1 µg/l) | [n = 5] |
| Hexaporphyrin | 5,0 % (30,8 µg/l) | [n = 5] |
| Pentaporphyrin | 5,1 % (35,9 µg/l) | [n = 5] |
| Coproporphyrin I | 7,5 % (24,0 µg/l) | [n = 5] |
| Coproporphyrin III | 4,7 % (65,9 µg/l) | [n = 5] |

Linearität

bis 1 mg/l

Nachweisgrenze

| | |
|--------------------|-----------|
| Uroporphyrin | 0,60 µg/l |
| Heptaporphyrin | 0,55 µg/l |
| Hexaporphyrin | 0,49 µg/l |
| Pentaporphyrin | 0,51 µg/l |
| Coproporphyrin I | 0,51 µg/l |
| Coproporphyrin III | 0,50 µg/l |

14. ENTSORGUNG

Das Laufmittel (MOPHA) muss als halogenfreier Lösungsmittelabfall entsorgt werden. Bitte beachten Sie die entsprechenden nationalen Richtlinien. Die Salzsäure (HCL) kann mit Natronlauge neutralisiert und bei neutralem pH als Salzlösung entsorgt werden.

Achtung: Wärmeentstehung!

15. MASSNAHMEN BEI STÖRUNGEN

| Problemstellung | Mögliche Ursache | Behebung |
|---------------------------|--|---|
| Kein Signal | Keine oder defekte Verbindung zur Auswerteeinheit. | Signalkabel und Anschluss prüfen. |
| | Detektorlampe zu alt | Ggf. Lampe erneuern |
| Keine Peaks | Injektor verstopft | Injektor überprüfen |
| Doppelpeaks | Totvolumen an Fittings und/oder Säule | Fittings und / oder Säule erneuern |
| Störpeaks | Injektor verunreinigt | Injektor reinigen |
| | Kontamination am Säulenkopf | Säule umdrehen und 30 min mit niedrigem Fluß (0,2 ml/min) Laufmittel spülen |
| | Luft im System | Pumpe entgasen |
| | Autosamplergefäße verunreinigt | Neue oder mit Methanol gespülte Autosamplergefäße verwenden |
| Breite Peaks, Tailing | Vorsäule / Säule zu alt | Neue Vorsäule / Säule verwenden |
| Veränderte Retentionszeit | Temperaturdrift | Säulenofen verwenden |
| | Pumpe fördert ungenau | Pumpe überprüfen, entlüften |
| | System noch nicht im Gleichgewicht | System mit mobiler Phase 15 min spülen |
| Basislinie driftet | Detektorlampe noch kalt | Warten |
| | Detektorlampe zu alt | Ggf. Lampe erneuern |
| | System noch nicht im Gleichgewicht | System mit mobiler Phase 15 min spülen |
| | Pumpe fördert ungenau | Pumpe überprüfen, entlüften |
| Unruhige Basislinie | Pumpe fördert ungenau | Pumpe überprüfen, entlüften |
| | Detektorzelle verschmutzt | Detektorzelle reinigen |

16. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Salzsäure (HCL) muss mit Vorsicht behandelt werden! Sie verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Als Vorsichtsmaßnahme wird empfohlen, das verwendete Humanmaterial immer als potentiell infektiös zu betrachten.
- Reagenzien dieser Testpackung enthalten organische Lösungsmittel. Berührungen mit der Haut oder den Schleimhäuten sind zu vermeiden.

17. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Reagenzien dieser Testpackung enthalten organische Lösungsmittel. Berührungen mit der Haut oder den Schleimhäuten sind zu vermeiden.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

- Schwerwiegende Vorkommnisse sind der Immundiagnostik AG und den nationalen Aufsichtsbehörden zu melden.
- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.

18. LITERATUR

1. Armbruster et al. (1983). Auftrennung und Quantifizierung der Porphyrine mit Hilfe der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie. *Ärztl. Lab.* **29**; 379-384.
2. Kazuyuki O. et al. (1988). Reevaluation of urinary excretion of copro-porphyrins in lead-exposed workers. *Int Arch Occup Environ Health* **60**; 107-110.
3. Thomas L. (Hrsg). *Labor und Diagnose* **5. Auflage** S. 458-474.

Verwendete Symbole:

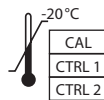
| | | | |
|---|---|---|---------------------------------------|
|  | Temperaturbegrenzung |  | Bestellnummer |
|  | In-Vitro-Diagnostikum |  | Zu verwenden mit |
|  | Hersteller |  | Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen |
|  | Chargenbezeichnung |  | Verwendbar bis |
|  | Enthält Plasmaderivate oder menschliches Blut |  | Gebrauchsanweisung beachten |
|  | Spezifikationsdatenblatt beachten |  | Nicht wiederverwenden |
|  | Herstellungskennung |  | Enthält Material tierischen Ursprungs |
|  | medizinische Substanz |  | Enthält Material humanen Ursprungs |

Porphyrins HPLC Kit

For the determination of porphyrins (free acids) in urine

Valid from 2023-01-12

REF **KC2601**



IVD **CE**



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

Table of Contents

| | |
|---|-----------|
| 1. INTENDED USE | 15 |
| 2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST | 15 |
| 3. PRINCIPLE OF THE TEST | 15 |
| 4. MATERIAL SUPPLIED | 16 |
| 5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED | 17 |
| 6. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS | 17 |
| 7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION | 17 |
| 8. ASSAY PROCEDURE | 18 |
| <i>Test procedure</i> | 18 |
| <i>Chromatographic conditions</i> | 18 |
| 9. TREATMENT OF THE COLUMN | 19 |
| 10. RESULTS | 19 |
| <i>Calculation</i> | 19 |
| <i>Typical chromatogram</i> | 19 |
| 11. LIMITATIONS | 20 |
| 12. QUALITY CONTROL | 20 |
| <i>Reference ranges</i> | 20 |
| 13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS | 21 |
| <i>Precision and reproducibility</i> | 21 |
| <i>Linearity</i> | 21 |
| <i>Detection limit</i> | 21 |
| 14. DISPOSAL | 22 |
| 15. TROUBLESHOOTING | 22 |
| 16. PRECAUTIONS | 23 |
| 17. GENERAL NOTES ON THE TEST | 24 |
| 18. REFERENCES | 24 |

1. INTENDED USE

This HPLC application is intended for the quantitative determination of porphyrins in urine. For *in vitro* diagnostic use only.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

The porphyrins are precursors of heme, which is a cofactor in hemoglobin, myoglobin and the cytochromes. They play an important role in the oxygen metabolism. Heme biosynthetic activity is located quantitatively in bone marrow and liver. The series of reactions leading to heme synthesis begins with the condensation of succinyl coenzyme A (CoA) and glycine and ends with the insertion of an iron atom into a molecule of protoporphyrin IX.

There are several genetic defects of heme biosynthesis described. In all of them an increase of porphyrins is recognized.

The laboratory diagnosis and classification of porphyrin disorders are based primarily on the measurement of the excretion of porphyrins and porphyrin precursors, mainly in urine. Uro-, copro-, penta- and tricarboxyporphyrin are increased in autosomal dominant acute porphyrin disorders. In chronic porphyrin disorders, including *porphyria cutanea tarda*, uro- and hepta-porphyrin are elevated. In chronic lead intoxication the coproporphyrins are slightly increased (0.5–2 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ urine), acute lead poisoning is characterized by extremely high excretion of total porphyrins (up to 15 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ urine).

Indications

- Hereditary hepatic porphyria (e. g. *porphyria variegata*)
- *Porphyria cutanea tarda* in chronic liver disease and alcoholic liver syndrome
- Hepatic porphyria in prostate and liver tumors
- Acute and chronic lead poisoning

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The first step in the determination of porphyrins includes an easy sample preparation. The pH value of the sample and the calibrator is adjusted below 2.5 by addition of 20 μl of hydrochloric acid. After centrifugation, 100 μl of the supernatant is injected into the HPLC system.

The separation via HPLC follows a gradient method, using a reversed phase column at 30 °C; one run lasts 25 minutes. The chromatograms are recorded with a fluorescence detector. The quantification is performed with the delivered calibrator. The concentration is calculated via integration of the peak areas or peak heights.

Summary

This HPLC application provides an easy, fast and precise method for quantitative determination of porphyrins. The kit contains all reagents necessary for sample preparation and separation except the column.

As for many other parameters, the advantage of HPLC analytics is the simultaneous handling of many analytes in a single test. The HPLC complete system enables even laboratories without experience in high performance liquid chromatography to use this technique for clinical chemical routines quickly and precisely. Mostly, a one-point calibration is sufficient for calibrating the test system – unlike immunoassays with up to 6 calibrators per test. It is possible to automate the sample application and calculation of the results so that even higher number of samples can be handled nearly without control. With short test series, the one-point calibration is much more economic than 6-point calibration for immunoassays.

4. MATERIAL SUPPLIED

| Cat. No. | Label | Kit components | Quantity |
|-----------|--------|--|--------------|
| K 0005.15 | RECSOL | Reconstitution solution | 1 x 15 ml |
| KC2601 | MOPHAA | Mobile phase A | 1 000 ml |
| | MOPHAB | Mobile phase B | 2 x 1 000 ml |
| | CAL | Calibrator; lyophilised (see specification data sheet for concentration) | 4 x |
| | HCL | Hydrochloric acid | 3 ml |
| | CTRL1 | Control1; lyophilised | 4 x |
| | CTRL2 | Control2; lyophilised | 4 x |

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

The HPLC column (KC2601RP), can be ordered separately from Immundiagnostik. To extend the lifetime of your HPLC column, pre-columns (KC2601VS) are highly recommended. These and also the pre-column holders (KC2601VH) can also be ordered from Immundiagnostik.

In addition to the complete kits, all components can also be ordered separately. Please ask for our single component price list.

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- 1.5 ml reaction tubes (e.g. Eppendorf)
- Centrifuge
- Various pipettes
- Vortex
- HPLC gradient pump with fluorescence detector
- Reversed phase C₁₈ column

6. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- **The lyophilised calibrator (CAL)** is stable at **-20°C** until the expiry date stated on the label. Before use, the **CAL** has to be reconstituted with **x µl (x = see the enclosed product specification for the volume needed) reconstitution solution (RECSOL)**. The concentration of porphyrins slightly changes from lot to lot, the exact concentration is stated on the specification data sheet.
- **The lyophilised controls 1 and 2 (CTRL1 and 2)** are stable at **-20°C** until the expiry date stated on the label. Before use, they have to be reconstituted each with **x µl (x = see the enclosed product specification for the volume needed) reconstitution solution (RECSOL)**. The concentration of porphyrins slightly changes from lot to lot, the exact concentration is stated on the specification data sheet.
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2–8°C**.

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Urine is suited for this test system.

The porphyrins are light and temperature-sensitive. Therefore, protect samples from light and cool immediately after collection.

8. ASSAY PROCEDURE

Test procedure

| | |
|---|---|
| Add 20 µl hydrochloric acid (HCL) to the calibrator and control 1 or 2 in the original flask and mix well. Pipet 250 µl into a reaction tube. | Mix 250 µl of a cool and dark stored 24 h urine (without additives), with 20 µl hydrochloric acid (HCL) (pH should be below 2.5) and mix well. |
| Centrifuge for 5 min at 10000 g . | |
| Inject 100 µl of the supernatant into the HPLC | |

Chromatographic conditions

| | | |
|-------------------------|--|--------|
| Column material: | Bischoff Prontosil 120-5-C18 ace EPS; 5 µm | |
| Column dimension: | 125 mm × 4 mm | |
| Flow rate: | 0.75 ml/min | |
| Fluorescence detection: | Excitation: | 400 nm |
| | Emission: | 620 nm |
| Temperature: | 30 °C | |
| Injection volume: | 100 µl | |
| Run time: | 25 minutes | |
| Gradient: | | |

| Time | % B | % A |
|----------|-----|-----|
| 0 min | 38 | 62 |
| 1.5 min | 38 | 62 |
| 9.5 min | 80 | 20 |
| 11.5 min | 80 | 20 |
| 11.6 min | 95 | 5 |
| 15 min | 95 | 5 |
| 15.1 min | 38 | 62 |
| 24 min | 38 | 62 |

9. TREATMENT OF THE COLUMN

It is recommended to use a guard column to extend column life.

After analysis, the column should be flushed with 30 ml ultra pure water (1 ml/min) and stored in 50% methanol in water (~ 30 ml, flow 0.7 ml/min). Before use, the system should be equilibrated with ~ 30 ml mobile phase (MOPHA).

10. RESULTS

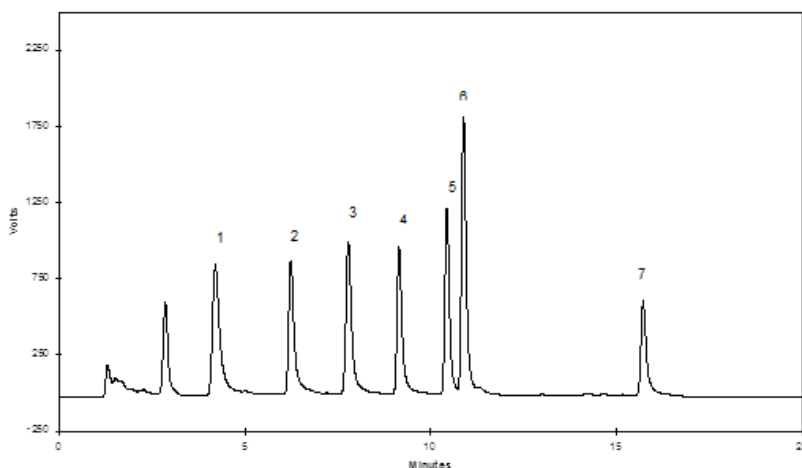
Calculation

$$\text{Sample concentration} = \frac{\text{Peak height sample} \times \text{calibrator concentration}^*}{\text{Peak height calibrator}}$$

* see specification data sheet

Tip: Alternatively, the peak area instead of the peak height can be used for quantification.

Typical chromatogram



Column: Prontosil 120-5-C18 ace-EPS

Order of peaks (from the left to the right)

- 1) 8-carboxyl Porphyrin (Uro-)
- 2) 7-carboxyl Porphyrin (Hepta-)
- 3) 6-carboxyl Porphyrin (Hexa-)
- 4) 5-carboxyl Porphyrin (Penta)
- 5) 4-carboxyl Porphyrin (Copro) I
- 6) 4-carboxyl Porphyrin (Copro) III
- 7) Mesoporphyrin IX

11. LIMITATIONS

Do not use blood samples for analysis.

12. QUALITY CONTROL

Reference ranges

The normal range is related to 24 h urine.

| | Mean ($\mu\text{g}/24\text{ h}$) | Area ($\mu\text{g}/24\text{ h}$) |
|--|------------------------------------|------------------------------------|
| 8-carboxyl porphyrin (Uro-) | 7.0 | 0–33 |
| 7-carboxyl porphyrin (Hepta-) | < detection limit | 0–10 |
| 6-carboxyl porphyrin (Hexa-) | < detection limit | 0–7 |
| 5-carboxyl porphyrin (Penta) | < detection limit | 0–5 |
| 4-carboxyl porphyrin (Copro) Coprop. I 17 – 31 % (Lit. 3) Coprop. III 69 – 83 % (Lit. 3) | 44.8 | 0–120 |

We recommend each laboratory to establish its own reference range. The above mentioned values are only for orientation and may deviate from other published data.

Controls

Control samples should be analysed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay CV:

| | | |
|--------------------|-------------------|----------|
| Uroporphyrin | 5.6 % (35.8 µg/l) | [n = 10] |
| Heptaporphyrin | 2.5 % (25.3 µg/l) | [n = 10] |
| Hexaporphyrin | 2.6 % (27.0 µg/l) | [n = 10] |
| Pentaporphyrin | 2.6 % (31.7 µg/l) | [n = 10] |
| Coproporphyrin I | 2.5 % (24.9 µg/l) | [n = 10] |
| Coproporphyrin III | 2.6 % (57.1 µg/l) | [n = 10] |

Inter-Assay CV:

| | | |
|--------------------|-------------------|---------|
| Uroporphyrin | 6.6 % (52.5 µg/l) | [n = 5] |
| Heptaporphyrin | 6.0 % (30.1 µg/l) | [n = 5] |
| Hexaporphyrin | 5.0 % (30.8 µg/l) | [n = 5] |
| Pentaporphyrin | 5.1 % (35.9 µg/l) | [n = 5] |
| Coproporphyrin I | 7.5 % (24.0 µg/l) | [n = 5] |
| Coproporphyrin III | 4.7 % (65.9 µg/l) | [n = 5] |

Linearity

up to 1 mg/l

Detection limit

| | |
|--------------------|-----------|
| Uroporphyrin | 0.60 µg/l |
| Heptaporphyrin | 0.55 µg/l |
| Hexaporphyrin | 0.49 µg/l |
| Pentaporphyrin | 0.51 µg/l |
| Coproporphyrin I | 0.51 µg/l |
| Coproporphyrin III | 0.50 µg/l |

14. DISPOSAL

The mobile phase (MOPHA) must be disposed as non-halogenated solvent. The hydrochloric acid (HCL) solution can be neutralized with NaOH and if the pH value is neutral it can be disposed of as salt solution.

Important: Reaction will produce heat, be careful!

Please refer to the appropriate national guidelines.

15. TROUBLESHOOTING

| Problem | Possible cause | Solution |
|--------------------------|--|---|
| No signal | No or defect connection to evaluation system | Check signal cord and connection |
| | Detector lamp is too old | Change lamp |
| No peaks | Injector is congested | Check injector |
| Double peaks | Dead volume in fittings and / or column | Renew fittings and / or column |
| Contaminating peaks | Injector dirty | Clean injector |
| | Contamination at the head of the column | Change direction of the column and rinse for 30 min at low flow rate (0.2 ml/min) with mobile phase |
| | Air in the system | Degas pump |
| | Auto sampler vials contaminated | Use new vials or clean them with methanol |
| Broad peaks, tailing | Precolumn / column exhausted | Use new precolumn / column |
| Variable retention times | Drift in temperature | Use a column oven |
| | Pump conveys inaccurately | Check pump, degas the system |
| | System is not in steady state yet | Rinse system mobile phase for 15 min |

| Problem | Possible cause | Solution |
|------------------------|---|--------------------------------------|
| Baseline is drifting | Detector lamp did not reach working temperature yet | Wait |
| | Detector lamp is too old | Change lamp |
| | System is not in steady state yet | Rinse system mobile phase for 15 min |
| | Pump conveys inaccurately | Check pump, degas the system |
| Baseline is not smooth | Pump conveys inaccurately | Check pump, degas the system |
| | Detector flow cell is dirty | Clean flow cell |

16. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- The hydrochloric acid (HCL) solution contains acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped out immediately with copious quantities of water. Do not breathe vapor and avoid inhalation.
- As a precaution, it is recommended that the human material used is always considered potentially infectious.
- The test components contain organic solvents. Contact with skin or mucous membranes must be avoided.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on kit label.

















17. GENERAL NOTES ON THE TEST

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.
- Plugs and caps of different reagents should not be swapped.
- Quality control guidelines should be observed.
- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which has not been consulted with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.
- Serious incidents are to be reported to Immundiagnostik AG and the national regulatory authorities.

18. REFERENCES

1. Armbruster et al. (1983). Auftrennung und Quantifizierung der Porphyrine mit Hilfe der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie. *Ärztl. Lab.* **29**; 379-384.
2. Kazuyuki O. et al. (1988). Reevaluation of urinary excretion of coproporphyrins in lead-exposed workers. *Int Arch Occup Environ Health* **60**; 107-110.
3. Thomas L. (Hrsg). *Labor und Diagnose* **5. Auflage** S. 458-474.

Used symbols:

| | | | |
|---|--|---|------------------------------------|
|  | Temperature limitation |  | Catalogue number |
|  | In Vitro Diagnostic Medical Device |  | To be used with |
|  | Manufacturer |  | Contains sufficient for <n> tests |
|  | Lot number |  | Use by |
|  | Contains plasma derivatives or human blood |  | Consult instructions for use |
|  | Consult specification data sheet |  | Do not re-use |
|  | Unique Device Identification |  | Contains material of animal origin |
|  | Medicinal substance |  | Contains material of human origin |

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

