

Porphyrins HPLC Kit

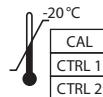
Zur Bestimmung der Porphyrine (freie Säuren) im Urin

For the determination of porphyrins (free acids) in urine

Gültig ab / Valid from 2015-12-21



KC2601



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

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. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN | 4 |
| 8. PROBENVORBEREITUNG | 5 |
| 9. TESTDURCHFÜHRUNG | 5 |
| <i>Hinweise</i> | 5 |
| <i>Arbeitsschema</i> | 5 |
| <i>Chromatographische Bedingungen</i> | 6 |
| 10. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE | 6 |
| 11. AUSWERTUNG | 7 |
| <i>Berechnung</i> | 7 |
| <i>Musterchromatogramm</i> | 7 |
| 12. EINSCHRÄNKUNGEN | 8 |
| 13. QUALITÄTSKONTROLLE | 8 |
| <i>Referenzbereiche</i> | 8 |
| <i>Kontrollen</i> | 8 |
| 14. TESTCHARAKTERISTIKA | 8 |
| <i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i> | 8 |
| <i>Linearität</i> | 9 |
| <i>Nachweisgrenze</i> | 9 |
| 15. ENTSORGUNG | 9 |
| 16. MASSNAHMEN BEI STÖRUNGEN | 9 |
| 17. LITERATUR | 10 |
| 18. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST | 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 erytroiden Zellen. Bei allen kommt es zu einer Anhäufung von Porphyrinen. Diese Krankheitsbilder werden daher als Porphyrien bezeichnet.

Um eine Porphyrrie zu diagnostizieren, bestimmt man quantitativ die Porphyrine im Urin. Bei den autosomal dominanten akuten Porphyrien dominieren Uro-, Copro-, Penta- und Tricarboxypporphyrin. 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 µmol/24 h), die akute Bleivergiftung hingegen durch eine z.T. extrem hohe Gesamtporphyrinausscheidung (bis zu 15 µmol/24 h) gekennzeichnet.

Indikationen

- Hereditäre hepatische Porphyrien (z.B. *Porphyria variegata*)
- *Porphyria cutanea tarda* bei chronischem Leberschaden und Alkohol-Leber-Syndrom
- Hepatische Porphyrrie 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 25 %iger 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 Einpunkt-Kalibrierung sehr viel wirtschaftlicher gegenüber der 6-Punkt-Kalibrierung bei Immunassays.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

| Art.-Nr. | Bezeichnung | Kit-Komponenten | Menge |
|----------|----------------|---|---------------------|
| KC2601LA | MOPHAA | Laufmittel A | 1000 ml |
| KC2601LB | MOPHAB | Laufmittel B | 2 x 1000 ml |
| KC2601KA | CAL | Kalibrator (lyoph. 1 ml; Konzentration siehe Spezifikationsdatenblatt) | 10 Fläschchen |
| KC2601HC | HCL | Salzsäure (25 %) | 10 ml |
| KC2601RE | RECSOL | Rekonstitutionslösung | 2 x 15 ml |
| KC2601KO | CTRL1 CTRL2 | Kontrolle 1 und 2 (lyoph. 1 ml; Konzentration siehe Spezifikationsdatenblatt) | 2 x 3 Fläschchen |

Die HPLC-Trennsäule (KC2601RP) kann separat 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

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

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C ($\geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$).

6. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Der lyophilisierte Kalibrator (CAL) ist bei -20 °C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor Gebrauch wird er in 1 ml Rekonstitutionslösung (RECSOL) resuspendiert. Der Gehalt der Porphyrine ändert sich geringfügig von Charge zu Charge, der genaue Gehalt ist dem Spezifikationsdatenblatt zu entnehmen. **Kalibrator** (rekonstituierter CAL) **sollte nicht länger als 24 h bei 4 °C aufbewahrt werden.**
- Die lyophilisierten Kontrollen 1 und 2 (CTRL 1 und 2) sind bei -20 °C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor Gebrauch werden sie in je 1 ml 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. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.
- Die 25%ige Salzsäure (HCL) muss mit Vorsicht behandelt werden. Sie verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhand-

schuhen, 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.

8. PROBENVORBEREITUNG

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

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettievolumina 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.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

Arbeitsschema

| |
|---|
| 1 ml eines kühl und dunkel gelagerten 24-Stunden-Urins (ohne Zusatz) sowie der Kalibrator und Kontrolle 1 oder 2 werden mit je 20 µl 25%iger Salzsäure (HCL) versetzt (pH soll < 2,5 sein) und gemischt. |
| 5 min bei 10 000 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 |

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

10. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE

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.

11. AUSWERTUNG

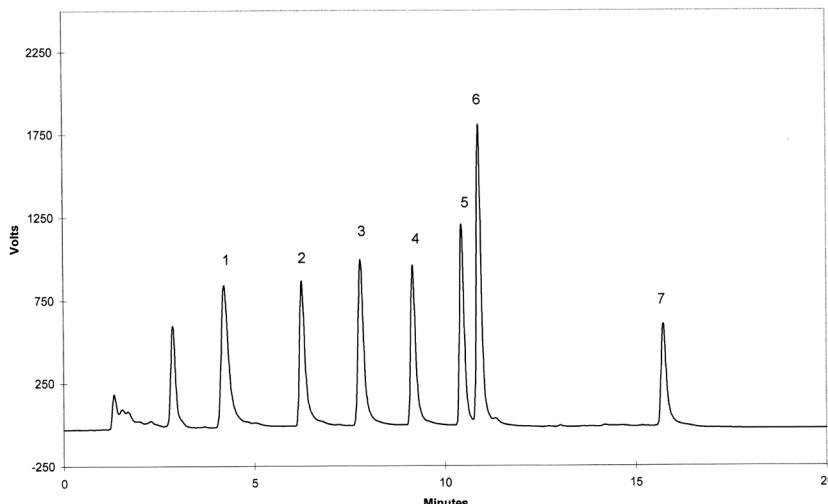
Berechnung

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

* siehe Spezifikationsdatenblatt

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

Musterchromatogramm



Peakreihenfolge (von links nach rechts)

- a) 8-carboxyl Porphyrin (Uro-)
- b) 7-carboxyl Porphyrin (Hepta-)
- c) 6-carboxyl Porphyrin (Hexa-)
- d) 5-carboxyl Porphyrin (Penta)
- e) 4-carboxyl Porphyrin (Copro) I
- f) 4-carboxyl Porphyrin (Copro) III
- g) Mesoporphyrin IX

12. EINSCHRÄNKUNGEN

Blutproben können nicht bestimmt werden.

13. QUALITÄTSKONTROLLE

Referenzbereiche

| | Mittelwert ($\mu\text{g}/24 \text{ h}$) | Bereich ($\mu\text{g}/24 \text{ h}$) |
|--|---|--|
| 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.

14. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay-VK:

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

15. ENTSORGUNG

Das Laufmittel (MOPHA) muss als halogenfreier Lösungsmittelabfall entsorgt werden. Die Salzsäure (HCl) kann mit Natronlauge neutralisiert und bei neutralem pH als Salzlösung entsorgt werden.

Achtung: Wärmeentstehung!**16. 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 |

| Problemstellung | Mögliche Ursache | Behebung |
|---------------------------|------------------------------------|---|
| Störpeaks | Injecteur verunreinigt | Injecteur reinigen |
| | Kontamination am Säulenkopf | Säule umdrehen und 30 min mit niedrigem Fluß (0,2 ml/min) Laufmittel spülen |
| | Luft im System | Pumpe entgasen |
| | Autosamplergefäß verunreinigt | Neue oder mit Methanol gespülte Autosamplergefäß 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 |

17. 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.

18. 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.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet 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 Pipettievolumina 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.

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Zu verwenden mit



Hersteller



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Chargenbezeichnung



Verwendbar bis



Achtung

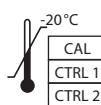
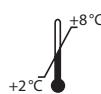
Porphyrins HPLC Kit

For the determination of porphyrins (free acids) in urine

Valid from 2015-12-21



KC2601



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

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 | 16 |
| 6. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS | 17 |
| 7. PRECAUTIONS | 17 |
| 8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION | 17 |
| 9. ASSAY PROCEDURE | 18 |
| <i>Procedural notes</i> | 18 |
| <i>Test procedure</i> | 18 |
| <i>Chromatographic conditions</i> | 19 |
| 10. TREATMENT OF THE COLUMN | 19 |
| 11. RESULTS | 20 |
| <i>Calculation</i> | 20 |
| <i>Typical chromatogram</i> | 20 |
| 12. LIMITATIONS | 21 |
| 13. QUALITY CONTROL | 21 |
| <i>Reference ranges</i> | 21 |
| <i>Controls</i> | 21 |
| 14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS | 22 |
| <i>Precision and reproducibility</i> | 22 |
| <i>Linearity</i> | 22 |
| <i>Detection limit</i> | 22 |
| 15. DISPOSAL | 22 |
| 16. TROUBLESHOOTING | 23 |
| 17. REFERENCES | 24 |
| 18. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE | 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 tricarboxyphosphyrin 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 ($0.5\text{--}2 \mu\text{mol}/24\text{ h}$ 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 $20 \mu\text{l}$ of 25 % hydrochloric acid. After centrifugation, 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 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 |
|----------|----------------|---|-------------|
| KC2601LA | MOPHAA | Mobile phase A | 1000 ml |
| KC2601LB | MOPHAB | Mobile phase B | 2 x 1000 ml |
| KC2601KA | CAL | Calibrator (lyoph. 1 ml, see specification data sheet for concentration) | 10 vials |
| KC2601HC | HCL | Hydrochloric acid (25 %) | 10 ml |
| KC2601RE | RECSOL | Reconstitution solution | 2 x 15 ml |
| KC2601KO | CTRL1 CTRL2 | Control 1 and 2 (lyoph. 1 ml, see specification data sheet for concentration) | 2 x 3 vials |

The HPLC column (KC2601RP) as well as individual components can be ordered separately from Immundiagnostik. Please ask for the price list of the individual components.

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- 1.5 ml reaction tubes (e.g. Eppendorf)
- Centrifuge
- Various pipettes
- Vortex
- HPLC gradient pump with fluorescence detector

- Reversed phase C₁₈ column

* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles >0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25°C (\geq 18.2 MΩ cm).

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 500 µl reconstitution solution (RECSOL). The concentration of porphyrins slightly changes from lot to lot, the exact concentration is stated on the specification data sheet. Calibrator (reconstituted CAL) **should not be stored longer than 24 h at 4°C**.
- The lyophilised controls 1 and 2 (CTRL 1 and 2) are stable at -20°C until the expiry date stated on the label. Before use, they have to be reconstituted with each 250 µl reconstitution solution (RECSOL). The concentration of porphyrinsslightly 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. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- The 25% 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.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on kit label.

8. 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.

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Quality control guidelines should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated 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.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

Test procedure

| |
|--|
| Mix 1 ml of a cool and dark stored 24 h urine (without additives), calibrator or control 1 or 2 with each 20 µl 25 % hydrochloric acid (HCL) (pH should be below 2.5). |
| Centrifuge for 5 min at 10 000 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 |

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

10. TREATMENT OF THE COLUMN

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).

11. RESULTS

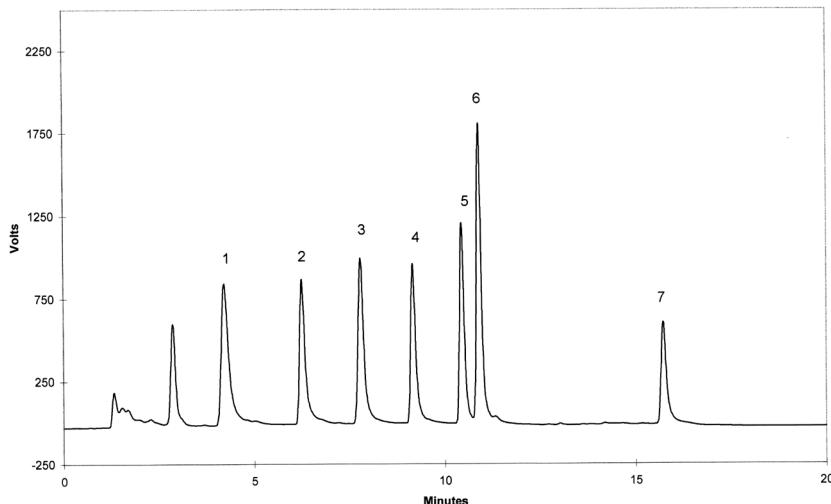
Calculation

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

* 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)

- a) 8-carboxyl Porphyrin (Uro-)
- b) 7-carboxyl Porphyrin (Hepta-)
- c) 6-carboxyl Porphyrin (Hexa-)
- d) 5-carboxyl Porphyrin (Penta)
- e) 4-carboxyl Porphyrin (Copro) I
- f) 4-carboxyl Porphyrin (Copro) III
- g) Mesoporphyrin IX

12. LIMITATIONS

Do not use blood samples for analysis.

13. 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.

14. 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 |

15. DISPOSAL

The mobile phase (MOPHA) must be disposed as non-halogenated solvent. The 25 % hydrochloric acid (HCl) solution could be neutralized with NaOH and if the pH value is neutral it can be disposed as salt solution.

Important: Reaction will produce heat, be careful!

Please refer to the appropriate national guidelines.

16. TROUBLESHOOTING

| Problem | Possible cause | Solution |
|--------------------------|---|---|
| No signal | No or defect connection to evaluation system | Check signal cord and connection |
| | Detector lamp is altered | 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 delivers imprecise | Check pump, degas the system |
| | System is not in steady state yet | Rinse system mobile phase for 15 min |
| Baseline is drifting | Detector lamp did not reach working temperature yet | Wait |
| | Detector lamp is too old | Renew lamp |
| | System is not in steady state yet | Rinse system mobile phase for 15 min |
| | Pump delivers imprecise | Check pump, degas the system |

| Problem | Possible cause | Solution |
|------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Baseline is not smooth | Pump delivers imprecise | Check pump, degas the system |
| | Detector flow cell is dirty | Clean flow cell |

17. 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.

18. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The test components contain organic solvents. Contact with skin or mucous membranes must be avoided.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on the kit label.
- 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 is not coordinated 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.

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



Attention