

Porphyrine HPLC Kit

Zur Bestimmung der Porphyrine (freie Säuren) im Urin

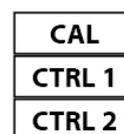
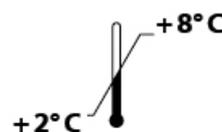
Porphyryns HPLC Kit

For the determination of Porphyryns (free acids) in urine

Gültig ab / Valid from 06.07.2011



KC 2601



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim
Tel.: ++49 6251 70190-0
Fax: ++ 49 6251 849430
e.mail: Info@immundiagnostik.com
www.immundiagnostik.com

Inhaltsverzeichnis/Table of contents	Seite/Page
1. VERWENDUNGSZWECK	3
2. EINLEITUNG	3
3. TESTPRINZIP	4
4. INHALT DER TESTPACKUNG	5
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	5
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	5
7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	6
8. PROBENVORBEREITUNG	6
9. TESTDURCHFÜHRUNG	6
HINWEISE	6
ARBEITSSCHEMA	7
CHROMATOGRAPHISCHE BEDINGUNGEN	7
10. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE	8
11. AUSWERTUNG	8
BERECHNUNG	8
MUSTERCHROMATOGRAMM	8
12. EINSCHRÄNKUNGEN	9
13. QUALITÄTSKONTROLLE	9
NORMBEREICH	9
KONTROLLEN	9
14. TESTCHARAKTERISTIKA	10
PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT	10
LINEARITÄT	10
NACHWEISGRENZE	10
15. ENTSORGUNG	10
16. MAßNAHMEN BEI STÖRUNGEN	11
17. LITERATUR	12
18. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12

1. INTENDED USE	14
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	14
3. PRINCIPLE OF THE TEST	15
4. MATERIAL SUPPLIED	16
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	16
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	16
7. PRECAUTIONS	17
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	17
9. ASSAY PROCEDURE	17
PROCEDURAL NOTES	17
SAMPLE AND STANDARD PREPARATION	18
CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS	18
10. TREATMENT OF THE COLUMN	18
11. RESULTS	19
CALCULATION	19
TYPICAL CHROMATOGRAM	19
12. LIMITATIONS	20
13. QUALITY CONTROL	20
EXPECTED VALUES	20
CONTROLS	20
14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	21
PRECISION AND REPRODUCIBILITY	21
LINEARITY	21
DETECTION LIMIT	21
15. DISPOSAL	21
16. TROUBLESHOOTING	22
17. REFERENCES	23
18. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	23

1. VERWENDUNGSZWECK

Die 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-Leber-Syndrom
- 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 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 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, so dass auch größere Probenzahlen fast unbeaufsichtigt abgearbeitet werden können. (Bei kurzen Serienlängen ist die Einpunktkalibrierung sehr viel wirtschaftlicher gegenüber der 6-Punkt-Kalibrierung bei Immuno-Assays).

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	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 Etikett)	10 Fläschchen
KC2601HC	HCL	HCl (25 %)	10 ml
KC2601RE	RECSOL	Rekonstitutionslösung	10 ml
KC2601KO	CTRL1 CTRL2	Kontrolle 1 und 2 (lyoph.1 ml; Konzentration siehe Produktspezifikation)	2 x 3 Fläschchen

Die HPLC Trennsäule (KC 2601RP) 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

- Diverse Pipetten
- 1,5 ml Reaktionsgefäße (z.B. Eppendorf)
- Vortex Wirbelmischer
- Zentrifuge
- Reversed Phase C₁₈ Säule
- HPLC-Gradientenanlage mit Fluoreszenzdetektor

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

Der **Kalibrator** (CAL) und die **Kontrollen** (CTRL1, CTRL2) werden in 1 ml Rekonstitutionslösung (RECSOL) rekonstituiert.

Der Gehalt der Porphyrine ändert sich geringfügig von Charge zu Charge. Die Konzentrationen der einzelnen Porphyrine entnehmen Sie bitte der beiliegenden Produktspezifikationen.

Nach Rekonstitution sollte der Kalibrator (CAL) nicht länger als 24 h bei 4 °C aufbewahrt werden.

Die Testreagenzien sind bei Raumtemperatur und die lyophilisierten **Kontrollen** (CTRL1, CTRL2) **und Kalibrator** (CAL) bei -20 °C bis zum Verfallsdatum haltbar (siehe Etikett).

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 Schutzhandschuhen 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. Die Probe sollte in jedem Fall sofort nach der Abnahme kühl und dunkel gelagert werden.

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik übernimmt keine Haftung.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung abzuarbeiten.

Arbeitsschema

1 ml eines kühl und dunkel gelagerten 24-Stunden-Urins (ohne Zusatz) sowie der Kalibrator (CAL) werden mit 20 µl 25%iger Salzsäure (HCL) versetzt (pH soll kleiner 2,5 sein) und gemischt.

5 min bei 10.000 x g zentrifugieren.

100 µl in das HPLC-System injizieren.

Chromatographische Bedingungen

Säulenmaterial: Bischoff Prontosil 120-5-C18 ace EPS; 5 µm

Säulendimension: 125 mm x 4 mm

Fluss: 0,75 ml/min

Fluoreszenz-Detektion: Exzitation: 400 nm

Emission: 620 nm

Temperatur: 30 °C

Auftragsvolumen: 100 µl

Laufzeit: 25 min

Gradient:

0 min	(38% B / 62 % A)
1,5 min	(38% B / 62 % A)
9,5 min	(80% B / 20 % A)
11,5 min	(80% B / 20 % A)
11,6 min	(95% B / 5 % A)
15 min	(95% B / 5 % A)
15,1 min	(38% B / 62 % A)
24 min	(38% B / 62 % A)

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** Aqua bidest. 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).

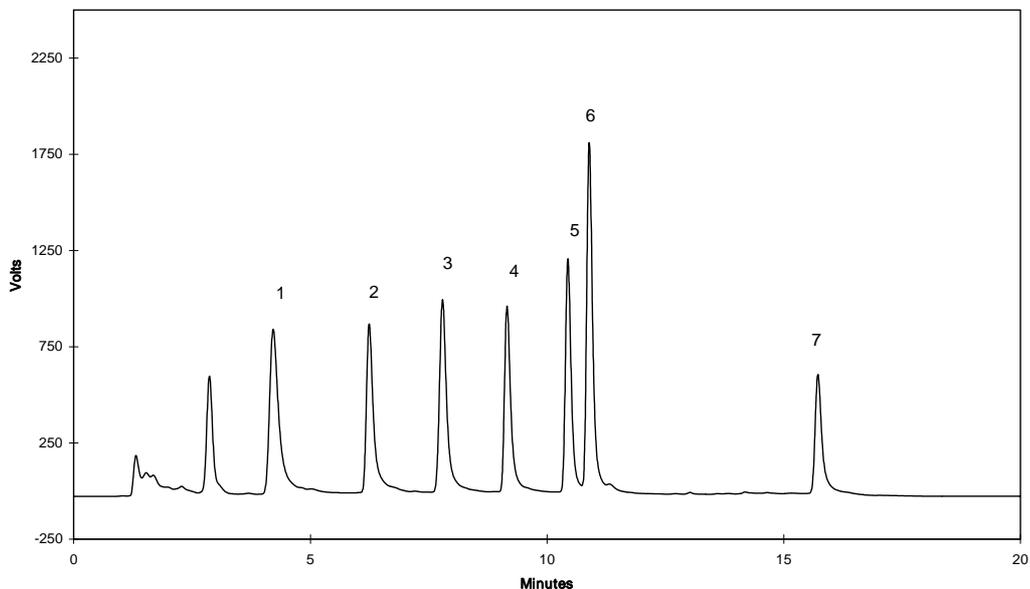
Zur Wiederinbetriebnahme wird das ganze System mit ca. **30 ml** Laufmittel äquilibriert.

11. AUSWERTUNG

Berechnung

$$\text{Konzentration Probe} = \frac{\text{Peakhöhe Probe} \times \text{Konzentration des Kalibrators}}{\text{Peakhöhe Kalibrator}}$$

Musterchromatogramm



Säule: Prontosil 120-5-C18 ace EPS 5 µm

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

12. EINSCHRÄNKUNGEN

Blutproben können nicht bestimmt werden.

13. QUALITÄTSKONTROLLE

Normbereich

	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)	44,8	0-120
Coprop. I 17 – 31 % (Lit. 3)		
Coprop. III 69 – 83 % (Lit. 3)		

Wir empfehlen jedem Labor seinen eigenen Normalwerte-Bereich zu erstellen, weil Referenzbereiche stark von der Auswahl des Probandenkollektivs abhängig sind. Die Angabe des Normalbereichs dient lediglich der Orientierung und kann von anderen publizierten Daten abweichen.

Kontrollen

Zur Überwachung der Qualität der Analyse sollten bei jedem Lauf Kontrollen mitgeführt werden. Wenn eine oder mehrere Kontrollen eines Laufs außerhalb ihres Bereichs liegen ist es möglich, dass auch die Patientenproben falsch ermittelt wurden.

14. 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

15. ENTSORGUNG

Das Laufmittel (MOPHA) muss als halogenfreier Lösungsmittelabfall entsorgt werden. Die Salzsäure 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
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
	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 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. 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.
- Sämtliche in der Testpackung enthaltene Reagenzien dürfen ausschließlich zur in-vitro-Diagnostik eingesetzt werden.
- Die Reagenzien sollten nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden (Verfallsdatum siehe Testpackung).
- Einzelkomponenten mit unterschiedlichen Lot-Nummern aus verschiedenen Testpackungen sollten nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die dafür erstellten Richtlinien für medizinische Laboratorien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten und der Aufbereitung der Proben wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immunodiagnostik AG übernimmt für direkt daraus resultierende Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

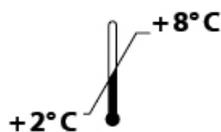
Porphyryns HPLC Kit

For the determination of Porphyryns (free acids) in urine

Valid from 06.07.2011

REF

KC 2601



CAL
CTRL 1
CTRL 2

CE

IVD

1. INTENDED USE

The *Immundiagnostik* Assay is intended for the quantitative determination of porphyrins in urine. This Assay is designed 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 heptaporphyrin 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 (*porphyria variegata*)
- *Porphyria cutanea tarda* in chronic liver disease and alcoholic-liver-syndrom
- 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 25% HCl. 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

The HPLC technique provides an easy, fast and precise method for quantitative determination of porphyrins. The kit contains all reagents necessary for sample preparation and separation in ready-to-use form except the column.

Like in the case of many other parameters, the advantage of the HPLC analysis is the simultaneous handling of many components in a single test. A complete HPLC system allows even laboratories without any experience in „high performance liquid chromatography“ a quick and precise use of the technique for clinical chemistry routine analyses. Mostly, a one-point calibration of the test system is sufficient - unlike immuno assays with up to 6 calibrators per test. With short test series, the one-point calibration is much more economic than the 6-point calibration for immuno assays. In addition, it is possible to automate the sample application and the result calculation, so that even a higher number of samples can be handled nearly without control.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Content	Kit Components	Quantity
KC 2601LA	MOPHAA	Eluent A	1000 ml
KC 2601LB	MOPHAB	Eluent B	2 x 1000 ml
KC 2601KA	CAL	Calibrator, lyophilized 1 ml	10 vials
KC 2601HC	HCL	HCl (25%)	10 ml
KC 2601RE	RECSOL	Reconstitution solution	10 ml
KC 2601KO	CTRL1 CTRL2	Control 1 and 2; 1 ml lyophilized (concentration, see product data sheet)	2 x 3 vials

HPLC column (KC 2601RP) 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

- 1.5 ml reaction tubes (Eppendorf)
- Centrifuge
- Various pipettes
- HPLC gradient pump with Fluorescence-detector
- Reversed phase C₁₈-column
- Vortex mixer

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- Reconstitute the **calibrator** (CAL) and **controls** (CTRL1, CTRL2) in **1 ml** reconstitution solution (RECSOL). The concentration of the porphyrins might have minor changes from lot to lot. The concentrations of the different porphyrins are given in the attached product specification sheet. After reconstitution the calibrator should not be stored longer than 24 h at 4°C.
- Store **Calibrator** (CAL) and **controls** (CTRL1, CTRL2) at – 20 °C. All other test reagents are stable at 20-25 °C, up to the date of expiry stated on the label.

7. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- The 25% HCl (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 wrong use.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

Sample and standard preparation

- Mix **1 ml** of a cool and dark stored 24-h-urine (without additives) or calibrator (CAL) with 20 μl 25% HCl (HCL) (pH should be below 2.5).
- Centrifuge for 5 min at 10.000 x g.
- Inject **100 μl** in the HPLC-system.

Chromatographic conditions

Column material:	Bischoff ProntoSil 120-5-C18 ace EPS; 5 μm
Column dimension:	125 mm x 4 mm
Flow rate:	0.75 ml/min
Fluorescence detection:	Excitation: 400 nm Emission: 620 nm Sensitivity high
Temperature:	30 °C
Injection volume	100 μl
Run time	25 min
Gradient:	0 min (38% B / 62 % A) 1.5 min (38% B / 62 % A) 9.5 min (80% B / 20 % A) 11.5 min (80% B / 20 % A) 11.6 min (95% B / 5 % A) 15 min (95% B / 5 % A) 15.1 min (38% B / 62 % A) 24 min (38% B / 62 % A)

10. TREATMENT OF THE COLUMN

After the analysis, the column should be flushed with 30 ml aqua bidest. (1 ml/min) and stored in 50% methanol in aqua bidest (ca. 30 ml, flow 0.7 ml/min). Before use, the system should be equilibrated with ca. 30 ml eluent.

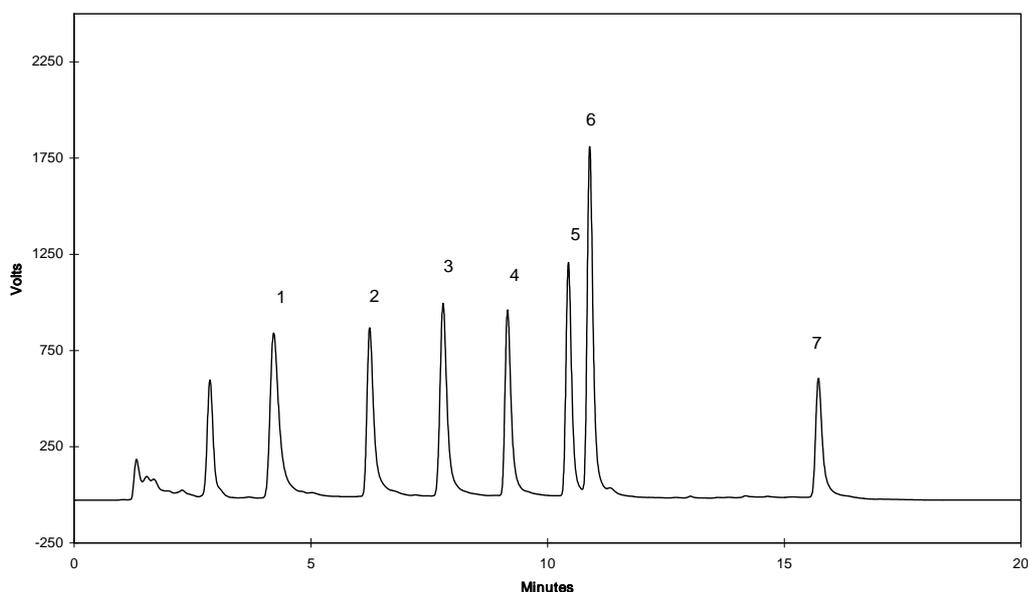
11. RESULTS

Calculation

Samples are evaluated with the supplied calibrator by comparison of the peak areas.

$$\text{Concentration sample} = \frac{\text{Peak height sample} \times \text{Concentration of the calibrator}}{\text{Peak height calibrator}}$$

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

12. LIMITATIONS

Do not use blood samples for analysis.

13. QUALITY CONTROL

Expected values

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)	44.8	0-120
Coprop. I 17 – 31 % (Ref. 3)		
Coprop. III 69 – 83 % (Ref. 3)		

It is recommended that each laboratory should establish its own normal range. Above mentioned values are only for orientation and may vary from other published data.

Controls

Control samples should be analyzed 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% 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 reason	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
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 put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The test components contain organic solvents. Contact with skin or mucous membranes has to be avoided.
- All reagents in the test package are for research use only.
- The reagents should not be used after the date of expiry stated on the label.
- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- 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 wrong use.