

Arbeitsanleitung / Manual

Kryptopyrrol Kit

Zur in vitro Bestimmung von Kryptopyrrol in Urin

Kryptopyrrole Kit

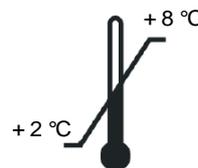
For the in vitro determination of Kryptopyrrole in urine

Nur zu wissenschaftlichen Zwecken/For research use only

Gültig ab / Valid from 24.11.2009



K 7823



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

Inhalt / Content

1. Deutsch
2. English

Weitere Informationen zu unseren Produkten finden Sie auf unserer
Homepage

Additional information about our products is available on our homepage

www.immundiagnostik.com

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für den kolorimetrischen Nachweis von Kryptopyrrol in Urin geeignet. Nur zu wissenschaftlichen Zwecken.

2. EINLEITUNG

Kryptopyrrolurie ist eine genetisch bedingte enzymatische Störung im Häm-Metabolismus, die unter normalen Lebensbedingungen jedoch weitgehend kompensiert wird. Unter Stresseinwirkung kann die Stoffwechselstörung nicht kompensiert werden und manifestiert sich mit verschiedenen Krankheitssymptomen. Kryptopyrrolurie kann mit hoher Zuverlässigkeit durch den Nachweis einer abnorm gesteigerten Pyrrolausscheidung im Urin diagnostiziert werden.

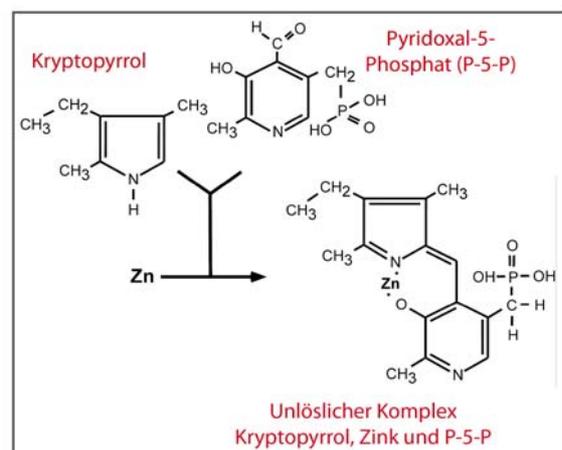
Kryptopyrrol, 2,4 Dimethyl-3-Äthylpyrrol, entsteht im Rahmen einer gestörten Hämoglobinsynthese. Zirkulierendes Kryptopyrrol bildet Schiff'sche Base mit der Aldehyd-Form von Pyridoxal-5-Phosphat (P-5-P), der aktiven Vitamin B₆-Form im Blut. Dabei wird zusätzlich Zink gebunden und es entsteht ein unlöslicher Kryptopyrrol – Zink - Vitamin B₆ - Komplex. Bei erhöhter Kryptopyrrolausscheidung werden somit auch Zink und P-5-P mit ausgeschieden und es entstehen Mangelsymptome für Zink und Vitamin B₆.

Kryptopyrrolurie ist mit emotionalen und Verhaltensstörungen assoziiert. Erhöhte Kryptopyrrolwerte wurden bei Kindern und Jugendlichen mit ADHS (Attention Deficit Hyperactivity Syndrome) gefunden, ebenso bei Kindern mit gestörtem Kurzzeitgedächtnis, Lernschwierigkeiten, Legasthenie und Stressunverträglichkeit. Positive Therapieerfahrungen konnten durch die Substitution mit Zink, Vitamin B₆ und Mangan gemacht werden.

Im Urin lässt sich Kryptopyrrol mit unserem kolorimetrischen Test nachweisen. Für die Urinabgabe sind spezielle Probenröhrchen erforderlich, die zusätzlich bei uns erhältlich sind.

Indikationen

- Verhaltensstörungen
- Autismus, Asperger-Syndrom
- ADHD, ADD
- Depression
- Bipolare Störungen
- Angreifendes / aggressives / gewalttätiges Verhalten



- Schizophrenie
- Reizbarkeit
- Geringe Belastbarkeit bei körperlichem und mentalem Stress
- Zorn
- Anfälle
- Schlechtes Gedächtnis
- Motorische Unruhe
- Schlechte Traumerinnerung
- Licht- und Geräuschempfindlichkeit

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K7823FR	REAG	Farbentwicklungsreagenz	1 x 30 ml
K7823LA	SOLA	Lösung A	1 x 40 ml
K7823LB	SOLB	Lösung B (Achtung: konzentrierte H₂SO₄!)	1 x 2 ml
K7823ST	STDKONZ	Standardkonzentrat	1 x vial
K7823TM	DRY	Trocknungsmittel	1 x 15 g
K7823VP	DIL	Standardverdünnungslösung	1 x vial

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- 1N Salzsäure
- Dichlormethan
- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Zentrifuge, 3000 rpm
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Spektralphotometer, 540 nm
- Eisbad
- Quartzküvette

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Das **REAG** (Farbentwicklungsreagenz) wird unmittelbar vor der Testdurchführung mit 28,5 ml der mitgelieferten SOL A (Lösung A) gelöst. Diese Lösung wird in ein Eisbad gestellt und dann tropfenweise, langsam und vorsichtig 1,5 ml SOL B (Lösung B) zugegeben. (**Achtung: Hitzeentwicklung!**). Diese Lösung ist 2 Tage bei 2-8°C stabil.
- Unmittelbar vor ihrem Gebrauch muss die **DIL** (Standardverdünnungslösung) mit exakt 30 ml bidestilliertem Wasser gelöst werden. Hierbei ist darauf zu achten, dass im Deckel und Gewinde anhaftendes Pulver ebenfalls gelöst wird. Diese Lösung ist unbedingt vor Licht zu schützen.
- Das **STDKONZ** (Standardkonzentrat) wird mit 45 µl SOL A (Lösung A) gelöst. Hierzu die SOL A (Lösung A) in das Glasfläschchen pipettieren und dieses 2-3 Minuten schwenken. Danach 4,95 ml der vorbereiteten DIL (Standardverdünnungslösung) zugeben. Dieses Standardkonzentrat hat eine Konzentration von 1 mg/ml.
- Aus 50 µl des aufgelösten STDKONZ (Standardkonzentrat) und 4,95 ml vorbereiteter DIL (Standardverdünnungslösung) wird eine Vorverdünnung von 10 µg/ml hergestellt.
- Aus dieser Vorverdünnung wird eine Standardreihe wie folgt hergestellt:

Standardkonzentration	Standardverdünnungslösung	Vorverdünnung (10 µg/ml)
STD 0 ng/ml	2000 µl	keine
STD 100 ng/ml	1980 µl	+ 20 µl
STD 250 ng/ml	1950 µl	+ 50 µl
STD 500 ng/ml	1900 µl	+ 100 µl
STD 1500 ng/ml	1700 µl	+ 300 µl

- Alle Testreagenzien sind bei 2-8 °C zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBEN

Als Probe wird Urin eingesetzt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

1.	pH-Wert des Urins bestimmen und - falls notwendig – mit 1N Salzsäure auf pH 3 – 4 einstellen.
2.	2 ml des angesäuerten Urins in ein Glasreagenzglas geben und mit 4 ml Dichlormethan ausschütteln (etwa 2 Minuten). Anschließend 5 Minuten bei 3000 U/min zentrifugieren und den wässrigen Überstand restlos entfernen.
3.	Die verbleibende organische Phase mit einer Spatelspitze DRY (Trocknungsmittel) versetzen um restliches Wasser aus der organischen Phase zu binden. Das DRY (Trocknungsmittel) absetzen lassen (etwa 2 Minuten).
4.	Mit der Pipette 2 ml der organischen Phase in ein sauberes Reagenzglas überführen und mit 0,5 ml des REAG (gelöstes Farbentwicklungsreagenz) versetzen.
5.	Die Absorption nach 30 Minuten im Spektralphotometer bei 540 nm in einer Quarzküvette messen.
6.	Die Standards werden ohne Vorbehandlung direkt mit 0,5 ml REAG (gelöstes Farbentwicklungsreagenz) versetzt und wie die Proben gemessen.

8. ERGEBNISSE

Für die Auswertung der Probenmesswerte an der Standardkurve empfehlen wir eine Punkt-zu-Punkt Auswertung. **Die Ergebnisse der Proben werden mit 2,25 multipliziert.** Bitte beachten Sie eventuell zusätzliche Verdünnungsfaktoren durch das Ansäuern mit Salzsäure.

9. QUALITÄTSKONTROLLE

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

10. VORSICHTSMABNAHMEN

- Nur zu wissenschaftlichen Zwecken.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden.
- SOL B (Lösung B) enthält eine starke Säure und muss vorsichtig verwendet werden. Sie kann bei Kontakt mit der Haut Verätzungen verursachen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

11. TECHNISCHE MERKMALE

- Bestandteile verschiedener Packungen nicht untereinander austauschen.
- Reagenzien nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwenden.
- Mikrotiterstreifen während den Inkubationen mit Folie abdecken.
- Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien vermeiden.
- Bestimmung immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchführen.

12. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken verwendet 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, zurück zu senden.

13. LITERATUR

1. Heufelder, A (2005) Kryptopyrrolurie. Artikel aus *Comed* 01
2. Jackson JA, Riordan HD, Neathery S, Riordan N (1997) Urinary pyrroles in health and disease. *J Orthomol Med* 12(2):96-98
3. Jackson JA, Riordan HD, Neathery S, tiemeyer BS (2000) Vitamins, blood lead and urine pyrrole levels in Down Syndrome patients. *J Orthomol Med* 15(3):139-140
4. Ellefson RD, Ford RE (1996) The porphyrias: characteristics and laboratory tests. *Regul Toxicol Pharmacol* 24:S119–S125
5. Heleniak EP, Lamola SW (1986) A new prostaglandin disturbance syndrome in schizophrenia: delta-6-pyrroluria. *Med Hypotheses* 19(4):333-338
6. Gendler PL, Duhan HA, Rapoport H (1978) Hemopyrrole and kryptopyrrole are absent from the urine of schizophrenics and normal persons. *Clin Chem* 4(2):230-233
7. Irvine DG, Bayne W, Miyashita H (1969) Identification of kryptopyrrole in human urine and its relationship to psychosis. *Nature* 224(5221):811-883

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



Nur für Forschungszwecke



Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

Kryptopyrrole Kit

For the in vitro determination of Kryptopyrrole in urine

For research use only

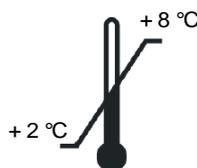
Gültig ab / Valid from 24.11.2009



K7823



40



1. INTENDED USE

The described assay is intended for the colorimetric determination of kryptopyrrole in urine. For research use only.

2. INTRODUCTION

Kryptopyrroluria is a genetically determined enzymatic disorder of the hem metabolism, which is essentially compensated under normal conditions. However, under stress conditions, there is an insufficient compensation and the disorder is manifested in the form of several different disease symptoms. Kryptopyrroluria can be diagnosed with high reliability by detection of abnormal increased pyrrole excretion in urine.

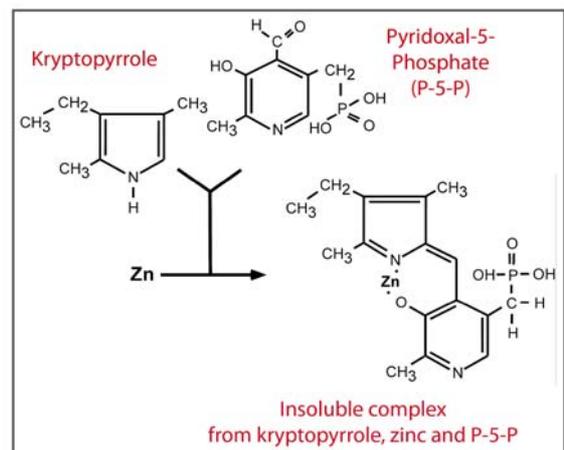
Kryptopyrrole, 2,4 dimethyl-3-ethylpyrrole, is a byproduct of disordered hemoglobin synthesis. It has been found out that circulating kryptopyrrole forms a Schiff's base with the aldehyde group of pyridoxal-5'-phosphate (P-5-P), the active vitamin B₆ form in the blood, whereby an additional zinc binding results in formation of an insoluble kryptopyrrole – zinc - vitamin B₆ - complex. Elevated excretion of kryptopyrrole in the urine is associated with an enhanced vitamin B₆ and zinc excretion and as a result in a B₆ and zinc deficiency in the blood.

Kryptopyrroluria is involved in behavior and emotional disorders. Increased kryptopyrrole values were found in children and juveniles with ADHS (Attention Deficit Hyperactivity Syndrome), as well as in children with disturbed short-term memory, learning difficulties, dyslexia and stress-intolerance. Positive therapy experiences were made with substitution of zinc, vitamin B₆ and manganese.

Our colorimetric test is designed for determination of urinary kryptopyrrole. Urine specimen collection and sample transport are very important for proper test results. Special urine test tubes for kryptopyrrole determination can be ordered in addition to the test kit.

Indications

- Behavior disorders
- Autism, Asperger´s
- ADHD, ADD
- Depression
- Bipolar disorders
- Assaultive/aggressive/violent behavior
- Schizophrenia
- Irritability



- Poor tolerance of physical and emotional stress
- Anger
- Episodes
- Poor memory
- Agitation
- Poor dream recall
- Sensitivity to light and sound

3. MATERIAL SUPPLIED

Catalogue No	Content	Kit Components	Quantity
K7823FR	REAG	Color developing reagent	1 x 30 ml
K7823LA	SOLA	Solution A	1 x 40 ml
K7823LB	SOLB	Solution B (Warning: concentrated H₂SO₄!)	1 x 2 ml
K7823ST	STDKONZ	Standard concentrate	1 x vial
K7823TM	DRY	Drying agent	1 x 15 g
K7823VP	DIL	Standard dilution solution	1 x vial

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- 1N Hydrochloric acid
- Dichloromethane
- Bidistilled water (aqua bidist.)
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10-1000 µl
- Centrifuge capable of 3000 rpm
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Spectral photometer, 540 nm
- Ice bath
- Quartz cuvette

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- Dissolve **REAG** (color developing reagent) immediately before test performance with 28.5 ml of SOL A (Solution A). Cool the prepared solution in an ice bath and then add drop-wise, slowly and carefully 1.5 ml of SOL B (Solution B) (**Warning: Heat development!**). This solution is stable at 2-8°C for 2 days.
- Dissolve **DIL** (Standard dilution solution) in exactly 30 ml of bidistilled water immediately before use. Ensure that any remaining powder on the cap and screw thread will be dissolved. It is essential to protect the solution from light.
- Dissolve **STDKONZ** (Standard concentrate) with 45 µl of SOL A (Solution A). For this, add SOL A (Solution A) into the glass vial and shake it for 2-3 minutes. Thereafter, add 4.95 ml of the prepared DIL (Standard dilution solution). The concentration of the obtained standard concentrate is 1 mg/ml.
- Using 50 µl of the dissolved standard concentrate (1 mg/ml) and 4.95 ml of the prepared DIL (Standard dilution solution), prepare diluted standard solution with a concentration of 10 µg/ml.
- Prepare a standard series of the above diluted standard solution (10 µg/ml) according to the following table:

Standard concentration	Standard dilution solution	Diluted standard solution (10 µg/ml)
STD 0 ng/ml	2000 µl	no
STD 100 ng/ml	1980 µl	+ 20 µl
STD 250 ng/ml	1950 µl	+ 50 µl
STD 500 ng/ml	1900 µl	+ 100 µl
STD 1500 ng/ml	1700 µl	+ 300 µl

- All test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at 2-8°C.

6. SAMPLES

Urine is used as a sample material.

7. ASSAY PROCEDURE

Test procedure

1.	Determine the pH-value of the urine and, if necessary, adjust it with 1N Hydrochloric acid to pH 3 – 4.
2.	Transfer 2 ml of the acidified urine into a glass reaction tube and extract it with 4 ml dichloromethane by shaking for app. 2 minutes. Then centrifuge for 5 minutes at 3000 rpm and discard completely the aqueous supernatant.
3.	On the tip of a spatula, take a small quantity of DRY (drying agent) and add it to the organic phase in order to bind the remaining water. Allow the DRY (drying agent) to sedimentate for about 2 minutes.
4.	Transfer with a pipette 2 ml of the organic phase in a clean reaction glass and add 0.5 ml of the REAG (dissolved color developing reagent).
5.	After 30 minutes, absorption is measured in a quartz cuvette on a spectral photometer at 540 nm .
6.	Standards are not extracted, only 0.5 ml of REAG (dissolved color developing reagent) is added, and measured like the samples at 540 nm.

8. RESULTS

For evaluation of the sample results, we recommend to produce a standard curve by drawing a point-to-point curve between the obtained values of the standards. **The sample results are multiplied by 2.25.** Please consider eventual additional dilution factors due to acidifying with hydrochloric acid.

9. QUALITY CONTROL

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.

10. PRECAUTIONS

- For research use only.
- Quality control guidelines should be followed.
- SOL B (Solution B) contains a strong acid and must be handled with care. It can cause acid 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.

11. TECHNICAL HINTS

- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

12. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- All reagents in the kit package are for research diagnostic use only.
- 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 wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

13. REFERENCES

8. Heufelder, A (2005) Kryptopyrrolurie. Artikel aus *Comed* 01
9. Jackson JA, Riordan HD, Neathery S, Riordan N (1997) Urinary pyrroles in health and disease. *J Orthomol Med* 12(2):96-98
10. Jackson JA, Riordan HD, Neathery S, tiemeyer BS (2000) Vitamins, blood lead and urine pyrrole levels in Down Syndrome patients. *J Orthomol Med* 15(3):139-140
11. Ellefson RD, Ford RE (1996) The porphyrias: characteristics and laboratory tests. *Regul Toxicol Pharmacol* 24:S119–S125
12. Heleniak EP, Lamola SW (1986) A new prostaglandin disturbance syndrome in schizophrenia: delta-6-pyrroluria. *Med Hypotheses* 19(4):333-338
13. Gendler PL, Duhan HA, Rapoport H (1978) Hemopyrrole and kryptopyrrole are absent from the urine of schizophrenics and normal persons. *Clin Chem* 4(2):230-233
14. Irvine DG, Bayne W, Miyashita H (1969) Identification of kryptopyrrole in human urine and its relationship to psychosis. *Nature* 224(5221):811-883

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



For research use only



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number