

PORPHYRINS T

Determinazione Cromatografica – Spettrofotometrica
delle Porfirine Preformate o Totali
(Porfirine Preformate + Porfirinogeni)
nelle Urine

20 test

REF KR09-20

USO PREVISTO

Kit per la determinazione quantitativa *in vitro* delle Porfirine Preformate o Totali nelle urine.

PRINCIPIO DI REAZIONE

Le porfirine vengono adsorbite su resina anionica. Dopo lavaggio delle sostanze interferenti, vengono eluite con acido forte e determinate mediante uno spettrofotometro, calcolandone la concentrazione utilizzando la formula di Allen o mediante un fluorimetro.

REAGENTI E COLONNE

Composizione del kit:

*REAGENT 1 Acido cloridrico diluito

COLUMN Colonne cromatografiche

REF KR09-20

1 x 105 ml

20

(*) I reagenti contrassegnati con l'asterisco contengono sostanze pericolose. Leggere le Schede di sicurezza.

STABILITÀ: il reagente sigillato e le colonne sono stabili a 20-25°C fino alla data di scadenza riportata sulla confezione.

REAGENTI AUSILIARI NON COMPRESI NEL KIT

Sodio carbonato per analisi, acido acetico glaciale.

STRUMENTAZIONE NECESSARIA E NON FORNITA

Spettrofotometro: idoneo a selezionare in modo netto le tre lunghezze d'onda previste nella formula di Allen per il dosaggio quantitativo.

Fluorimetro a filtri: eccitazione 405 nm
emissione 595 nm (590-600 nm)

CAMPIONE

Urine delle 24 ore.

Conservare i campioni al riparo dalla luce.

DETERMINAZIONE DELLE PORFIRINE PREFORMATE

Effettuare l'analisi immediatamente dopo la raccolta del campione, in quanto la trasformazione dei porfirinogeni in porfirine può causare risultati errati. I porfirinogeni a pH 6-9 si trasformano completamente in porfirine dopo 36 ore.

DETERMINAZIONE DELLE PORFIRINE TOTALI (preformate + porfirinogeni)

Preparare il campione in uno dei seguenti modi:

- Misurare il volume dell'urina raccolta, prenderne un campione ed aggiungervi sodio carbonato fino ad ottenere una soluzione all'1% p/v. Conservare il campione a temperatura ambiente, al riparo dalla luce. Effettuare il test dopo 24 ore.
STABILITÀ: il campione rimane stabile per una settimana.
- Per ottenere immediatamente le porfirine totali, acidificare le urine a pH 5.0 con acido acetico glaciale ed incubare in bagnomaria bollente per 30 minuti al riparo della luce.

PROCEDIMENTO MANUALE

Lunghezza d'onda: 380, 400 - 407, 430 nm
Cammino ottico: 1 cm
Lettura: contro Reagent 1
Temperatura: ambiente
Metodo: spettrofotometrico o fluorimetrico
Linearità: fino a 13 mg/L
Sensibilità: colorimetria 40 µg/L - fluorimetria 10 µg/L
C.V. (intra-assay): 2%
C.V. (inter-assay): 5%

PREPARAZIONE DELLA COLONNA

Togliere il tappo superiore della colonna e quindi spezzare la lancetta di chiusura inferiore. Lasciare defluire completamente il liquido scartandolo.

SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA

Urine	1.0 ml	scartare l'eluato
Acqua distillata	5.0 ml	scartare l'eluato

Porre la colonna sopra una provetta pulita e pipettare nella colonna:

Reagent 1	2.5 ml	raccogliere l'eluato
-----------	--------	----------------------

Attendere che il liquido sia defluito del tutto, quindi pipettare nuovamente nella colonnina:

Reagent 1	2.5 ml	raccogliere l'eluato
-----------	--------	----------------------

Raccogliere l'eluato insieme al precedente. Mescolare gli eluati (5 ml) e leggere le assorbanze a 380 nm, al massimo assorbimento tra 400 e 407 nm e a 430 nm contro il Reagente 1 (correzione di Allen).

CALCOLO

Calcolare la differenza tra i valori di assorbanza (ΔA) misurati secondo la seguente formula:

$$\Delta A = 2A(400 - 407 \text{ nm}) - [A(380 \text{ nm}) + A(430 \text{ nm})]$$

$$\text{Porfirine } (\mu\text{g/l}) = \Delta A \times 3857$$

$$\mu\text{g porfirine totali/L} \times \text{L di urine 24ore} = \mu\text{g porfirine totali/24ore}$$

VALORI DI RIFERIMENTO

Uomini: 50 - 200 µg/24 ore

Donne: 35 - 180 µg/24 ore

OSSERVAZIONI

- Se si è aggiunto sodio carbonato al campione per portarlo a pH alcalino, all'aggiunta del Reagent 1 potrebbero formarsi alcune bollicine di CO₂, che rallenterebbero così il flusso del liquido attraverso la colonna. Le bollicine possono essere eliminate inclinando leggermente la colonna.
- Per la misurazione delle porfirine nel range dei valori normali è consigliabile usare il fluorimetro. Preparare uno standard di coproporfirine (conc. approssim. di 1 µg/ml) e, per diluizione, uno standard di lavoro di 40 µg/L (0.2 ml standard soluzione madre + 4.8 ml Reagente 1). Leggere le assorbanze a 380 nm, 401- 402 nm e 430 nm e determinare la concentrazione come segue:
Standard (µg/ml) =
= 747.6 x [2A(401 - 402 nm) - A(380 nm) - A(430 nm)].
Leggere la fluorescenza 405/595 nm degli eluati (F), dello standard di lavoro (Fst) e del Reagente 1 (Fo) e calcolare come segue:
µg porfirine totali/24 ore =
= [(F - Fo) / (Fst - Fo)] x 5.3 x standard (µg/ml) x L di urine 24 ore.
- Le urine conservate con sodio bicarbonato non possono essere utilizzate per la determinazione di ALA e PBG, in quanto questi ultimi non sono stabili a pH basico.
- Sostanze pirroliche eventualmente presenti nell'urina non interferiscono: la bilirubina non viene eluita fino alla concentrazione di 10 mg/L, il cloruro di emina fino alla concentrazione di 100 mg/L; per contro il porfobilinogeno è presente nell'eluato acido, tuttavia non presenta assorbimento nel campo spettrale compreso tra 360 e 450 nm.
- Confrontando il kit FAR per la determinazione delle porfirine T rispetto ad un altro kit in commercio si è ottenuto un coefficiente di correlazione pari a 0.998.

BIBLIOGRAFIA

- M. Doss et U. Bode, Z. Klin. Chem. Klein. Biochem. 9, 415 (1971)



Edizione 01 - Giu 21 MS



Prodotto da: FAR srl

Via Fermi, 12 - 37026 Pescantina - VERONA - ITALY

Tel. +39 045 6700870 - Fax +39 045 7157763

sito web: <http://www.farddiag.com> e-mail: farddiag@farddiag.com