

# PROTOPORPHYRIN IX

Determinazione Fluorimetrica  
delle Porfirine Eritrocitarie Libere  
nel Sangue

20 test

REF KR10-20

## USO PREVISTO

Kit per la determinazione quantitativa *in vitro* delle Porfirine Eritrocitarie Libere nel sangue.

## PRINCIPIO DI REAZIONE

Le porfirine eritrocitarie libere, messe a contatto con un opportuno adsorbente che facilita la ritenzione degli interferenti, vengono estratte quantitativamente con una miscela di etile acetato - acido acetico; dopo essere state trasferite in acido cloridrico, la loro concentrazione viene determinata fluorimetricamente.

## REAGENTI E MATERIALI

Composizione del kit:

*REAGENT 1 Solvente	REF KR10-20 1 x 40 ml
*REAGENT 2 Standard concentrato di protoporfirina IX con concentrazione di 500 µg/100 ml	1 x 5 ml
*REAGENT 3 Acido cloridrico 1.5 mol/L	1 x 84 ml
*REAGENT 4 Acido cloridrico-etile acetato	1 x 40 ml
TEST TUBES Provette con adsorbente	20

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

STABILITÀ: i reagenti e le provette sigillati sono stabili a 2-8°C fino alla data di scadenza riportata sulla confezione.

## STRUMENTAZIONE NECESSARIA E NON FORNITA

Centrifuga, spettrofotometro o fotometro a filtri (405 nm), spettrofluorimetro o fluorimetro a filtri (eccitazione 405 nm, emissione 600 nm).

## PREPARAZIONE DEGLI STANDARD

STANDARD 100 µg /dl

Per preparare lo standard di protoporfirina IX (100 µg/100 ml), diluire 1 volume di Reagent 2 Standard con 4 volumi di Reagent 3 e agitare bene. Si consiglia di usare i seguenti volumi:

Reagent 2 Standard	0.5 ml
Reagent 3	2.0 ml

Si ottengono 2.5 ml di Standard 100 sufficiente per preparare 25 dosi di Standard 5.

Leggere l'assorbanza A St (100) a 405 nm contro Reagent 3.

Calcolare il coefficiente di correzione  $K = A \text{ St (100)} / 0.489$  (vedi osservazione 3)

STABILITÀ: alcune settimane se conservato a 2-8°C al riparo dalla luce.

STANDARD 5 µg/dl

Per preparare lo standard di protoporfirina IX con concentrazione di 5 µg / 100 ml, diluire 1 volume di Standard 100 con 19 volumi di Reagent 4. Si consiglia di usare i seguenti volumi:

Standard 100	0.1 ml
Reagent 4	1,9 ml

Si ottiene il volume di 2.0 ml di Standard 5 da utilizzare nel test.

AVVERTENZA: questo standard deve essere preparato immediatamente prima di iniziare il test.

## CAMPIONE

Sangue intero.

Utilizzare sangue capillare, oppure sangue venoso con eparina o EDTA come anticoagulante.

STABILITÀ: sangue capillare: 72 ore a temperatura ambiente, sangue eparinato o in EDTA: 1 settimana a 2-8°C.

## PROCEDIMENTO MANUALE

Lunghezza d'onda:	eccitazione 405 nm / emissione 600 nm
Letture:	contro Reagent 3
Temperatura:	ambiente
Metodo:	fluorimetrico
Linearità:	fino a 2 mg/100 ml
Sensibilità:	3 µg/100 ml
C.V. (intra-assay):	2%
C.V. (inter-assay):	4%

Pipettare in una provetta monouso fornita con il kit:

Sangue	20 µl
Reagent 1	2.00 ml

Agitare la provetta su Vortex per circa 15 secondi e centrifugare a 2000 rpm per 2 minuti. Trasferire il supernatante in un tubo da centrifuga ed aggiungere:

Reagent 3	2.00 ml
-----------	---------

Agitare su Vortex per circa 15 secondi e centrifugare a 2000 rpm per 2 minuti. Scartare la fase superiore (organica) e raccogliere quella inferiore (acquosa) in una cuvetta per fluorimetro. Leggere entro 1 ora la fluorescenza del campione e confrontarla con quella dello STANDARD 5.

Fluorimetri a lettura analogica: aggiustare la sensibilità in modo che lo STANDARD 5 legga K x 67.5.

Fluorimetri a lettura digitale: aggiustare la sensibilità in modo che lo STANDARD 5 legga K x 675.

## CALCOLO

La lettura dei campioni, eseguita alle condizioni sopra indicate, fornisce direttamente la concentrazione del campione in µg di protoporfirina IX/100 ml (vedi osservazione 4).

## VALORI DI RIFERIMENTO

fino a 60 µg/100 ml di sangue

fino a 5.3 µg/g di Hb

## OSSERVAZIONI

1. Nel caso di soggetti anemici (nei quali vi è un'evidente diminuzione, rispetto alla normalità, dei globuli rossi) è consigliabile determinare la concentrazione di emoglobina (g Hb/100 ml) e quindi dividere il valore delle porfirine per la concentrazione di emoglobina.

2. Significato clinico:

60-190 µg di protoporfirina IX/100 ml di sangue, 5.3-17 µg/g di Hb:

intossicazione da Pb, anemia ferropriva o sideropenica

>190 µg di protoporfirina IX/100 ml di sangue, >17 µg/g di Hb:

grave intossicazione da Pb o raramente disordini genetici.

3. Data la sensibilità alla luce della protoporfirina IX, la concentrazione dello standard va determinata ogni volta, tenendo conto dell'assorbanza elettiva del prodotto. Disponendo di uno strumento tarato per la lunghezza d'onda, una soluzione 100 µg/100 ml di protoporfirina IX, in HCl 1.5 M, dà un'assorbanza  $A = 0.489$ .

Pertanto il valore K consente di determinare l'esatta concentrazione dello standard preparato ( $=K \times 100 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ) che verrà diluito 1:20 per il riferimento fluorimetrico.

4. Per fenomeni di ripartizione, dopo l'estrazione con il Reagent 3, si ha un volume finale della fase inferiore = 2.7 ml. In essi si trovano estratte le porfirine libere contenute nei 20 µl di campione utilizzato, con un rapporto di diluizione 1:135.

Considerando inoltre che la concentrazione dello STANDARD 5 è uguale a  $K \times 5 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$  (vedi osservazione 3), la concentrazione del campione Cc, in relazione alle fluorescenze lette Fs e Fc (rispettivamente dello standard e del campione), è espressa nella formula:

$Cc = [(Fc \times 135) \times (K \times 5)]/Fs$ , cioè:  $Cc = Fc \times [(K \times 675)]/Fs$ ,

da cui si ricava che per  $Fs = K \times 675$ , il rapporto  $(K \times 675)/Fs = 1$ ,

e quindi  $Cc = Fc$ .

Pertanto, impostando la sensibilità dello strumento in modo che la fluorescenza (Fs) dello STANDARD 5 legga K x 675, le letture in fluorescenza dei campioni rispecchiano direttamente i rispettivi valori di concentrazione in µg/100 ml. I fluorimetri a lettura analogica devono invece essere impostati a K x 67.5.

## BIBLIOGRAFIA

1. S. Piomelli, "Clin. Chem." 23 (2), 264-269 (1977)



Edizione 01 - Novr 2021



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](mailto:farddiag@farddiag.com)