

U/C PORPHYRINS

Determinazione Cromatografico – Spettrofotometrica
delle Porfirine Totali
e separazione delle Uro-Porfirine dalle Copro-Porfirine
nelle Urine

20 test

REF KR11-20

USO PREVISTO

Kit per la determinazione quantitativa *in vitro* delle porfirine totali nelle urine.

PRINCIPIO DI REAZIONE

Le porfirine vengono adsorbite su due colonnine contenenti una resina anionica. Dalla prima colonnina, dopo lavaggio delle sostanze interferenti, vengono eluite le uro e le coproporfirine. Dalla seconda colonnina, dopo lavaggio selettivo delle copro mediante tampone acetato, vengono eluite le uroporfirine, che possono essere misurate separatamente. Le porfirine vengono dosate per via spettrofotometrica, calcolandone la concentrazione mediante la formula di Allen, o con un fluorimetro.

REAGENTI E MATERIALI

Composizione del kit:

REF KR11-20

*REAGENT 1 Acido cloridrico 1 x 105 ml
*REAGENT 2 Tampone acetato 1 x 105 ml
COLUMN Colonne cromatografiche 20

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

STABILITA': i reagenti e le colonne sigillati sono stabili a 2-8°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 405nm
emissione 595nm (590-600nm).

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:

1. 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.

STABILITA': Il campione rimane stabile per una settimana.

2. 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

Lunghezza d'onda: 380, 400-407, 430 nm
Linearità: fino a 13 mg/L
Cammino ottico: 1 cm
Sensibilità: Porfirine totali colorimetria 40 µg/L fluorimetria 10 µg/L
Sensibilità: Coproporfirine colorimetria 150 µg/L fluorimetria 20 µg/L
Lettura: contro Reagent 1
Temperatura: ambiente
C.V. (intra-assay): 2 %
C.V. (inter-assay): 5 %

PREPARAZIONE DELLA COLONNA

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

SEPARAZIONE CROMATOGRAFIA

Pipettare in due colonne:

	Colonna 1 (copro+uro)	Colonna 2 (uro)	
Urine	1.0 ml	1.0 ml	scartare l'eluato
Reagent 2	----	10.0 ml	scartare l'eluato
Acqua distillata	5.0 ml	1.0 ml	scartare l'eluato

Porre ciascuna colonna sopra una provetta pulita e pipettare:

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

Attendere che il liquido sia defluito del tutto, quindi ripetere l'aggiunta di 2.5 ml di Reagent 1 raccogliendo 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, azzerando contro il Reagent 1 (correzione di Allen).

AVVERTENZA: se si è aggiunto sodio carbonato al campione per portarlo a pH alcalino, all'aggiunta del Reagent 1 o 2 potrebbero formarsi alcune bolle di CO₂, che rallenterebbero così il flusso del liquido attraverso la colonna. Queste bollicine possono essere eliminate inclinando leggermente la colonna.

CALCOLO

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

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

COLONNA 1

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

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

COLONNA 2

$$\text{Uroporfirine } (\mu\text{g/L}) = \Delta A \times 4266$$

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

$$\text{Coproporfirine } (\mu\text{g/L}) = \text{porfirine totali } (\mu\text{g/L}) - \text{uroporfirine } (\mu\text{g/L})$$

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

VALORI DI RIFERIMENTO

Porfirine totali: < 220 µg/24 ore

Coproporfirine: 35 - 150 µg/24 ore

Uroporfirine: 15 - 50 µg/24 ore

OSSERVAZIONI

- Le urine conservate con sodio carbonato non possono essere utilizzate per la determinazione di ALA e PBG, in quanto questi ultimi non sono stabili a pH basico.
- Se devono essere determinate solo le porfirine totali, utilizzare una sola colonna per ciascun campione e seguire il procedimento descritto per la colonna 1.
- 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) =
= $747.6 \times [2A(401 - 402 \text{ nm}) - A(380 \text{ nm}) - A(430 \text{ nm})]$
Leggere la fluorescenza 405/595 nm dei due eluati (F1) e (F2), dello standard di lavoro (Fst) e del Reagente 1 (Fo) e calcolare come segue:
µg porfirine totali/24 h =
= $[(F1 - Fo)/(Fst - Fo)] \times 5.3 \times \text{standard } (\mu\text{g/ml}) \times \text{L di urine 24 ore}$
µg uroporfirine/24 h =
= $[(F2 - Fo)/(Fst - Fo)] \times 6.3 \times \text{standard } (\mu\text{g/ml}) \times \text{L di urine 24 ore}$
µg coproporfirine/24 h =
= $[(F1 - F2)/(Fst - Fo)] \times 5 \times \text{standard } (\mu\text{g/ml}) \times \text{L di urine 24 ore}$
- In alcuni casi il lavaggio delle coproporfirine non è totale a causa delle caratteristiche chimiche di queste, per cui piccole quantità possono venire dosate insieme alle uroporfirine.
- Confrontando il kit per la determinazione delle U/C porfirine rispetto ad un altro kit in commercio si è ottenuto un coefficiente di correlazione pari a 0.996.

BIBLIOGRAFIA

C. Sobel, C. Cano, and R.E. Thiers, Clin. Chem., Vol. 20, No. 11, 1397-1402. (1974)



Edizione 02 - Lug 2023 MS



Prodotto da: FAR srl

Via Fermi, 12 - 37026 Pescantina - VERONA - ITALY

Tel. +39 045 6700870

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