

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Petra Lacinová

# **HPLC V DIAGNOSTICE PORFYRIÍ VALIDACE METODY**

HPLC in diagnostics of porphyrias

Validation of the method

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Zuzana Bosáková CSc.

Praha 2012

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 1. května 2012.

**Poděkování:**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Zuzana Bosáková CSc. za poskytnutí cenných informací a rad při zpracování této bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Subhanové z Hepatologické laboratoří ÚKBLD Všeobecné fakultní nemocnice v Praze za vedení při měření analytických dat použitých v mé bakalářské práci a za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

## SEZNAM ZKRATEK

HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
FD	fluorometrická detekce
CoA	sukcinylkoenzym A
ALA	kyselina 5-aminolevulová
PBG	porfobilinogen
CEP	kongenitální erythropoetická porfyrie
AIP	akutní intermitentní porfyrie
PV	porfyria variegata
HK	hereditární koproporfyrie
PCT	porfyria cutanea tarda
EPP	erythropoetická protoporfyrie
CEP	kongenitální erythropoetická porfyrie
ÚKBLD	Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky
VFN	Všeobecná fakultní nemocnice
LF UK	Lékařská fakulta Univerzity Karlovy
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
UV	ultrafialové záření
HP	Hewlett-Packard
SW	software
SGX	sephadex
M	mol/l
HCl	kyselina chlorovodíková

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>- 7 -</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>- 9 -</b>
2.1	STRUKTURA PORFYRINŮ .....	- 9 -
2.2	BIOSYNTÉZA HEMU .....	- 10 -
2.3	DĚLENÍ A KLASIFIKACE PORFYRIÍ .....	- 12 -
2.3.1	<i>Akutní porfyrie</i> .....	- 12 -
2.3.2	<i>Chronické porfyrie</i> .....	- 14 -
2.4	LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA PORFYRIÍ .....	- 15 -
2.4.1	<i>Stanovení prekurzorů porfyrinů</i> .....	- 16 -
2.4.2	<i>Stanovení celkových porfyrinů</i> .....	- 17 -
2.4.3	<i>Speciální vyšetření</i> .....	- 18 -
2.5	VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE (HPLC) .....	- 19 -
2.5.1	<i>Vyhodnocení</i> .....	- 22 -
2.5.2	<i>Validace</i> .....	- 24 -
2.6	HPLC STANOVENÍ PORFYRINŮ .....	- 26 -
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>- 28 -</b>
3.1	PŘÍSTROJE A POMŮCKY .....	- 28 -
3.2	ČINIDLA A CHEMIKÁLIE .....	- 28 -
3.3	PŘÍPRAVA STANDARDU PORFYRINŮ PRO HPLC .....	- 29 -
3.4	PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO HPLC .....	- 29 -
3.5	PARAMETRY HPLC .....	- 30 -
3.6	VYHODNOCENÍ CHROMATOGRAMU STANDARDU PORFYRINU .....	- 30 -
3.7	VYHODNOCENÍ CHROMATOGRAMŮ VZORKŮ PACIENTŮ .....	- 31 -
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>- 32 -</b>
4.1	VALIDACE HPLC METODY PRO STANOVENÍ PORFYRINŮ V MOČI A VE STOLICI .....	- 33 -
4.2	STANOVENÍ DALŠÍCH PARAMETRŮ .....	- 35 -
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>- 37 -</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>- 38 -</b>
	<b>PŘÍLOHA- SEZNAM CHROMATOGRAMŮ</b> .....	<b>40</b>

## **Abstrakt**

Porfyriny a jejich deriváty jsou využívány v diagnostice typů porfyrií. K jejich stanovení se používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s fluorometrickou detekcí (FD). Cílem této práce byla validace HPLC metody pro stanovení porfyrinů v moči a ve stolici na novém přístroji Chromatograf HP1200 s fluorometrickým detektorem (Agilent Technologies, USA). Metody HPLC se využívá v Hepatologické laboratoři ÚKBLD Všeobecné fakultní nemocnice v Praze.

Vedoucí laboratoře si vyžádal určení počtu teoretických pater na koloně, rozlišení, retenčního faktoru a přesnosti metody. Průměrná přesnost metody pro stanovení porfyrinů v moči a ve stolici byla 0,74 %. Přesnost metody HPLC vyhovuje požadavku pro rutinní stanovení porfyrinů v moči, respektive ve stolici. Metoda byla rovněž ověřena na vzorcích moče a stolice pacientů, u kterých byl typ porfyrie již dříve určen. Stanovení odpovídá současným kritériím pro rutinní vyšetření analytu v biologických materiálech.

**Klíčový slova:** porfyriny, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, validace, moč, stolice.

# 1 Úvod

Porfyriny jsou organické sloučeniny, obsahující čtyři pyrrolová jádra spojená konjugovanými dvojnými vazbami do cyklu s chelatačně vázaným atomem kovu. Biologicky nejvýznamnějším porfyrinem je hem [1]. Při poruše biosyntézy hemu způsobené úplnými nebo částečnými defekty enzymů podílejících se na této metabolické dráze vzniká u člověka onemocnění tzv. porfyrií. Při porfyrii se hromadí porfyriny nebo jejich prekurzory v některých tkáních, zvyšuje se jejich hladina v plazmě či v erytrocytech a dochází rovněž k jejich zvýšenému vylučování stolicí nebo močí.

Dvojně vazby přítomné v pyrrolových jádrech porfyrinů jsou odpovědné za jejich charakteristickou absorpci a fluorescenci. Pro všechny porfyriny bez ohledu na postranní řetězec je charakteristické absorpční maximum při 400 – 408 nm v oblasti Soretova pásu. Tohoto jevu se využívá při spektrofotometrickém stanovení jejich celkového množství v moči a stolici.

Porfyriny po excitaci světlem o vlnové délce 400 - 408 nm červeně fluoreskují, vlnová délka emitovaného světla je charakteristická pro jednotlivé porfyriny. Této specifické vlastnosti porfyrinů se využívá pro jejich fluorimetrickou detekci v krvi. Pro odlišení jednotlivých typů porfyrií je nutné stanovit zastoupení jednotlivých porfyrinů v poměru k jejich celkovému množství v moči a stolici. K tomuto stanovení se používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s gradientovou elucí na reverzní fázi s fluorimetrickou detekcí. Analytická metoda včetně přístroje před uvedením do rutinního provozu musí být validována. Plná validace se provádí pro ověření vhodnosti metody pro diagnostiku porfyrií u pacientů. V dalších letech se provádí jen částečná validace, respektive revalidace. Požadavky na revalidaci nejsou přesně definovány a mohou se lišit pro různá stanovení.

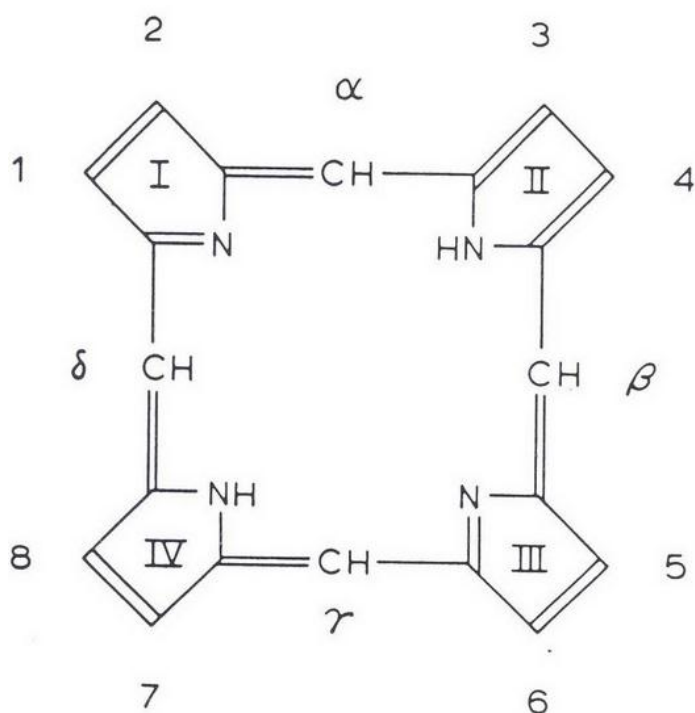
Cílem mé bakalářské práce bylo validovat HPLC metodiku pro stanovení porfyrinů v moči a ve stolici na novém přístroji Chromatograf HP1200 (Agilent Technologies, USA) s fluorimetrickým detektorem (Agilent Technologies, USA) v Hepatologické laboratoři ÚKBLD Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. V první části své práce jsem shrnula teoretické poznatky o porfyreinech s ohledem na jejich strukturu a chemické vlastnosti. Dále jsem popsala syntézu hemu a onemocnění, které souvisejí s defektem enzymů při jeho syntéze.

V praktické části jsem určila přesnost metody HPLC a dále počet teoretických pater na koloně, rozlišení a retenční faktor podle požadavku pracoviště. Po validaci metody jsem určila spektrum porfyrinů u vybraných pacientů a hodnotila získané chromatogramy.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Struktura porfyrinů

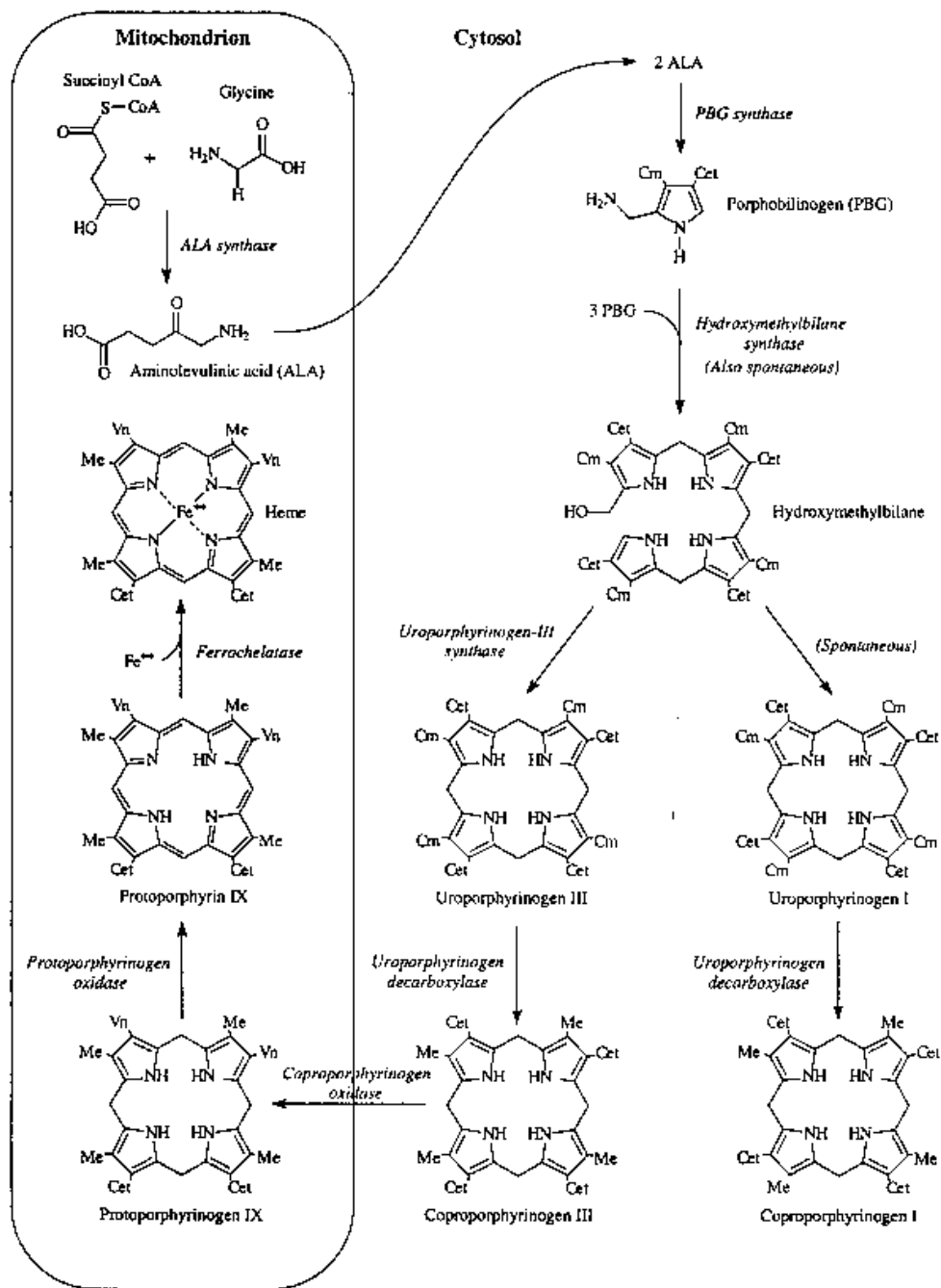
Porfyriny jsou sloučeniny odvozené od porfinu. Porfin je tetrapyrrol, obsahující čtyři pyrrolové kruhy, které jsou vzájemně spojené pomocí methylenových můstků (-HC=). Molekula porfinu je uvedena na obr. 1. Pyrrolové kruhy jsou označeny I- IV. Substituenty na kruzích jsou označeny 1 - 8. Methylenové můstky jsou označeny  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  a  $\delta$ . Významnou vlastností těchto sloučenin je schopnost tvořit komplexy s kovovými ionty ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), které se vážou k dusíkovému atomu pyrrolových kruhů a vznikají tzv. metaloporfyriny. Porfyriny mají také substituované periferní vodíky. Mezi substituenty patří skupiny methylová, karboxyethylová, vinylová a karboxymethylová. Porfyriny se symetricky uspořádanými substituenty se nazývají porfyriny typu I. Asymetrické porfyriny jsou porfyriny typu III. V lidském těle se vyskytují pouze typ porfyrinů I a III. Přičemž typ III je častější a významnější, neboť je obsažen v hemu. Hem je komplex porfyrinu s  $\text{Fe}^{2+}$  ionty. Porfyriny obsahují systém konjugovaných dvojných vazeb, který je odpovědný za typické zbarvení [2].



Obr. 1: Molekula porfinu: Převzato z publikace Burtis a spol [3]

## 2.2 Biosyntéza hemu

Hem je syntetizován prakticky ve všech lidských buňkách, nejaktivnější biosyntéza probíhá v kostní dřeni a játrech. Hem je kromě hemoglobinu přítomen např. v myoglobinu a v katalase [3]. Vzhledem k nepostradatelnosti hemu v organismu má jeho výpadek fatální následky pro život člověka. Schéma syntézy hemu je uvedeno na obr. 2 [3]. Výchozím produktem syntézy je sukcinylkoenzym A (sukcinyl CoA), pocházející z citrátového cyklu v mitochondriích, a aminokyselina glycin. Produktem této kondenzační reakce, katalyzované syntasou kyseliny 5-aminolevulové, je kyselina aminoketoadipová, která je dekarboxylována za vzniku kyseliny 5-aminolevulové (ALA). ALA je syntetizována v mitochondriích, ze kterých přechází do cytosolu. V cytosolu kondenzují dvě molekuly ALA za katalytického účinku ALA-dehydratasy (synonymum porfobilinogensyntasa) za tvorby 2 molekul vody a porfobilinogenu (PBG), což je první prekurzorový pyrol. Kondenzací 4 molekul PBG vzniká hydroxymethylbilan. Reakce je katalyzována enzymem hydroxymethylbilansyntasou (PBG-deaminasou). Hydroxymethylbilan samovolně vytváří cyklus a vzniká uroporfyrinogen I nebo může být přeměněn enzymaticky na uroporfyrinogen III. Tato reakce je aktivována uroporfyrinogenkosyntasou. Za fyziologických podmínek vzniká výhradně izomer III. Uroporfyrinogen III je přeměněn na koproporfyrinogen III dekarboxylací všech acetátových skupin, které se tím mění na methylové substituenty. Reakce je katalyzována enzymem uroporfyrinogendekarboxylasou. Koproporfyrinogen III vstupuje do mitochondrií, kde se mění na protoporfyrinogen IX a poté na protoporfyrin IX za enzymatického působení koproporfyrinogenoxidas a protoporfyrinogenoxidas. Konečným krokem syntézy hemu je začlenění železnatého iontu do protoporfyrinu za katalytického působení ferrochelatasy. Koncentrace hemu v mitochondriích reguluje negativní zpětnou vazbou aktivitu enzymů. Při defektu některého enzymu při syntéze hemu se začínou zvyšovat koncentrace některých meziproductů, které vyvolají v organismu metabolické onemocnění, tzv. porfyrii. Meziproducty syntézy hemu se v závislosti na své rozpustnosti vylučují močí (ALA, PBG, uroporfyrin, koproporfyrin) nebo stolicí (koproporfyrin, protoporfyrin). Stanovení spektra vylučovaných meziproductů syntézy hemu ve stolici nebo moči se využívá v diagnostice porfyrií [4].



Obr. 2: Schéma syntézy hemu: Cet- karboxyethyl, Cm- karboxymethyl, Me- methyl, Vn-vinyl  
Převzato z publikace Burtis a spol. [3]

## **2.3 Dělení a klasifikace porfyrií**

Základní dělení typu porfyrií je primární a sekundární. Primární porfyrie je způsobena vrozeným defektem enzymů v biosyntetické dráze hemu. Většinou se jedná o autozomálně dominantní onemocnění, kromě kongenitální erythropoetické porfyrie (CEP), která je autozomálně recesivní. Naopak sekundární porfyrie jsou získané. Mohou vzniknout intoxikací (např. otrava olovem) nebo při některých systémových onemocněních jako jsou např. chronické hepatopatie, lymfoproliferativní onemocnění nebo hemolytické anémie.

Kromě výše uvedeného dělení lze porfyrie dělit na chronické a akutní. Mezi akutní porfyrie patří akutní intermitentní porfyrie (AIP), porfyria variegata (PV) a hereditární koproporfyrie (HK). Mezi chronické onemocnění řadíme porfyrii cutanea tarda (PCT), erythropoetickou protoporfyrii (EPP) a kongenitální erythropoetickou porfyrii (CEP) [5].

### **2.3.1 Akutní porfyrie**

Akutní porfyrie se projevují ataky s kolikovitými bolestmi břicha, popř. neurologickými a psychiatrickými příznaky. Mezi psychické poruchy patří například dezorientace, deprese, úzkost, halucinace a hysterie. Neurologickým symptomem akutní porfyrie může být neuropatie periferních nervů horních končetin, která může vést až k paralýze respiračních svalů a smrti.

Akutní ataky mohou být vyvolány například zvýšenou koncentrací pohlavních hormonů (estrogeny a gestageny u žen), léky, alkoholem, stresem, infekcí, dietní chybou a dále i porfynogenními xenobiotiky. Dietní chybou je myšlena redukční dieta nebo snížený přívod sacharidů. Některá xenobiotika jsou schopna vyvolat onemocnění i u osob, které nemají genetickou predispozici. Např. hexachlorbenzen používaný pro moření pšenice v 50. letech v Turecku vyvolal ataku PCT až u tisíce osob. Mezi xenobiotika, způsobující ataku jen u osob s genetickou poruchou, patří barbituráty, sulfonamidy, makrolidová antibiotika, některá antimykotika, ranitidin nebo paracetamol [5].

### Akutní intermitentní porfyrie (AIP)

AIP je nejčastější porfyrie v České republice, výskyt je 1/30 000 obyvatel. AIP je způsobena defektem enzymu hydroxymetylbilansyntasy, který katalyzuje přeměnu porfobilinogenu na hydroxymetylbilan. Většinou je provázena akutními atakami. Charakteristické je 20 - 200 násobné zvýšení vylučování PBG močí při atace a 2-5 násobné vylučování mimo ataku. Vylučování porfyriu stolicí je normální, což umožňuje odlišit AIP od PV a HK [5].

### Porfyria variegata (PV)

PV je v České republice poměrně vzácná (relativně častá je u bělošské populace v Jihoafrické republice s incidencí 3/1000 obyvatel). PV je způsobena defektem enzymu protoporfyrinogenoxidas, která katalyzuje přeměnu protoporfyrinogenu III na protoporfyrin IX. Vyznačuje se neurologickými příznaky, kožní symptomatologií nebo obojím. Charakteristickým rysem je vysoká exkrece protoporfyrinu a koproporfyrinu stolicí. ALA a PBG jsou v období akutní ataky vylučovány močí ve vysokých hodnotách. Uroporfyrin v moči, který během akutní ataky často nacházíme, vzniká neenzymatickou kondenzací porfyriuogenu [5,6].

### Hereditární koproporfytie (HK)

HK je méně časté onemocnění v porovnání s ostatními typy porfyrií. Onemocnění je způsobeno defektem enzymu koproporfyrinogenoxydasy katalyzující přeměnu koproporfyrinogen III na protoporfyrinogen IX. Diagnosticky se vyznačuje zvýšeným vylučováním koproporfyrinu močí a stolicí. Exkrece je většinou vyšší než 500 µg/24 hodin (normální hodnota do 200 µg/24 hodin). Klinické příznaky HK jsou podobné AIP. U HK se v některých případech vyskytují kožní léze [5].

## 2.3.2 Chronické porfyrie

### Porphyria cutanea tarda (PCT)

PCT lze dále dělit následujícím způsobem: typ I – sporadická forma, typ II – familiární forma s autozomálně dominantním způsobem dědičnosti, typ III je toxická forma, způsobená látkami, které vyvolávají klinické i biochemické symptomy i u zdravých jedinců.

Enzymovým defektem je u PCT snižená aktivita uroporphinogendekarboxylasy v jaterní tkáni. Ke snížení aktivity dochází u formy sporadické patrně exogenním vlivem, u formy familiární je aktivita snížena vrozeně. PCT je nejčastější porfyrií v České republice. Výskyt je 1/5 000 obyvatel. Její příznaky dělíme na kožní a jaterní. Pro kožní příznaky jsou charakteristické hyperpigmentace kůže, tvorba puchýřů, fotosenzitivita a snadná zranitelnost kůže. Jaterní postižení není specifické, je pravděpodobně výsledkem zevních faktorů, jako jsou alkohol, drogy, toxiny, infekce hepatitidou C, infekce HIV, užívání estrogenů, kouření nebo nízký příjem vitamínu A a C. Tyto faktory zároveň mohou způsobit manifestaci porfyrie. Dále je popsána asociace s cukrovkou [6].

Jaterní postižení může vést až k cirhóze jater a hepatocelulárnímu karcinomu. U nemocných s neléčenou PCT je výrazně zvýšena exkrece porfyrinů (nad 500  $\mu\text{g}/24$  hod) v moči, ALA a PBG je v normě. V chromatografickém profilu porfyrinů ve stolici jsou přítomny patologické formy porfyrinu se 4 karboxylovými skupinami (koproporfyriu), které vznikají dekarboxylací porfyrinu s 5 karboxylovými skupinami (pentakarboxyporfyriu). Přítomnost patologických derivátů koproporfyriu je typická pro neléčenou PCT, nikdy se nevyskytují u jiných onemocnění. [5].

### Erythropoetická protoporfyrie (EPP)

EPP je relativně vzácná. Popsáno bylo celosvětově dosud jen několik stovek pacientů. Jedná se o autosomálně dominantní dědičné onemocnění, způsobené defektem v enzymu ferrochetalasy. U této porfyrie dominují kožní příznaky s normální exkrecí porfyrinů moči. Ostatní projevy jsou vzácnější a vyskytují se jen u menšiny nemocných. Jedna se zejména o postižení jater, způsobené akumulací protoporyfrinů, které může vést v malém procentu případů i k selhání jater. Tato komplikace je provázena výrazným ukládáním protoporyfrinu v játrech a zvýšením hladin protoporyfrinu v plazmě a erytrocytech. [5].

### Kongenitální etyropoetická porfyrie (CEP)

CEP je velmi vzácné autosomálně recesivní dědičné onemocnění, které se projevuje brzy po narození. V dospělosti se vyskytuje jen zřídka. Onemocnění je způsobeno nedostatkem enzymu uroporfyrinogensyntasy. Klinické projevy jsou různé a jsou ovlivněny stupněm enzymatického deficitu. Kožní příznaky a fotosenzitivita připomínají symptomy u PCT, ale u většiny případů jsou mnohem závažnější. Zuby jsou červenohnědé, což je způsobeno ukládáním porfyrinů, a mohou fluoreskovat v ultrafialovém světle. Porfyriny jsou uloženy také v kostech. Výrazným rysem je hemolytická anémie, která je důsledkem výrazně zvýšených hladin porfyrinů v erytrocytech [5,7].

## **2.4 Laboratorní diagnostika porfyrií**

Laboratorní diagnostiku porfyrií a konzultace poskytuje Hepatologická laboratoř ÚKBLD VFN a 1. LF UK v Praze. Molekulární diagnostika porfyrií se v České republice provádí na Klinice dětského a dorostového lékařství VFN a 1. LF UK v Praze.

### Vyšetřovací algoritmus při podezření na porfyrickou nemoc [8]

U pacientů s podezřením na chronickou porfyrii s kožními příznaky nebo jaterní lézí nejasného původu se provádí stanovení odpadu celkových porfyrinů ve sbírané moči za 24 hodin a ve stolici. U všech pacientů s vyšším odpadem močových porfyrinů nad 200 µg/den nebo vyšším obsahem porfyrinů ve stolici nad 200 nmol/g sušiny se vyšetřuje automaticky separace porfyrinů HPLC v moči, případně ve stolici. Tito pacienti mají obvykle normální hladiny ALA a PBG v čerstvé ranní moči.

Druhou klinickou situací jsou pacienti s atakou. Pokud lze pacientovi odebrat vzorek moče během ataky, může se potvrdit diagnóza pomocí zvýšené hladiny ALA, PBG nebo zvýšeného odpadu celkových porfyrinů ve sbírané moči. Stejně jako v předchozím případě u všech pacientů s odpadem močových porfyrinů nad 200 µg/l se provádí automaticky separace porfyrinů metodou HPLC.

Další alternativou je pacient mimo ataku, který má hodnoty porfyrinů a jeho prekurzorů v moči prakticky normální. Pokud má lékař klinické podezření (např. na základě typických anamnestických údajů), je vhodné provést odpad celkových porfyrinů ve stolici

a pokud je množství porfyrinů ve stolici nad 200 nmol/g provádí se automaticky HPLC separace porfyrinů.

K odlišení akutních porfyrií se stanovuje emisní maximum plazmatických porfyrinů. K dispozici je rovněž stanovení aktivity enzymů biosyntetické dráhy porfyrinů v erythrocytech.

### **2.4.1 Stanovení prekurzorů porfyrinů**

#### Stanovení deltaaminolevulové kyseliny (ALA)

Stanovení se provádí ze vzorku ranní moči. Principem stanovení je reakce ALA obsažené v moči s acetylacetonem za vzniku pyrrolové sloučeniny, která reaguje s 4-dimethylaminobenzaldehydem (Ehrlichova reakce). Vzniklý růžovofialový barevný komplex se stanovuje spektrofotometricky při 555 nm [9].

Vzorek moče pro stanovení ALA je stabilní při pH 6 - 7 v temnu při -20 °C 1 měsíc nebo při +4 až +8 °C 4 dny. Při zpracování vzorku v den odběru může být vzorek ponechán při pokojové teplotě. Některé léky zvyšují při běžné dávce koncentraci ALA (interference *in vivo*). Jedná se o anopyrin (také analytická interference), diazepam, noxyron, radepur, rudotel, seduxen, sodanton, deriváty pyrazolonu, sulfonamidy a estrogeny. Ke zvýšení hladiny ALA vede i abusus alkoholu (interference *in vivo*). Inhibice Ehrlichovy reakce může být způsobena močovinou, askorbovou kyselinou, thioly, kyselinou 5-hydroxyindolctou, indikanem, tryptofanem, indoxylsulfátem nebo bilirubinem [10]. Normální hodnoty ALA v ranní moči jsou do 4,5 mg/l [11].

#### Stanovení porfobilinogenu (PBG)

Stanovení se provádí ze vzorku ranní moči. Principem stanovení je Ehrlichova reakce v kyselém prostředí za vzniku růžovofialového produktu, jehož intenzita se stanovuje spektrofotometricky při 555 nm [12].

Vzorek moče pro stanovení PBG je v temnu stabilní při +20 až +25 °C pouze 8 hodin. Některé léky snižující při běžné dávce koncentraci PBG. Jedná se o erevit, glucosum, lipovitan, vitamin E, ascorutin a celaskon. Naopak léky, které zvyšují při běžné dávce koncentraci PBG, jsou radepur, noxyron, sodanton, anopyrin, dírastantorecan, plegomasin, chlorpromazin, prokain a penicilin [10]. Látky, které inhibují Ehrlichovu reakci, jsou stejné jako pro stanovení ALA. Normální hodnoty PBG v ranní moči jsou 2,5 mg/l [11].

## 2.4.2 Stanovení celkových porfyrinů

### Stanovení celkových porfyrinů v moči

V moči se za fyziologických podmínek vyskytuje koproporfyryl a uroporfyryl, protoporfyryl v moči není prokazatelný pro jeho malou rozpustnost ve vodě. Při defektech enzymů při syntéze hemu lze prokázat v moči hepta-, hexa- i pentakarboxy porfyriny. Stanovení celkových porfyrinů se provádí ve vzorku sbírané moče za 24 hodin. Odpad porfyrinů v moči se stanovuje spektrofotometrickou metodou v kyselém prostředí v oblasti Soretova pásu (400 - 408 nm) [13].

Porfyriny ve vzorku sbírané moči jsou v temnu stabilní 1 měsíc při -20 °C nebo 4 dny při +4 až +8 °C při pH 6 - 7. Při pokojové teplotě a pH 6 - 7 je vzorek moči stabilní pouze jeden den. Léky, které zvyšují při běžné dávce koncentraci porfyrinů, jsou noxyron, fenobarbital, rhytmochin II, spasmoveralgin, diazepam, radepur, rudotel, seduxen a tetracyklin. Interferující látky u stanovení celkových porfyrinů v moči jsou hemoglobin a bilirubin [10]. Normální hodnoty celkových porfyrinů v moči jsou do 200 µg/24 hodin [11].

### Stanovení celkových porfyrinů ve stolici

Ve stolici se za fyziologických podmínek vyskytuje protoporfyryl a koproporfyryl, vzácně uroporfyryl. Tři dny před vyšetřením je nutné dodržovat dietu bez masných výrobků a syrového nebo nedovařeného masa. Princip metody je stejný, jako je popsán v kapitole Stanovení celkových porfyrinů v moči. Před stanovením porfyrinů ve stolici je nutné extrahovat chlorofyl a karotenoidy ze vzorku stolice do éteru [12].

Porfyriny ve vzorku stolice jsou stabilní 1 den při 4 °C nebo 1 měsíc při -20 °C. Interference stanovení jsou stejné jako u stanovení porfyrinů v moči. Normální hodnoty celkových porfyrinů ve stolici jsou do 200 µmol/kg sušiny [11].

### Stanovení porfyrinů v plazmě

Porfyriny jsou v krvi především ve formě uroporfyriu, koproporfyriu a protoporfyriu. Principem stanovení je měření fluorescenčního emisního maxima porfyrinů. Porfyriny po excitaci světlem o vlnové délce 405 nm červeně fluoreskují. Vlnová délka emitovaného světla 619 - 620 nm odpovídá onemocněním PCT, AIP, HK, CEP a sekundární koproporfyriurii, vlnová délka 626 - 629 nm je typická pro onemocnění PV a 633 - 635 nm pro EPP, eventuálně otravu olovem [14].

Vzorek je stabilní 1 den při 4 °C nebo 1 měsíc při -20 °C. Léky zvyšující při běžné dávce koncentraci porfyrinů jsou tetracyklin, noxyron, phenobarbital, rhytmochin II, spasmoveralgin, diazepam, radepur, rudotel a seduxen. Stanovení je stíženo interferencí hemoglobinu nebo bilirubinu v plazmě [10].

### **2.4.3 Speciální vyšetření**

#### Stanovení aktivity enzymů - Dehydratasa 5-aminolevulové kyseliny

Spektrofotometrické stanovení aktivity enzymu se provádí v nesrážlivé krvi. Krev musí být odebrána do zkumavek obsahujících heparin nebo EDTA. Vzorky musí být transportovány do laboratoře na ledu. Dehydratasa 5-aminolevulové kyseliny katalyzuje kondenzaci 2 molekul ALA na PBG. Koncentrace PBG se stanoví spektrofotometricky Ehrlichovou reakcí při 555 nm. Stanovení aktivity dehydratasy se provádí při podezření na otravu olovem, při které dochází k inaktivaci tohoto enzymu [15].

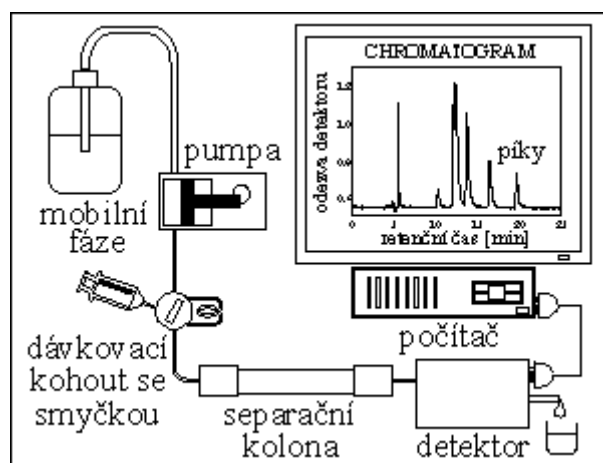
#### Stanovení aktivity enzymů - Porfobilinogendeaminasa (uroporfyriinogen-I-syntasa)

Spektrofotometrické stanovení aktivity porfobilinogenasy se provádí v nesrážlivé krvi. Stejně jako v předchozím případě je nutné odebrat vzorek do zkumavky, která obsahuje heparin nebo EDTA. Porfobilinogendeaminasa katalyzuje přeměnu čtyř molekul PBG na hydroxymethylbilan. Hydroxymethylbilan je buď enzymově kosyntasou přeměněn na uroporfyriinogen III, nebo spontánně cyklizuje za vzniku uroporfyriinogenu I. Oxidací bezbarvých uroporfyriinogenů I a III působením UV světla vznikají porfyriny, jejichž koncentrace je stanovována fluorometricky [16].

## 2.5 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je separační metoda, kde se látky dělí na základě rozdílné distribuce mezi stacionární a mobilní fází. Jednotlivé analyty jsou různě zadržovány a zpožďovány stacionární fází [17]. Separace se provádí za účelem kvantitativní nebo kvalitativní analýzy. Jedná se o kolonovou chromatografii. Na základě rozdílného způsobu zadržování a dělení separovaných látek můžeme HPLC dělit na rozdělovací, adsorpční, iontově výměnou a gelovou permeační chromatografii. Pro separaci porfyrinů se používá chromatografie rozdělovací, která je založena na principu rozdílné rozpustnosti analytu mezi dvě zcela nemísitelné kapaliny. Dále rozlišujeme chromatografii s normální fází a chromatografii s rezervní fází. V prvním případě je stacionární fáze polární a mobilní fáze nepolární. Při reverzní chromatografii je polarita fází obrácená.

V následující části jsou popsány jednotlivé části přístroje pro HPLC [17, 18, 19, 20] a schéma chromatogramu je uvedeno na obr. 3. Přístroj HPLC se skládá ze zásobníku na mobilní fázi, pumpy, dávkovacího zařízení, separační kolony, detektoru a počítače. Na rozdíl od běžné kolonové chromatografie je součástí HPLC přístroje vysokotlaká pumpa, která umožňuje průtok mobilní fáze kolonou menších rozměrů, což umožňuje vyšší účinnost separace látek za kratší dobu ve srovnání s klasickou kolonovou chromatografií.



Obr. 3 : Schéma přístroj pro HPLC. Schéma převzato z webových stránek [21]

### Zásobník na mobilní fázi a pumpa

Mobilní fáze je ze zásobníku odčerpávána pumpou přes filtry, které zabraňují nasátí nečistot do separační kolony. Při stanovení porfyrinů v moči i ve stolici se používá HPLC s kvartérní pumpou a mobilní fáze je nasávána a vytlačována periodicky. Nasávání je zajištěno čtyřmi ventily napojenými na čtyři separátní zásobníky. U této pumpy lze plynule měnit složení mobilní fáze a to změnou obsahu jednotlivých složek mobilní fáze. Gradientové eluce můžeme využít pro separaci směsi analytů lišících se svou polaritou [18, 19].

### Dávkovací zařízení

Přesně definovaný objem vzorku se dávkuje do proudu mobilní fáze pod velkým tlakem. Vzorek dávkuje buď manuálně nebo automaticky s pomocí automatického dávkovače. Dávkovač může být ve dvou polohách a to buď v poloze plnění smyčky, kdy smyčkou neprochází proud mobilní fáze a dávkuje se vzorek, nebo v poloze nástřiku, kdy je vzorek vyplachován mobilní fází do systému [18, 19, 20].

### Kolona

Separční kolony pro HPLC musí odolávat vysokým tlakům, a proto jsou vyráběny z odolných materiálů například z kovu, skla, plastu nebo křemene. Uvnitř kolony se nachází stacionární fáze, která může být polární nebo nepolární. Na koloně je většinou napsána její specifikace, tj. rozměry kolony (délka, vnitřní průměr), velikost částic, velikost pórů a typ stacionární fáze. Většinou se používají kolony 10 - 25 cm dlouhé s vnitřním průměrem 3 - 6 mm, o velikosti částic 3, 5, nebo 10  $\mu\text{m}$  a průměrnou velikostí pórů 8 nm [18, 19]. Stacionární fáze je držena v koloně pomocí frit. Před poškozením je kolona chráněna kovovým pláštěm. V našem případě byla použita kolona s chemicky vázanou stacionární fází na inertním nosiči (silikagel). Silikagel neboli oxid křemičitý je dnes nejčastěji používaný inertní nosič díky velkému specifickému povrchu, který se pohybuje mezi 100 až 150  $\text{m}^2/\text{g}$ . Na povrchu silikagelu jsou přítomny hydroxylové (silanové) skupiny, které mohou být modifikovány vhodnými funkčními skupinami, určující výslednou polaritu. Běžně používané jsou hydrofobní stacionární fáze s navázanými uhlovodíkovými řetězci.

## Detektor

Detektor reaguje na změnu složení mobilní fáze měřením fyzikálních nebo chemických veličin. Detektory lze dělit na destruktivní a nedestruktivní. V destruktivním detektoru je analyt nevratně degradován. Příkladem jsou elektrochemické detektory. Naopak v nedestruktivním detektoru nedochází ke změně analytu. Mezi tyto detektory patří například spektrofotometrický, refraktometrický nebo fluorimetrický detektor. Dále můžeme detektory dělit na univerzální, které reagují na velkou škálu analytů, na selektivní, které reagují na určitou skupinu látek, a na specifické, které detekují pouze jediný analyt.

Základní pojmy týkající se detektoru jsou následující [18]

- Šum:* Náhodné výkyvy měřeného signálu.
- Drift:* Postupná změna intenzity signálu s časem.
- Mez detekce:* Koncentrace analytu, při které je signál statisticky významně odlišný od šumu.
- Citlivost detektoru:* Citlivost je nejmenší rozdíl v koncentraci stanovované látky, který už lze detektorem rozlišit. Odpovídá směrnici kalibrační přímky zobrazující závislost koncentrace na odezvě detektoru.
- Dynamický rozsah detektoru:* Rozsah koncentrací, ve kterém změna koncentrace způsobí změnu intenzity signálu.
- Lineární dynamický rozsah detektoru:* Rozsah koncentrací, ve kterém je citlivost detektoru konstantní ( $\pm 5\%$ ).

## Fluorimetrický detektor

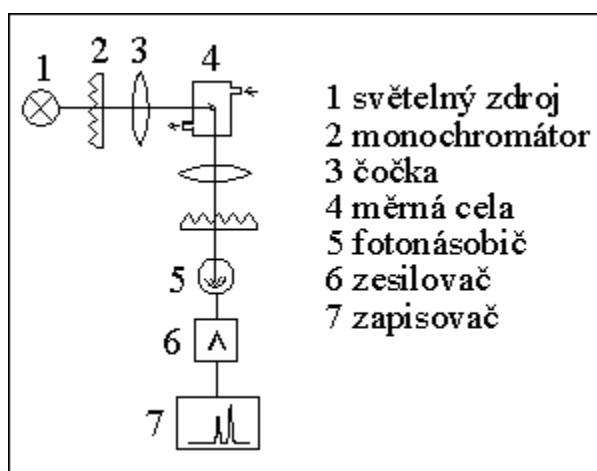
Dále se budu zabývat pouze fluorimetrickým detektorem, který jsem použila pro stanovení porfyrinů v moči i stolici [22]. Fluorimetrický detektor lze použít pouze pro látky, které vykazují fluorescenci. V tomto případě měříme sekundární emisní záření, které vyzáří látka poté, co absorbovala primární excitační záření. Při absorpci záření přechází

molekula do excitovaného stavu, resp. do vyšší vibrační hladiny. Při přeskoku zpět do základního stavu dojde k vyzáření emisního záření ve formě fluorescence.

Jako zdroj záření se používá rtuťová výbojka, miniaturní xenonová výbojka nebo laser. Po světelném zdroji následuje monochromátor, který z polychromatického záření ze zdroje propustí pouze paprsek o určité vlnové délce. Poté paprsek prochází měrnou celou. Zde dojde k absorpci excitačního záření a poté k emisi. Intenzita záření se měří v úhlu  $90^\circ$  k původnímu paprsku, aby na fotonásobič nedopadalo excitační záření. Poté následuje opět monochromátor, který vybere fluoreskující záření o určité vlnové délce.

Fotonásobič je založen na principu vnějšího fotoelektrického efektu. Je to evakuovaná nádoba, v níž je umístěna katoda, na druhé straně anoda a mezi nimi soubor dynod. Z katody se uvolňují elektrony, které dopadají na dynodu. Zde je sekundární emisí násoben jejich počet. Toto se opakuje i na dalších dynodách. Nakonec na anodu dopadne o několik řádů více elektronů. Výhodou tohoto detektoru je velmi nízká mez detekce [18, 19, 20].

Na obr. 4 je uvedeno schéma tohoto detektoru.



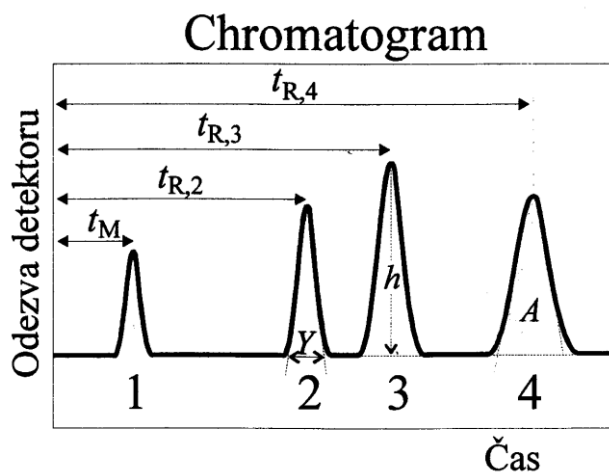
Obr. 4: Schéma fluorimetrického detektoru. Převzato z webových stránek [21]

### 2.5.1 Vyhodnocení

HPLC techniku lze využívat jak k identifikaci analytu (kvalitativní vyhodnocení), tak i ke stanovení jeho množství (kvantitativní vyhodnocení). Kvalitativní i kvantitativní vyhodnocení se provádí z chromatogramu pomocí speciálního programu, který je součástí HPLC přístroje. Odezva detektoru se zobrazí na chromatogramu jako chromatografický pík. V ideálním případě je pík přesně symetrický, tzv. Gaussovský pík. Velikost píku je většinou

přímou úměrnou koncentraci látky. Retenční faktor, vypočítaný z chromatogramu, odpovídá typu analyzované látky [19].

Příklad chromatogramu je uveden na obr. 5 [19].



Obr. 5: Chromatogram:  $t_M$ - mrtvý čas kolony,  $t_R$ - retenční čas složky vzorku,  $Y$ - šířka píku při základně (ve vzorcích používáme označení  $w$ ),  $h$ - výška píku,  $A$ - plocha píku. Obrázek převzat z publikace Opekar a kol. [19]

Retenční faktor charakterizuje zpoždování a zadržování analytu v koloně. Výpočet se provádí podle vzorce [17] a má být větší než 3.

$$k_i = \frac{t_{R,i} - t_M}{t_M} = \frac{t'_{R,i}}{t_M}$$

$k_i$  - retenční faktor

$t_{R,i}$  - retenční čas  $i$ -tého analytu [min]

$t_M$  - mrtvý čas kolony [min]

$t'_{R,i}$  - redukovaný retenční čas [min]

Rozlišení určuje míru oddělení dvou píků, separace může být buď úplná, tj. až na základní linii (rozlišení větší než 1,5) nebo částečná (rozlišení menší než 1,5) [17].

$$R_{i,j} = \frac{2 \cdot (t_{R,i} - t_{R,j})}{w_i + w_j} = \frac{2 \cdot \Delta t_R}{w_i + w_j}$$

$R_{i,j}$  - rozlišení píků  $i$ -tého a  $j$ -tého analytu

$t_{R,i}$  - retenční čas  $i$ -tého analytu [min]

$t_{R,j}$  - retenční čas  $j$ -tého analytu [min]

$w_i$  - šířka píku  $i$ -tého analytu při základně [cm]

$w_j$  - šířka píku  $j$ -tého analytu při základně [cm]

Počet teoretických pater je mírou účinnosti separace analytů na chromatografické koloně. Požadovaný počet teoretických pater je vyšší než 2000 [17].

$$n = 16 \cdot \left( \frac{t_{R,j}}{w_j} \right)^2 = 5,545 \cdot \left( \frac{t_{R,j}}{w_{1/2,j}} \right)^2$$

- $n$  - počet teoretických pater
- $t_{R,j}$  - retenční čas j-tého analytu [min]
- $w_i$  - šířka píku j-tého analytu při základně [cm]
- $w_{1/2,j}$  - šířka píku j-tého analytu v polovině výšky píku [cm]

## 2.5.2 Validace

Pod pojmem validace se rozumí ověření spolehlivosti analytické metody včetně samotného přístroje k zamýšlenému použití. Validační parametry HPLC metody zahrnují přesnost metody (směrodatná odchylka, opakovatelnost), správnost metody (výťažnost metody, porovnání s referenčním materiálem), kalibrační charakteristiky (rozsah, linearita, citlivost metody, mez detekce, mez stanovitelnosti), selektivitu, robustnost metody a vliv matrice vzorku [23].

Před zavedením metody do rutinního používání je nutné ji plně validovat pro daný účel. Při jejím převedení na nový přístroj se metoda nově validuje a nebo se porovnává návaznost některých validačních parametrů stanovených na původním přístroji. Pro převedení stanovení porfyriu v moči a stolici na nový HPLC přístroj HP1200 (Agilent Technologies, Inc, USA) bylo nutné provést kontrolu přesnosti metody, stanovení normálního rozložení dat (test normality), stanovení počtu teoretických pater, rozlišení a retenčního faktoru. V případě, že všechny hodnoty jsou v mezích požadavků pro validaci v Hepatologické laboratoři ÚKBLD Všeobecné fakultní nemocnice v Praze, je nový přístroj dostatečně připraven pro rutinní stanovení porfyriinů v moči a ve stolici.

Základní pojmy popisné statistiky [23]:

*Aritmetický průměr:* Slouží k popisu střední hodnoty určitého souboru dat. Vyjadřuje střed kolem, kterého jsou data rozptýlena (dále jen průměr).

*Medián:* Je také ukazatel střední hodnoty a při popisu menšího souboru dat je jeho použití lepší než použití průměru. Medián získáme, když seřadíme soubor dat vzestupně nebo sestupně a u lichého počtu měření je medián prostřední hodnota, u sudého počtu měření je medián průměr dvou středních hodnot.

*Rozpětí:* Je rozdíl mezi maximální a minimální hodnotou v souboru dat.

#### Základní pojmy validace [23]:

*Přesnost metody:* Je shoda mezi na sobě nezávislými výsledky stanovení za předem definovaných podmínek. Přesnost je dána směrodatnou odchylkou a opakovatelností.

Směrodatná odchylka  $s$

$$s = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

$N$  - počet měření

$x_i$  - naměřená hodnota

$\bar{x}$  - průměrná hodnota

Relativní směrodatná odchylka nebo-li variační koeficient  $v$

$$v = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 [\%]$$

$s$  - směrodatná

$\bar{x}$  - průměrná hodnota

*Správnost metody:* Je míra totožnosti mezi naměřenou hodnotou a skutečnou hodnotou.

#### *Kalibrační charakteristiky:*

*Linearita:* Je přímková závislost odezvy přístroje na koncentraci analytu. Říká, v jakém rozsahu koncentrací je odezva přístroje lineární.

*Citlivost a mez detekce:* viz odstavec detektor v kapitole 6.2 Validace HPLC.

- Mez stanovitelnosti:* Odpovídá koncentraci, při které je přesnost stanovení taková, že dovoluje kvantitativní vyhodnocení.
- Selektivita:* Schopnost metody určit daný analyt dostatečně přesně a správně i v přítomnosti interferujících látek.
- Robustnost:* Míra vlivu kolísání jednotlivých parametrů na výsledek analytického stanovení.
- Validace přístroje:* Validace jednotlivých komponent přístroje (např. software).
- Test normality:* Pomocí tohoto testu kontrolujeme, zda jsou hodnoty v souboru dat Gaussovsky rozložené.

## **2.6 HPLC stanovení porfyrinů**

Množství celkových porfyrinů se stanovuje v moči a stolici semikvantitativně. Pro stanovení přesné diagnózy a určení typu porfyrie je nutné znát rovněž spektrum porfyrinů v moči a stolici. K tomuto účelu se používá HPLC. Podle rozdílné rozpustnosti porfyrinů ve vodě nebo v tucích se deriváty porfyrinů vylučují močí nebo stolicí. Uroporfyrin je dominantním porfyrinem v moči, ve stolici je to koproporfyrin a protoporfyrin. Při zvýšených koncentracích uroporfyrinu v organismu může docházet k jeho přeměně a vzniku derivátů porfyrinů se 5, 6 a 7 karboxylovými skupinami. Naopak ve stolici může být koproporfyrin transformován anaerobními bakteriemi zažívacího traktu na deriváty s větším počtem karboxylových skupin [24].

Celkové porfyriny v moči se mohou rozdělit metodou HPLC na uroporfyrin s 8 karboxylovými skupinami, heptakarboxyporfyrin se 7 karboxylovými skupinami, hexakarboxyporfyrin se 6 karboxylovými skupinami, pentakarboxyporfyrin s 5 karboxylovými skupinami a koproporfyrin se 4 karboxylovými skupinami. K separaci je vhodná gradientová eluce na reverzní fázi s fluorimetrickou detekcí [25].

Porfyriny ze vzorku nesusušené stolice se extrahují esterifikační směsí za vzniku esterů porfyrinů. Estery reagují s kyselinou sírovou (součást esterifikačního činidla). Vzorek je poté zředěn vodou a stanovované látky jsou extrahovány do chloroformu. Vzorek esterů porfyrinů ze stolice v chloroformu se rozdělí vysokoúčinnou HPLC na ester uroporfyrinu,

heptakarboxyporfyrinu, hexakarboxyporfyrinu, pentakarboxyporfyrinu, koproporfyrinu a protoporfyrinu. K separaci je vhodná gradientová eluce na normální fázi s fluorimetrickou detekcí [26].

Veškerá experimentální data byla naměřena v termínu od 15. 10. 2010 do 31. 1. 2011 na kapalinovém chromatografu HP1200. Data byla vyhodnocena pomocí validačního programu SW Effichem v 3.0 [24].

## 3 Experimentální část

### 3.1 Přístroje a pomůcky

Pro stanovení porfyrinů v moči a ve stolici byl použit kapalinový chromatograf HP1200 (Agilent Technologies, Inc, USA) složený z kvartérního čerpadla a smyčkového dávkovacího analytického ventilu (ECOM, ČR). Detekce byla prováděna s využitím fluorimetrického detektoru (Agilent Technologies, Inc, USA) (excitace 405 nm, emise 625 nm). Pro stanovení porfyrinů v moči byla použita kolona Separon SGX C18 (Tessek, ČR). Tato kolona je vhodná pro chromatografii na reverzní fázi. Průměrná velikost částic v koloně byla 5  $\mu\text{m}$ . Délka kolony byla 150 mm a vnitřní průměr byl 3,3 mm.

K homogenizaci vzorku stolice byl použit nožový homogenizátor (Ultra turrax, Ika werk, Germany). Ke kontrole kvality extrakce porfyrinů do chloroformu byla použita UV lampa (UVC-16, Ultra Lum, USA). K odpaření chloroformu ze vzorku byla použita rotační vakuová odparka (RVO 200A, Ingos, ČR). Separace porfyrinů ze stolice byla provedena na koloně Separon SGX NH<sub>2</sub> (Tessek, ČR). Jedná se o kolonu vhodnou pro chromatografii s normální fází. Průměrná velikost částic v koloně byla 7  $\mu\text{m}$ . Délka kolony byla 150 mm a průměr byl 3,3 mm.

### 3.2 Činidla a chemikálie

K přípravě mobilní fáze pro separaci porfyrinů z moči byl použit roztok A a B. Roztok A byl připraven smísením 0,25 ml 2,6 lutidinu p. a. (Sigma, USA), 0,40 ml 85% kyseliny fosforečné p. a. (Penta, ČR), 105 ml acetonitrilu p. a. (Sigma, USA) a 70 ml acetonu p.a. (Sigma, USA). Objem byl doplněn do 500 ml destilovanou vodou. Roztok B byl připraven smísením 300 ml acetonitrilu p.a. (Sigma, USA), 150 ml methanolu p.a. (Sigma, USA) a 50 ml acetonu p.a. K okyselení moči byla připravena 3M HCl do 10 ml baňky naředěním 2,5 ml 37% HCl p.a. (Penta, ČR). Objem baňky byl doplněn destilovanou vodou [25].

K přípravě esterifikační směsi používané pro úpravu vzorku stolice byl použit methanol p. a. (Penta, ČR) a 98% kyselina sírová p.a. (Meck, USA). Výsledná koncentrace

kyseliny sírové byla 5% v metanolu. Směs byla připravována v ledové lázni. K extrakci byl použit chloroform p.a. (Penta, ČR). Další chemikálie, která byla nutná pro přípravu vzorku stolice pro analýzu porfyrinů, byl octan sodný, trihydrát p. a. (Penta, ČR). K přípravě mobilní fáze byl použit roztok A (octan ethylnatý p.a., Merck, USA) a roztok B (heptan p.a., Merck, USA) [26].

### **3.3 Příprava standardu porfyrinů pro HPLC**

Pro stanovení porfyrinů v moči byl použit standard porfyrinů Porphyrin Acid Chromatographic Marker Kit (Porphyrin Products, Logan, UT 84321, USA), který obsahuje 10 nmol každého porfyrinu tj. uroporfyrinu, heptakarboxyporfyrinu, hexakarboxyporfyrinu, pentakarboxyporfyrinu, koproporfyrinu a protoporfyrinu. Směs standardu porfyrinů byla rozpuštěna v 1 ml 3 M kyseliny chlorovodíkové. Výsledná koncentrace každého porfyrinu v naředěném standardu byla 10 pmol/l. Naředěný standardní vzorek byl skladován při 4 °C [25].

Pro stanovení porfyrinů ve stolici byl použit standard porfyrinů Porphyrin Ester Chromatographic Marker Kit (Porphyrin Products, Logan, UT 84321, USA), který obsahuje 10 nmol každého esteru porfyrinu tj. uroporfyrinu, heptakarboxyporfyrinu, hexakarboxyporfyrinu, pentakarboxyporfyrinu, koproporfyrinu a dikarboxyporfyrinu. Směs standardu porfyrinů byla rozpuštěna v 1 ml chloroformu p.a. (Penta, ČR). Výsledná koncentrace každého porfyrinu v naředěném standardu byla 10 pmol/l. Naředěný standardní vzorek byl skladován při 4 °C [26].

### **3.4 Příprava vzorků pro HPLC**

Jeden mililitr vzorku moče byl okyselen 0,1 ml 3 M HCl a centrifugován 10 minut při 1500 otáčkách za minutu. V případě, že koncentrace celkových porfyrinů byla nad 600 µg/l, bylo nutné vzorek naředit 3 M HCl. Poté byla provedena HPLC analýza s fluorimetrickou detekcí [25].

Do baňky bylo naváženo mezi 300 – 400 mg nativní stolice. Vzorek stolice byl přelit 10 ml esterifikační směsí a zhomogenizován nožovým homogenizátorem. Směs se přes noc esterifikovala při laboratorní teplotě. Druhý den byla směs přelita do 15 ml centrifugační

zkumavky a centrifugována 5 minut při 1500 otáčkách za minutu. Supernatant byl opatrně stáhnut do 100 ml děličky. K sedimentu byly přidány 3 ml esterifikační směsi, obsah byl promíchán, znovu centrifugován a supernatant byl přelit do děličky. K hnědému roztoku v děličce bylo přidáno 5 ml nasyceného octanu sodného. Z roztoku se vykristalizovaly bílé krystaly  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Indikátorovým papírkem bylo zkontrolováno pH. Bylo-li pH nižší než 3,5, byl přidán octan sodný a opět bylo zkontrolováno pH. Bylo-li vyšší než 3,5, bylo přidáno 30 ml destilované vody, a poté došlo k úplnému rozpuštění síranu sodného. Do děličky bylo přidáno 25 ml chloroformu. Poté byl vzorek 2 min. důkladně třepán a byla provedena kontrola pod UV lampou. Po osvětlení UV světlem byla červená pouze vrstva chloroformu obsahující porfyriny. Dále byla chloroformová vrstva oddělena, 2 x promyta 50 ml vody, zfiltrována do 50 ml odpařovací baňky, odpařena na rotační vakuové odparce a uložena do temna. Vzorek byl připravený pro HPLC analýzu. Před vlastním stanovením byl vzorek ředěn chloroformem na koncentraci porfyrinů nižší než 600  $\mu\text{g/l}$  a byla provedena HPLC analýza s fluorimetrickou detekcí (excitace 405 nm, emise 625 nm) [26].

### **3.5 Parametry HPLC**

Pro optimální separaci porfyrinů ze vzorku moči byl nastaven průtok mobilní fáze 0,8 ml/min při 30 °C. Byl aplikován lineární gradient. Na začátku analýzy byla mobilní fáze složená z 97 obj. % roztoku A a z 3 obj. % roztoku B, do dvacáté minuty klesla složka A na 5 obj. % a do 24 minuty klesla na 3 obj. %. Do dávkovacího zařízení bylo nejdříve aplikováno 150  $\mu\text{l}$  připraveného standardu a následně vzorky moči jednotlivých pacientů [25].

Naproti tomu pro stanovení porfyrinů ze vzorku stolice byl nastaven optimální průtok mobilní fáze na 1,5 ml/min při 30 °C a také byl použit lineární gradient. Na začátku stanovení byla mobilní fáze složená z 5 obj. % roztoku A a z 95 obj. % roztoku B. Po 12 minutách bylo složení 30 obj. % roztoku A, po 25 minutách bylo 80 obj. % roztoku A a po 30 minutách bylo 90 obj. % roztoku A. Nejprve bylo do dávkovacího zařízení aplikováno 20  $\mu\text{l}$  připraveného standardu a následně 20  $\mu\text{l}$  jednotlivých vzorků zpracované stolice pacientů [26].

### **3.6 Vyhodnocení chromatogramu standardu porfyriu**

Připravené standardy (Porphyrin Acid Chromatographic Marker Kit a Porphyrin Ester Chromatographic Marker Kit) byly analyzovány na HPLC přístroji. Získané chromatogramy

jsou uvedeny v příloze 1 a 2. Odpovídající retenční časy derivátů porfyrinů jsou uvedeny v tab. 1. a tab. 2. Identifikaci porfyrinů na dalších chromatogramech jsem provedla ze standardu měřeného personálem laboratoře.

### **3.7 Vyhodnocení chromatogramů vzorků pacientů**

1) *Kvalitativní vyhodnocení porfyrinů:* Pomocí retenčních časů porfyrinů ve standardu byly identifikovány porfyriny ve vzorku moče a stolice.

2) *Kvantitativní vyhodnocení porfyrinů:* Pro stanovení diagnózy porfyrie je nutné určit zastoupení jednotlivých porfyrinů ve vzorku. Pro tento účel byla použita metoda vnitřní normalizace za předpokladu stejných odezvových faktorů pro jednotlivé deriváty. Celková plocha píků všech porfyrinů na chromatogramu je 100 %. Z plochy píku a z celkové plochy všech píků bylo zjištěno procentuální zastoupení každého porfyrinů.

#### Fyziologické hodnoty:

Fyziologické hodnoty ve vzorku moče jsou pro koproporfyryl do 80 %, uroporfyryl do 20 % a heptaporfyryl do 7 % z celkového množství porfyrinů ve vyšetřovaném vzorku [11]. Fyziologické hodnoty ve vzorku stolice jsou pro protoporfyryl do 80 %, koproporfyryl do 20 % a uroporfyryl do 3 % z celkového množství porfyrinu ve vzorku [9].

## 4 Výsledky a diskuze

Nejprve bylo nutné určit retenční časy derivátů porfyrinů pomocí standardů pro stanovení v moči a ve stolici. Vhodné podmínky pro analýzu porfyrinů v moči byly následující: nástřik 150  $\mu$ l standardu, průtok mobilní fáze 0,8 ml/min při teplotě 30 °C, lineární gradient změny složení mobilní fáze byl od 97 obj. % do 3 obj. % roztoku A (složení roztoků A a B viz kapitola 3.2 Činidla a chemikálie) a fluorimetrická detekce (excitace 405 nm, emise 625 nm). Pro stanovení porfyrinů ve stolici byl nástřik 20  $\mu$ l standardu, průtok mobilní fáze 1,5 ml/min při teplotě 30 °C, lineární gradient změny složení mobilní fáze byl od 5 obj. % do 90 obj. % roztoku A (složení roztoků A a B viz kapitola 3.2 Činidla a chemikálie) a fluorimetrická detekce (excitace 405 nm, emise 625 nm). Za těchto podmínek byla naměřena data uvedená v tabulkách 1, 2, 3, 6, 8 a 9.

*Tab. 1: Retenční časy derivátů porfyrinů ze vzorku moči*

Deriváty Porfyrinů	Retenční časy (min)
Uroporfyryl	7,53
Heptakarboxyporfyryl	8,65
Hexakarboxyporfyryl	10,02
Pentakarboxyporfyryl	11,76
Koproporfyryl	14,06
Protoporfyryl	19,75

*Tab. 2: Retenční časy derivátů porfyrinů ze vzorku stolice*

Deriváty Porfyrinů	Retenční časy (min)
Protoporfyryl	4,10
Koproporfyryl	11,04
Pentakarboxyporfyryl	14,54
Hexakarboxyporfyryl	16,63
Heptakarboxyporfyryl	18,17
Uroporfyryl	19,43

#### 4.1 Validace HPLC metody pro stanovení porfyrinů v moči a ve stolici

K testování byl použit standard porfyrinů. Standard porfyrinů pro stanovení v moči byl změřen pětkrát. Pro stanovení ve stolici šestkrát. Naměřené hodnoty jsou uvedené v procentuálním zastoupení jednoho píku k celkové ploše všech píků. Z dat byla určena popisná statistika, přesnost metody a test normality. Výsledky měření standardu pro stanovení v moči jsou uvedeny v tabulce 3, 4, 5 a standardu pro stanovení ve stolici v tabulce 6, 7 a 8.

Tab. 3: Naměřené hodnoty standardu porfyrinů pro stanovení v moči

Porfyriny	Měření (%)				
	1	2	3	4	5
Uroporfyryl	13,4	13,6	13,2	13,4	13,4
Heptakarboxyporfyryl	14,2	14,2	14,0	14,2	14,1
Hexakarboxyporfyryl	15,8	15,8	15,9	15,9	15,9
Pentakarboxyporfyryl	19,8	19,7	19,8	20,0	19,7
Koproporfyryl	16,7	17,3	17,5	17,5	17,4
Protoporfyryl	20,0	19,5	19,7	19,4	19,6

Tab. 4: Popisná statistika z hodnot naměřených ze standardu pro stanovení v moči

	Počet měření	Průměr	Medián	Minimální hodnota	Maximální hodnot	Rozpětí
Uroporfyryl	5	13,4	13,4	13,2	13,6	0,4
Heptakarboxyporfyryl	5	14,1	14,2	14,0	14,2	0,2
Hexakarboxyporfyryl	5	15,9	15,9	15,8	15,9	0,1
Pentakarboxyporfyryl	5	19,8	19,8	19,7	20,0	0,3
Koproporfyryl	5	17,3	17,4	16,7	17,5	0,8
Protoporfyryl	5	19,6	19,6	19,6	20,0	0,4

**Tab. 5: Přesnost metody pro stanovení porfyrinů v moči**

	<b>Směrodatná odchylka</b>	<b>Relativní směrodatná odchylka (%)</b>	<b>Test normality</b>
Uroporfyryin	0,14	1,06	0,30
Heptakarboxyporfyryin	0,09	0,63	0,25
Hexakarboxyporfyryin	0,05	0,35	0,26
Pentakarboxyporfyryin	0,12	0,62	0,30
Koproporfyryin	0,33	1,94	0,25
Protoporfyryin	0,23	1,17	0,20

**Tab. 6: Měření opakovatelnosti nástřiku standardu porfyrinů pro stanovení ve stolici**

<b>Porfyryin</b>	<b>Měření (%)</b>					
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
Protoporfyryin	13,51	13,48	13,62	13,54	13,64	13,51
Koproporfyryin	16,31	16,31	16,18	16,4	16,27	16,24
Pentakarboxyporfyryin	16,05	16,22	16,01	16,04	16,10	16,19
Hexakarboxyporfyryin	16,19	16,14	16,14	16,02	16,12	16,10
Heptakarboxyporfyryin	18,21	18,11	18,15	18,26	18,11	18,17
Uroporfyryin	19,93	19,71	19,86	19,72	19,37	19,76

**Tab. 7: Popisná statistika z hodnot naměřených ze standardu pro stanovení v moči**

	<b>Počet měření</b>	<b>Průměr</b>	<b>Medián</b>	<b>Minimální hodnota</b>	<b>Maximální hodnot</b>	<b>Rozpětí</b>
Protoporfyryin	6	13,55	13,52	13,48	13,64	0,16
Koproporfyryin	6	16,28	16,29	16,18	16,40	0,22
Pentakarboxyporfyryin	6	16,10	16,07	16,01	16,22	0,21
Hexakarboxyporfyryin	6	16,11	16,13	16,02	16,19	0,17
Heptakarboxyporfyryin	6	18,16	18,16	18,11	18,26	0,15
Uroporfyryin	6	19,72	19,74	19,37	19,93	0,56

**Tab. 8: Přesnost metody pro stanovení porfyrinů ve stolici**

	<b>Směrodatná odchylka</b>	<b>Relativní směrodatná odchylka (%)</b>	<b>Test normality</b>
Protoporfyrin	0,06	0,48	0,22
Koproporfyrin	0,07	0,45	0,20
Pentakarboxyporfyrin	0,08	0,53	0,22
Hexakarboxyporfyrin	0,05	0,35	0,18
Heptakarboxyporfyrin	0,05	0,32	0,17
Uroporfyrin	0,19	0,98	0,14

Naměřené hodnoty byly vyhodnoceny. Jednotlivé parametry pro určení přesnosti metody musí vyhovovat požadavků laboratoře. Kritická hodnota pro relativní směrodatnou odchylku byla 2 % a pro test normality 0,34. Abychom mohli metodu považovat za vhodnou pro stanovení, musely být naměřené hodnoty nižší než kritická hodnota. Všechna data požadavkům vyhovují. Z testu normality vyplývá, že naměřená data mají Gaussovské rozdělení. Relativní směrodatná odchylka vypovídá o dostatečné přesnosti metody.

## **4.2 Stanovení dalších parametrů**

Kromě výše uvedených parametrů byl určen ještě počet teoretických pater, rozlišení a retenční faktor. Tyto parametry byly určeny jak pro stanovení v moči, tak pro stanovení ve stolici. Oba standardy byly změřeny jednou. Výsledky měření standardu pro stanovení porfyrinů v moči jsou uvedeny v tabulce 9 a pro stanovení porfyrinů ve stolici jsou uvedeny v tabulce 10.

**Tab. 9: Stanovení počtu teoretických pater, rozlišení a retenčního faktoru pro stanovení porfyriu v moči**

	<b>Počet teoretických pater</b>	<b>Rozlišení</b>	<b>Retenční faktor</b>
Uroporfyriu	4800	-	16,85
Heptakarboxyporfyriu	5800	2,51	19,49
Hexakarboxyporfyriu	4200	2,56	22,75
Pentakarboxyporfyriu	3800	2,50	26,86
Koproporfyriu	3900	2,76	32,31
Protoporfyriu	8200	6,41	45,80
Požadavek	<b>&gt;2000</b>	<b>&gt;1,5</b>	<b>&gt;2</b>

**Tab. 10: Stanovení počtu teoretických pater, rozlišení a kapacitního faktoru pro stanovení porfyriu ve stolici**

	<b>Počet teoretických pater</b>	<b>Rozlišení</b>	<b>Retenční faktor</b>
Protoporfyriu	4196	-	16,97
Koproporfyriu	10246	20,13	47,47
Pentakarboxyporfyriu	25099	8,69	62,80
Hexakarboxyporfyriu	46069	6,18	71,99
Heptakarboxyporfyriu	58779	5,03	78,74
Uroporfyriu	68616	4,22	84,27
Požadavek	<b>&gt;2000</b>	<b>&gt;1,5</b>	<b>&gt;2</b>

Naměřené hodnoty musely vyhovovat požadavku. Kritická hodnota byla pro počet teoretických pater 2000, rozlišení píků 1,5 a retenční faktor 2. Všechny naměřené hodnoty musely být vyšší než kritické hodnoty. Veškerá data požadavku vyhovovala.

## 5 Závěr

Porfýrie je skupina onemocnění způsobená nedostatečnou funkcí některého enzymu působícího při syntéze hemu. V diagnostice porfýrií se používá stanovení jednotlivých porfyrinů a jejich prekurzorů v moči, krvi či stolici. K odlišení jednotlivých typů porfýrií, resp. ke stanovení jednotlivých porfyrinů se používají separační metody jako je HPLC.

Bakalářská práce se zabývá validací HPLC metody pro stanovení porfyrinů v moči a ve stolici na novém přístroji Chromatograf HP1200 (Agilent Technologies, USA) s fluorometrickým detektorem (Agilent Technologies, USA) v Hepatologické laboratoři ÚKBLD Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Připravený standard pro stanovení porfyrinů v moč a ve stolici byl změřen opakovaně. Z naměřených hodnot byla určena popisná statistika a přesnost metody. Relativní směrodatné odchylky byly menší než 2 % a testy normality byly menší než 0,34. Ze získaných výsledků vyplývá, že metoda HPLC pro stanovení porfyrinů v moči a stolici je dostatečně přesná a soubor dat má Gaussovské rozdělení. Další testované parametry, jako je počet teoretických pater, rozlišení a retenční faktor, odpovídají zadanému požadavku. Uvedenou metodou byly dále změřeny vzorky stolice a moče získané od pacientů s podezřením na některý typ porfýrie. Z chromatogramů byla potvrzena předpokládaná diagnóza.

Závěrem lze říci, že metoda HPLC pro stanovení porfyrinů v moči a ve stolici vyhovuje danému účelu a může být používána rutinně při laboratorní diagnostice pacientů s podezřením na porfýrii.

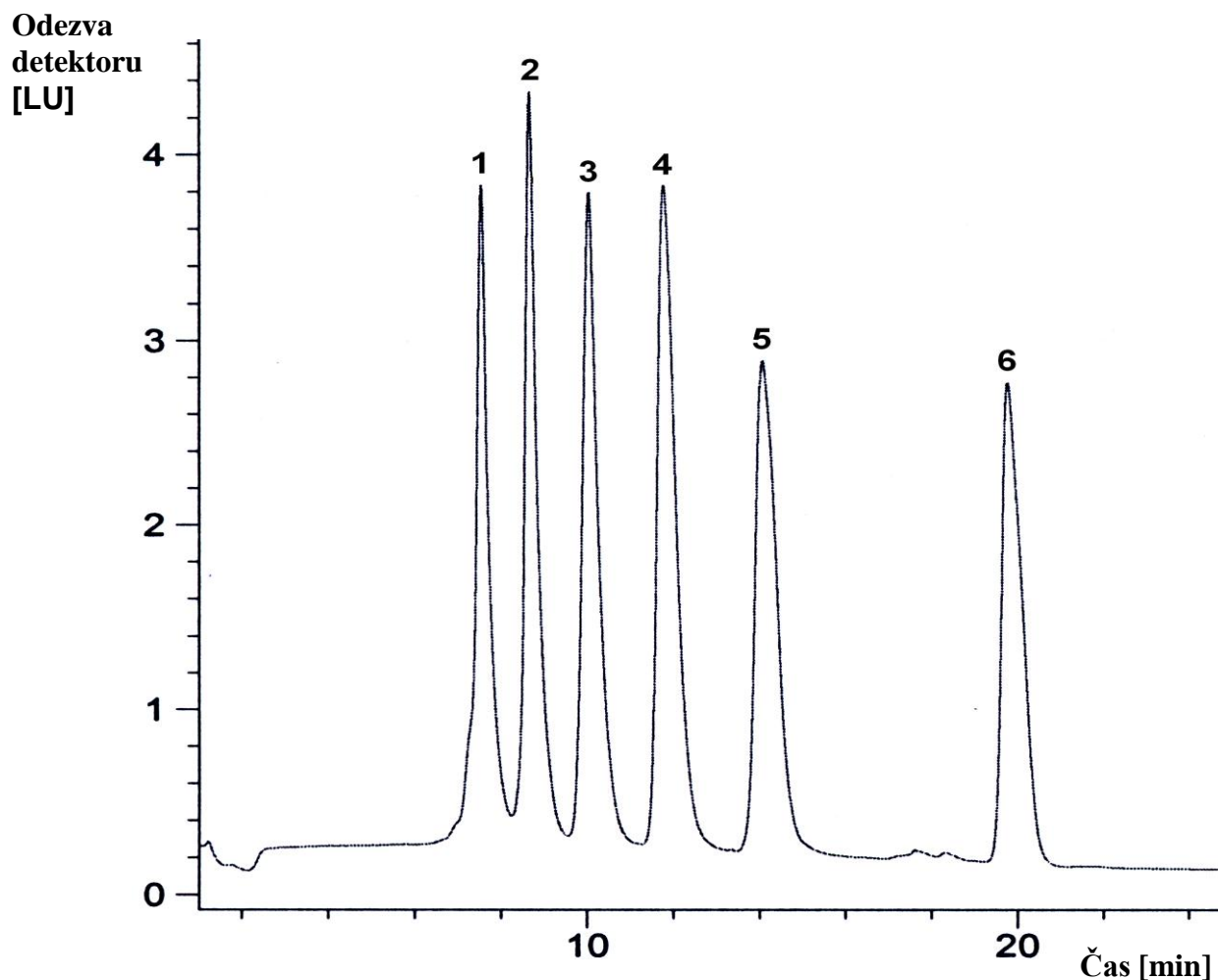
## 6 Literatura

---

- [1] Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W.: Harperova biochemie, Vydavatelství a nakladatelství H & H, ČR, 1998
- [2] Vokurka M., Hugo J. a kol., Velký lékařský slovník, Maxdorf, ČR, 2009
- [3] Burtis A.C., Ashwood R.E., Nuttall M.D., Kern L.: Porphyrins and disorders of porphyrin metabolism, Tietz textbook of clinical chemistry, W.B. Saunders company, USA., 1999
- [4] Henry J.R., Cannon C.D., Winkelman W.J., Jacobs S.L.: Porphyrins and their precursors, Clinical chemistry, Harper and Row, USA, 1974
- [5] Vítek L., Subhanová I.: Poruchy metabolismu porfyrinů, Lékařské listy 28, 24 - 26, 2004
- [6] Kaláb M., Jirsa M.: Porfyrie, Amireport 6, 67 - 72, 1996
- [7] Verstraeten L., Van Regemorter N., Pardou A., de Verneuil H., Da Silva V., Rodesch F.: Biochemical diagnosis of a fatal case of Gunther's disease in a newborn with hydrops fetalis, European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry; 31, 121 - 128 , 1993
- [8] Vítek L.: Diagnostika porfyrické nemoci, Časopis Česká společnost klinické biochemie informační bulletin, 23 - 26, 2004.
- [9] Standardní operační postup Hepatologické laboratoře a Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky (SOP-ÚKBLD-CVL-HL-2)
- [10] Nekvasilová H., Drašnar F., Štern P.: Interference léčiv s laboratorními metodami, Skripta, Státní ústav pro kontrolu léčiv, Praha, 1989
- [11] [www.ukb.lf1.cuni.cz](http://www.ukb.lf1.cuni.cz) [cit. 8.2. 2011]
- [12] Standardní operační postup Hepatologické laboratoře a Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky (SOP-ÚKBLD-CVL-HL-3)
- [13] Standardní operační postup Hepatologické laboratoře a Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky (SOP -ÚKBLD-CVL-HL-4)
- [14] Poh-Fitzpatrick M.B., Lamola A.A.: Direct spectrofluorometry of diluted erythrocytes and plasma: A rapid diagnostic method in primary and secondary porphyrimias, The Journal of Laboratory and Clinical Medicine. 87, 543 – 547, 1976

- 
- [15] Berlin A., Schaller K.H.: European standardized method for the determination of  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase activity in blood, *Zeitschrift für klinische Chemie und klinische Biochemie* 12, 389-390, 1974.
- [16] Magnussen C.R.: A red cell enzyme method for the diagnostics of acute intermitent porphyria, *Blood* 44, 857-868, 1974.
- [17] Pacáková V., Štulík K.: *Vysokoučinná kapalinová chromatografie*, Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 1986
- [18] Snyder L.R., Kirkland J.J., Glajch J.L.: *Practical HPLC Method Development*, John Wiley and Sons, USA, 1997
- [19] Opekar F., Jelínek I., Rychlovský P., Plzák Z.: *Základní analytická chemie*, Karolinum, 2003
- [20] Zýka J., Hejtmánek M., Vláčil F.: *Analytická příručka, díl I.*, SNTL a ALFA, 1979
- [21] <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html> [cit. 20.2. 2011]
- [22] User Manual G1321-90010, Agilent Technologies, Inc. 2006
- [23] [www.hplc.cz/Validace](http://www.hplc.cz/Validace) [cit. 15.2. 2011]
- [24] [www.fffchem.cz](http://www.fffchem.cz) [cit. 15.2. 2011]
- [25] Standardní operační postup Hepatologické laboratoře a Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky (SOP-ÚKBLD-CVL-HL-5)
- [26] Standardní operační postup Hepatologické laboratoře a Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky (SOP-ÚKBLD-CVL-HL-6)

## Příloha- Seznam chromatogramů

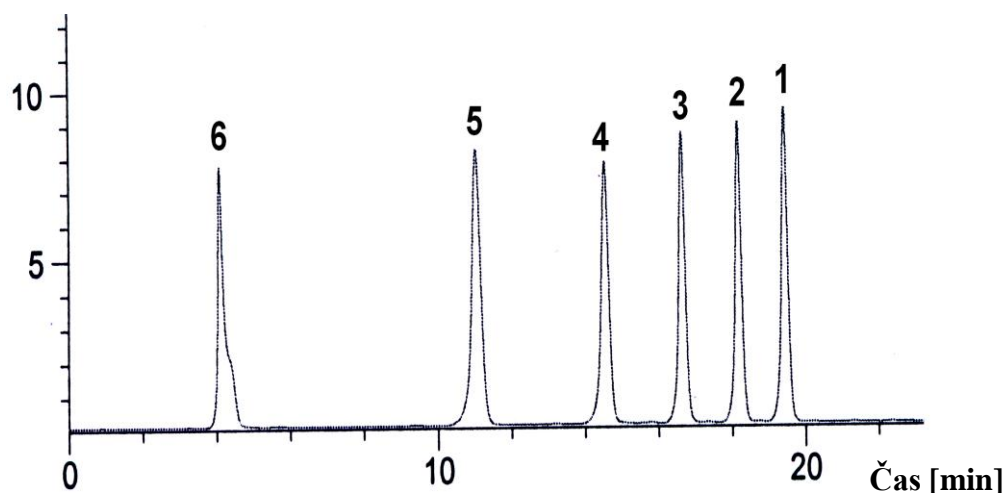


### 1. Chromatogram standardu porfyrinů v moči

*Označení píků: 1-uroporfyryl, 2-heptakarboxyporfyryl, 3-hexakarboxyporfyryl, 4-pentakarboxyporfyryl, 5-koproporfyryl, 6-protoporfyryl*

*Separční podmínky: nástřik 150  $\mu$ l standardu, průtok mobilní fáze 0,8 ml/min při teplotě 30 °C, lineární gradient změny složení mobilní fáze od 97 obj. % do 3 obj. % roztoku A (složení roztoků A a B viz kapitola 3.2 Činidla a chemikálie) a fluorimetrická detekce (excitace 405 nm, emise 625 nm)*

Odezva  
detektoru  
[LU]

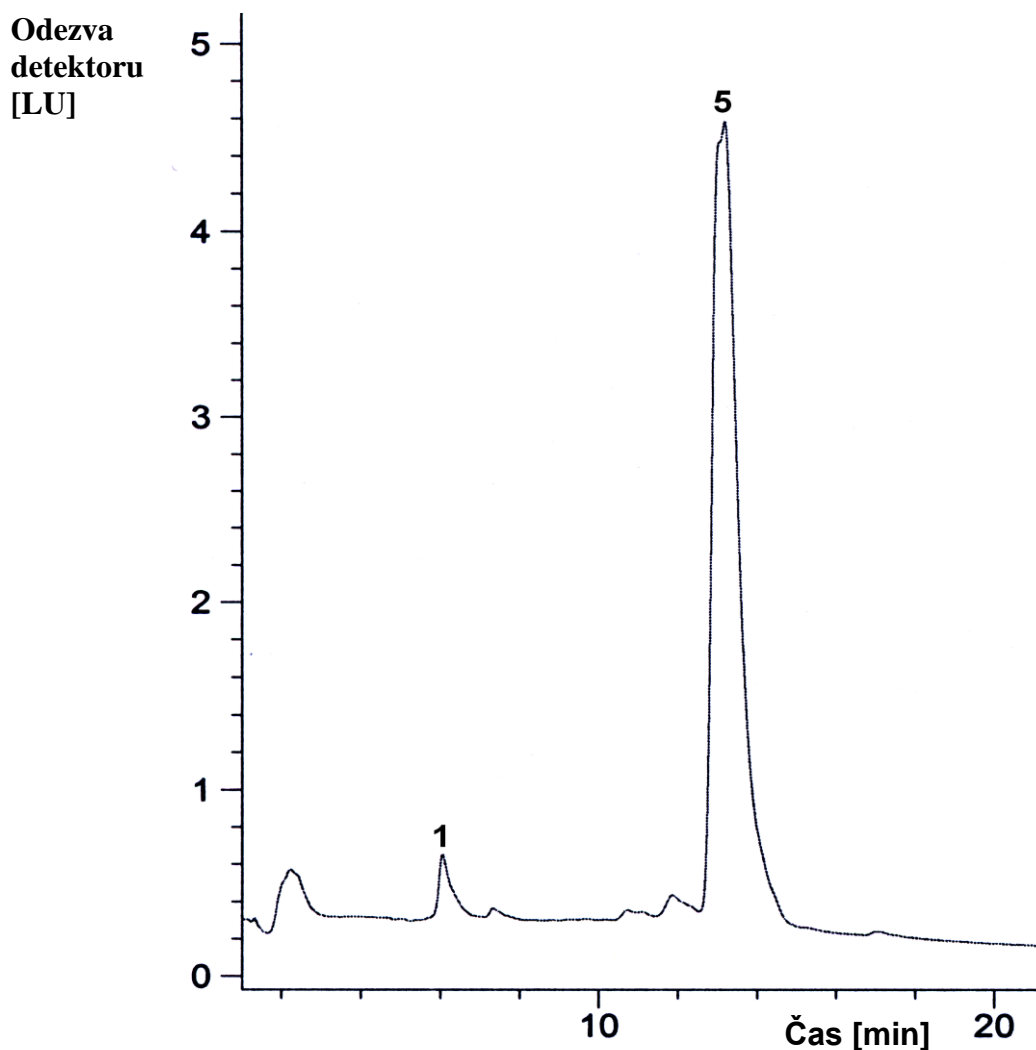


## 2. Chromatogram standardu porfyrinů ve stolici

*Označení píků: 1-uroporfyryn, 2-heptakarboxyporfyryn, 3-hexakarboxyporfyryn, 4-pentakarboxyporfyryn, 5-koproporfyryn, 6-protoporfyryn*

*Separační podmínky: nástřik 20  $\mu$ l standardu, průtok mobilní fáze 1,5 ml/min při teplotě 30 °C, lineární gradient změny složení mobilní fáze od 5 obj. % do 90 obj % roztoku A (složení roztoků A a B viz kapitola 3.2 Činidla a chemikálie) a fluorimetrická detekce (excitace 405 nm, emise 625 nm)*

### **Chromatografické nálezy nejčastějších porfyrií:**



### **3. Chromatogram porfyriinů v moči u pacienta s hereditární porfyrií**

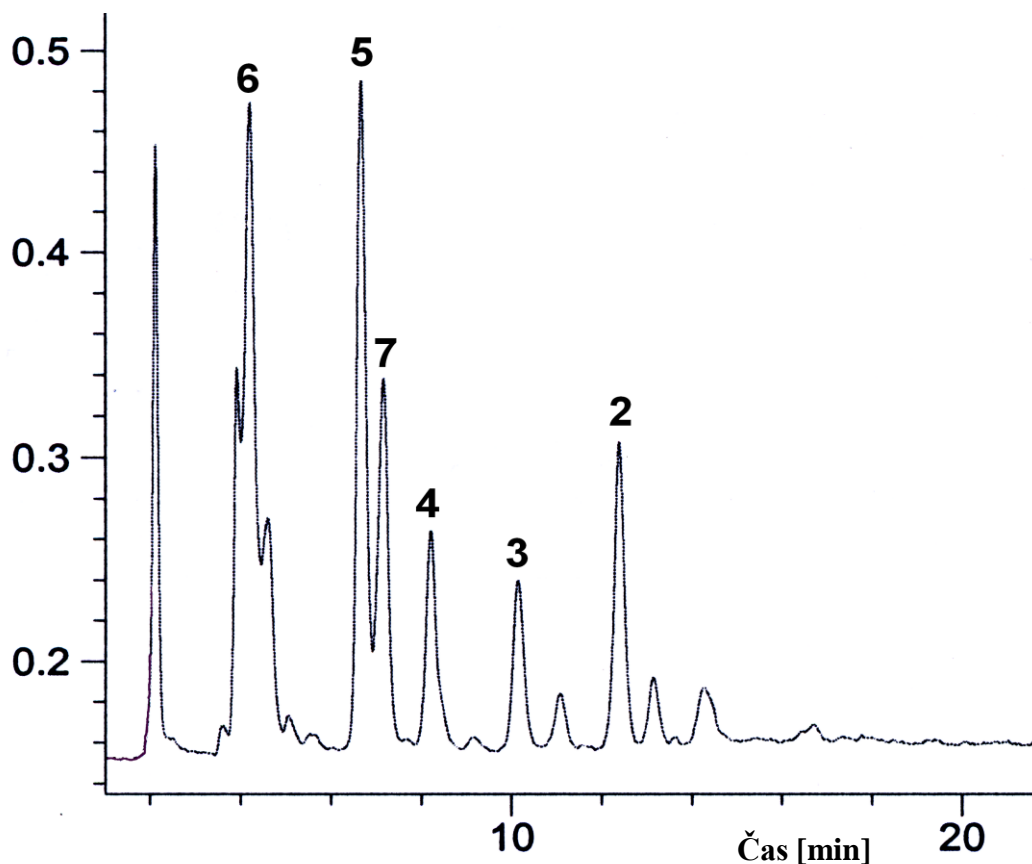
*Označení píků: 1-uroporfyriin, 5-koproporfyriin*

*Separační podmínky: nástřik 150  $\mu$ l standardu, průtok mobilní fáze 0,8 ml/min při teplotě 30 °C, lineární gradient změny složení mobilní fáze od 97 obj. % do 3 obj. % roztoku A (složení roztoků A a B viz kapitola 3.2 Činidla a chemikálie) a fluorimetrická detekce (excitace 405 nm, emise 625 nm)*

*Chromatogram v moči: Zvýšené množství koproporfyriinu*

*Diagnóza: Muž 32 let, kožní a abdominální příznaky, celkové porfyriiny v moči: pozitivní (12 x vyšší), ALA: pozitivní (1,4 x vyšší), PBG: pozitivní (orientační hodnocení, kvantitativně nelze hodnotit pro interferenci), plazmatické fluorescenční maximum: pozitivní (619 nm)*

Odezva  
detektoru  
[LU]



#### 4. Chromatogram porfyrinů ve stolici u pacienta s porfyrií cutanea tarda

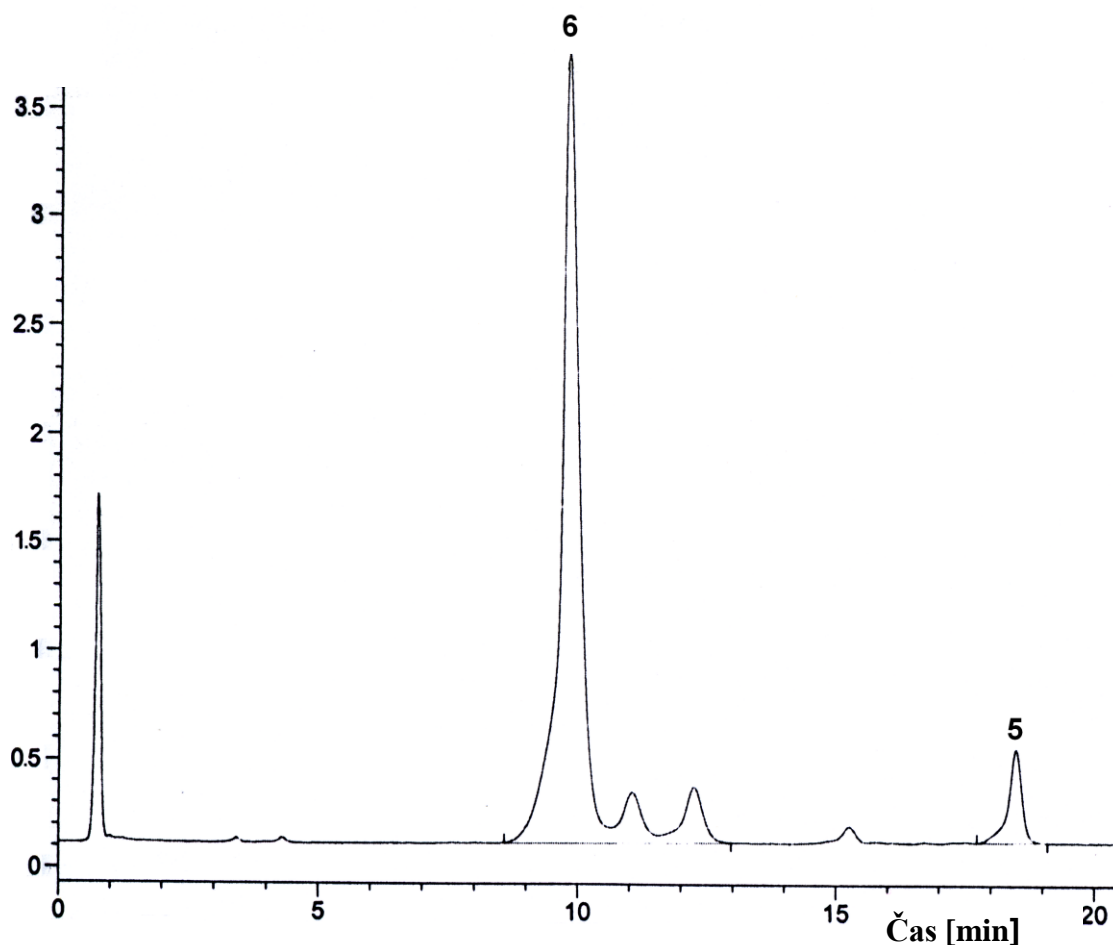
*Označení píků: 2-heptakarboxyporfyryin, 3-hexakarboxyporfyryin, 4-pentakarboxyporfyryin, 5-koproporfyryin, 6-protoporfyryin, 7-isokoproporfyryin*

*Separční podmínky: nástřik 20 µl standardu, průtok mobilní fáze 1,5 ml/min při teplotě 30 °C, lineární gradient změny složení mobilní fáze od 5 obj. % do 90 obj. % roztoku A (složení roztoků A a B viz kapitola 3.2 Činidla a chemikálie) a fluorimetrická detekce (excitace 405 nm, emise 625 nm)*

*Chromatogram ve stolici: Nález patologických koproporfyryinů (izokoproporfyryin, deethylizokoproporfyryin)*

*Diagnóza: Muž 54 let, bolestivé puchýřky na rukou, udává epizody nevysvětlitelných žaludečních bolestí, celkové porfyriny v moči: pozitivní (1,9 x vyšší), celkové porfyriny ve stolici: pozitivní (2 x vyšší), ALA: negativní, PBG: negativní, plazmatické fluorescenční maximum: pozitivní (619 nm), zvýšené množství uroporfyrynu a heptakarboxyporfyryinů v moči*

Odezva  
detektoru  
[LU]



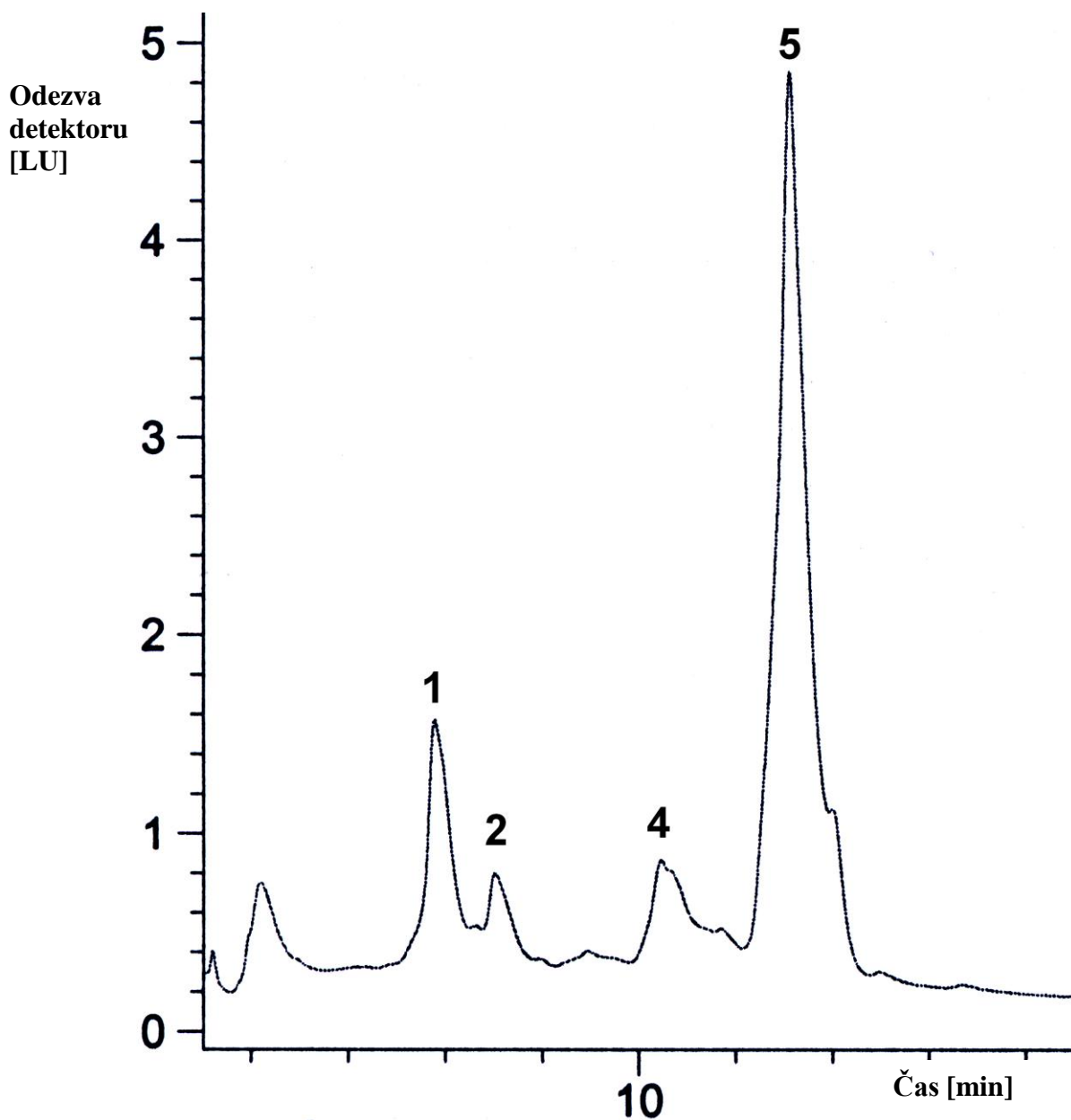
### 5. Chromatogram porfyrinů ve stolici u pacienta s erythropoetickou protoporfyrií

*Označení píků: 5-koproporfyryn, 6-protoporfyryn*

*Separační podmínky: nástřik 20 µl standardu, průtok mobilní fáze 1,5 ml/min při teplotě 30 °C, lineární gradient změny složení mobilní fáze od 5 obj. % do 90 obj % roztoku A (složení roztoků A a B viz kapitola 3.2 Činidla a chemikálie) a fluorimetrická detekce (excitace 405 nm, emise 625 nm)*

*Chromatogram ve stolici: Zvýšené množství protoporfyrinu*

*Diagnóza: Muž 32 let, žloutenka, abdominální bolesti, fotosenzitivita, diagnóza EPP v 5 letech, celkové porfyriny v moči: negativní, celkové porfyriny ve stolici: pozitivní (1,9 x vyšší), plazmatické fluorescenční maximum: pozitivní (633 nm)*



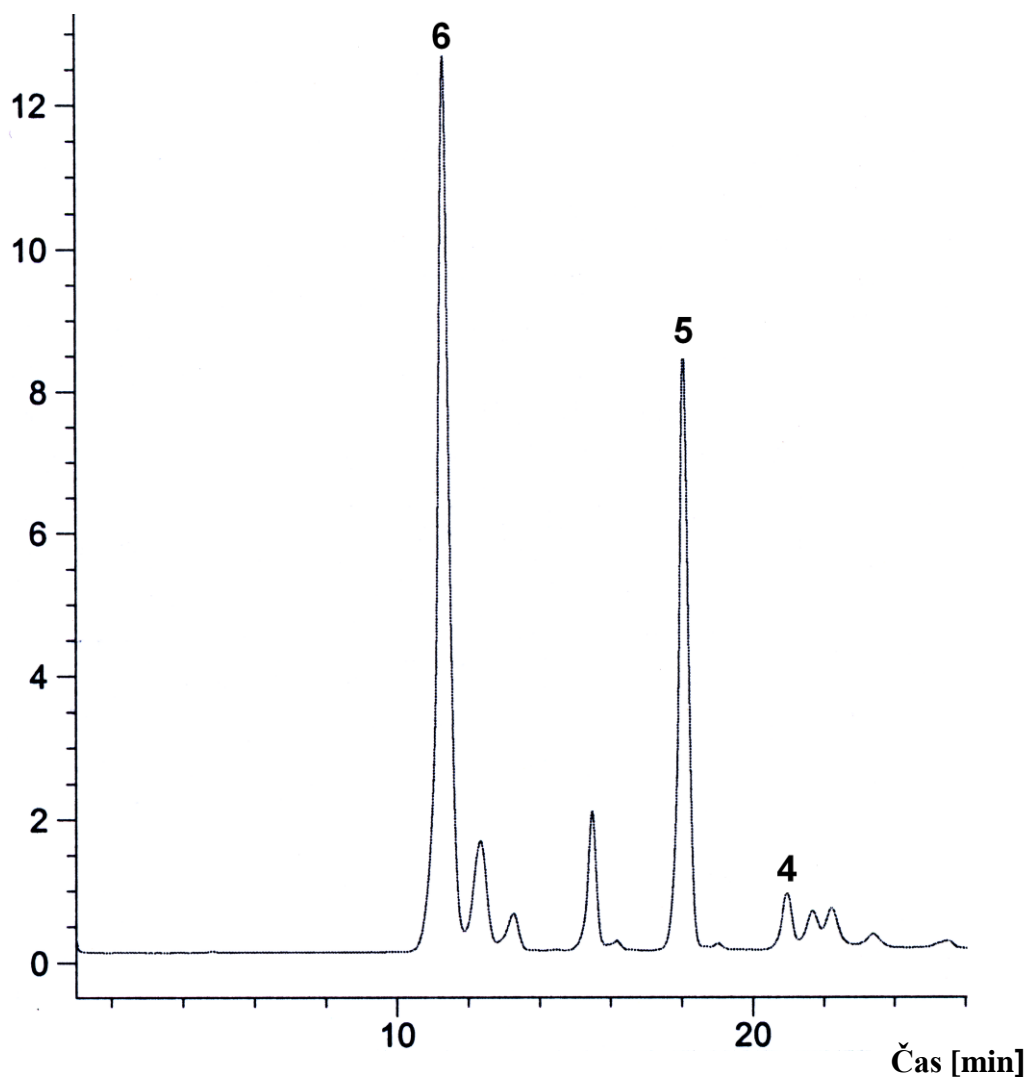
## 6. Chromatogram porfyrinů v moči u pacienta s porfyrií variegata

*Označení píků: 1-uroporfyryn, 2-heptakarboxyporfyryn, 4-pentakarboxyporfyryn, 5-koproporfyryn*

*Separační podmínky: nástřik 150  $\mu$ l standardu, průtok mobilní fáze 0,8 ml/min při teplotě 30 °C, lineární gradient změny složení mobilní fáze od 97 obj. % do 3 obj % roztoku A (složení roztoků A a B viz kapitola 3.2 Činidla a chemikálie) a fluorimetrickou detekcí (excitace 405 nm, emise 625 nm)*

*Chromatogram v moči: Zvýšené množství koproporfyrynu*

Odezva  
detektoru  
[LU]



### 7. Chromatogram porfyrinů ve stolici u pacienta s porfyrií variegata

Označení píků: 1-uroporfyriin, 2-heptakarboxyporfyriin, 4-pentakarboxyporfyriin, 5-koproporfyriin

Separáční podmínky: nástřik 20  $\mu$ l standardu, průtok mobilní fáze 1,5 ml/min při teplotě 30 °C, lineární gradient změny složení mobilní fáze od 5 obj. % do 90 obj % roztoku (složení roztoků A a B viz kapitola 3.2 Činidla a chemikálie) a fluorimetrická detekce (excitace 405 nm, emise 625 nm)

Chromatogram ve stolici: Normální profil porfyrinů

Diagnóza: Žena 52 let, nespecifické bolesti žaludku, deprese, celkové porfyriny v moči: pozitivní (5 x vyšší), celkové porfyriny ve stolici: pozitivní (12 x vyšší), ALA: pozitivní (1,5 - x vyšší), PBG: pozitivní (2 x vyšší), plazmatické fluorescenční maximum: pozitivní (627 nm)