

Sammenligning av prøveopparbeidelser og kromatografimetoder for porfyriner i urin

Line Lerpold Andersen

Masteroppgave

Masterprogram i helsefag, studieretning radiograf/bioingeniør

Institutt for global helse og samfunnsmedisin

Universitetet i Bergen



Vår 2020

Ordliste

AIP: Akutt intermitterende porfyri
CEP: Kongential erytropoietisk porfyri
CI: Konfidensintervall
DMF: N,N dimetylformaid
DMSO: Dimetylsulfoksid
EPP: Erytropoietisk protoporfyri
HUS: Haukeland universitetssjuehus
HEP: Hepatoerytropoietisk porfyri
HCl: Saltsyre
HCP: Hereditær koproporfyri
KOH: Kaliumhydroksid
MBF: Avdeling for medisinsk biokjemi og farmakologi
N: Platetall
n: Antall målinger
NaOH: Natriumhydroksid
PV: Porphyria variegata
PCT: Porphyria cutanea tarda
RP-HPLC: Omvendtfase væskekromatografi
Rs: Resolusjon
RT: Retensjonstid
SPE: Fast-fase ekstraksjon
TFA: Trifluoreddiksyre
TCA: Trikloreddiksyre
 α : Selektivitet

Forord

Det er mange jeg ønsker å takke for at jeg har fått gjennomført studien. Først vil jeg begynne med å takke Haukeland universitetssjukehus, Avdeling for medisinsk biokjemi og farmakologi (MBF), seksjon for porfyrianalyser, da spesielt min sjef Alexander R. Blø og for å tilrettelegge slik at det var mulig å kombinere jobb med masterstudie. Takk for at du har vært tålmodig i denne prosessen og for at du har gitt meg tilbakemeldinger på arbeidet jeg har gjort. I tillegg til dette vil jeg takke MBF for å bidra med økonomiske midler som var nødvendige for å få gjennomført studien. Videre vil jeg takke veilederne mine for at de har vært tilgjengelige for å svare på spørsmål hele veien. Hovedveileder Philip Webber har vært god støtte i hele prosessen og kommet med faglig innspill, mens Aasne K. Aarsand har gitt uvurderlig hjelp i skriveprosessen. Veileder fra UIB Åshild Lunde har gitt tilbakemeldinger i skriveprosessen og jeg setter pris på dine innspill. Til slutt vil jeg takke Berit Brendehaug og mine andre kollegaer ved seksjon for porfyrianalyser for deres positivitet og tilrettelegging i den litt spesielle tiden vi var inne i på våren av 2020 i siste del av arbeidet med denne mastergraden.

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	7
Abstract	9
1 Introduksjon	11
1.1 Bakgrunn for valg av tema.....	11
1.2 Sentral teori på området og studiens teoretisk forankring.....	12
1.2.1 Generelt om porfyrisykdommene	12
1.2.2 Kutane porfyrisykdommer.....	13
1.2.3 Diagnostikk av de vanligste porfyrisykdommene.....	14
1.2.4 Prøveopparbeidelse	15
1.2.5 Kromatografi.....	16
1.2.6 Begreper knyttet til kromatografi	18
1.3 Gjennomgang av publiserte metoder for analyse av porfyriner i urin.....	20
1.4 Oversikt over betegnelser for metoder benyttet i oppgaven	21
2 Hensikt og problemstilling(er)	21
2.1 Hensikt.....	21
2.2 Problemstillinger	22
3 Metode	22
3.1 Studiedesign/analyseoppsett	22
3.2 Utvalg.....	22
3.3 Prøveopparbeidelse brukt ved metodesammenligning	23
3.3.1 Prøveopparbeidelse 1.....	23
3.3.2 Prøveopparbeidelse 2.....	24
3.3.3 Prøveopparbeidelse 3.....	24
3.4 Beskrivelse av kromatografisk metode	24
3.4.1 Kromatografisk metode A	24
3.4.2 Kromatografisk metode B.....	25
3.4.3 Detektorinnstillinger for kromatografi	26
3.4.4 Kolonne.....	26
3.5 Kalibrator, internstandard og kontroll	26
3.5.1 Internstandard.....	26
3.5.2 Ekstern kalibrator (markør)	27
3.5.3 Urinkalibrator	27
3.5.4 Intern kvalitetskontroll	28
3.5.5 Kalibrering	28
3.6 Vurdering av korrelasjon og metodeytelse	29

3.6.1	Korrelasjon	30
3.6.2	Selektivitet og interferens og toppform	31
3.6.3	Retensjonstid.....	32
3.6.4	Injeksjonsvolum og analysetid	32
3.6.5	Linearitet	32
3.6.6	Carry-over.....	33
3.6.7	Stabilitet	33
3.6.8	Kvantifiserings og deteksjonsgrense	34
3.6.9	Presisjon	34
3.7	Statistiske tester	34
3.8	Etiske hensyn.....	35
4	Resultater	36
4.1	Korrelasjon for kromatografisk metode A.....	36
4.2	Metodeytelse for kromatografisk metode A.....	41
4.2.1	Separasjon	41
4.2.2	Interferens.....	42
4.2.3	Toppform.....	43
4.3	Korrelasjon for kromatografi metode B sammenlignet med kromatografi metode A	43
4.4	Metodeytelse for kromatografisk metode B.....	45
4.4.1	Selektivitet, interferens og toppform.....	45
4.4.2	Retensjonstid.....	47
4.4.3	Injeksjonsvolum.....	48
4.4.4	Kvantifiseringsgrense og deteksjonsgrense	49
4.4.5	Linearitet	50
4.4.6	Carry-over.....	51
4.4.7	Stabilitet	51
4.4.8	Presisjon	53
4.4.9	Ekstern kvalitetskontroll.....	54
4.5	Separasjon og kvantifisering av porfyrin-isomerer	55
5	Diskusjon	58
5.1	Korrelasjon og metodeytelse for kromatografi metode A.....	58
5.2	Korrelasjon for kromatografisk metode B sammenlignet med kromatografisk metode A ..	60
5.3	Metodeytelse for kromatografisk metode B.....	61
5.3.1	Analysetid og injeksjonsvolum for kromatografisk metode B	64
5.4	Separasjon av porfyrin-isomerer	65
5.5	Validitet og reliabilitet i studien	65

6	Konklusjon	66
	Referanseliste	68
	Vedlegg	70
	Vedlegg 1 Framleggingsvurdering fra REK	70
	Vedlegg 2 Uttalelse fra personvernombudet	71
	Vedlegg 3: Bio-bank.....	75
	Appendix.....	77
	Mobilfase	77
	Løsninger brukt ved opparbeidelse	77
	Utstyr	78
	Kjemikalier	79
	Ekstinksjonskoeffisienter ($E_{\mu\text{M}}$)	80
	Konsentrasjon og renhet til stockløsninger	81
	Linearitet	82
	Oversikt holdbarhet av løsninger	82
	Passing-Bablok regresjon og Bland-Altman plot kromatografi metode A kalibrert med markør	83
	Passing-Bablok regresjon og Bland-Altman plot for kromatografi metode A kalibrert med urinkalibrator.....	84
	Passing-Bablok regresjon for kromatografi metode B kalibrert med urinkalibrator	88
	Linearitet prøveoppbeidelse 2	92
	Linearitet prøveoppbeidelse 3	93
	Carry-over	94

Sammendrag

Studien ble utført ved Avdeling for medisinsk biokjemi og farmakologi (MBF) ved Haukeland universitetssjukehus). Målet med studien var å undersøke om det var mulig å forenkle analyse av porfyriner i urin som består av analyttene uroporfyrin, heptaporfyrin, heksaporfyrin, pentaporfyrin, koproporfyrin I, koproporfyrin III og summen av porfyrinene totalporfyrin ved å endre metode for prøveopparbeidelse. I tillegg ble det undersøkt om endring av kromatografisk analysemetode kunne føre til bedre ytelse, særlig separasjon av porfyrin-isomerer. Studien ble godkjent av personvernombudet ved HUS.

Inklusjonskriteriene for studien var prøver mottatt til utredning og kontroll av porfyrisykdom hvor totalporfyriner var over 15 nmol/mmol kreatinin. Studien ble utført på prøver hvor rutineanalyse av porfyriner i urin allerede var utført.

Dagens rutinemetode for porfyriner i urin ved MBF er opparbeidelse med fast-fase ekstraksjon og analyse ved omvendt fase kromatografi (RP-HPLC) med gradient eluering med 0,1 % trifluoreddiksyre i vann og acetonitril mobilfase og zorbax eclipse XDB, C18, 1,8 µm, kolonne. To metoder for prøveopparbeidelse ble testet, en hvor urinprøvene ble fortynnet med 1:1 H₂O:(1:1 dimetylsulfoksid: trikloreddiksyre) og en annen hvor urinprøvene ble fortynnet med saltsyre. Begge de nye metodene for prøveopparbeidelse ble analysert med 0,1 % trifluoreddiksyre i vann og acetonitril mobilfase i tillegg til 1,0 M ammoniumacetat (pH 5,16) og metanol mobilfase. Deretter ble metodeytelse med parametre som konsentrasjon, selektivitet og interferens vurdert opp mot dagens rutinemetode. Kvantifisering av analyttene ble utført ved hjelp av kalibrator laget fra Chromatographic marker kit fra Frontier scientific eller spiket urin.

Korrelasjonsstudier indikerte at prøver opparbeidet ved fortynning med syre ikke hadde signifikant forskjellig konsentrasjon til de som ble opparbeidet med fast-fase ekstraksjon når prøvene ble kalibrert med urin-kalibrator og analysert med 0,1 % trifluoreddiksyre. Ved kalibrering med markør var det signifikant forskjell i konsentrasjon mellom metodene ifølge den ikke-parametriske passing-bablok regresjon. Det ble ikke påvist forskjell i selektivitet og interferens.

Analyse av urinprøver opparbeidet ved fortynning med syre og kromatografisk analyse med 1,0 M ammoniumacetat (pH 5,16) og metanol mobilfase førte til økt separasjon og mulighet

for kvantifisering av porfyrin-isomerer som uroporfyrin I og uroporfyrin III samt heptaporfyrin I og heptaporfyrin III.

Metoden hvor urinprøvene fortynnes med 1:1 H₂O:(1:1 dimetylsulfoksid:trikloreddiksyre) hadde høyere kvantifiseringsgrense enn de andre metodene for opparbeidelse uavhengig av mobilfase brukt i kromatografisk analyse. Årsaken til dette er høyere grad av fortynning for denne metoden for opparbeidelse sammenlignet med de andre metodene.

Konklusjonen som kan trekkes fra oppgaven er at det er mulig å endre metode for porfyriner i urin til en metode som er raskere å opparbeide, som samtidig gir bedre separasjon og mulighet for kvantifisering av porfyrin-isomerer (som for eksempel uroporfyrin I og uroporfyrin III) og har minst like god metodeytelse. Da fast-fase ekstraksjon tar lang tid og har begrensninger i forhold til hvor mange prøver som opparbeides samtidig vil nye metoder være enklere å utføre. Analyse med 1,0 M ammoniumacetat, pH 5,16/metanol mobilfase fører til noe økt analysetid på instrumentet og dette resulterer i at tid fra opparbeidelse til svarutgivelse ikke vil gå ned.

Nøkkelord: fast-fase ekstraksjon, omvendt fase kromatografi, porfyrin isomerer, mobilfase, gradient eluering.

Abstract

The project was carried out at the Department of Medical Biochemistry and Pharmacology (MBF) at Haukeland University Hospital. The aim of the study was to investigate if it is possible to simplify analysis of the analytes uroporphyrin, heptaporphyrin, hexaporphyrin, pentaporphyrin, coproporphyrin I and coproporphyrin III by changing the method for sample preparation. It was also investigated if changing the chromatographic method would lead to better performance, especially when it comes to separation of porphyrin isomers. The project was approved by data protection officer (personvernombud) at Haukeland University Hospital and urine left over after routine analysis of porphyrins in urine was used in the project.

The routine method for total porphyrins in urine at MBF consists of solid-phase extraction sample preparation followed by reverse phase chromatography with gradient elution, 0,1 % trifluoroacetic acid in water and acetonitrile mobile phase on a zorbax eclipse XDB, 1.8 μm , c18 column. Two new sample preparation methods that was tested involved dilution with ether 1:1 H₂O:(1:1 dimethyl sulfoxide: trichloroacetic acid) or hydrochloric acid. Both of the new sample preparation methods were tested with two sets of chromatographic conditions, 0,1 % trifluoroacetic acid in water and acetonitrile mobile phase, and 1.0 M ammoniumacetate (pH 5,16) and methanol mobile phase. For the two new methods, measured analyte concentration, selectivity and interference were compared to those of the routine method. Quantitation was performed either with the Frontier Scientific marker kit or with spiked calibrator in urine.

Samples diluted with acid and analysed with 0,1 % trifluoroacetic acid in water and acetonitrile mobile phase correlates well with the routine method when calibrated with calibrator in urine. Calibration with the chromatographic marker kit shows a significant difference in concentration between the two methods according to the non parametric Passing-Bablok regression. There is no difference in selectivity and interference.

Analysis of urine samples by chromatographic analysis with 1.0 M ammoniumacetate dilution (pH 5,16) and methanol mobile phase afforded greater separation compared to 0,1 % trifluoroacetic acid in water and acetonitrile. Consequently the quantitation of both I and III isomers of uroporphyrin and heptaporphyrin could be realised.

The sample preparation method in which urine samples are diluted by 1:1 H₂O:(1:1 dimethyl sulfoxide: trichloroacetic acid) have a greater quantitation limit compared to the other methods regardless of chromatographic method. This higher quantitation limit is due to the higher degree of dilution in the sample preparation method.

We can conclude that it is possible to change analysis of the analytes uroporphyrin, heptaporphyrin, hexaporphyrin, pentaporphyrin, coproporphyrin I and coproporphyrin III to a method with a simple and faster sample preparation, which has a better separation and possibility for quantitation of porphyrin isomers (for example uroporphyrin I and uroporphyrin III) and equally good method performance. Solid-phase extraction is time consuming and has limitations when it comes to the number of samples than can be prepared simultaneously. Analysis with 1.0 M ammoniumacetate (pH 5.16) and methanol leads to an increase in runtime which results in no change in turnaround time for the analysis.

Keywords: solid-phase extraction, reverse phase chromatography, porphyrin isomers, mobile phase, gradient

1 Introduksjon

1.1 Bakgrunn for valg av tema

I mitt arbeid som bioingeniør ved Avdeling for klinisk biokjemi og farmakologi (MBF) jobber jeg med biokjemiske analyser som benyttes til diagnostikk og oppfølging av porfyrisykdom. Det finnes mange ulike porfyriner og porfyrin-isomerer, som i varierende grad benyttes i diagnostikk av porfyrisykdom. Gjennom masterstudien har jeg undersøkt om det er mulig å forenkle MBFs metode for porfyriner i urin, som innebærer analyse av porfyrinene uroporfyrin, heptaporfyrin, heksaporfyrin, pentaporfyrin, koproporfyrin I og koproporfyrin III.

Rutinemetode ved MBF i bruk i dag innebærer at urinprøvene opparbeides ved fast-fase ekstraksjon (SPE) før analyse med omvendt fase kromatografi (RP-HPLC). Fast-fase ekstraksjon har mange trinn og kan være omfattende og ta lang tid å utføre. Utstyret som benyttes har i tillegg en begrensing på hvor mange prøver som kan analyseres samtidig. Automatisert utstyr for SPE er for dyrt med tanke på analysevolumet ved MBF på Haukeland universitetssjukehus (HUS).

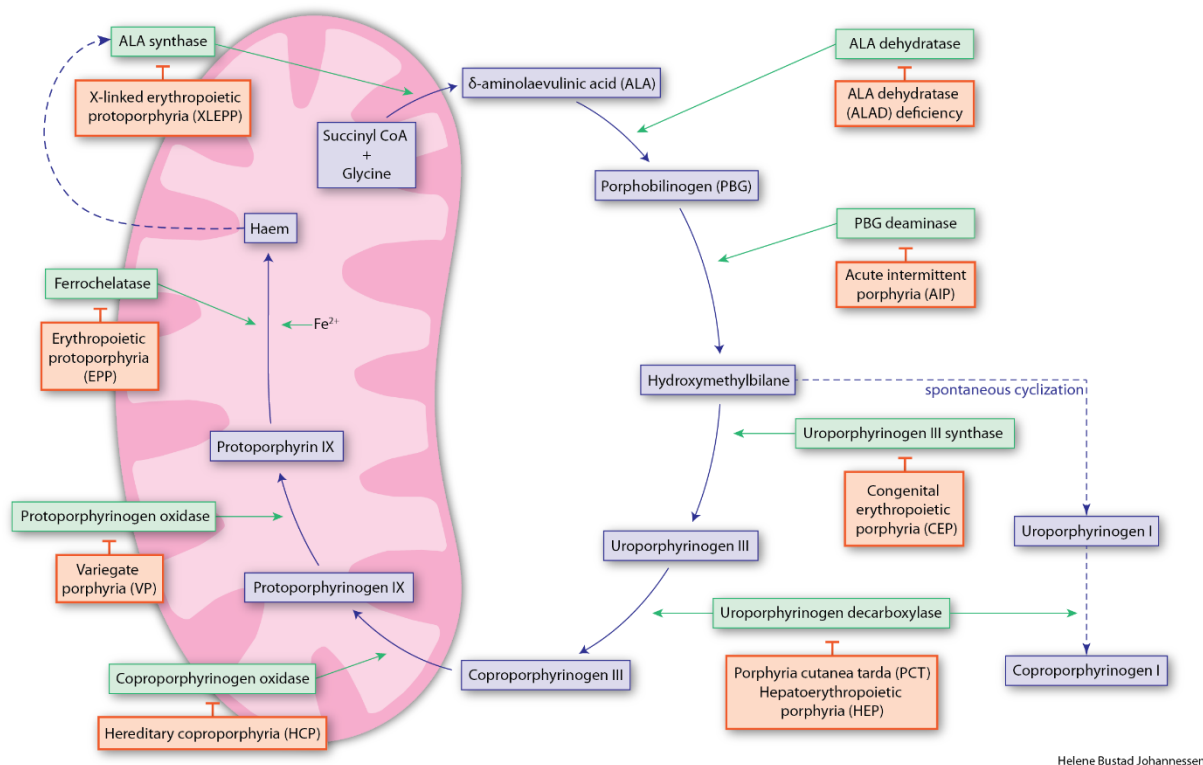
Ved å endre metode for prøveoppbeidelse for urinprøvene fra fast-fase ekstraksjon til en enklere metode hvor det tilsettes saltsyre til urinprøvene (Lundanes & Greibrokk, 2013) eller trikloreddiksyre og dimetylsulfoksid (Clavero et al., 2010) vil man kunne spare tid ved prøveoppbeidelse. Endring av mobilfase vil kunne endre resolusjonen til enkelte av analyttene og gjøre det mulig å separere uroporfyrin I- og III-isomerer, noe som ikke er mulig med dagens metode. Dersom en av de nye metodene kan tas i bruk ved MBF vil dette også kunne medføre en kostnadsbesparelse ved redusert tidsbruk på oppbeidelse per analyse utført ved laboratoriet.

Det er funnet studier som sammenligner ulike kolonner og beskriver optimalisering av buffer brukt i kromatografisk metode (Benton, Lim, Moniz, & Jones, 2012). Det er ved litteratursøk ikke funnet studier som sammenligner ulike metoder for prøveoppbeidelse for porfyriner i urin, av den typen som vi planlegger å utføre. MBF har en landsdekkende funksjon for porfyridiagnostikk, og det er få eller ingen andre laboratorier i Norge som utfører analysene.

1.2 Sentral teori på området og studiens teoretisk forankring

1.2.1 Generelt om porfyrisykdømmene

Porfyrisykdømmer er en gruppe metabolske sykdommer (se Tabell I) forårsaket av nedsatt aktivitet, eller for en av sykdommene økt aktivitet, av et enzym i hemsyntesen, noe som fører til akkumulering av forstadier til hem, se figur 1.



Figur 1: Oversikt over hemsyntesen. Ulike porfyrisykdømmer i figuren er satt opp i oransje firkanter, affisert enzym i grønne og forstadier til heme i blå. (Figur laget av Helene Bustad Johannessen, gjengitt med tillatelse).

Porfyrisykdømmer kan klassifiseres basert på hvilken type symptomer de gir, da som akutte porfyrisykdømmer, kutane porfyrisykdømmer eller sykdommer med begge former for symptomer (se Tabell I).

De ulike porfyrinene i hemsyntesen har ulik vannløselighet. En nedgang i vannløselighet for de ulike porfyrinene er forårsaket av at karboksylgrupper som fjernes gradvis noe som påvirker porfyrinenes ekskresjonsrute. Type symptomer avhenger av om pasienten får opphopning av hemforstadier som ikke har ringstruktur eller om det er opphopning av hemeforstadier med ringstruktur som kan eksiteres av lys (Sarkany, 2008).

Tabell I: Oversikt over de vanligste porfyrisykdommene og assosierte symptomer

Sykdom		Symptomer	Enzymdefekt
Akutt intermitterende porfyri	AIP	Akutte	Nedsatt porfobilinogen deaminase
Hereditær koproporfyri	HCP	Akutte±hud ¹	Nedsatt koproporfyriinogen oksidase
Porphyria variegata	PV	Akutte±hud ¹	Nedsatt protoporfyriinogen oksidase
Porphyria cutanea tarda	PCT	Hud ¹	Nedsatt uroporfyriinogen dekarboksylase
Kongenital erythropoietisk porfyri	CEP	Hud ^{1,2} m.m	Nedsatt uroporfyriinogen III syntase
Erythropoietisk protoporfyri	EPP	Hud ²	Nedsatt ferrokelatase

Akutte symptomer innebærer vanligvis sterke magesmerter, nevrologiske og psykiske symptomer (Karim et al., 2015; Revisjonsskjema Porfyrisykdommar (versjon 5: 24.05.2019))

1.2.2 Kutane porfyrisykdommer

PCT er den vanligste porfyrisykdommen på verdensbasis og er forårsaket av abnormal funksjon (nedsatt aktivitet) av det femte enzymet i hemsyntesen, uroporfyriinogen dekarboksylase. Nedsatt enzymaktivitet fører til en opphopning av porfyriiner, hovedsakelig uroporfyriin og heptaporfyriin i lever. Disse transporteres så til huden hvor de gir skade når huden bestråles av lys med relevante bølgelengder, rundt 400 nm (Bleasel & Varigos, 2000; Karim et al., 2015). Dette gir symptomer, som også sees ved andre porfyrisykdommer som PV og HCP (Tabell I), i form av sårbar og skjør hud og blærer på soleksponerte områder av huden. Pasienten selv setter vanligvis ikke dette i sammenheng med lyseksponering, da reaksjonen er forsinket.

Porfyrisykdommene PV og HCP kan i tillegg til hudsymptomer også gi akutte symptomer i form av abdominale smerter, psykiske og nevrologiske symptomer (Karim et al., 2015). EPP gir brennende smerte i huden, og i noen tilfeller ødemer etter kun minutter med soleksponering. EPP er forårsaket av en delvis mangel (abnormal funksjon) av det siste enzymet i hemsyntesen, mitokondrial ferrokelatase (FECH). Dette fører til en opphopning av metallfritt protoporfyriin-XI (PPIX) i erythrocytter, protoporfyriin transporteres deretter bl.a. til huden hvor symptomene oppstår (Karim et al., 2015).

1.2.3 Diagnostikk av de vanligste porfyrisykdommene

Tabell II: Oversikt diagnostikk for de vanligste porfyrisykdommene

Sykdom	Urin	Feces	Plasma fluorescens emisjonsmaksimum (nm)	Erytrocytter
Akutt intermitterende porfyri (AIP)	PBG>ALA Uroporfyrin1	-/↑uroporfyrin Normal koproporfyrin isomer III:I ratio	615-622	-
Porphyria variegata (PV)	PBG>ALA2	Protoporfyrin Kopropofyrin Økt koproporfyrin isomer III:I-ratio	624-628	-
Hereditær koproporfyrin (HCP)	PBG>ALA2	Koproporfyrin III Økt koproporfyrin isomer III:I - ratio	615-622	-
Porphyria cutanea tarda (PCT)	Uroporfyrin Heptaporfyrin	Uroporfyrin Pentaporfyrin Normal koproporfyrin isomer III:I – ratio	615-622	-
Kongenital erytropoietisk porfyri (CEP)	Uro- I og koproporfyrin I økt.	Koproporfyrin I Koproporfyrin III:I – ratio er ikke økt	615-618	Uroporfyrin I Koproporfyrin I Protoporfyrin
Erytropoietisk protoporfyri (EPP)	-	Protoporfyrin	626-636	Metallfritt protoporfyrin3

1: omdannet fra PBG, 2: Ved PV og HCP er utskillelsen av ALA/PBG tilnærmet normal utenom akutte anfall (Aarsand, 2012; Hagve & Berg, 2019).

Porfyrisykdommer kan ikke diagnostiseres på bakgrunn av kliniske symptomer og funn, men stilles på bakgrunn av påvisning av typiske mønstre av økte mengder porfyriner i urin, feces og blod. Biokjemisk diagnostikk er nødvendig både for å kunne påvise en porfyrisykdom, og for å kunne skille mellom de ulike sykdommene, da flere av dem kan gi samme type symptomer (Tabell I). Ved MBF på HUS mottas det urin-, feces- og blodprøver fra pasienter,

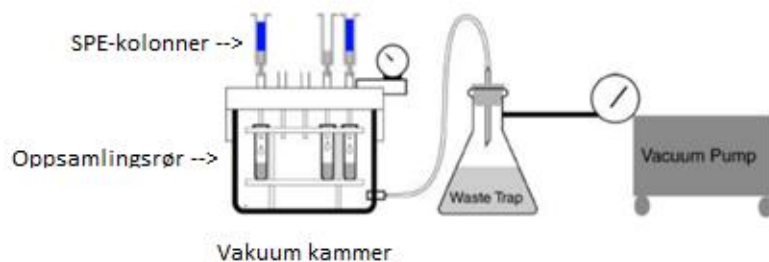
og relevante analyser rekvireres av laboratoriet basert på hvilken type symptomer pasientene har. For personer med kutane symptomer er analyse av totalporfyriner i urin førstelinjeanalyse med en semikvantitativ screeningmetode som bestemmer konsentrasjon for totalporfyriner i urin (skiller ikke mellom de ulike porfyrinene). Totalporfyriner i urin er en samlebetegnelse på porfyrinene som eluerer ut i urin. Prøver med konsentrasjon over 15 nmol/mmol kreatinin analyseres deretter med HPLC metode. Denne metoden kvantifiserer uroporfyrin, heptaporfyrin, heksaporfyrin, pentaporfyrin, koproporfyrin I, koproporfyrin III som summeres til totalporfyriner i urin. Porfyrinene finnes som flere typer isomerformer, og hvilken type isomer som er i overskudd, kan benyttes diagnostisk. Analysen som benyttes i rutineanalyse ved MBF i dag kan kun skille mellom koproporfyrin III og I.

Ved diagnose av kutan porfyrisykdom mottas det og analyseres porfyriner i plasma, urin og i feces. De biokjemiske analysene er nødvendige for å kunne skille mellom de ulike kutane porfyrisykdommene. Biokjemiske analyser av porfyriner og porfyrinforstadier i urin, og andre prøvematerialer, utføres også som monitorering av porfyrisykdommene. Dette er spesielt viktig for PCT for å påvise et eventuelt biokjemisk residiv slik at behandling kan igangsettes før pasienten får nye symptomer.

1.2.4 Prøveopparbeidelse

Det er vanlig med en form for prøveopparbeidelse før kromatografi metoder. Dette er fordi det kan være nødvendig og for eksempel oppkonsentrere eller fortynne prøvene, gjøre de kompatibel med videre analyse eller fjerne interferenser fra prøvematerialer. Det finnes mange ulike metoder for prøveopparbeidelse som benyttes, som for eksempel enkel fortynning, proteinfelling og væske-væske ekstraksjon. Fast-fase ekstraksjon, som er metoden som blir brukt i rutine ved MBF ved analyse av porfyriner, er et annet eksempel.

Fast-fase ekstraksjon benyttes for å oppkonsentrere og rense prøver før analyse. Fast-fase ekstraksjon utføres ved at det først lages en prøveløsning som består av urin tilsatt i for eksempel buffer/syre/intern standard. Etter dette utføres selve fast-fase ekstraksjonen vanligvis i fem trinn på en kolonne med vakuüm, se figur 2. Trinnene i fast-fase ekstraksjon er kondisjonering av kolonnen, rensing av kolonnen, tilsetting av prøveløsning (analyttene fester seg til kolonnen), vask av kolonnen og til slutt eluering av analyttene (Lundanes & Greibrokk, 2013, pp. 118-123).

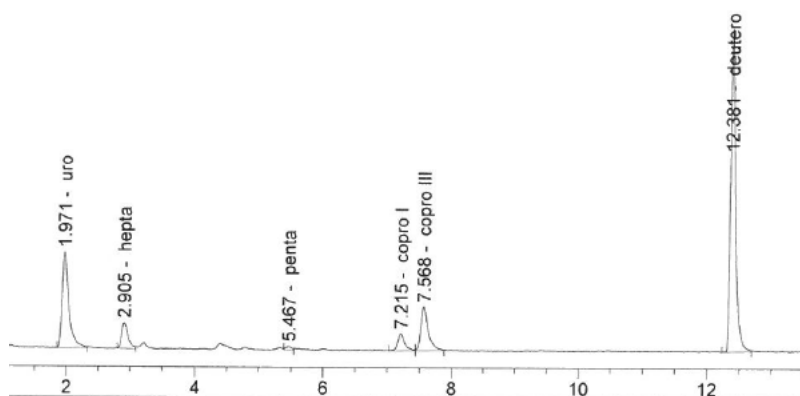


Figur 2: Utstyr brukt ved fast-fase ekstraksjon. SPE-kolonnene (med blå væske) står over vakuumkanteret. Oppsamlingsrørene settes inn i vakuumkanteret når analyttene skal elueres ut (Phenomenex, 2020, mai 25).

1.2.5 Kromatografi

Innen kromatografi er RP-HPLC det mest brukte separasjonsprinsippet. Ved RP-HPLC separeres og detekteres analyttene ved blanding med en polar mobilfase som føres gjennom en stasjonærfase kolonne. Molekyler med høy hydrofobisitet adsorberes sterkere til kolonnen og eluerer ut saktere enn mer hydrofile molekyl. Den polare mobilfasen består av vandige og organiske løsninger som acetonitril, metanol, tetrahydrofuran, ofte i kombinasjon med buffere eller syrer for pH-kontroll. Den stasjonære fasen (kolonnen) er hydrofobisk, ikke polar ofte med silika som adsorbsjonsmateriale. (Grethe Wibetoe & Store norske leksikon, 2018, 20 februar; Lundanes & Greibrokk, 2013)

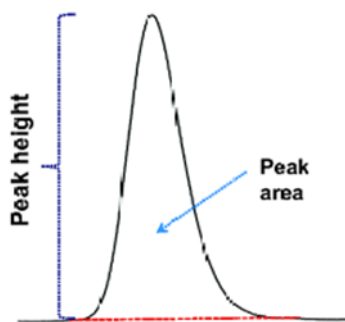
Analyse med alle typer kromatografiske metoder kan utføres ved enten isokratisk eluering eller gradient eluering. Ved isokratisk eluering er mobilfasesammensetningen konstant, og den endres ikke i løpet av analysen. Ved gradient eluering endres derimot mobilfasesammensetningen etter et fast oppsett. Her vil pH-endringer i mobilfasen som oppstår på grunn av endringer i mobilfasesammensetningen kunne påvirke selektiviteten til enkelte analytter. (Lundanes & Greibrokk, 2013, pp. 11-12)



Figur 3: Kromatogram fra analyse av urinporfyriner med fast-fase ekstraksjon analysert med RP-HPLC på Agilent 1100.

HPLC systemer har vanligvis en øvre trykkgrense på 400 bar, mens nyere instrumenter som ultra high performance liquid chromatography-systemer (UHPLC) kan ha øvre trykkgrense over 1200 bar. På UHPLC instrumenter kan det brukes kolonner med mindre partikkelstørrelse og høyere flow hastighet, og det gir høyere systemtrykk. Kolonner med mindre partikkelstørrelse kan gi mer sensitiv eller raskere kromatografisk analyse mens høyere flow hastighet vil føre til en raskere kromatografisk analyse.

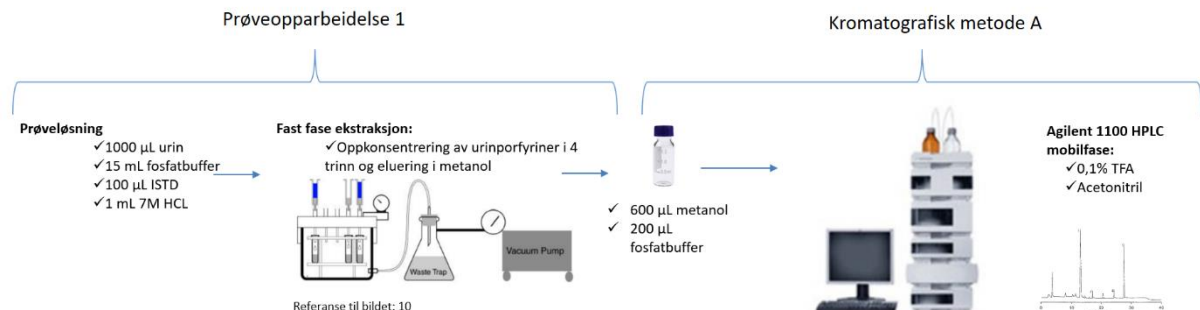
Kalibrering og konsentrasjonsbestemmelse av kromatografiske metoder kan utføres ved bruk av en ekstern kalibrator og eventuelt en internstandard. Den eksterne kalibratoren er en løsning med kjent konsentrasjon av analytter. Ekstern kalibrering utføres ved en sammenligning av signal fra detektoren i prøvene mot signalet fra detektoren i kalibratoren.



Figur 4: Signal fra detektor forklar tom Areal og topphøyde fra kromatografisk analyse. Kromaogram vises med tid (min) bortover baselinjen og signal fra detektor oppover (Lundanes & Greibrokk, 2013, p. 137).

Internstandarden er en løsning med en analytt som har tilsvarende egenskaper som analyttene som skal analyseres, men det bør også være et stoff som ikke er naturlig tilstede i en prøve. Internstandarden tilsettes i lik konsentrasjon i alle prøvene, også i den eksterne kalibratoren. Hvilken metode for prøveopparbeidelse som brukes avgjør om internstandard inkluderes i metoden. Siden utførelsen av fast-fase ekstraksjon går over mange trinn, og internstandard kan kompensere for variasjon og eventuelt tap av analytt i prøveopparbeidelsen, er det vanlig å bruke internstandard i fast-fase ekstraksjon. (Lundanes & Greibrokk, 2013, pp. 121-122)

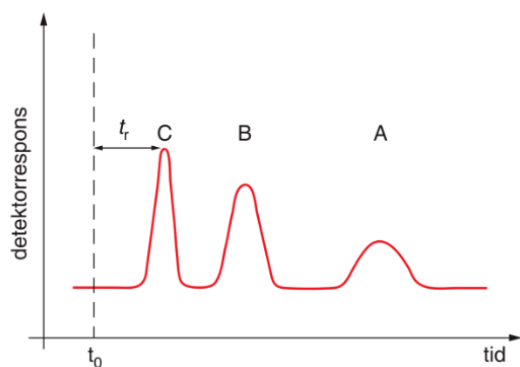
Deteksjon av analyttene kan utføres ved hjelp av for eksempel UV, fluorescens, refraktiv indeks eller massespektrometri-detektorer. Siden porfyriner fluoriserer, er det vanlig å detektere analyttene ved hjelp av fluorescens. (Lundanes & Greibrokk, 2013, pp. 10-18)



Figur 5: Oversikt over dagens rutiner ved analyse av porfyriner i urin. Analyse ved fast-fase ekstraksjon og omvendt fase kromatografi med fluorescensdetektor på Agilent 1100. Analysen benyttes til konsentrasjonsbestemmelse av urinporfyrinene uro-, hepta-, heksa-, penta-, kopro- I og koproporfyrin III.

1.2.6 Begreper knyttet til kromatografi

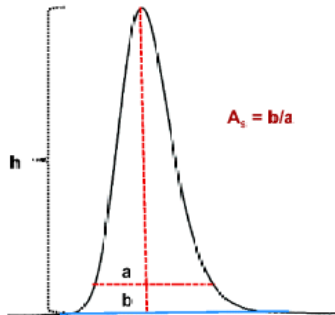
Retensjonstiden hvor lenge et stoff retenderes, det vil si at den angir tiden fra en prøve injiseres i HPLC-systemet og til analytten detekteres av detektoren (Figur 5). Et stoff som interagerer mer med den stasjonære fasen i kolonnen vil ha lengre retensjonstid enn et stoff som interagerer mindre med den stasjonære fasen. (Grethe Wibetoe & Store norske leksikon, 2018, 20 februar)



Figur 5: Kromatogram hvor retensjonstid for eksempel stoff C måles i tid (min) fra injeksjon til høyeste punkt av toppen (Grethe Wibetoe & Store norske leksikon, 2018, 20 februar)

Toppformen til analyttene ved kromatografianalyse vurderes ved symmetri. «Peak fronting» betegner asymmetriske topper, hvor første halvdel av toppen er bredest sammenlignet med siste halvdel. Når siste halvdel av toppen er bredest, brukes begrepet «peak tailing» (Lundanes & Greibrokk, 2013, p. 17). Smalere toppbredde gjør det lettere for instrumentet å separere to ulike topper med lignende interaksjoner med systemet. Det kan

være flere årsaker til at det oppstår asymmetriske topper, som for eksempel sterke interaksjoner, for høyt nivå av analytt, dårlig prøve- og løsemiddel kompatibilitet eller dårlig pakking av kolonner.



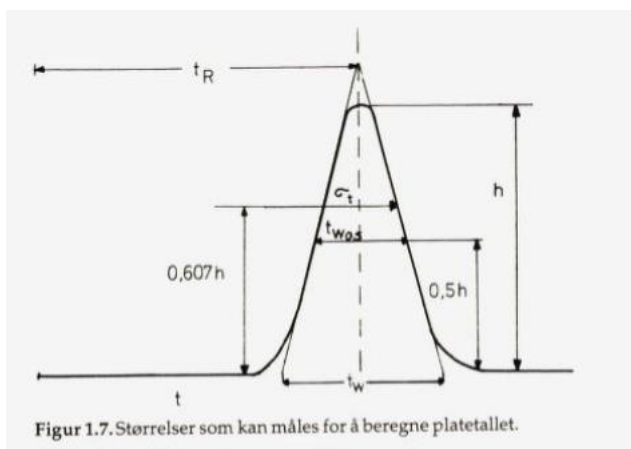
Figur 6: Toppform (Lundanes, Raubsæet, & Greibrokk, 2013)

Resolusjon angir hvor god separasjon det er mellom to analytter, og begrepet blir gjerne definert som graden av separasjon mellom to topper. Når resolusjonen (R_s) er 1,5 er det grunnlinjeseparasjon mellom to topper. Resolusjon kan regnes ut med formelen:

$$R_s = \frac{1}{4}(\alpha - 1)\sqrt{N} \frac{k}{(1 + k)}$$

Figur 7: Formel for resolusjon (Lundanes & Greibrokk, 2013)

Selektivitet (α) eller separasjonsfaktoren viser hvor godt en analytt er retendert i forhold til et annet. N i formelen referer til platetallet eller effektiviteten mens retensjonsfaktoren (k) kan defineres som ratioen av tiden en analytt er i stasjonærfasen mot tiden analytten er i mobilfasen (Greibrokk, 1994; Lundanes & Greibrokk, 2013).



Figur 1.7. Størrelser som kan måles for å beregne platetallet.

Målinger	Beregning av N
t_R og σ_t	$N = (\frac{t_R}{\sigma_t})^2$
t_R og bredden ved basislinjen t_w ($t_w = 4\sigma_t$)	$N = 16(\frac{t_R}{t_w})^2$
t_R og bredden ved halve høyden $t_{w0,5}$	$N = 5,54(\frac{t_R}{t_{w0,5}})^2$
t_R og bredden ved 4,4% av høyden ($w = 5\sigma_t$)	$N = 25(\frac{t_R}{t_{w4,4\%}})^2$

Figur 8: Oversikt over utregning av platetall (N) (Greibrokk, 1994)

1.3 Gjennomgang av publiserte metoder for analyse av porfyriner i urin

Det er publisert flere artikler som beskriver ulike metoder for prøveopparbeidelse av porfyriner i urin før analyse med RP-HPLC. Beskrivelsene inkluderer en metode for analyse av porfyriner i urin for analyttene uro-, hepta-, heksa-, penta- og koproporfyrin (Johnson, Perkins, & Kennedy, 1988). Johnson, Perkins & Kennedy 1988 konkluderer med at metoden separerte porfyrinene og hadde god nok analysekvalitet til å være en kvantitativ analyse for porfyriner i urin. Metoden benytter en enkel prøveopparbeidelse med kun fortynning av urinen med HCl. Det blir beskrevet flere metoder som benytter enkle prøveopparbeidelser (Clavero et al., 2010; Danton & Lim, 2006) .I en artikkel ble prøvematerialet fortynnet med saltsyre (Danton & Lim, 2006) og i en annen artikkel beskriver prøveopparbeidelse ved fortynning av plasma og urin med trikloreddisyre/dimetylsulfoksid (Clavero et al., 2010) .

Ved analyse av porfyriner i urin er det viktig både å skille mellom de diagnostisk viktige porfyrinene, samt mellom koproporfyrin-isomer I og koproporfyrin-isomer III, da forholdet mellom disse er en viktig diagnostisk markør. Den eldste av de beskrevne metodene (Gorchein et al., 1998) skiller ikke mellom disse porfyrin-isomerene. I en annen artikkel (Benton, Lim, Ritchie, Moniz, & Jones, 2012) beskrives metodeutvikling for separasjon av porfyriner i urin, der opparbeidelsen utføres ved hjelp av fast-fase ekstraksjon og analyse med RP-HPLC, gradient eluering med 10 % (v/v) acetonitril i 1 M ammoniumacetat-eddiksyre buffer (pH 5,16) og 10% (v/v) acetonitril i metanol. Instrumentet beskrevet her kan utføre analyse ved høyere trykk enn konvensjonell HPLC, og utvalgte kvalitetsparametere som resolusjon (eller oppløsningsevnen til analyttene), analysetid og deteksjonsgrense blir forbedret i forhold konvensjonell HPLC. Metoden skiller mellom I- og III-isomer.

Kromatografiske metoder med tilsvarende mobilfaser er også beskrevet (Macours & Cotton, 2006).

Endring i prøveopparbeidelse for urinprøver fra fast-fase ekstraksjon til en fortynning med saltsyre eller trikloreddisyre/dimetylsulfoksid vil forenkle og forkorte prøveopparbeidelsen.

Det er ikke funnet studier som beskriver en sammenligning av ulike metoder for opparbeidelse som er i bruk ved analysing av porfyriner i urin.

1.4 Oversikt over betegnelser for metoder benyttet i oppgaven

I den videre redegjørelsen vil metoder for prøveopparbeidelse og kromatografi i bruk i dag ved MBF bli omtalt som *Prøveopparbeidelse 1* og *Kromatografisk metode A*. Kombinasjonen av disse vil bli referert til som *standardoppsettmetode*. Metodene som har blitt undersøkt i oppgaven blir omtalt som *Prøveopparbeidelse 2*, *Prøveopparbeidelse 3* og *Kromatografisk metode B*. Se nærmere beskrivelse i *Tabell III*.

Tabell III: Oversikt over betegnelser for metoder brukt i studien.

Begrep	Beskrivelse
Prøveopparbeidelse 1	Fast-fase ekstraksjon
Prøveopparbeidelse 2	Urin tilsatt trikloreddiksyre/dimetylsulfoksid (10)
Prøveopparbeidelse 3	Urin tilsatt saltsyre (1)
Kromatografisk metode A	0,1% trifluoreddiksyre i vann og acetonitril mobilfase, Zorbax Eclipse XDB, 1,8 µm, 4,6x50 mm, C18 kolonne
Kromatografisk metode B	1,0 M ammoniumacetat og metanol mobilfase (11) Zorbax Eclipse XDB, 1,8 µm, 4,6x50 mm, C18 kolonne
Standardoppsettmetode	Prøveopparbeidelse 1 fulgt av kromatografisk metode A

2 Hensikt og problemstilling(er)

2.1 Hensikt

Porfyriner i urin er en viktig analyse for diagnostikk og monitorering av porfyrisykdommer, spesielt PCT. Dagens rutinemetode i bruk ved MBF har mange trinn, og på grunn av utstyret som brukes i fast-fase ekstraksjonen er antall prøver som opparbeides på en gang begrenset til 12. Fast-fase ekstraksjon egner seg av den grunn ikke til analyse av lange prøveserier.

Hensikten med denne studien er å se om endring i prøveopparbeidelse og kromatografisk metode kan føre til enklere prøveopparbeidelse samtidig som det oppnås analyseresultater av god nok kvalitet. To forskjellige tilnærminger for prøveopparbeidelse vil bli undersøkt; prøveopparbeidelse 2 hvor urinprøvene tilsettes trikloreddiksyre/dimetylsulfoksid (Clavero et al., 2010) og prøveopparbeidelse 3 hvor prøvene tilsettes saltsyre (Danton & Lim, 2006). Resultatene vil bli sammenlignet mot prøveopparbeidelse 1, det vil si fast-fase ekstraksjon.

Videre vil det bli undersøkt om kromatografisk metode B (Macours & Cotton, 2006) med ammoniumacetat/metanol mobilfase gir samme måleresultat og metodeytelse som kromatografisk metode A med trifluoroeddiksyre/acetonitril mobilfase.

2.2 Problemstillinger

Følgende problemstillinger belyses i oppgaven:

1. Vil prøveopparbeidelse 1, prøveopparbeidelse 2 og/eller prøveopparbeidelse 3 gi ulik konsentrasjon og metodeytelse når analysert med kromatografisk metode A?
2. Vil prøveopparbeidelse 2 og/eller prøveopparbeidelse 3 gi ulik konsentrasjon og metodeytelse for porfyriner i urin når analysert med kromatografisk analysemetode B sammenlignet med standardoppsettmetoden?
2. Vil prøveopparbeidelse 2 og/eller prøveopparbeidelse 3 gi mulighet for kvantifisering og separasjon av flere porfyrin-isomerer når analysert med kromatografisk metode B, sammenlignet med standardoppsettmetoden?

3 Metode

3.1 Studiedesign/analyseoppsett

Studien beskrives som metodesammenligningsstudie hvor nye metoder testes opp mot en etablert metode. I studier som denne sammenlignes resultater fra samme analytter utført med ulike analysemetoder ved for eksempel Bland-Altman plott og Passing-Bablok regresjon (Baumdicker & Hölker, 2020; Bland & Altman, 2010; Hanneman, 2008).

3.2 Utvalg

Inklusjonskriteriene for prøver i studien var at de var sendt til utredning eller kontroll av kjent kutan porfyrisykdom, at totalporfyriner var over 15 nmol/mmol kreatinin ved analyse med screeningmetode og at det var prøvemateriale i igjen frys ved MBF etter at rutineanalysene hadde blitt utført. Prøver hvor det ikke var nok materiale til å utføre alle metodene fra samme prøverør ble ekskludert.

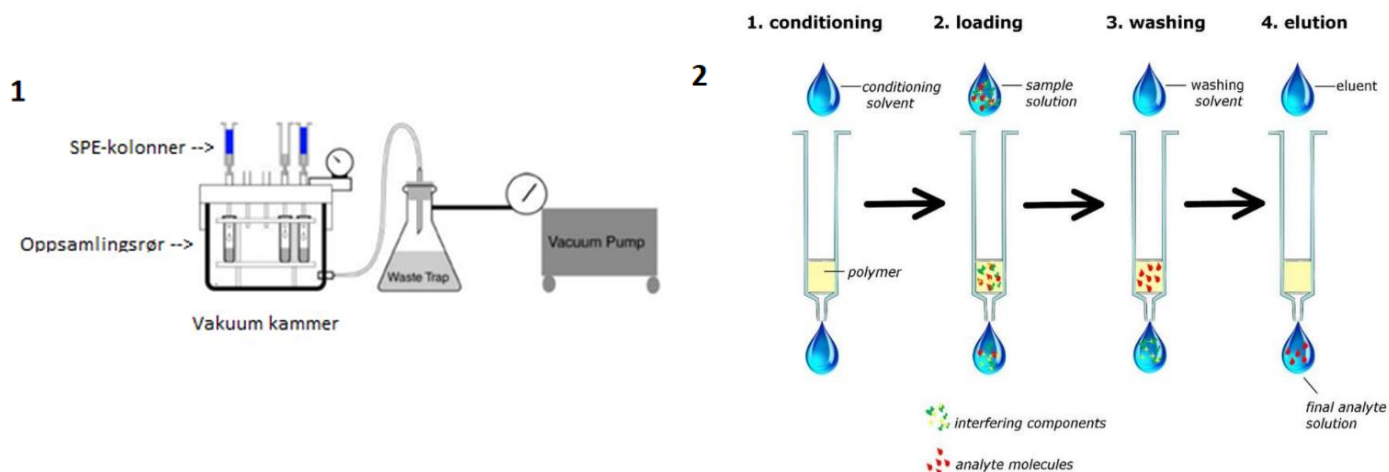
Kjemikalier brukt i oppgaven, i tillegg til enkelte reagenser (inkludert buffere og mobilfaser), er beskrevet i appendiks (vedlegg 5).

3.3 Prøveopparbeidelse brukt ved metodesammenligning

3.3.1 Prøveopparbeidelse 1

Rutineanalyse av porfyriner i urin (uro-, hepta-, hekso-, penta-, koproporfyrin I og koproporfyrin III) ved MBF utføres ved opparbeidelse med fast-fase ekstraksjon (prøveopparbeidelse 1). En prøveløsning hvor følgende reagenser/prøvemateriale ble blandet ble laget og benyttet i selve fast-fase-ekstrasjonen:

- 1 mL urin fra enten pasientprøve, kontroll eller kalibrator
- 1 mL 7 M HCl
- 15 mL 0,1 M fosfatbuffer
- 100 µL internstandard fortykning 1:10 (deuteroporfyrin IX)



Figur 9: Oversikt over utstyr til fast-fase ekstraksjon merket 1 (Phenomenex, 2020, mai 25) og illustrasjon av trinnene i fast-fase ekstraksjon merket 2 (Sandoval R, 2017)

Selve fast-fase ekstraksjonen foregikk i fire trinn under vakuüm (se Figur 10):

1. Kondisjonering (forbereding) av SPE-kolonne:

- Vask av SPE-kolonne med 4 mL metanol
- Vask av SPE-kolonne med 4 mL 0,1 M fosfatbuffer (pH 5.16)

2. Tilsetting av prøveløsning til SPE-kolonne (se tillaging over)

3. Vask av SPE-kolonne for å fjerne upolar interferens fra urinprøven med 2 mL fosfatbuffer

4. Eluering av porfyriner fra fast-fase kolonnen:

- et rør ble satt under hver SPE-kolonne
- 1 mL metanol ble tilsatt SPE-kolonnen

600 µL av løsningen fra røret i trinn 4 ble blandet med 200 µL fosfatbuffer og analysert med RP-HPLC.

3.3.2 Prøveopparbeidelse 2

Denne opparbeidelsesmetoden innebærer en fortykning av urin med trikloreddiksyre og dimetylsulfoksid (Clavero et al., 2010). Siden metoden ikke inneholder mange trinn, og det er liten mulighet for tap av analytt i prøveopparbeidelse, ble det ikke inkludert internstandard i oppsettet. Opparbeidelsen ble utført ved at urin ble blandet i forholdet 1:1 med en løsning som består av 1:1 av 20% trikloreddiksyre: dimetylsulfoksid. Prøvene ble så sentrifugert i 3 minutter ved 10 000 g, og supernatanten analysert på HPLC.

3.3.3 Prøveopparbeidelse 3

Prøveopparbeidelse 3 innebærer tilsetning av saltsyre til urin (Danton & Lim, 2006). Av samme grunn som for prøveopparbeidelse 2 ble det valgt å ikke inkludere internstandard i denne metoden. Opparbeidelsen ble utført ved at 1 mL urin fra pasientprøve/kontroll/kalibrator ble tilsatt 40 µL konsentrert saltsyre. Prøvene ble sentrifugert i 10 minutter ved 10 000 g og supernatant analysert på HPLC.

3.4 Beskrivelse av kromatografisk metode

3.4.1 Kromatografisk metode A

Denne metoden benyttet Agilent 1100-system med fluorescensdetektor. Dette er instrumentet som er i rutinebruk ved analysering av porfyriner urin ved MBF. Mobilfasen for metoden var 0,1 % trifluoreddiksyre i vann og acetonitril, og kolonnen som ble brukt var Zorbax Eclipse XDB, C18, 1,8 µm. Analysen hadde gradient eluering med endring i mobilfase sammensetningen (se Tabell IV). Flow var 1 ml/min. Tabellen viser hvordan den prosentvise sammensetningen av mobilfasen endres over tid med en flow på 1 ml/min.

Tabell IV: Gradientbetingelser for kromatografisk analysemetode A.

Tid/min	0,1 % trifluoreddiksyre (%)	Acetonitril (%)
0.00	74,0	26,0
7.30	62,2	33,8
11.70	41,4	58,6
14.80	0	100
15.50	0	100
16.00	74,0 %	26,0
18.8	74,0 %	26,0

3.4.2 Kromatografisk metode B

Kromatografisk metode B benyttet et Agilent 1200-system, som har øvre trykkgrense på 400 bar. Mobilfasen bestod av 1,0 M ammoniumacetat-buffer (pH 5,16) og metanol med kolonnen Zorbax Eclipse XDB, C18, 1,8 µm. Analysen hadde gradient eluering (se Tabell V) med endring i mobilfase sammensetningen. Flow var 1 ml/min. Tabellen viser hvordan den prosentvise sammensetningen av mobilfasen endres over tid med flow på 1 ml/min (Gorchein et al., 1998; Macours & Cotton, 2006)

Tabell V: Gradientbetingelser for kromatografisk analysemetode B

Tid/min	1,0 M Ammoniumacetat buffer i vann (pH 5,16) (%)	Metanol (%)
0	80,0	20,0
7.0	63,4	36,6
16.5	25,4	74,6
16.6	10,0	90,0
21.5	10,0	90,0
22.0	80,0	20,0
25.0	80,0	20,0

Analysen ble satt opp med nålvask hvor nålen skylles i en vial med 1:1 H₂O:(1:1 20 % trikloreddiksyre : dimetylsulfoksid). I tillegg ble analysen satt opp med systemvask hvor 100 µL 1:1 acetonitril: 1M saltsyre ble injisert to ganger for hver prøve/kontroll/kalibrator som

injiseres. Metoden er en tilpasning av en kromatografisk metode brukt ved analyse av porfyriner i plasma ved MBF.

3.4.2.1 Valg av mobilfase

Uttesting av mobilfase som inneholdt 10% acetonitril ga lavere trykk ved analysering på HPLC (Gorchein et al., 1998). Kolonnen som ble brukt i oppgaven har en anbefalt øvre trykkgrense på 400 bar, og analyse med mobilfase uten acetonitril ga trykk lavere enn dette. Uttesting ble derfor utført uten acetonitril da dette fører til at mobilfase er enklere å lage.

3.4.3 Detektorinnstillinger for kromatografi

Innstillinger for fluorescensdetektoren var de samme for kromatografisk metode A og kromatografisk metode B med eksitasjon 403 nm og emisjon 618 nm.

3.4.4 Kolonne

Samme kolonne ble brukt til analyse med kromatografisk metode A og kromatografisk metode B. Zorbax Eclipse XDB, 1,8 μm , 4,6x50 mm, C18 kolonnen har optimalt pH-område 6-9, men kan også brukes ved lavere pH-verdier. Den anbefales brukt med trykk under 400 bar.

Forkolonnen Agilent Eclipse XDB C18 guard, 5 x 4.6 mm, 1.8 μm brukes i kombinasjon med kolonnen ved analyse med kromatografisk metode A. 1,0 M ammoniumacetat buffer (pH 5,16) og metanol mobilfase gir et høyere trykk enn ved analyse med 0,1 % trifluoreddiksyre i vann og acetonitril. Bruk av forkolonne bidrar til trykkøkning, og det er derfor valgt å ikke inkludere forkolonnen ved kromatografisk metode B.

3.5 Kalibrator, internstandard og kontroll

3.5.1 Internstandard

Internstandard ble laget ved at deuteroporfyrin IX dihydroklorid ble løst i noen dråper 1,0 M NaOH i et begerglass. Denne løsningen ble så fortynnet med 0,01 M NaOH til en konsentrasjon på ca. 400 $\mu\text{mol/L}$. Konsentrasjonen til stockløsningen ble bestemt ved fortynning 1:251 i 0,1 HCl og scanning på Cary 100 UV/VIS-spektrofotometer og justert til 40 $\mu\text{mol/L}$ med 0,01 M NaOH. Før hver analysering ble det laget en bruksløsning (heretter

omtalt som internstandard) ved å fortynne stockløsningen 1:10 med 7,0 M HCl i et lysbeskyttet rør.

3.5.2 Ekstern kalibrator (markør)

Porphyrin Acids Chromatographic Marker Kit (Frontier Scientific, CMK-1A) inneholder uroporfyrin I, heptaporfyrin I, heksaporfyrin I, pentaporfyrin I, koproporfyrin I og mesoporfyrin I som tørrstoff i konsentrasjon på 10 \pm 1 nmol. Tørrstoffet ble løst opp i 0,5 mL av 3,0 M HCl og denne løsningen brukt til å lage en markørbruksløsning, heretter omtalt bare som markør. Markøren brukes ved kalibrering av standardoppsettmetoden.

Markøren ble laget på følgende måte:

- 3 mL metanol og 1 mL 0,1 M fosfatbuffer ble tilsatt
- 25 μ L av oppløst «Porphyrin Acids Chromatographic Marker Kit».
- 25 μ L protoporfyrin stock (løst i DMF) og
- 40 μ L internstandard (deuteroporfyrin 40 μ M løst i 0,01 M NaOH).

Markør lages på nytt for hvert prøveoppsett.

3.5.3 Urinkalibrator

For å lage urinkalibrator ble en urinprøve tilsatt stockløsninger. For å lage stockløsningene veide vi inn 1,0 mg tørrstoff i eppendorf mikrosentrifuge tube. Løsningene ble løst opp i 1 mL 0,05 M kaliumhydroksid (KOH) og deretter tilsatt 2 mL 0,05 KOH. Konsentrasjonen til stockløsningene ble så bestemt ved fortynning 1:201 i 0,5 M HCl og scanning på Cary 100 spektrofotometer og justert til omtrent 200 μ M. Ekstinksjonskoeffisient brukt til utregningene finnes i appendiks.

For hepta-, hekso- og pentaporfyrin oppgis ikke noen renhet for tørrstoffene. Selv om renheten til porfyrinene oppgis for de andre tørrstoffene, ble renheten til alle porfyrin tørrstoffene testet. Renhetsbestemmelse ble utført med både fluorescens- og UV/VIS-detektor. Agilent 1100 HPLC instrumentet var satt opp med metanol og 1,0 M ammoniumacetat-buffer (pH= 5,16) som mobilfaser og gradient eluering. Stockløsningene var fortynnet med 1:1 H₂O :(1:1 20 % TCA:DMSO) før injeksjon på HPLC-en og for å unngå carry-over ble de brukt nålvask, systemvask og to blankprøver ble injisert mellom hver

stockløsning. Det ble laget en løsning for hvert porfyrin. Renhet av de ulike stockløsningene ble bestemt ved å beregne prosentandel av andre aktuelle porfyriner i stockløsningen. Ut ifra dette ble det regnet ut en renhetsgrad for hver av stockløsningene. Konsentrasjonen til stockløsningene ble så regnet ut i forhold til renhetsgraden. For konsentrasjon og renhet til stockløsningene se appendiks.

Urinkalibratoren ble laget ved å tilsette stockløsninger av uroporfyrin I, uroporfyrin III, heptaporfyrin I, heksaporfyrin I, pentaporfyrin I, koproporfyrin I og koproporfyrin III til en urinprøve med lavt nivå av porfyriner. Ved konsentrasjonsbestemmelse av urinkalibratoren ble det nødvendig å ta høyde for at noen av stockløsningene inneholder flere porfyriner og ikke er helt rene. For eksempel for stockløsning av uroporfyrin I er både uroporfyrin I og uroporfyrin III tilstede i stockløsningen. Konsentrasjonen av porfyriner i urinkalibratoren er dermed en kombinasjon av tilsatt mengde av porfyriner fra stockløsningene, renhetsgrad (se appendiks) i tillegg til opprinnelig konsentrasjon av porfyriner i urinprøven.

3.5.4 Intern kvalitetskontroll

Intern kvalitetskontroll brukt i denne studien ble laget ved at en urinprøve ble spiket med heksaporfyrin I, pentaporfyrin I, koproporfyrin III og protoporfyrin IX stockløsninger. Kontrollen inneholdt uroporfyrin I, uroporfyrin III, heptaporfyrin I, heptaporfyrin III, heksaporfyrin I, pentaporfyrin I, koproporfyrin I, koproporfyrin III og protoporfyrin IX.

3.5.5 Kalibrering

Kalibrering av standardoppsettmetoden utføres ved hjelp av intern standard og ekstern kalibrator. Internstandarden deuteroporfyrin IX tilsettes i alle prøvene og i markør. Kalibrering foregikk ved at en respons faktor ble regnet ut fra kalibratoren. For å få responsfaktoren (Figur 10) ble en konsentrasjonsratio beregnet fra konsentrasjonen til analytten delt på konsentrasjonen til internstandard og en areal ratio ble beregnet ved at arealet til analytten ble delt på arealet til internstandard. Respons ratioen regnes ut i prøvene som skal konsentrasjonsbestemmes ved å dele arealet til analytten i prøven på arealet til internstandard i prøven. Konsentrasjonen blir beregnet ved å multiplisere respons faktoren med respons ratioen og med konsentrasjonen til internstandard.

Konsentrasjon av internstandard settes som regel til 1 da den skal være lik i alle prøver og kalibrator og utregningene ble utført på følgende måte:

$$\text{Respons faktor kalibrator (RF)} = \frac{\text{konsentrasjon ratio}}{\text{Areal ratio}}$$

$$\text{Respons ratio} = \frac{\text{areal ukjent prøve}}{\text{areal ISTD i ukjent prøve}}$$

$$\text{Konsentrasjon ukjent prøve} = \text{RF} \times \text{respons ratio} \times \text{konsentrasjon av ISTD}$$

Figur 10: Oversikt over utregninger ved kalibrering med internstandard (Agilent Technologies usermanuals, 2004)

Resultater fra metodene som ble opparbeidet uten internstandard, det vil si prøveoppbeidelse 2 og prøveoppbeidelse 3, ble kalibrert med ekstern kalibrator. Arealet av toppene til de ulike porfyrinene i prøvene ble konsentrasjonsbestemt mot arealet av samme porfyrin i den eksterne kalibratoren med kjent konsentrasjon (Greibrokk, 1994, pp. 288-294)

3.6 Vurdering av korrelasjon og metodeytelse

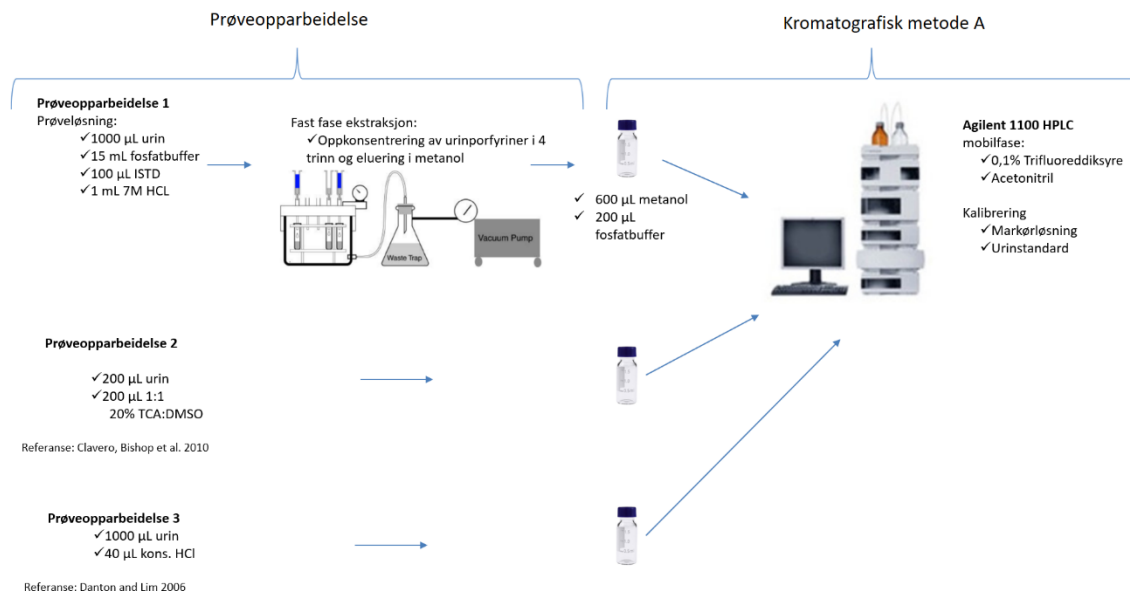
Ved kromatografiske metoder er det en rekke parametre som må undersøkes, for å kunne si noe om hvor egnet metoden er. I den videre redegjørelsen vil selektivitet, interferens, toppform, retensjonstid, sensitivitet, recovery, injeksjonsvolum, analysetid samt metodevalideringsparametere som linearitet, carry-over, stabilitet, presisjon, kvantifiseringsgrense og deteksjonsgrense omtales som metodeytelse. Se en detaljert gjennomgang av de forskjellige parametrene i punktene under. For mange av disse parametrene forelå det allerede data på dette for standardoppsettmetoden, og da er ikke nye undersøkelser utført.

3.6.1 Korrelasjon

Metodesammenligning for kromatografisk metode A ble utført ved at analyseresultatene for prøveoppbeidelse 2 og prøveoppbeidelse 3 ble sammenlignet med resultater fra standardoppsettmetode. Ved rutineanalyse rapporteres det ut resultat for totalporfyriner i urin ved at alle porfyrinene summeres. Det ble derfor valgt å se på denne verdien i korrelasjonen.

Beskrivelse av oppsett for metodesammenligning for kromatografisk metode A:

1. Korrelasjon og metodeytelse for prøveoppbeidelse 2 og 3 analysert med kromatografisk metode A ble sammenlignet med standardoppsettmetoden på følgende måte (se figur 8):
 - a. Prøvene ble kalibrert med både urinkalibrator og markør.
 - b. Konsentrasjon, selektivitet, interferens og toppform ble sammenlignet.



Figur 11: Oversikt over oppsett for prøveoppbeidelse med kromatografisk metode A.

Prøveoppbeidelse 1 er ikke kompatibel med kromatografisk metode B, og den ble derfor ikke analysert med denne. Prøvene som er analysert med kromatografisk metode B ble sammenlignet med standardoppsettmetoden. Mønsteret av porfyriner i prøven sees på ved at prosentvis fordeling av de ulike porfyrinene i sammenlignes med kromatografi metode B.

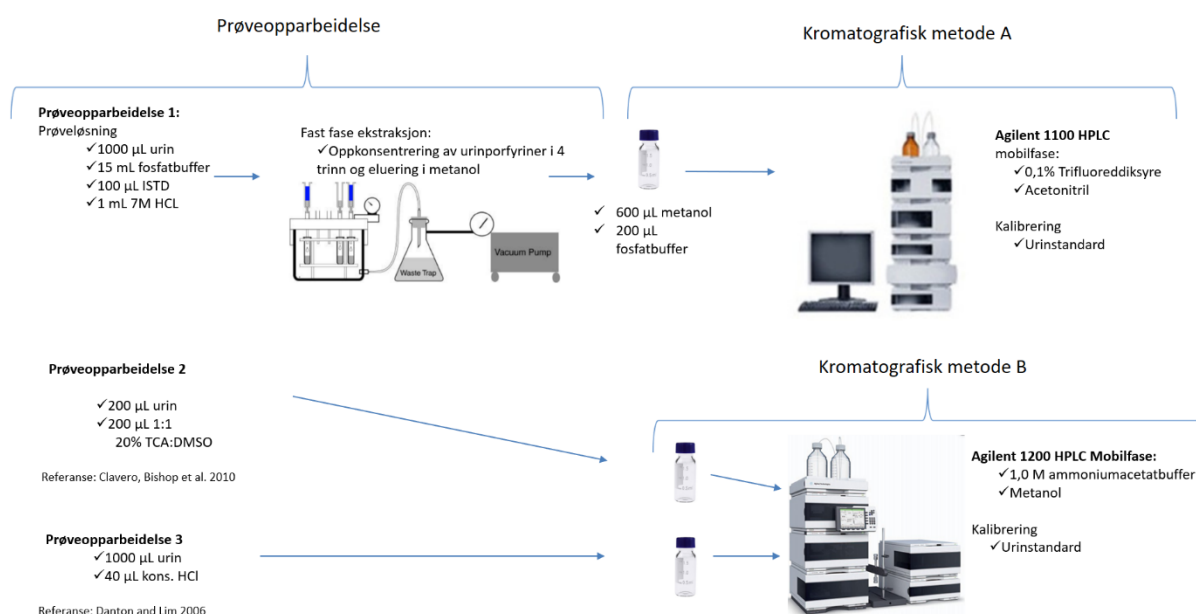
Beskrivelse av oppsett for metodesammenligning for kromatografisk metode B (se figur 9):

- a. Prøveoppbeidelse 1 ble analysert med kromatografisk analysemetode A
- b. Prøveoppbeidelse 2 og prøveoppbeidelse 3 ble analysert med kromatografisk analysemetode B

- c. Alle metodene ble kalibrert med urinkalibrator
- d. Konsentrasjon og metodeytelse for begge kromatografiske analysemetoder ble sammenlignet.
- e. Separasjon av porfyrin-isomerer og mulighet for kvantifisering av isomerene for kromatografisk metode B ble vurdert

Metodeytelse ble undersøkt for kromatografisk analysemetode B. For å teste analysekvalitet ble det utført linearitetsforsøk, og riktighet ble testet ved at konsentrasjon av porfyriner i urin ble korrelert/sammenlignet med standardoppsettmetoden. Presisjon ved måling av standardavvik og variasjonskoeffisient ble utført for prøveoppbeidelse 3.

Vurdering og godkjenning av analyseseriene ble gjort ved vurdering av areal til urinkalibrator, kontrollverdier ble etablert og kontroll vurdert opp mot disse. I tillegg ble retensjonstid vurdert både mot tidligere serier og for variasjon innen et analyseoppsett.



Figur 12: Oversikt over oppsett for korrelasjon av kromatografisk metode A mot kromatografi metode B.

3.6.2 Selektivitet og interferens og toppform

Selektiviteten til de ulike porfyrin-isomerene er vurdert ved visuell bedømmelse av kromatogram for prøver i ulike konsentrasjonsnivå. Interferens ble undersøkt ved ved å se på toppbredde og symmetri til toppene. Ekstra topper er også undersøkt, og vurdering av toppform er utført ved visuell vurdering.

Siden laboratoriet bruker kolonnen i rutineanalyse var det tilgang på ulike batcher med kolonner, og det ble testet om separasjonen varierte fra kolonne-batch til batch ved å analysere de samme prøvene med samme reagenser og samme kromatografi metode på to ulike kolonne-batcher.

3.6.3 Retensjonstid

Retensjonstid for eluering av de ulike analyttene var allerede etablert for standardoppsettmetode. I denne oppgaven ble det vurdert om det var endringer i retensjonstid med bruk av prøveoppbehandling 2 og 3 fulgt av kromatografisk metode A.

Ved analyse av prøver med kromatografisk analysemetode B ble retensjonstiden til de ulike analyttene identifisert ved analyse av stockløsninger med ulike porfyriner. Kolonner fra to ulike lot-nummer ble undersøkt med tanke på retensjonstid og separasjon av porfyrin-isomerene.

3.6.4 Injeksjonsvolum og analysetid

Vurdering av injeksjonsvolum ble undersøkt ved å injisere synkende injeksjonsvolum for så å vurdere toppform og konsentrasjon for de ulike analyttene. Analysetid, inkludert tid brukt på oppbehandling og tid brukt på kromatografisk metode, ble også vurdert.

3.6.5 Linearitet

Lineariteten ble testet for analyttene uroporfyrin I, uroporfyrin III, heptaporfyrin I, heksaporfyrin I (trans/cis isomerer), pentaporfyrin I, koproporfyrin I og koproporfyrin III. For heptaporfyrin III ble ikke linearitet undersøkt i denne oppgaven, da det ikke finnes mulighet for å lage stockløsninger av analytten. Urinprøve tilsatt heptaporfyrin I bruktes isteden til å estimere linearitet. For å sjekke lineariteten ble urinprøver fra pasienter med lav konsentrasjon av porfyriner poollet, og en del av poolen så spiket slik at prøven hadde en høy konsentrasjon av alle porfyriner. Prøven med høyt nivå av porfyriner ble så fortynnet i 7 konsentrasjonsnivåer ved å tilsette økende volum av poolen av prøver med lav porfyrin konsentrasjon.

Vurderingen av linearitet ble utført ved å beregne stigningstall og skjæringspunkt fra målt areal og fortynning av de ulike analyttene. For å få kurvetilpasning ($y=ax+b$) er stigningstall og skjæringspunkt regnet ut ifra areal av analytt (y) og fortynning av prøven (x).

Regresjonslinjen som vi får da brukes til å regne ut teoretisk areal og kvadrert korrelasjonskoeffisient (R^2) (Bolann & Sandberg, 2003; Norsk Klinisk Kvalitetskontroll NKK, Februar 2002).

Linearitet ble vurdert separat for de tre ulike metodene for opparbeidelse på begge kromatografi metodene, og prøvene ble fortynnet ved lavere injeksjonsvolum dersom de var utenfor lineariteten. For noen få prøver ble ikke prøvene fortynnet, og da ble porfyrinene som gikk utenfor lineariteten og totalporfyrin ekskludert fra sammenligningen.

3.6.6 Carry-over

Carry-over for kromatografisk metode B ble undersøkt ved å analysere to blankprøver etter prøve med høy konsentrasjon av porfyriner hadde vært analysert. Blank prøvene ble vurdert for om de inneholdt porfyriner (European medicines agency & health, 2011, juli 21).

I et forsøk på å redusere carry-over ble undersøkelsen utført med nålvask og systemvask. Det er allerede undersøkt og funnet at det ikke er carry-over for kromatografisk metode A.

3.6.7 Stabilitet

Stabilitet for kromatografiske analysemetoder innebærer blant annet å undersøke holdbarhet for kontroll, kalibrator, standardløsninger, stockløsninger, mobilfaser, analytter etter opparbeidelse og stabilitet til retensjonstidene. Da prøveoppbeidelse 1 og kromatografisk metode A har vært i rutinebruk ved MBF er stabilitet tidligere undersøkt for de fleste av løsningene (se appendiks).

Stabilitet for kromatografisk analysemetode A med større endringer av pH i buffer er ikke undersøkt. Optimalisering av pH til ammoniumacetat-buffer er utført tidligere (Benton, Lim, Moniz, et al., 2012).

Stockløsninger av uroporfyrin I, uroporfyrin III, heptaporfyrin I, heksaporfyrin I, pentaporfyrin I, koproporfyrin I og koproporfyrin III ble konsentrasjonsbestemt på UV/VIS spektrofotometer ved tillaging og oppbevares i 2 år. Holdbarhet til disse stockløsningene er

sannsynligvis på 2 år. Holdbarhet ble vurdert ved at konsentrasjonen ble kontrollert på spektrofotometer hver 3-6 måned, samt ved visuell vurdering av toppform og areal til kalibrator (spiket med stockløsninger). Holdbarheten må testes videre for å bekreftes.

Stabilitet på instrumentet Agilent 1200 for kromatografisk metode B ble testet ved at kontroll, kalibrator og en urinprøve analyseres og areal ble plottet prosentvis i forhold til første injeksjon. Første injeksjon antas å inneholde 100 prosent. Stabilitet av retensjonstid ble vurdert i 5 ulike serier.

3.6.8 Kvantifiserings og deteksjonsgrense

Deteksjonsgrensen ble satt til konsentrasjonen ved 3 x signal-til-støy forhold.

Kvantifiseringsgrense ble satt til 10 x signal-til-støy forhold i kombinasjon med visuell vurdering av symmetri til toppene (Salvatore, 2013).

3.6.9 Presisjon

Intern kvalitetskontroll i urin ble tatt med i hver analyseserie og brukes til validering av analyseserien. Westgaard kvalitetskontrollregler 2_{2s} og 1_{3s} og Levey-Jennings plot satt opp med middelvei, +/- to standardavvik og +/- tre standardavvik ble brukt i vurderingen av intern kvalitetskontroll. Med kontrollregelen 2_{2s} underkjennes en analyseserie dersom intern kvalitetskontroll går utenfor 2 standardavvik to ganger på rad, mens 1_{3s} kontrollregel brytes når intern kvalitetskontroll går utenfor 3 standardavvik (Westgard QC, n.d.). Utover dette ble presisjon vurdert ved standardavvik og variasjonskoeffisient. Den praktiske utførelsen ble utført i duplikat i tre nivå over 5 dager for prøveoppbeidelse 3.

3.7 Statistiske tester

For analyse av data ble statistikkprogrammene «Analyse it» og IBM SPSS® Statistics (SPSS) benyttet. Korrelasjon mellom metoder kan testes på ulike måter. Parametriske metoder som paret t-test (student t-test) antar normalfordeling av variablene, mens ikke-parametriske metoder som Passing-Bablok regresjon ikke har samme antagelse. For å beslutte hvilken test som skulle bli brukt for å se på korrelasjonen mellom metodene ble variablene

(differansene) derfor vurdert i forhold til normalfordelingsplott i tillegg til Kolmogorov-Smirnov og Shapiro-Wilk tester for normalitet. For Shapiro-Wilk testen er nullhypotesen at variablene er normalfordelt. P-verdien ble vurdert mot et signifikansnivå på 0,05. Shapiro-Wilk testen er ikke-parametrisk, men er en vanlig test for å vurdere normalfordeling. Nullhypotesen for testen er at variablene er normalfordelt og signifikansnivået som er brukt er 0,05. Log-normal distribusjon hvor variablene er logaritme transformert kan brukes for å utføre parametriske metoder, men dette ble ikke testet (Miller & Miller, 2000). Utvalgte tester for metodevalidering eller metodeytelse er beskrevet tidligere (Norsk Klinisk Kvalitetskontroll NKK, Februar 2002).

3.8 Etske hensyn

Studien ble vurdert å være en kvalitetssikringsstudie, og mastergraden ble utført som en del av studien. Man planla i denne studien å bruke allerede innsendte urinprøver, og studien vil ikke påvirke rutineanalysering av porfyrinene og heller ikke medføre noen ekstra belastning for pasienten.

Det ble sendt en fremleggingsvurdering til REK med referansenummer 2018/2284, og hvor REK vurderte dette til å være en kvalitetssikringsstudie. Basert på denne vurderingen ble det søkt personvernombudet, og studien ble godkjent, med saksnummer 2019/8927. Biobank 3270 «Forbedring av prøveopparbeidelse for porfyranalyser, Helse Bergen, Haukeland Universitetssykehus, Avd. for medisinsk biokjemi og farmakologi (MBF)» ble opprettet i forkant av studieoppstart. Før studieoppstart ble det også opprettet plass til studien på kvalitetsserveren med eget område for koblingsnøkkel hvor rekvisisjonsnummer og løpenummer ble registrert. Urinprøvene som ble satt inn i biobanken ble aidentifisert og prøvene gitt løpenummer. Koblingslisten vil bli slettet etter studien er ferdig utført.

4 Resultater

Total sett ble 50 urinprøver inkludert i prosjektet. Det varierte mellom de forskjellige forsøkene hvor mange prøver som ble benyttet. Median totalporfyrin konsentrasjon når analysert med standardoppsettmetode med markør var 514 nmol/L med spredning fra 69 nmol/L til 3624 nmol/L. Prøvene kom i all hovedsak fra pasienter med kutan porfyridiagnose, vanligvis PCT, og hadde overvekt av uro- og heptaporfyriner forenlig med dette. Resultater under kvantifiseringsgrensen og over linearitet for de ulike porfyrinene ble ekskludert før beregninger.

4.1 Korrelasjon for kromatografisk metode A

I dette avsnittet sees det på korrelasjon for kromatografisk metode A. Først ble det vurdert om differansene var normalfordeling. Det ble så vurdert hvordan kalibrering med ulike kalibratorer innvirket på korrelasjonen.

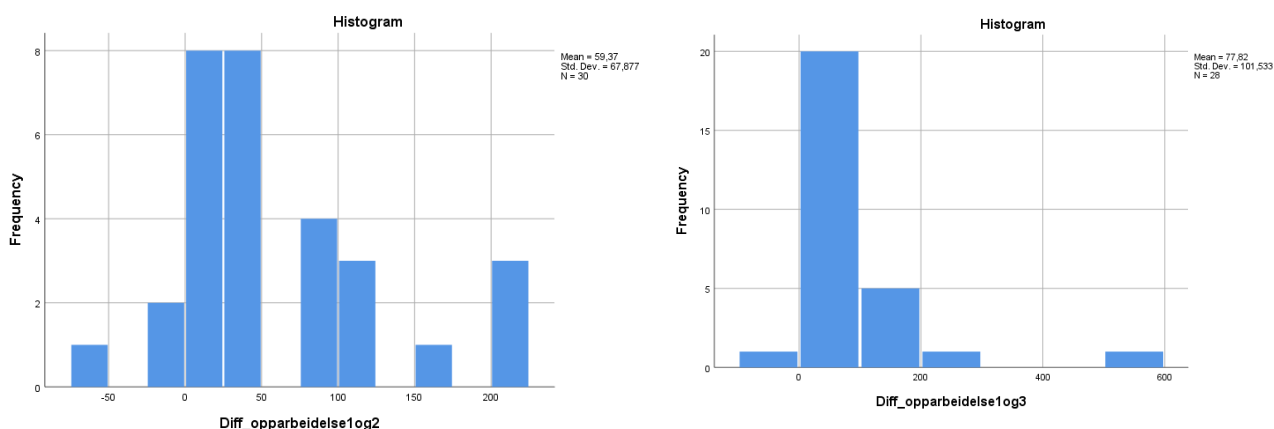
Det ble valgt å vurdere prøver kalibrert med markør ved først å se på normalfordeling for differansen av totalporfyrin (nmol/L) opparbeidet med standardoppsettmetoden og prøveoppbeidelse 2 eller 3. Dette var for å se om forutsetningen for parett-test for om at differansene må være tilnærmet normalfordelte var oppfylt. Nullhypotesen for Shapiro-Wilk testen var at utvalgene er normalfordelt. Testen viste for differansene mellom prøveoppbeidelse 1 og 2 et signifikansnivå under 0,05, noe som fører til at nullhypotesen forkastes. Det samme gjaldt for differansene mellom prøveoppbeidelse 1 og 3.

Kolmogorov-Smirov testen samt visuell vurdering av normalfordelingsplot støtter opp under vurderingen om at differansene ikke er tilnærmet normalfordelt (Tabell VI). Dette fører med seg at resultater fra en eventuell t-test kan vanskelig å tolke uten for eksempel log-transformering av dataene. Passing-Bablok regresjon som er ikke parametriske ble derfor benyttet til å vurdere korrelasjon mellom resultatene fra de to prøveoppbeidelsene.

Tabell VI: Test av normalitet for differanse av totalporfyrin (nmol/L) analysert med standardoppsettmetoden og prøveopparbeidelse 2 eller 3

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Diff_opparbeidelse1og2	,251	30	,000	,869	30	,002
Diff_opparbeidelse1og3	,218	28	,002	,683	28	,000

a. Lilliefors Significance Correction



Figur 13: Histogram av differansen av totalporfyrin (nmol/L) analysert med standardoppsettmetoden og prøveopparbeidelse 2 eller 3.

Gjennomsnitt av totalporfyrin for prøvene som ble kalibrert med markør var for prøveopparbeidelse 1 på 858 nmol/L, for prøveopparbeidelse 2 på 799 nmol/L og for prøveopparbeidelse 3 på 790 nmol/L. Forskjellen mellom prøveopparbeidelsene var mindre når medianen ble vurdert. For medianen var konsentrasjonen for prøveopparbeidelse 1, 2 og 3 var henholdsvis 514 nmol/L, 486 nmol/L og 487 nmol/L. Prøveantallet som var opparbeidet med de tre metodene var 30 for prøveopparbeidelse 1 og 2 og for prøveopparbeidelse 3 var antallet 28.

For å vurdere korrelasjon av prøver kalibrert med markør ble Passing-Bablok regresjon utført. Resultater for totalporfyriner (nmol/L) opparbeidet med opparbeidelse 2 og opparbeidelse 3 ble sammenlignet med resultater fra standardoppsettmetoden. Her inneholder 95 % konfidensintervallet til Passing-Bablok regresjon 1 mens 95 % konfidensintervallet til skjæringspunktet ikke inneholder 0. (Tabell VII). Dette antyder at det er en konsentrasjonsavhengig forskjell mellom analyseresultat fra standardoppsettmetoden og fra både opparbeidelse 2 og opparbeidelse 3 (Figur 14 og vedlegg). Data fra Bland-Altman

plot viser en proposjonell bias og dette i tillegg til at datamaterialet ikke er normalfordelt gjør estimatet av bias er feil (Figur 3)(Bland & Altman, 1999).

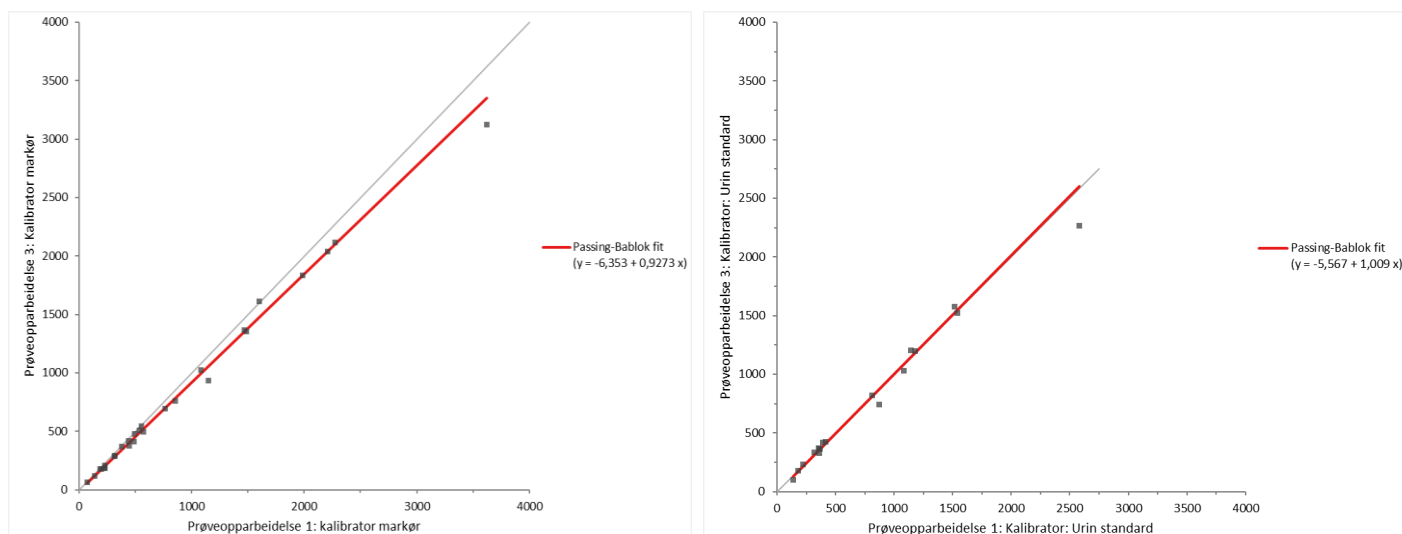
Ved korrelasjon av prøver på kromatografisk metode A er det analysert 17 prøver med de tre ulike prøveopparbeidelsene. Gjennomsnitt for henholdsvis prøveopparbeidelse 1, 2 og 3 er 793 nmol/L, 769 nmol/L og 791 nmol/L. Median for porfyrinprøvene som har blitt analysert er 414 nmol/L for prøveopparbeidelse 1, 420 nmol/L for prøveopparbeidelse 2 og 419 for prøveopparbeidelse 3. For å vurdere korrelasjon av prøver kalibrert med urinkalibrator ble totalporfyriner (nmol/L) opparbeidet med opparbeidelse 2 og opparbeidelse 3 ble sammenlignet med prøveopparbeidelse 1. Her viser Passing-Bablok regresjon at 95 % konfidensintervallet til stigningstallet inneholder 1 og at 95 % konfidensintervallet til skjæringspunktet inneholder 0. Passing-Bablok regresjon påviser dermed ikke signifikant forskjell mellom metodene (se Tabell VII). Bland-Altman plot som sammenligner prøveopparbeidelse 3 og prøveopparbeidelse 1 viste mindre spredning i differansen mellom metodene, og det kan ikke påvises en konsentrasjonsuavhengig forskjell. Det samme er tilfelle for sammenligning av prøveopparbeidelse 2 og prøveopparbeidelse 1.

95 % konfidensintervall for skjæringspunktet er veldig bredt for Passing-Bablok regresjon (Tabell VII), og samtidig er det noen prøver som muligens kan defineres som uteligger i datamaterialet (Figur 7). Passing-Bablok analyse ble forsøkt utført uten disse prøvene, men dette endret ikke stigningstallet eller skjæringspunktet og størrelsen på 95 % konfidensintervallet.

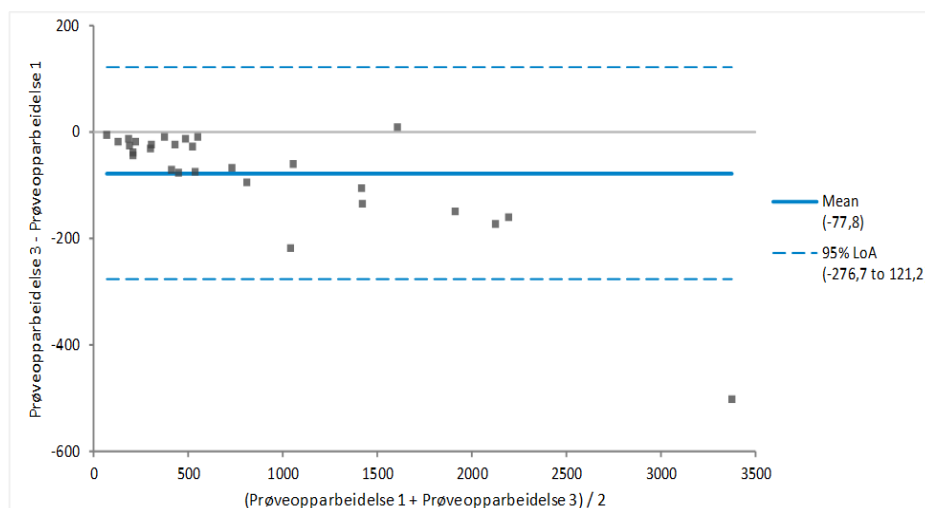
Tabell VII: Passing-Bablok regresjon for totalporfyrin (nmol/L) fra prøveopparbeidelse 2 og prøveopparbeidelse 2 analysert med kromatografisk metode A mot standardoppsettmetoden.

Korrelasjon etter analyse med kromatografi metode A				
Porfyrin	Prøveopparbeidelse	Passing-Bablok fit	Skjæringspunkt: (95% CI)	Stigningstall: (95% CI)
Totalporfyrin kalibrert med markør	Prøveopparbeidelse 1 vs 2, n=30	$y = -11,97 + 0,9417x$	-11,97 (-25,14 - 0,7480)	0,9517 (0,9125 - 0,9919)
	Prøveopparbeidelse 1 vs 3, n=28	$y = -6,353 + 0,9273x$	-6,353 (-18,89 - 6,292)	0,9273 (0,8934 - 0,9496)
Totalporfyrin kalibrert med urinkalibrator	Prøveopparbeidelse 1 vs 2, n=17	$y = -8,355 + 1,0194x$	-8,355 (-41,75 - 24,58)	1,019 (0,9585 - 1,092)
	Prøveopparbeidelse 1 vs 3, n=17	$y = -5,567 + 1,009x$	-5,567 (-40,11 - 35,47)	1,009 (0,9033 - 1,056)

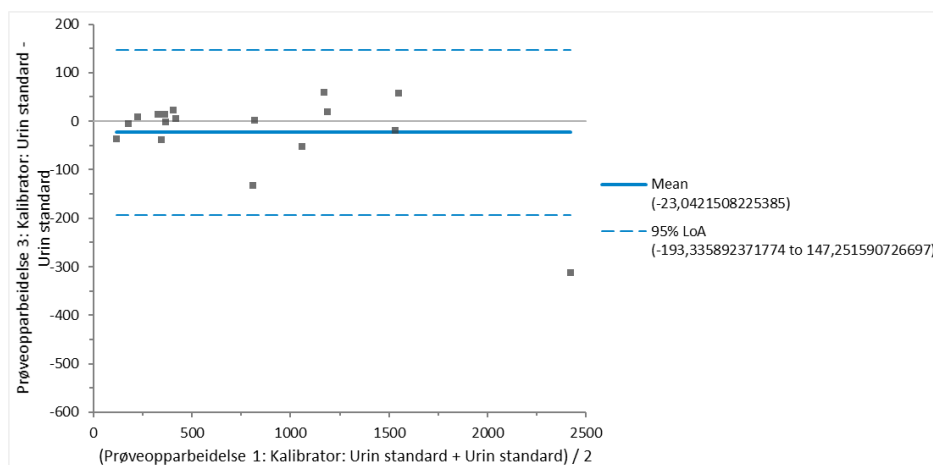
Figurene under viser resultater fra prøveopparbeidelse 3 sammenlignet med resultater fra prøveopparbeidelse 2. Figurer for sammenligning av resultater fra prøveopparbeidelse 1 og 2 finnes i vedlegg.



Figur 14: Passing-Bablok regresjon for totalporfyriner (nmol/L) fra prøveopparbeidelse 3 analysert med kromatografisk metode A mot standardmetoden. Totalporfyrin er utregnet med markør i A og urinstandard i B



Figur 15: Bland-Altman plot for totalporfyriner (nmol/L) fra prøveopparbeidelse 3 analysert med kromatografisk metode A mot standardmetoden. Totalporfyrin er utregnet med markør



Figur 16: Figur 2: Bland-Altman plot for totalporfyriner (nmol/L) fra prøveopparbeidelse 3 analysert med kromatografisk metode A mot standardmetoden. Totalporfyrin er utregnet med standard

Som for totalporfyrin viser Passing-Bablok regresjon for uroporfyrin, heptaporfyrin, pentaporfyrin, koproporfyrin I og koproporfyrin III at det ikke påvises en konsentrasjonsavhengig eller konsentrasjonsuavhengig forskjell når konsentrasjonsbestemmelse ble utført med urinkalibrator. Dette gjelder for både opparbeidelse 2 og opparbeidelse 3 sammenlignet med prøveopparbeidelse 1 (Tabell VIII).

Tabell VIII: Data fra Passing-Bablok regresjon utført på resultater av uro-, hepta-, heksa-, penta-, kopro-I og koproporfyrin III (nmol/L) kalibrert med urinkalibrator.

Korrelasjon av kromatografi metode A mot standardoppsettmetode				
Porfyrin	Prøveopparbeidelse	Passing-bablok fit	Skjæringspunkt: 95% CI	Stigningstall: 95% CI
Uroporfyrin	Prøveopparbeidelse 1 vs 2, n= 18	$y=-3,132+1,007x$	-3,132 (-32,89 - 7,587)	1,007 (0,9670 - 1,055)
	Prøveopparbeidelse 1 vs 3, n=17	$y=1,556+0,994$	1,556 (-22,46 - 21,14)	0,994 (0,8758 - 1,052)
Heptaporfyrin	Prøveopparbeidelse 1 vs 2, n=19	$y=-1,28+1,03x$	-1,280 (-3,306 - 0,1086)	1,030 (0,9936 - 1,040)
	Prøveopparbeidelse 1 vs 3, n=18	$y=0,2447+0,9964x$	0,2447 (-6,266 - 2,818)	0,9964 (0,9325-1,068)
Pentaporfyrin	Prøveopparbeidelse 1 vs 2, n=15	$y=-0,7166+1,063x$	-0,7166 (-1,987 - 0,1030)	1,063 (0,9635 - 1,112)
	Prøveopparbeidelse 1 vs 3, n=16	$y=-0,1163+0,9629x$	-0,1163 (-1,847 - 1,051)	0,9629 (0,8701 - 1,023)
Koproporfyrin I	Prøveopparbeidelse 1 vs 2, n= 18	$y=-2,287+1,065x$	-2,287 (-8,356 - 0,7282)	1,065 (0,988 - 1,265)
	Prøveopparbeidelse 1 vs 3, n=19	$y=-0,2984+0,9938x$	-0,2984 (-3,385 - 2,593)	0,9938 (0,8441 - 1,111)
Koproporfyrin III	Prøveopparbeidelse 1 vs 2, n= 18	$y=1,25+1,012x$	1,250 (-1,879 - 11,05)	1,012 (0,8954 - 1,067)
	Prøveopparbeidelse 1 vs 3, n=18	$y=0,5199+1,028x$	0,5199 (-3,015 - 6,933)	1,028 (0,8955 - 1,076)

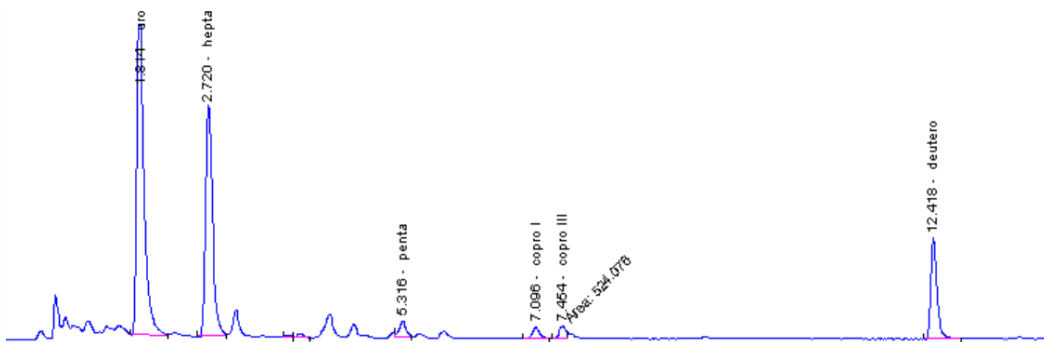
4.2 Metodeytelse for kromatografisk metode A

Ved vurdering av metodeytelse ble alle prøver analysert med kromatografisk metode A vurdert ved visuell vurdering av kromatogrammene ved å vurdere parametere som toppbredde, symmetri og separasjon. For prøver hvor resultatene ble kalibrert med markør ble det vurdert 30 prøver for prøveopparbeidelse 1 og prøveopparbeidelse 2, samt 28 prøver fra prøveopparbeidelse 3. For urinprøver kalibrert med urinkalibrator ble det inkludert 17 prøver for alle metodene. Disse 17 av prøvene ble opparbeidet en gang med hver metode, og kalibrert med både urinkalibrator og markør.

4.2.1 Separasjon

Forskjell i separasjon for de ulike metodene for opparbeidelse ble vurdert visuelt.

Pentaporfyrin ble ikke grunnlinjeseparert ved analyse med kromatografisk metode A, og størrelsen på av toppene som eluerte ut like før og etter pentaporfyrin varierte i størrelse i de ulike urinprøvene. Toppene som eluerte ut i de tre ulike metodene var like for alle metodene for prøveopparbeidelse når samme urinprøve ble undersøkt. Mellom heksaporfyrin trans- og cis-isomerer var det heller ikke grunnlinjeseparasjon. Også her var separasjonen lik for alle metodene for prøveopparbeidelse.



Figur 17: Kromatogram fra pasientprøve analysert med standardoppsettmetoden

4.2.2 Interferens

Ingen interferens ble observert for uro-, hepta og koproporfyrin I for noen av prøveopparbeidelsene (Tabell IX). Det ble observert en interferens etter koproporfyrin III-toppen som ikke var separert fra toppen. Interferensen ble observert i omtrent 20 % av prøvene i studien. I de prøvene interferensen var tilstede ble den observert i alle metodene for opparbeidelse.

Tabell IX: Oversikt over interferens ved kromatografisk analysemetode A.

Kromatografisk analysemetode A			
Porfyrin	Prøveopparbeidelse 1	Prøveopparbeidelse 2	Prøveopparbeidelse 3
Uroporfyrin I	Ingen interferenser	Ingen interferenser	Ingen interferenser
Heptaporfyrin I	Ingen interferenser	Ingen interferenser	Ingen interferenser
Heksaporfyrin I	Overlapp for enkelte prøver	Overlapp for enkelte prøver	Overlapp for enkelte prøver
Pentaporfyrin I	Stort overlapp på både i før og etter toppen	Stort overlapp på både før og etter toppen	Stort overlapp på både før og etter toppen
Koproporfyrin I	Ingen observert	Ingen observert	Ingen observert

Koproporfyryn III	Interferens etter toppen for enkelte prøver	Interferens etter toppen for enkelte prøver	Interferens etter toppen for enkelte prøver
-------------------	---	---	---

4.2.3 Toppform

Alle topper var symmetriske, og det ble ikke funnet noen forskjell mellom toppformen for noen av analyttene for de ulike metodene.

4.3 Korrelasjon for kromatografi metode B sammenlignet med kromatografi metode A

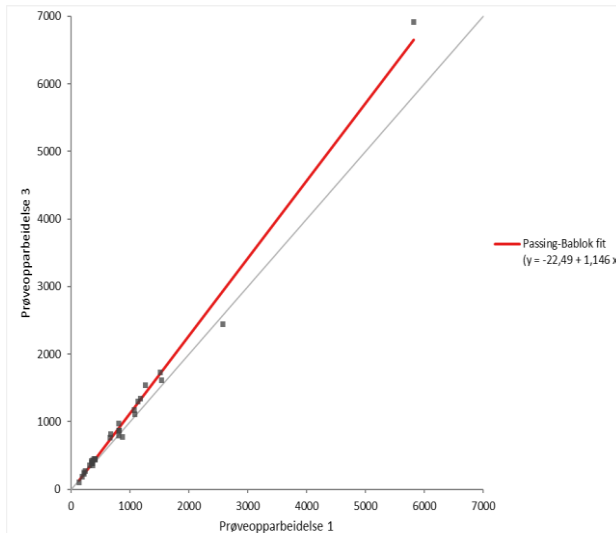
For å sammenligne kromatografimetoder ble de samme prøvene analysert med prøveopparbeidelse 2 og prøveopparbeidelse 3 i kombinasjon med kromatografisk analysemetode B. Prøvene ble deretter sammenlignet med standardoppsettmetode (Figur 18). Konsentrasjonsbestemmelse utførtes med urin kalibrator for alle metodene og for standardoppsettmetoden ble internstandard inkludert i beregning av konsentrasjon.

Kologorov-Smirnov og Shapiro-Wilk tester for normalitet er vurdert for kromatografisk metode A og da utvalget av urinprøver er det samme for kromatografisk metode B antas det at vurderingen av normalfordeling kan overføres til prøver analysert med kromatografisk metode B.

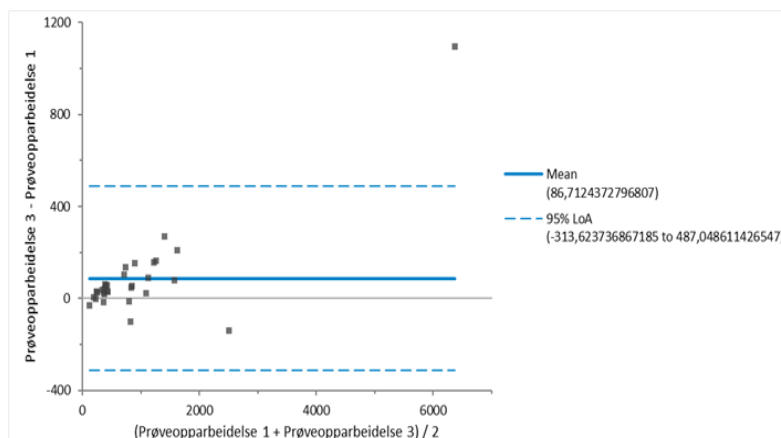
Vurdering av totalporfyryn med Passing-Bablok regresjon viser at 95 % konfidensintervallet til stigningstallet ikke inneholder verdien 1 mens 95 % konfidensintervallet til skjæringspunktet inneholder 0. Passing-Bablok regresjon antyder dermed en mulig konsentrasjonsavhengig forskjell mellom de to kromatografi metodene. Passing-Bablok antyder også en konsentrasjonsavhengig forskjell mellom metodene.

For uroporfyryn, heptaporfyryn, pentaporfyryn, koproporfyryn I og koproporfyryn III er resultatene regnet ut som prosent av totalporfyryn, og det er deretter utført metodesammenligning med Passing-Bablok regresjon. Resultatene viser at for uroporfyryn, heptaporfyryn, koproporfyryn I og koproporfyryn III er det ingen signifikant forskjell i verken skjæringspunkt eller stigningstall mellom analyser utført med kromatografisk metode B og standardoppsettmetoden når begge er kalibrert med urin-kalibrator. Pentaporfyryn skiller seg ut ved at det er signifikant forskjell i både skjæringspunkt og stigningstall (Tabell X).

Da pentaporfyrin utgjør en liten del av totalprosenten, vil ikke avvikene for pentaporfyrin påvirke de andre analyttene. Median av konsentrasjonen til pentaporfyrinene er 10 nmol/L, mens gjennomsnittet er 16 nmol/L. Til sammenligning er medianen til uroporfyrin 374 nmol/L mens gjennomsnittet er 626 nmol/L. I tillegg er det kun 12 prøver over kvantifiseringsgrense for prøveopparbeidelse 2 og 21 prøver for prøveopparbeidelse 3.



Figur 18: Metodesammenligning med Passing-Bablok regresjon



Figur 19: Bland-Altman plott

Tabell X: Data fra Passing-Bablok regresjon for prøveopparbeidelse 2 og prøveopparbeidelse 3 analysert med kromatografisk metode B og korrelert mot standardoppsettmetoden.

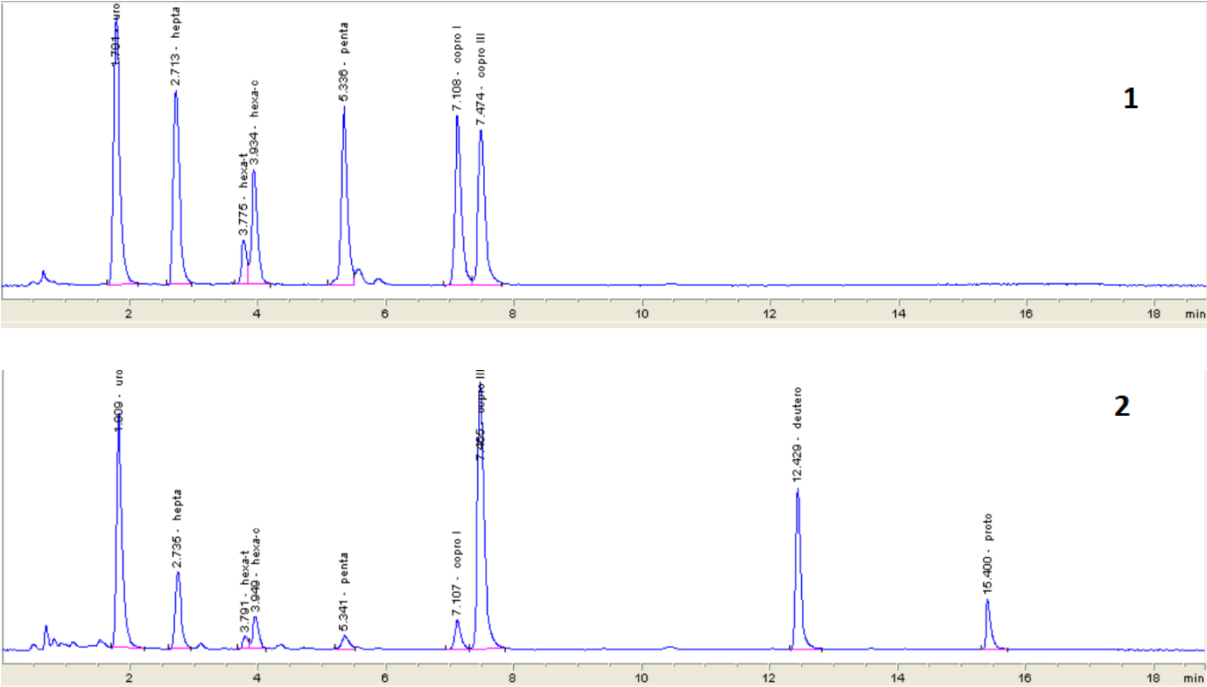
Korrelasjon av kromatografi metode B mot standardoppsettmetode				
Porfyrin	Prøveopparbeidelse	Passign-Bablok fit	Skjæringspunkt: 95% CI	Stigningstall: 95% CI
Totalporfyrin	Prøveopparbeidelse 1 vs 2, n=24	$y = -13,24 + 1,074x$	-13,24 (32,66-18,84)	1,074(1,010-1,129)
	Prøveopparbeidelse 1 vs 3, n=31	$y = -22,49 + 1,146x$	-22,49 (-47,96-12,50)	1,146 (1,044-1,196)
Uroporfyrin	Prøveopparbeidelse 1 vs 2, n=23	$y = -1,904 + 1,03x$	-1,0904 (-4,37-3,04)	1,03 (0,9642-1,077)
	Prøveopparbeidelse 1 vs 3, n=30	$y = -1,282 + 1,001x$	1,282 (-1,805-4,499)	1,001 (0,9439-1,044)
Heptaporfyrin	Prøveopparbeidelse 1 vs 2, n=23	$y = -0,1895 + 0,998x$	-0,1895 (-0,7687-0,1613)	0,998 (0,9681-1,025)
	Prøveopparbeidelse 1 vs 3, n=30	$y = -0,1749 + 0,9916x$	-0,1749 (-0,6370-0,4612)	0,9916 (0,9496-1,012)
Pentaporfyrin	Prøveopparbeidelse 1 vs 2, n=12	$y = -0,06386 + 0,65x$	-0,06386 (-0,3841-0,1478)	0,6500 (0,5019-0,8796)
	Prøveopparbeidelse 1 vs 3, n=21	$y = -0,09741 + 0,6913x$	-0,09741 (-0,2367-0,5551)	0,6913 (0,572-0,7866)
Koproporfyrin I	Prøveopparbeidelse 1 vs 2, n=24	$y = -0,004579 + 0,9286x$	-0,004579 (-0,1822-0,1857)	0,9289 (0,8817-0,9766)
	Prøveopparbeidelse 1 vs 3, n=30	$y = -0,2071 + 0,9565x$	-0,2071 (-0,4796-0,1365)	0,9565 (0,8849-1,008)
Koproporfyrin III	Prøveopparbeidelse 1 vs 2, n=23	$y = 0,04421 + 1,096x$	0,04421 (-0,1774-0,6085)	1,096 (1,052-1,132)
	Prøveopparbeidelse 1 vs 3, n=30	$y = 0,1177 + 1,043x$	0,1177 (-0,3764-0,9117)	1,043 (-0,9767-0,9117)

4.4 Metodeytelse for kromatografisk metode B

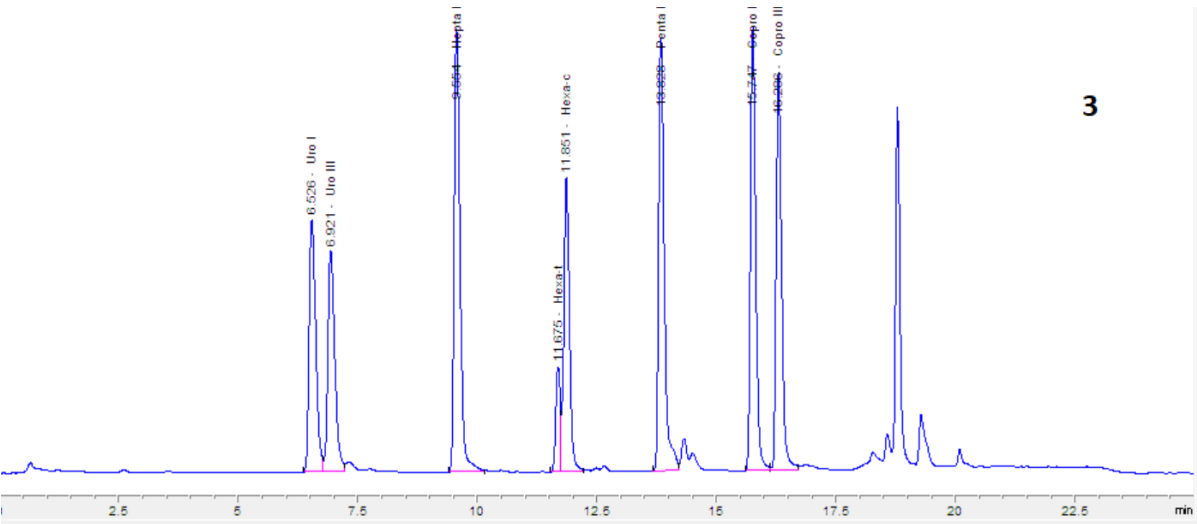
4.4.1 Selektivitet, interferens og toppform

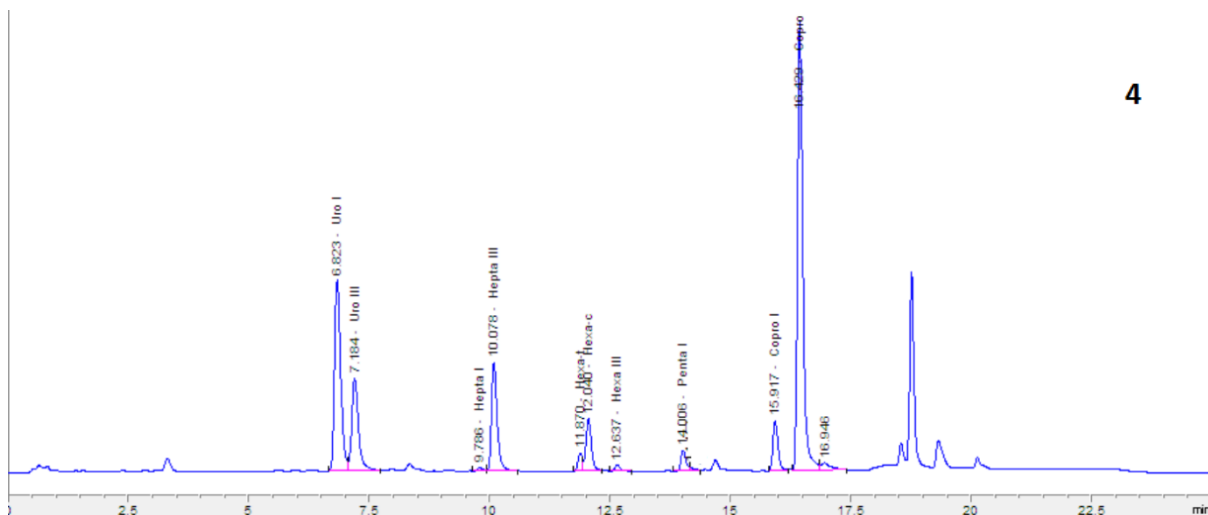
Vurderingene er basert på 31 prøver for opparbeidelse 1 og opparbeidelse 3, samt 25 prøver fra opparbeidelse 3. Vurdering av interferens ble utført visuelt ved å se på toppform og forhold til toppbredde. For uroporfyrin I, uroporfyrin III, heptaporfyrin I ble det ikke sett interferens. For heptaporfyrin III ble det sett en interferens på halesiden av toppen for en eller to av prøvene. Pentaporfyrin I var ikke baselinjeseparert for noen av urinprøvene og er overlappet både før og etter pentaporfyrin-toppene med det som sannsynligvis er blant annet pentaporfyrin III-isomerer. Det er også mulig at overlappet som observeres er på grunn av bedre resolusjon for pentaporfyrin slik som for de andre porfyrinene, og at topper som koeluerer i metode A separeres mer ut i metode B. Visuelt kan det se ut som at det er større

overlapp for pentaporfyrin for opparbeidelse 2 og opparbeidelse 3 analysert med kromatografisk metode B sammenlignet med standardoppsettmetode.



Figur 20: Kromatogrammer fra kromatografisk metode A. Figur merket 1 er urinstandard, og figur merket 2 er intern kvalitetskontroll





4

Figur 21: Kromatogrammer fra kromatografisk metode B. Figur merket 3 er urinkalibrator og figur merket 4 er intern kvalitetskontroll.

Tabell XI: Oversikt over interferens ved kromatografisk metode B

Kromatografisk analysemetode B		
Porfyriner	Prøveopparbeidelse 2	Prøveopparbeidelse 3
Uroporfyrin I	Ingen interferens observert	Ingen interferens observert
Uroporfyrin III	Ingen interferens observert	Ingen interferens observert
Heptaporfyrin I	Ingen interferens observert	Ingen interferens observert
Heptaporfyrin III	Mulig liten interferens på halesiden av toppen	Mulig liten interferens på halesiden av toppen
Heksaporfyrin I (trans/cis)	Mulig interferens for Heksa-cis	Mulig interferens for Heksa-cis
Pentaporfyrin	Overlapp før og etter toppen	Overlapp før og etter toppen
Koproporfyrin I	Ingen interferens observert	Ingen interferens observert
Koproporfyrin III	Ofte interferens på halesiden av toppen	Ofte interferens på halesiden av toppen

4.4.2 Retensjonstid

Typiske retensjonstider for analyttene er ført opp i tabell XII. Gjennomgang av fem tilfeldige serier analysert med to ulike kolonner viste at for kromatografisk metode B er variasjonen (standardavvik) i retensjonstiden ved analyse 0.12 minutter for uroporfyrin I og -III-isomerer, for heptaporfyrin I- og III-isomerer er den 0.07 minutter og for hekso- I-, penta- I-, kopro- I- og koproporfyrin III-isomerer er variasjonen mindre enn 0.05 minutter. Variasjonen er mindre enn 0.05 minutter for alle porfyrinene ved bruk av samme kolonne. Retensjonstiden til heksaporfyrin III og andre pentaporfyrin-isomerer enn pentaporfyrin I kunne ikke bestemmes da det ikke eksisterer tørrstoff eller referansemateriale. Mesoporfyrin og

deuteroporfyryn IX eluerer ut i retensjonstidsområdet 17.6-20.0 minutter hvor blank, kontroll, urin-kalibrator og urinprøvene alle har interferenstopper og kan ikke kvantifiseres i metoden.

Tabell XII: Oversikt over retensjonstider for kromatografisk metode B.

Porfyrin	Typisk retensjonstid (min)
Uroporfyrin I	6.68
Uroporfyrin III	7.06
Heptaporfyrin I	9.68
Heptaporfyrin III	9.98
Heksaporfyrin I cis	11.78
Heksaporfyrin I trans	11.95
Pentaporfyrin I	13.98
Koproporfyrin I	15.88
Koproporfyrin III	16.41

4.4.3 Injeksjonsvolum

Et eksperiment ble utført for å teste injeksjonsvolumet hvor en urinkalibrator ble injisert med ulike volum (Tabell XIII og XIV). Prøvene ble så kalibrert med kalibrator med 10 µL injeksjonsvolum og konsentrasjonen ble justert for volum. Det ble her valgt å vurdere injeksjonene opp mot en differanse på 5 %. 5 % er valgt for å ha en verdi og vurdere konsentrasjonene opp mot og for å lettere kunne oppdage hvor det er størst variasjon, 5 % er ikke ment som en fastsatt grense. For noen av injeksjonen på 1 og 2 µL gikk konsentrasjonen utenfor 5 %, mens alle andre injeksjoner var innenfor. Endring av injeksjonsvolum påvirket ikke resolusjonen mellom de ulike analyttene. Toppene var symmetriske.

Tabell XIII: Urinkalibrator opparbeidet med opparbeidelse 2 og analysert med ulike injeksjoner.

Injeksjonsvolum (µL)	Konsentrasjon (nmol/L)							
	Uro I	Uro III	Hepta I	Heksa-t	Heksa-c	Penta	Kopro I	Kopro III
1	80,3	75,9	120,3	0	105,5	110,2	113,5	109,9
2	80,5	74,6	117,6	0	100,6	120,2	116,3	117,6
2	82,0	77,8	119,2	0	103,2	115,0	117,2	117,8
2	79,9	78,5	116,0	0	80,1	109,6	117,3	120,9
2	79,9	76,6	117,9	0,0	100,8	118,4	117,7	120,6
2,5	80,0	76,7	120,4	20,9	79,7	112,6	115,6	117,4

5	81,3	78,6	120,2	19,9	82,6	120,3	118,9	120,0
10	80,0	77,7	120,7	18,4	82,6	120,4	119,4	121,9
25	79,7	80,8	120,6	20,4	82,0	120,0	120,7	124,8
Gj.snitt	80,38	77,46	119,21	11,14	90,79	116,30	117,39	118,98
Gj.snitt-5%	76,37	73,59	113,25	10,58	86,25	110,48	111,52	113,04
Gj.snitt+5%	84,40	81,34	125,17	11,69	95,33	122,11	123,26	124,94

Tabell XIV: Injisering av lavere volum for prøveopparbeidelse 3

Injeksjonsvolum (µL)	Konsentrasjon (nmol/L)							
	Uro I	Uro III	Hepta I	Heksa-t	Heksa-c	Penta	Kopro I	Kopro III
1	83,1	76,1	119,6	20,0	80,2	116,1	116,7	119,8
1	81,5	76,0	120,4	22,3	80,7	112,6	116,3	117,3
1	80,4	75,8	115,5	20,1	80,5	111,5	112,6	113,4
1	80,7	76,2	115,8	19,6	81,7	110,6	110,8	108,8
2	80,9	75,1	117,4	19,3	80,4	115,0	115,9	116,9
2,5	81,5	74,7	119,8	20,2	80,8	119,5	116,6	119,5
5	80,7	75,4	119,5	18,9	83,0	121,1	117,1	119,7
10	80,0	77,7	120,7	21,4	79,7	120,4	119,4	121,9
25	78,5	78,8	119,6	18,4	84,7	119,7	119,4	123,9
Gj.snitt	80,83	76,2	118,7	20,0	81,3	116,3	116,1	117,9
Gj.snitt-5%	76,8	72,4	112,8	19,0	77,2	110,5	110,3	112,0
Gj.snitt+5%	84,9	80,0	124,7	21,0	85,4	122,1	121,9	123,8

4.4.4 Kvantifiseringsgrense og deteksjonsgrense

Signal-til-støy ratio på mer enn 3 ganger støy ligger til grunn for vurdering av deteksjonsgrensene. For analyttene uroporfyrin I, uroporfyrin III, heptaporfyrin I, heptaporfyrin III, heksaporfyrin I og pentaporfyrin I finner vi en deteksjonsgrense på 1 nmol/L for opparbeidelse 2 og 0,5 nmol/L for prøveopparbeidelse 3 ved analyse med kromatografi metode B og injeksjonsvolum på 25 µL. Deteksjonsgrense for koproporfyrin I og koproporfyrin III er satt til 2 nmol/L for prøveopparbeidelse 2 og 1,0 nmol/L for prøveopparbeidelse 3.

Kvantifiseringsgrensen er bestemt ved signal-til-støy ratio på mer enn 10 ganger støy og vurdering av toppform for analyttene. Kvantifiseringsgrensene for uro, hepta, hekso- og pentaporfyrin er vurdert til 7 nmol/L mens kvantifiseringsgrense for koproporfyrin I og

koproporfyrin III er 10,0 nmol/L for prøveopparbeidelse 2. For prøveopparbeidelse 3 er kvantiseringsgrensene satt til 5 nmol/L for alle analyttene.

Tabell XV: Oversikt over deteksjonsgrense og kvantiseringsgrenser for kromatografisk analysemetode B

Porfyriner	Konsentrasjon (nmol/L)			
	Prøveopparbeidelse 2		Prøveopparbeidelse 3	
	Deteksjonsgrense	Kvantiseringsgrense	Deteksjonsgrense	Kvantiseringsgrense
Uroporfyrin I Uroporfyrin III	1	7	0,5	5
Heptaporfyrin I Heptaporfyrin III	1	7	0,5	5
Heksaporfyrin I (trans/cis)	1	7	0,5	5
Pentaporfyrin	1	7	0,5	5
Koproporfyrin I	2	10	1,0	5
Koproporfyrin III	2	10	1,0	5

4.4.5 Linearitet

Linearitetsforsøkene ble utført med opparbeidelse i duplikat i alle nivå. Det testede lineære området er akseptabelt for både opparbeidelse 2 og opparbeidelse 3 analysert med kromatografisk metode B, se figurer i appendiks.

Tabell XVI: linearitet prøveopparbeidelse 2

Komponent	Lineært område (nmol/l)	Kurvetilpassing $Y=ax+b$	Korrelasjon Koeffisient (R^2)
Uroporfyrin I	5 - 471	$Y=0,9996x+0,1319$	1,0000
Uroporfyrin III	5 - 554	$Y=0,9998x+0,0841$	1,0000
Heptaporfyrin I	5 - 1169	$Y=0,9999x+0,0988$	1,0000
Heksaporfyrin-trans	5 - 124	$Y=0,9996x+0,0393$	0,9998
Heksaporfyrin-cis	5 - 445	$Y=0,9998x+0,0589$	1,0000
Pentaporfyrin I	5 - 553	$Y=0,9995x+0,1867$	0,9999
Koproporfyrin I	5 - 573	$Y=x-2^{-13}$	0,9998
Koproporfyrin III	5 - 596	$Y=x-2^{-13}$	0,9997

For å få kurvetilpassing ($y=ax+b$) er stigningstall og skjæringspunkt regnet ut ifra areal av analytt (y) og fortykning av prøven (x). Teoretisk areal er regnet ved hjelp av regresjonslinjen. R^2 er beregnet fra teoretisk areal mot målt areal. Konsentrasjon for det lineært område er estimert fra areal

Tabell XVII: Linearitet prøveopparbeidelse 3

Komponent	Lineært område (nmol/l)	Kurvetilpassing $Y=ax+b$	Korrelasjons Koeffisient (R^2)
Uroporfyrin I	7 - 484	$Y=0,9995x+0,1845$	0,9999
Uroporfyrin III	7 - 515	$Y=1,0005x-0,1821$	0,9992
Heptaporfyrin I	7 - 1220	$Y=0,9997x+0,2432$	0,9999
Heksaporfyrin t	7 - 110	$Y=0,9995x+0,046$	0,9994
Heksaporfyrin c	7 - 462	$Y=0,9994x+0,2011$	0,9998
Pentaporfyrin I	7 - 575	$Y=0,9992x+0,3198$	0,9998
Koproporfyrin I	10 - 589	$Y=x-2^{-13}$	0,9996
Koproporfyrin III	10 - 591	$Y=x-2^{-13}$	0,9992

For å få kurvetilpasning ($y=ax+b$) er stigningstall og skjæringspunkt regnet ut ifra areal av analytt (y) og fortynning av prøven (x). Teoretisk areal er regnet ved hjelp av regresjonslinjen. R^2 er beregnet fra teoretisk areal mot målt areal. Konsentrasjon for det lineære området er estimert fra areal

4.4.6 Carry-over

Carry-over ble observert for prøveopparbeidelse 2 etter konsentrasjon på 1473 nmol/L for uroporfyryn I, ved 643 nmol/L for uroporfyryn III, 1399,0 nmol/L for heptaporfyryn I, 1045 nmol/L for heptaporfyryn III, 2173 nmol/L for pentaporfyryn I mens koproporfyryn I og III viste interferens ved henholdsvis 2526 nmol/L og 2839 nmol/L. Prøver analysert etter høye prøver må reanalyseres på grunn av mulighet for carry-over. Det bør også undersøkes nærmere på hvor høye prøver som kan analyseres før det sees carry-over.

Carry-over vurdert ved visuell bedømming av blank prøve for prøveopparbeidelse 3 viste at det er topper i kromatogrammet til blankprøvene når foregående prøve inneholdt konsentrasjon på 1926 nmol/L for uroporfyryn I, ved 392 nmol/L for uroporfyryn III, 1074 nmol/L for heptaporfyryn I, 616,9 nmol/L for heptaporfyryn III, 1325,6 nmol/L for pentaporfyryn I mens koproporfyryn I viser carry-over etter prøver ved 1360,3 nmol/L.

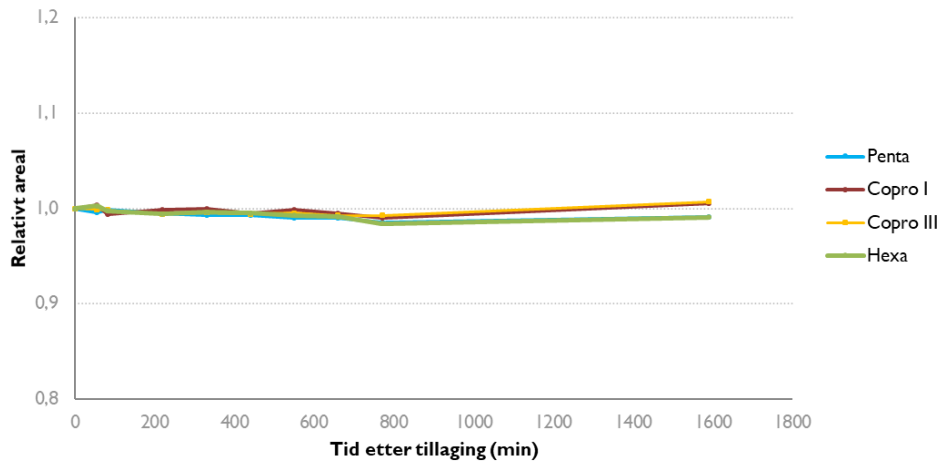
4.4.7 Stabilitet

4.4.7.1 Holdbarhet på instrument prøveopparbeidelse 3

Holdbarhet på kalibrator og kontroll på instrument etter tillaging ble vurdert ved å opparbeide og så analysere prøven og kontrollen ved ulike tidsintervall i omtrent 24 timer. Kontrollen viser ingen tegn til dekomponering av prøven i det testede tidsrommet. For urinprøven øker arealet noe da spesielt for koproporfyryn III ved siste analysering.

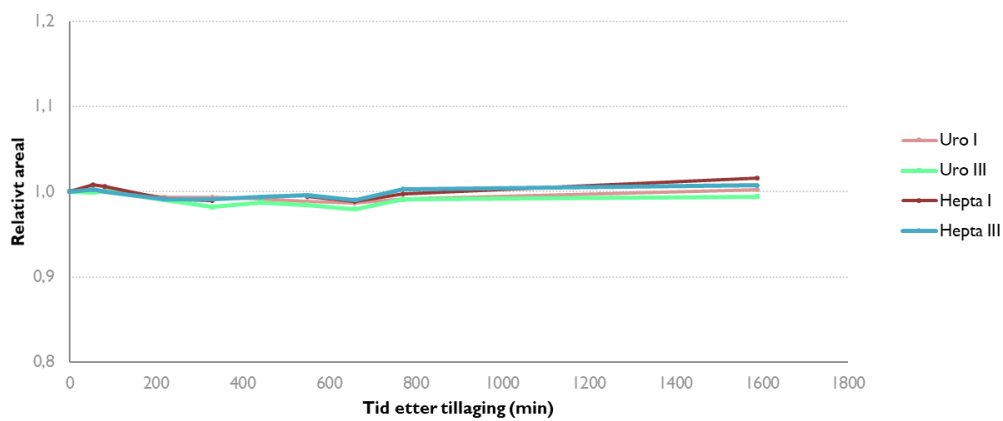
Stabilitet på instrument - kontroll

Alle resultater plottet relativt til areal av først injeksjon, satt til 1.



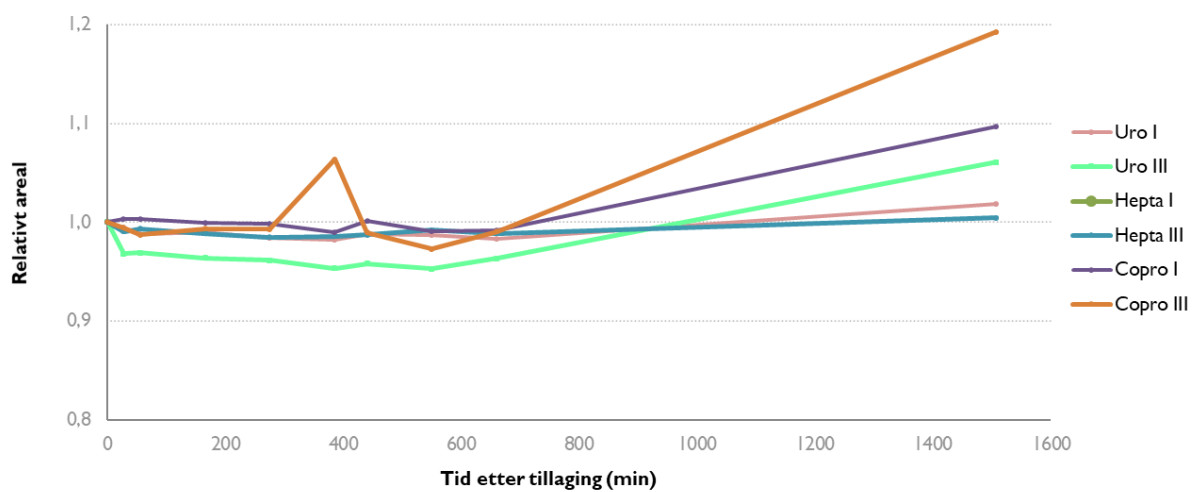
Stabilitet på instrument - kontroll

Alle resultater plottet relativt til areal av først injeksjon, satt til 1.



Stabilitet på instrument - urinprøve

Alle resultater plottet relativt til areal av først injeksjon, satt til 1.



4.4.8 Presisjon

Presisjon for prøveopparbeidelse 3

Basert på 10-20 målinger i 3 forskjellige nivå, var CV % under 10 % for alle porfyrinene, bortsett fra pentaporfyrin i nivå 3.

Tabell XVIII: Uroporfyrin I

Prøvemateriale	Antall målinger	Middelverdi (nmol/L)	SD	CV%
Nivå 1	10	79,7	3,12	3,91
Nivå 2	12	198,6	2,70	1,36
Nivå 3	10	638,7	22,58	3,54
Kontroll	19	354,9	5,7	1,6

Tabell XIX: Uroporfyrin III

Prøvemateriale	Antall målinger	Middelverdi (nmol/L)	SD	CV%
Nivå 1	10	37,3	3,17	6,38
Nivå 2	12	152,8	5,90	3,86
Nivå 3	10	21,8	19,82	7,29
Kontroll	19	127	2,0	1,7

Tabell XX: Heptaporfyrin I

Prøvemateriale	Antall målinger	Middelverdi (nmol/L)	SD	CV%
Nivå 1	10	2,0	0,16	7,69
Nivå 2	12	43,1	1,50	3,49
Nivå 3	10	253,2	11,91	4,71
Kontroll	19	3,9	0,3	8,4

Tabell XXI: Heptaporfyrin III

prøvemateriale	Antall målinger	Middelverdi (nmol/L)	SD	CV%
Nivå 1	10	65,1	1,90	2,92
Nivå 2	12	127,0	1,34	1,05
Nivå 3	10	312,5	9,87	3,16
Kontroll	19	116,0	1,7	1,5

Tabell XXII: Heksaporfyrin

Prøvemateriale	Antall målinger	Middelverdi (nmol/L)	SD	CV%
Nivå 2	12	75,4	1,38	1,83
Nivå 3	10	37,4	1,45	3,88
Kontroll	19	72,1	1,3	1,8

Tabell XXIII: Pentaporfyrin

Prøvemateriale	Antall målinger	Middelverdi (nmo/L)	SD	CV%
Nivå 1	10	2,7	0,11	4,08
Nivå 2	12	20,3	1,13	1,62
Nivå 3	10	34,3	4,47	13,03
Kontroll	19	23,5	2,2	9,0

Tabell XXIV: Presisjon koproporfyrin I

Prøvemateriale	Antall målinger	Middelverdi (nmol/L)	SD	CV%
Nivå 1	10	16,0	0,81	5,05
Nivå 2	12	48,6	0,94	1,94
Nivå 3	10	67,4	5,22	7,74
Kontroll	19	52,7	1,5	2,9

Tabell XXV: Presisjon koproporfyrin III

Prøvemateriale	Antall målinger	Middelverdi (nmol/L)	SD	CV%
Nivå 1	10	71,6	4,17	5,83
Nivå 2	12	392,7	7,44	1,90
Nivå 3	10	235,6	12,09	5,13
Kontroll	19	540,9	11,8	2,2

4.4.9 Ekstern kvalitetskontroll

Ekstern kvalitetskontroll for urin porfyriner er EPNET External Quality Assessment Scheme (EPNET EQAS). Den eksterne kvalitetskontrollen sendes ut som en pasient "case" med beskrivelse av symptomer samt vanligvis både urin, feces og blodprøver. Tabell XXVI er fra andre utsendelse i 2019 og viser resultatene fra standardoppsettmetoden. MBF er i metode gruppe 1. Totalporfyrin rapporteres i nmol/mmol kreatinin mens de andre porfyrinene regnes ut som prosent av totalporfyrin.

Tabell XXVI: EPNET EQAS 2/19 ekstern kvalitetskontroll analysert på standardoppsettmetoden.

Numerical overview

Method group	n	n _x	Median	Mean	SD	CV%	n _{ql}	Comments
1 HPLC as sum of fractions	17	2	59.9	57.9	13.7	23.6	17	
2 Extraction + spectroscopy	5	0	53.3	47.9	14.9	31.2	5	
3 Acidification + spectroscopy	13	0	49.0	49.3	17.5	35.5	11	
0 Other	0	0	–	–			0	
All centres	35	2	53.9	53.3	15.6	29.3	33	

n: results included, n_x: results excluded from calculations, n_{ql}: results within method-related performance specifications.

u-porphyrin fractions [%]		reported by 36 out of 38 laboratories*						
Porphyrin	n	n _x	Your result	Median	Range	Mean	SD	Comments
Uro total	34	1	13	10	3 - 17	10	3.2	
Uro I	22	0	NA	8	1 - 17	8	3.6	
Uro III	21	0	NA	3	0 - 9	3	2.0	
Hepta	34	0	2	1	0 - 3	1	0.8	
Hexa	32	0	0	0	0 - 2	1	0.7	
Penta	33	0	3	5	0 - 14	6	3.8	
Copro total	35	0	82	84	68 - 95	83	5.8	
Copro I	32	1	8	8	7 - 11	9	0.9	
Copro III	32	1	74	75	60 - 85	74	5.7	

* The statistical calculations include only the results in method group 1 (HPLC; n=35).

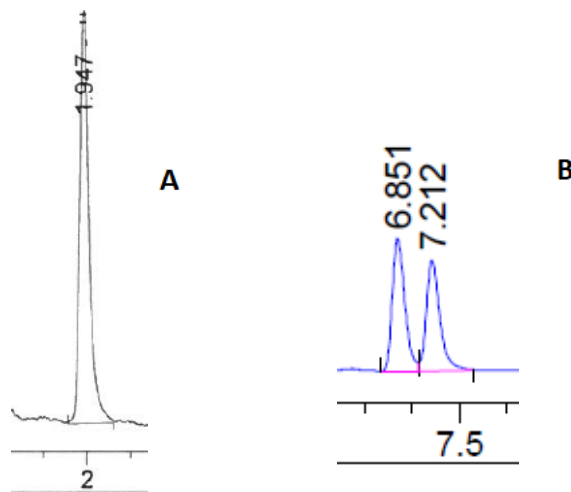
Ved analyse av ekstern kvalitetskontroll 2/19 med opparbeidelse 3 og kromatografisk metode B ble porfyriner/kreatinin (total porfyriner) målt til 33 nmol/mmol kreatinin, Tabell XXVII viser den prosentvise fordelingen av porfyriner i urinprøven.

Tabell XXVII: Ekstern kvalitetskontroll EPNET EQAS 2/19 med opparbeidelse 3 og kromatografisk metode B.

	Resultat (%)	Median (%)
Uro total	8	10
Uro I	2	8
Uro III	1	3
Hepta	0	1
Heksa	0	0
Penta	0	5
Kopro total	93	84
Kopro I	8	8
Kopro III	85	75

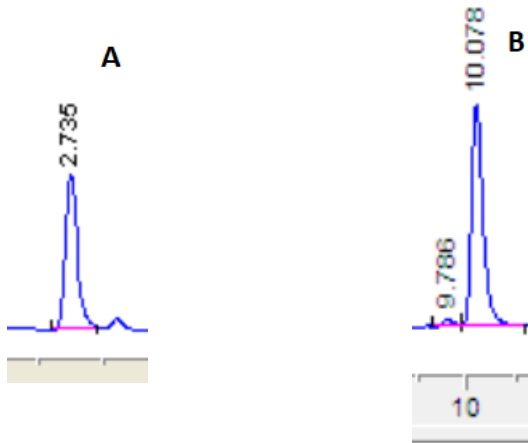
4.5 Separasjon og kvantifisering av porfyrin-isomerer

I motsetning til chromatografisk metode A hvor uroporfyrin I og uroporfyrin III koeluerer, separeres isomerene og kan kvantifiseres i chromatografisk metode B. Bildet merket A i figur 20 viser uroporfyrin fra chromatografisk metode A hvor det ikke er en separasjon mellom uroporfyrin I og uroporfyrin III. Kromatogrammet merket B i figur 20 viser opparbeidelsesmetode 2 analysert med chromatografisk metode B hvor uroporfyrin I har retensjonstid 6,85 min og uroporfyrin III har retensjonstid 7,21 min. Toppene er ikke helt grunnlinjeseparert, men kan identifiseres og kvantifiseres. Opparbeidelsesmetode 3 analysert med chromatografisk analysemetode B viser det samme som figur 20 bilde B.



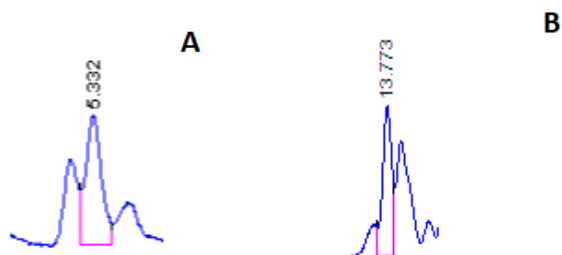
Figur 22: Uroporfyrin-kromatogram fra prøveoppbeidelse 1 og 2 analysert med chromatografisk analysemetode A og B.

Heptaporfyrin I og heptaporfyrin III kan kvantifiseres ved analyse med chromatografisk metode B. Bildet merket A i figur 21 viser heptaporfyrin fra en urinprøve analysert med opparbeidelse 1 med chromatografisk analysemetode A hvor det ikke er en separasjon mellom heptaporfyrin I- og heptaporfyrin III-isomerer. Kromatogrammet merket B i figur 21 viser opparbeidelsesmetode 2 analysert med chromatografisk metode B hvor heptaporfyrin I har retensjonstid 9,79 min og heptaporfyrin III har retensjonstid 10,08 min.



Figur 23: Heptaporfyrin fra prøveopparbeidelse 1 og 2 analysert med kromatografisk analysemetode A og B.

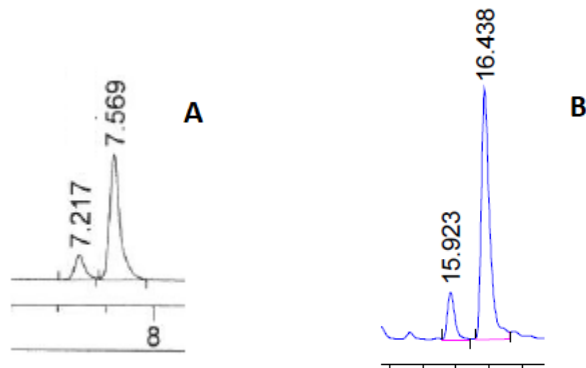
Figur 22 viser pentaporfyrin fra samme urinprøve opparbeidet med opparbeidelse 3 og analysert med to ulike kromatografiske metoder. Prøven merket A er analysert med kromatografisk metode B og viser pentaporfyrin med retensjonstid 13.77 mens prøven merket B er analysert med kromatografisk metode A og viser pentaporfyrin med retensjonstid 5.33.



Figur 24: Pentaporfyrin fra prøveopparbeidelse 1 og 2 analysert med kromatografisk analysemetode A og B.

Bildet merket A i figur 23 viser resultatene med opparbeidelse 1 og kromatografisk analysemetode A, og det viser separasjon av koproporfyrin I med retensjonstid 7,22 minutter og koproporfyrin III med retensjonstid 7.57 minutter. Bildet merket B fra figur 23 viser koproporfyrin I med retensjonstid 15.92 minutter og koproporfyrin III med retensjonstid 16.44 minutter fra samme urinprøve analysert med opparbeidelse 2 med

kromatografisk analysemetode A. Separasjonen mellom koproporfyrim-isomerene er fremdeles tilstede etter endring av kromatografisk metode.



Figur 25: Koproporfyrim I og koproporfyrim III fra prøveopparbeidelse 1 og 2 analysert med kromatografisk analysemetode A og B.

Tabell XXI: Oversikt separasjon av porfyrim-isomerer ved ulike kromatografiske analysemetoder

Porfyrim	Kromatografisk analysemetode A	Kromatografisk analysemetode B	
	Prøveopparbeidelse 1	Prøveopparbeidelse 2	Prøveopparbeidelse 3
Uroporfyrim I Uroporfyrim III	Ingen separasjon. Analyttene koeluerer	Separasjon av I- og III-isomerer	Separasjon av I- og III-isomerer
Heptaporfyrim I Heptaporfyrim III	Ingen separasjon. Analyttene koeluerer	Separasjon av I- og III-isomerer	Separasjon av I- og III-isomerer
Heksaporfyrim I trans Heksaporfyrim I cis	Separasjon av heksaporfyrim cis /trans	Separasjon av heksaporfyrim cis /trans	Separasjon av heksaporfyrim cis /trans
Pentaporfyrim I	Er ikke baselinjeseperert. Interferenstoppp før og etter toppen	Flere topper rundt pentaporfyrim enn ved prøveopparbeidelse med kromatografisk analysemetode A	Flere topper rundt pentaporfyrim enn ved prøveopparbeidelse med kromatografisk analysemetode A
Koproporfyrim I Koproporfyrim III	Separasjon av I- og III-isomerer	Separasjon av I- og III-isomerer	Separasjon av I- og III-isomerer

5 Diskusjon

I denne studien ble to nye tilnærminger for prøveopparbeidelse undersøkt for å se om en endring kunne føre til enklere prøveopparbeidelse enn dagens metode og samtidig opprettholde god nok kvalitet. I tillegg ble det undersøkt om endring i kromatografisk metode kunne gir bedre separasjon av porfyrin-isomerer samtidig som metoden gav samme måleresultatet og tilsvarende metodeytelse som dagens metode.

5.1 Korrelasjon og metodeytelse for kromatografi metode A

For å undersøke om det var forskjeller mellom de tre metodene for opparbeidelse ble først korrelasjon utført med samme kromatografimetode. Resultatene fra Passing-Bablok regresjon indikerte at resultatene fra de forskjellige prøveopparbeidelsene samsvarte bedre når konsentrasjonsbestemmelsen ble gjort med en urinkalibrator som fulgte hele prøveopparbeidelsen, enn når kalibreringen ble utført med markør.

Resultatene viste ingen signifikant forskjell i konsentrasjon for totalporfyrin, uroporfyrin, heptaporfyrin, koproporfyrin I- og koproporfyrin III-isomerer når kalibreringen ble utført med urin-kalibrator. Urinkalibratoren ble opparbeidet sammen med prøvene, og recovery for alle porfyrinene, inkludert internstandard i kalibratoren, var dermed lik som i prøvene. Ved kalibrering med markør ble samme tillaging av bruksløsning brukt til å kalibrere alle metodene for opparbeidelse (justert for volum). På tross av dette viste Passing-Bablok regresjonen at det var en signifikant konsentrasjonsavhengig forskjell mellom prøveopparbeidelse 1 og de to andre metodene. Tolkning av bias fra Bland-Altman plott er ikke utført da testen er parametrisk og differansene her ikke var normalfordelt.

Det er mulig den konsentrasjonsavhengige forskjellen som sees ved kalibrering med markør kan forklares med at markør ikke går igjennom fast-fase kolonnene og at det dermed ikke blir kompensert for et eventuelt tap av internstandard i fast-fase ekstraksjonen i opparbeidelse 1. Resultatene kan tyde på at recovery for internstandard ved fast-fase ekstraksjon ikke er lik som recovery for de andre porfyrinene.

Det var ikke oppgitt nøyaktig konsentrasjon for Chromatographic marker kit som inneholder uro-, hepta-, heksa, penta- og koproporfyrin I-isomerer. For standardoppsettmetoden bestemmes konsentrasjonen til ny batch av markør ved parallell analysering med gammel

batch. Eksakt konsentrasjon til porfyrin-isomerene i markør er av denne grunn usikker, og den var i tillegg vanskelig å kalkulere ved bruk av de nye metodene. Andre studier benyttet stockløsninger til kalibrering (Macours & Cotton, 2006; Zuijderhoudt, Koehorst, Kluitenbergh, & Dorresteijn-de Bok, 2000) eller kalibrering med Chromatografic marker kit (Benton, Lim, Moniz, et al., 2012). Forskjellen mellom disse studiene og denne er at kalibratoren ble med i prøveopparbeidelsen i en av studien (Zuijderhoudt et al., 2000), mens i en av de andre studiene kalibreres prøvene med en fem punkt standardkurve (Macours & Cotton, 2006). Det hadde vært mulig å endre rutinen ved kalibrering med markør ved å for eksempel analysere flere nivå og dermed få en mer nøyaktig kalibrering. Fordelen med urinkalibratoren sammenlignet med markører er at urinkalibratoren fulgte samme prøveopparbeidelse som pasientprøvene og eksakt konsentrasjon kan beregnes. Matriksen til urinkalibratoren vil være mer lik den til urinprøvene og vil dermed være mer representativ.

Den studien viser at mellom de tre metodene for prøveopparbeidelse er det ikke forskjell i separasjon og resolusjon av koproporfyrin I- og koproporfyrin III-isomerer når prøvene analyseres med kromatografi metode A. Interferens på halesiden av koproporfyrin III sees i samme grad for alle metodene, og samtidig viser sammenligning ingen forskjell i overlapp med interfererende topper, da spesielt for heksaporfyrin og pentaporfyrin. Det er ikke gjort beregninger på resolusjonen og separasjonen mellom de ulike toppene. Utrekninger av resolusjonen ville kunne stadfeste endringene i separasjonen bedre. I dette tilfellet er det vurdert slik at det ikke er nødvendig da visuell vurdering av toppbredde og separasjon er utført. Interferens er testet ved visuell vurdering av toppbredde og symmetri for kromatogrammene og ikke ved tilsetning av eventuelle andre forbindelser som kan interferere med analyse av porfyriner i urin. Full testing av interferens er vanskelig og tar tid da det er uvisst hvilke forbindelser som eventuelt interfererer og det er heller ikke testet fullt ut for standardoppsettmetoden som er i bruk i rutine ved MBF. Basert på resultatene fra Passing-Bablok regresjon kan vi si at eventuelle interferenser som er tilstede i de prøvene som er analysert på kromatografisk metode A sannsynligvis ikke endres når opparbeidelsen endres.

5.2 Korrelasjon for kromatografisk metode B sammenlignet med kromatografisk metode A

Et av målene i studien var å se på om endring av kromatografisk metode gir samme måleresultat som standardoppsettmetoden vurderes i dette avsnittet. Grunnen til at prøveopparbeidelse 1 ikke ble analysert med kromatografisk metode B er at eluatet fra opparbeidelse 1 (fast-fase ekstraksjon) inneholder 75 % metanol og er ikke kompatibel med 1,0 M ammoniumacetat i vann (pH 5,16) og som følge av at metanol mobilfase inngår i kromatografisk metode B ville ikke porfyrinene kunne kvantifiseres. Sammenligning ble derfor kun utført for prøveopparbeidelser 2 og 3 mot standardoppsettmetoden hvor kromatografisk metode A inngår.

Ved kalibrering av resultatene for uro-, hepta-, heksa-, kopro- I- og koproporfyrin III-isomerer med urinkalibrator ser det ut som konsentrasjonen lå høyere med kromatografisk metode B sammenlignet med standardoppsettmetoden. Passing-Bablok regresjon og Bland-Altman plott viser en konsentrasjonsavhengig forskjell for porfyrinene når analysert med kromatografisk metode B sammenlignet med standardoppsettmetoden. Pentaporfyrin skilte seg ut ved at konsentrasjonen i snitt lå lavere ved analyse med kromatografisk metode B. Passing-Bablok regresjon og Bland-Altman plot for pentaporfyrin støtter oppunder dette. Konsentrasjonen for uroporfyrin og heptaporfyrin er for kromatografisk metode B summen av både I- og III isomerer mens det for pentaporfyrin kun har vært mulig å identifisere I-isomeren. Det at pentaporfyrin I i snitt er lavere kan tyde på at det er oppnådd bedre separasjon med kromatografi metode B og at en eller flere topper som koeluerer i kromatografisk metode A nå er separert ut. Heksaporfyrin I trans/cis isomerer har kvantifiseringsgrense på 10 nmol/L dersom analysert med prøveopparbeidelse 2 og kromatografisk metode B. Her var tre prøver over kvantifiseringsgrensen og det ble derfor ikke utført noen korrelasjonstester for analytten. Det er også for få prøver analysert med de andre metodene, til å trekke noen slutninger.

Sammenligningen av prosentvis fordeling av porfyriner ble utført da typiske mønstre av porfyriner i urin i tillegg til mønstre i feces og blod er med i den biokjemiske vurderingen ved utredning av porfyrisykdom (Hagve & Berg, 2019). Passing-Bablok regresjon utført etter omregningene ingen indikasjon på konsentrasjonsavhengig eller konsentrasjonsuavhengig forskjell i den prosentvise fordelingen av porfyrinene. Ekstern kvalitetskontrollprøve som ble

analysert med kromatografisk metode B viste lavere konsentrasjon enn ved analyse med standardoppsettmetoden. I tillegg var prosentvis fordeling av porfyrinene noe avvikende fra middelveiden for de øvrige deltakerne. Prosentvis fordeling av porfyriner i forhold til totalporfyrin ble også vurdert ved sammenligning av kromatografisk metode B med standardoppsettmetoden.

De to ulike kromatografimetodene utføres på to ulike instrument med detektorer fra ulike produsenter. Det kan se ut som at detektorene har ulik sensitivitet for urenheter i kjemikalier fordi injeksjon av blankløsning gir ulik baselinje og interfererende topper ved endring av detektor. En serie med prøver for kromatografi metode B ble utført med kjemikalier fra annen leverandør enn den som ble brukt i oppgaven. Dette gav mindre bakgrunn/interferens topper ved bruk med kromatografisk metode B. Ved analyse med de samme kjemikalierne på kromatografisk metode A sees ikke de samme endringene. Noe som kunne tyde på ulikheter i de to detektorene.

5.3 Metodeytelse for kromatografisk metode B

Metodeytelsen ble vurdert her ved at separasjon, interferens og toppform ble sammenlignet for opparbeidelse 2 og opparbeidelse 3 analysert med kromatografisk metode B mot standardoppsett metoden. Generelt observeres det flere topper i kromatogrammet fra urinprøver ved analyse med kromatografisk metode B, da spesielt for topper som eluerer ut med retensjonstid etter ca 7.5 minutter det vil si i nærheten av heksaporfyrin I, pentaporfyrin I og koproporfyrin. Det er mulig at bedre separasjon etter endring av kromatografi metode kan forklare noen av disse toppene. I tillegg er pH-verdien til mobilfasen til de to kromatografiske metodene ulike noe som sannsynligvis påvirker antall topper som sees i kromatografisk metode B.

For kromatografisk metode B observeres interferens for cis-isomeren til heksaporfyrin I i enkelte prøver. Heksaporfyrin I cis-isomerene har et areal tilsvarende en konsentrasjon på 10-15 nmol/L. Det er generelt vanskeligere å identifisere heksaporfyrin I trans-/cis-isomerene i kromatografisk metode B sammenlignet med kromatografi metode A på grunn av topper med retensjonstid nær retensjonstiden heksaporfyrin I i kromatogrammene. Sikker identifikasjon av heksaporfyrin I krever både at trans- og cis-isomer er detektert. Dette er fordi det ved sammenligning med kromatografi metode A vises at kun tilstedeværelse av heksaporfyrin I-cis sannsynligvis er en interferens. I tillegg viser erfaring

med kromatografi metode A fra rutineanalyse at når heksaporfyrin er over kvantifiseringsgrensen sees begge isomerene.

Interferens på halesiden av koproporfyrin III ble sett i de samme prøvene for både kromatografi metode A og kromatografi metode B.

Undersøkelser viser at det er carry-over for prøver analysert etter høye prøver når analyse utføres med kromatografi metode B (se vedlegg). Konsentrasjonen når mulig carry-over for uroporfyrin III inntraff, var lavere sammenlignet med de andre analyttene.

For å hindre carry-over ble det i studien utført nålvask (utsiden av nålen) mellom hver injeksjon og systemvask med injeksjon av 100 µL noe som fører til at hele sample loopen blir vasket mellom hver injeksjon. Carry-over er undersøkt med et injeksjonsvolum på 25 µL, og det er naturlig å anta at en lavere injeksjonsvolum ville endre grensen for når prøver må reanalyseres. Injeksjonsvolum er økt til 25 µL for å få høyere deteksjonsgrense da spesielt for koproporfyrin I og koproporfyrin III. Spørsmålet er om dette har påvirket carry-over og om det bør vurderes å senke injeksjonsvolumet til 10 µL for å få mindre carry-over. Ingen carry-over sees i andre injeksjon av blank prøve. For å unngå carry-over må det injiseres en blankprøve etter høye prøver når analyse utføres med kromatografisk analysemetode B. Carry-over for kromatografi metode A er ikke observert.

Test av stabilitet for opparbeidelse 3 analysert med kromatografisk analysemetode B viser at urinprøven variasjon på grunn av veldig lav konsentrasjon for noen av analyttene som medfører litt større usikkerhet i integrering og noe høyere CV% generelt. Heksaporfyrin I og pentaporfyrin I er ikke tatt med da konsentrasjonen er i området rundt/under kvantifiseringsgrensen. For urinprøven øker konsentrasjonen da spesielt for koproporfyrin III ved siste analysering. I forhold til utgangsverdi for urinprøven og kontrollen påvises det ikke i denne studien dekomponering av i det testede tidsrommet. Økningen av koproporfyrin III ved siste analysering gjør vurderingen av holdbarhet mer usikker og

Denne studien viste at kvantifiseringsgrensene for prøveoppbeidelse 3 med kromatografisk metode B ved 25 µL injeksjon var tilsvarende som for standardoppsettmetoden (større enn 5 nmol/L). Signal-til-støy forholdet er noe høyere for

koproporfyrin enn for de andre prøvene. Kvantifiseringsgrensen for koproporfyrin I og koproporfyrin III er dermed noe høyere enn for resten av analyttene, men den er fremdeles lavere enn 5 nmol/L. Kvantifiseringsgrensen er satt høyt slik at variasjon i topphøyde for analyttene fra kolonne til kolonne og endringer i løpet av kolonnens levetid er tatt høyde for. I tillegg er kvantifiseringsgrensen justert opp til 5 nmol/L for å gjøre det enkelt da dette er kvantifiseringsgrensen for standardoppsettmetoden og det er vurdert slik at kvantifiseringsgrense lavere enn dette ikke er nødvendig. I denne studien er analytter under kvantiseringsgrensen ekskludert fra korrelasjonen.

Kvantifiseringsgrensen for prøveopparbeidelse 2 er høyere enn for prøveopparbeidelse 3. Dette skyldes at ved prøveopparbeidelse 3 blir prøvene mer fortynnet under opparbeidelsen. En kvantifiseringsgrense for heptaporfyrin I på 5 nmol/L eller høyere vil føre til at heptaporfyrin ikke kan kvantifiseres i mange av prøvene, da de få urinprøvene vi har analysert har lave konsentrasjoner av analytten. For standardoppsettmetoden er kvantifiseringsgrensen ikke testet da denne allerede var fastsatt, men på grunn av gammel detektor som er vanskelig å vedlikeholde er det mulig at kvantifiseringsgrensen på >5nmol/L burde vært gjennomgått på nytt.

Presisjonen til uroporfyrin I, uroporfyrin III, Heptaporfyrin I, Heptaporfyrin III, heksaporfyrin I, koproporfyrin I og koproporfyrin III analysert med opparbeidelse 3 og kromatografisk analysemetode B har en CV% mindre enn 10 % som er satt som grense for standardoppsettmetode (rutinemetode ved MBF). Analytten som avviker fra dette er pentaporfyrin med en CV på 13,03 % for nivå 3. Pentaporfyrin er analytten som har dårligst separasjon fra andre topper i kromatogrammet og er dermed vanskeligst å integrere. CV % vil påvirkes av at størrelsen på toppene som ligger før og etter pentaporfyrin varierer fra pasientprøve til pasientprøve. Andre studier (Zuijderhoudt et al., 2000) finner høyere CV% i lavere konsentrasjonsområder. Dette stemmer ikke overens med det vi finner i denne oppgaven da det for pentaporfyrin ikke er laveste konsentrasjon som gir høyest CV%. Presisjonsdataene i denne studien er for tre av nivåene utført over kun 5 dager av samme person. For en mer robust indikasjon på den reelle presisjonen ville de ha vært ønskelig å ha mer presisjonsdata tilgjengelig.

5.3.1 Analysetid og injeksjonsvolum for kromatografisk metode B

Når det gjelder tidsbruk ved opparbeidelse vil det ta kortere tid å opparbeide prøver med prøveopparbeidelse 2 og 3 sammenlignet med standardoppsettmetoden.

Standardoppsettmetoden hvor det benyttes fast-fase ekstraksjon har flere trinn enn de andre metodene, er mer omfattende og kun 12 prøver/standard/kontroll kan settes opp samtidig. Dette fører til at det brukes mindre arbeidstid på å utføre opparbeidelse 2 og opparbeidelse 3. Dette gjelder spesielt for prøveserier på mer enn 11 prøver da opparbeidelse med fast-fase ekstraksjon (opparbeidelse 1) vil ta dobbelt så lang tid dersom prøveantallet er større enn dette.

For kromatografisk metode er analysetiden utvidet fra 18,5 minutter for kromatografisk metode A til 25 minutter ved kromatografisk metode B. Dette er fordi mobilfasene og gradient elueringen er endret for å øke separasjonen av porfyrin-isomerene. Den instrumentelle analysen er det som tar lengst tid i analyseprosessen. Tiden fra prøven opparbeides til resultatet frigis i labdatasystemet vil være like lang for alle metodene fordi analysetiden gjør at resultatene først kan vurderes neste arbeidsdag. Dette vil si at en endring av prøveopparbeidelse vil gi en innsparing i tidsbruk, men at total analysetid (opparbeidelse og instrumentell analyse) vil være omtrent lik. Samtidig krever de nye metodene for opparbeidelse mindre avansert utstyr da fast-fase ekstraksjon ikke lenger må utføres.

Igjennom denne studien observeres det at for HPLC analyser er det viktig at injeksjonsvolumet holdes likt for alle prøvene spesielt for metoder hvor det ikke er tilsatt internstandard, som prøveopparbeidelse 2 og prøveopparbeidelse 3. I denne studien er kvantifiseringsgrense og linearitet fastsatt med et standardisert injeksjonsvolum og ved en endring av injeksjonsvolumet vil grensene sannsynligvis endres. For å oppnå en kvantifiseringsgrense med kromatografisk metode B tilsvarende standardoppsettmetoden må man benytte opparbeidelse 3 og injeksjon av 25 µL. For å oppnå samme kvantifiseringsgrense for opparbeidelse 2 er det nødvendig å injisere et høyere volum noe som ikke er testet.

5.4 Separasjon av porfyrin-isomerer

En studie (Macours & Cotton, 2006) beskriver forbedring av en kromatografisk metode hvor 1,0 M ammoniumacetat i vann (pH 5,16) og metanol mobilfase ble benyttet til separasjonen av porfyrin-isomer som uroporfyrin I og uroporfyrin III og koproporfyrin I og koproporfyrin III. Studien beskriver ikke separasjon av heptaporfyrin I og heptaporfyrin III slik som vi har i denne studien. Metoden har separasjon av porfyrin isomerer som for eksempel uroporfyrin I og uroporfyrin III, og det konkluderes med at metoden kan brukes ved analyse av porfyriner i urin, plasma og feces. Analyse av prøver med kromatografisk metode B (ammoniumacetat i vann (pH 5,16) og metanol mobilfase) og opparbeidelse 2 eller opparbeidelse 3 viser separasjon og mulighet for kvantifisering av de samme porfyrin-isomerene på samme måte som er beskrevet i artikkelen (Macours & Cotton, 2006).

5.5 Validitet og reliabilitet i studien

Intern validitet styrkes gjennom korrelasjon mot etablert rutinemetode ved MBF. De ulike porfyrinene ble i tillegg identifisert, og retensjonstiden til de ulike porfyrinene ble bekreftet ved hjelp av isomer stockløsninger. Faktorer som holdbarhet av kalibrator, kontroll og prøver påvirker intern validitet i mindre grad da korrelasjon ble utført for alle metoder samme dag. Urin-kalibrator, kontroll og urinprøver (inkludert de til presisjon analyse) har vært frosset ned og ble vurdert som holdbare i perioden studien pågikk.

Presisjonsforsøket i denne studien ble utført av en person. For å kunne vurdere robustheten til metodene vil det være nødvendig å utføre presisjonsforsøk som involverer flere analytikere. Fordi dette er manuelle metoder hvor variasjon i opparbeidelse og integrering av kromatogrammene kan ha stor innvirkning på resultatene, forventes det at dette vil gjøre at CV øker, og at man får et bedre estimat på variasjonen i analysen dersom den skal settes inn i rutinebruk. Det er vanskelig å vurdere nøyaktigheten til metoden da sertifisert referansemateriell ikke er tilgjengelig. Standardoppsettmetoden kan ikke brukes som referanse for riktighet da denne kalibreres med Chromatographic marker solution hvor det ikke er oppgitt nøyaktig konsentrasjon, og riktigheten til metoden ikke er vurdert på mange år.

Ekstern validitet påvirkes i denne studien av at urinprøvene som er analysert er fra et utvalg av pasienter. Utvalget i studien er fra pasienter med kutan porfyrisykdom hvor totalporfyriner i urin er målt til over 15 nmol/mmol kreatinin med screeningmetode fra Bio-Rad. Da produksjonen av Bio-Rad sin totalporfyrin metode ble lagt ned, og reagenset ved MBF vil ta slutt i 2020, er det mulig at utvalget av prøver som analyseres med kromatografisk metode vil bli endret. Det er ikke besluttet hvilken metode som eventuelt erstatter screeningmetode. I tillegg er det er ulik praksis ved andre porfyrilaboratorier for hvilke pasientgrupper og når porfyriner i urin analyseres med kromatografisk metode.

Store norske leksikon skriver følgende om reliabilitet: «Reliabilitet brukes om konsistens eller stabilitet i målinger»(Frode Svardal, 2020, april 3). Reliabilitet i denne oppgaven innebærer blant annet stabilitet av prøveopparbeidelse og analyse på HPLC instrument. Reliabiliteten til de ulike metodene for opparbeidelse og til kromatografimetodene (inkludert HPLC instrumentene) ble vurdert for hver analyseserie. Systemtester ble innført med vurdering av retensjonstid, areal av analyttene i kalibratoren, trykk i HPLC systemet samt urin kontroll med fastsatte kontrollgrenser (2,2s 1,3s Westgaard kontrollregler) som bidro til godkjenning av hver av analyseseriene. Kontrollgrenser for standardoppsettmetoden som også er rutinemetode ved MBF var allerede utarbeidet, og disse kontrollgrensene ble brukt for alle metodene for opparbeidelse ved analyse på kromatografi metode A. For opparbeidelse 2 og opparbeidelse 3 analysert med kromatografi metode B ble egne kontrollverdier utarbeidet.

6 Konklusjon

I denne studien ble det undersøkt om to enklere metoder for prøveopparbeidelse for porfyriner i urin hadde god nok kvalitet til å kunne benyttes i rutinen ved MBF. Samtidig ble det undersøkt om en endring i kromatografisk metode ville gi samme måleresultater, tilsvarende metodeytelse og mulighet for kvantifisering av porfyrin isomerer.

Når urinkalibrator ble inkludert i konsentrasjonsbestemmelsen gav prøveopparbeidelse 1, prøveopparbeidelse 2 og prøveopparbeidelse 3 lik konsentrasjon og metodeytelse når analysert med kromatografisk metode A. Ved inkludering av markør som kalibrator indikerte Passing-Bablok regresjon og Bland-Altman plot at konsentrasjonen ikke var lik for prøveopparbeidelse 1 sammenlignet med prøveopparbeidelse 2 og prøveopparbeidelse 3. I

snitt lå analyseresultat fra standardoppsettmetoden lavere enn for de andre metodene for opparbeidelse når markør ble benyttet som kalibrator her var gjennomsnittet for prøveopparbeidelse 1 858 nmol/L, for prøveopparbeidelse 2 på 799 nmol/L og for prøveopparbeidelse 3 på 790 nmol/L.

Resultater fra denne studien viser at endring av kromatografisk metode førte til en konsentrasjonsavhengig forskjell og endring i metodeytelse. Sammenligning av de ulike prøveopparbeidelsene viser at analyseresultater fra prøveopparbeidelse 2 og prøveopparbeidelse 3 analysert med kromatografisk metode B ligger i snitt høyere enn for standardoppsettmetoden når urinkalibrator benyttes. Studie av metodeytelse for kromatografisk metode B viste at kvantifiseringsgrensen var tilsvarende standardoppsettmetoden for prøveopparbeidelse 3, mens for prøveopparbeidelse 2 var den noe høyere. Det ble påvist carry-over selv etter tiltak som nålvask og systemvask (vask av sample loop). Carry-over som påvises er i lav konsentrasjon og under kvantifiseringsgrensen.

Studien viser at det er mulig å kvantifisere I- og III-isomerer av porfyriner som uroporfyrin, heptaporfyrin og koproporfyrin. Det kan konkluderes med at både opparbeidelse 2 og opparbeidelse 2 samt kromatografisk metode B kan benyttes til kvantifisering av porfyriner i urin og at metodeytelsen er god nok. Opparbeidelse 3 har lavere kvantifiseringsgrense og opparbeidelsen involverer færre reagenser noe som fører til at det naturlig å anbefale videre utredning av metodeytelse. Presisjonsdata er utført i begrenset omfang og videre tester av innen serie presisjon samt utvidelse av totalpresisjon ved å sette flere personer til å utføre analysene. Antall målinger som er brukt til å se på forskjeller i konsentrasjon er også noe begrenset. Årsaken til at antall målinger er noe lavt er fordi prøvene blir analysert samtidig på samme instrument. Samtidig tar det lang tid å opparbeide prøver med tre ulike metoder for opparbeidelse. Videre kan det være nyttig å utvide korrelasjonen av opparbeidelse 1 mot opparbeidelse 3 analysert på kromatografisk metode B. Det er ikke i denne studien sammenlignet prøvesvar fra analyse med kromatografisk metode B og kalibrering med urinkalibrator mot standardoppsettmetoden og kalibrert med markør. Dette vil være nødvendig å vurdere før eventuelt en av de nye metodene tas i bruk i rutine.

Denne mastergraden er en del av en større studie som også involverer fecesporfyriner. Samtidig viser resultatene i denne masteroppgaven at endring av kalibrator er noe som eventuelt burde vurderes da recovery i dette tilfellet vil være lik for internstandard i både prøver og kalibrator. Ved en endring av prøveopparbeidelse ville det være lettere å ta med flere nivåer av kalibrator ettersom begge prøveopparbeidelsene som er prøvd ut er lettere å utføre.

Referanseliste

- Aarsand, A. K. (2012). *Diagnosing and monitoring the porphyrias*. (Dok). University of Bergen, Bergen, Norway.
- Agilent Technologies usermanuals. (2004). Agilent ChemStation, . In *Understanding your ChemStation* (Vol. 07/09). Germany: Agilent Technologies, Catalog Number G2079-91126, volume 07/09, .
- Baumdicker, F., & Hölker, U. (2020). Method comparison with repeated measurements — Passing–Bablok regression for grouped data with errors in both variables. *Statistics and Probability Letters*, *164*. doi:10.1016/j.spl.2020.108801
- Benton, C. M., Lim, C. K., Moniz, C., & Jones, D. J. (2012). Ultra high-performance liquid chromatography of porphyrins in clinical materials: column and mobile phase selection and optimisation. *Biomedical Chromatography*, *26*(6), 714-719. doi:10.1002/bmc.1720
- Benton, C. M., Lim, C. K., Ritchie, H. J., Moniz, C., & Jones, D. J. L. (2012). Ultra high-performance liquid chromatography of porphyrins. *Biomedical Chromatography*, *26*(3), 331-337. doi:10.1002/bmc.1662
- Bland, J. M., & Altman, D. G. (1999). Measuring agreement in method comparison studies. *Statistical Methods in Medical Research*, *8*(2), 135-160. doi:10.1177/096228029900800204
- Bland, J. M., & Altman, D. G. (2010). Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *International Journal of Nursing Studies*, *47*(8), 931-936. doi:10.1016/j.ijnurstu.2009.10.001
- Bleasel, N. R., & Varigos, G. A. (2000). Porphyria cutanea tarda. *Australas J Dermatol*, *41*(4), 197-206; quiz 207-198. doi:10.1046/j.1440-0960.2000.00437.x
- Bolann, B. J., & Sandberg, S. (2003). Evaluering av nye laboratorieanalyser. *Tidsskrift for Den norske legeforening*, *123*(3), 337-339.
- Clavero, S., Bishop, D. F., Haskins, M. E., Giger, U., Kauppinen, R., & Desnick, R. J. (2010). Feline acute intermittent porphyria: a phenocopy masquerading as an erythropoietic porphyria due to dominant and recessive hydroxymethylbilane synthase mutations. *Human Molecular Genetics*, *19*(4), 584-596. doi:10.1093/hmg/ddp525
- Danton, M., & Lim, C. K. (2006). Porphyrin profiles in blood, urine and faeces by HPLC/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, *20*(6-7), 612-621. doi:10.1002/bmc.656
- European medicines agency, & health, S. m. (2011, juli 21). Guideline on bioanalytical method validation. 192217/2009 Rev. 1. Retrieved from

https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf

- Frode Svardal. (2020, april 3). reliabilitet. Retrieved from <https://snl.no/reliabilitet>
- Gorchein, A., Guo, R., Lim, C. K., Raimundo, A., Pullon, H. W. H., & Bellingham, A. J. (1998). Porphyrins in urine, plasma, erythrocytes, bile and faeces in a case of congenital erythropoietic porphyria (Gunther's disease) treated with blood transfusion and iron chelation: lack of benefit from oral charcoal. *Biomedical Chromatography*, 12(6), 350-356. doi:10.1002/(SICI)1099-0801(199811/12)12:6<350::AID-BMC761>3.0.CO;2-B
- Greibrokk, T. (1994). *Kromatografi*. [Oslo]: Universitetsforlaget.
- Grethe Wibetoe, & Store norske leksikon. (2018, 20 februar). Kromatografi. Retrieved from <https://snl.no/kromatografi>
- Hagve, T. A., & Berg, j. P. (2019). Porfyrisykdommer. In *Klinisk biokjemi og fysiologi* (6. utgave, 1. opplag 2019 ed., pp. 438-444). Oslo: Gyldendal Norsk Forlag.
- Hanneman, S. K. (2008). Design, analysis, and interpretation of method-comparison studies. *AACN Adv Crit Care*, 19(2), 223-234. doi:10.1097/01.AACN.0000318125.41512.a3
- Johnson, P. M., Perkins, S. L., & Kennedy, S. W. (1988). A high-speed liquid-chromatographic method for measuring urinary porphyrins. *Clinical Chemistry*, 34(1), 103-105.
- Karim, Z., Lyoumi, S., Nicolas, G., Deybach, J.-C., Gouya, L., & Puy, H. (2015). Porphyrins: A 2015 update. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 39(4), 412-425. doi:<https://doi.org/10.1016/j.clinre.2015.05.009>
- Lundanes, E., & Greibrokk, T. (2013). *Chromatography, Basic principles, sample preparations and related methods*: Wiley.
- Lundanes, E., Raubsæet, L., & Greibrokk, T. (2013). *Chromatography*: Wiley.
- Macours, P., & Cotton, F. (2006). Improvement in HPLC separation of porphyrin isomers and application to biochemical diagnosis of porphyrias. *Clin Chem Lab Med*, 44(12), 1433-1440. doi:10.1515/CCLM.2006.266
- Miller, J. N., & Miller, J. C. (2000). *Statistics and chemometrics for analytical chemistry* (4th ed. ed.). Harlow: Pearson Prentice Hall.
- Norsk Klinisk Kvalitetskontroll NKK. (Februar 2002). Validering/verifisering av klinisk kjemiske analyser, Klinisk nytte – praktisk egnethet – analytisk kvalitet In (Vol. 2017).
- Phenomenex. (2020, mai 25). SPE Vacuum Manifold and Pump Recommendations. Retrieved from file:///C:/Users/linel/Downloads/SPE%20Vacuum%20and%20Pump%20Setup%20(2).pdf
- Rekvisisjonsskjema Porfyrisykdommar (versjon 5: 24.05.2019)*. Bergen: Avdeling for medisinsk biokjemi og farmakologi Retrieved from <https://helse-bergen.no/seksjon/Napos/Documents/Rekvisisjonsskjema%20for%20porfyrianalyser.pdf>
- Rimington, C. (1960). Spectral-absorption coefficients of some porphyrins in the Soret-band region. In (pp. 620-623). London.
- Rimington, C., & Sveinsson, S. L. (1950). The spectrophotometric determination of uroporphyrin. In (pp. 209-216). [Oslo, Norway] :
- Salvatore, F. (2013). *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*: United States: Elsevier.
- Sandoval R, M. (2017). *Extraction of Phorbol Esters (PEs) from Pinion cake using computationally-designed polymers as adsorbents for Solid Phase Extraction*.
- Sarkany, R. P. (2008). Making sense of the porphyrias. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 24(2), 102-108. doi:10.1111/j.1600-0781.2008.00336.x
- Westgard QC. (n.d.). "Westgard Rules" and Multirules Retrieved from <https://www.westgard.com/mltirule.htm>
- Zuijderhoudt, F. M., Koehorst, S. G., Kluitenberg, W. E., & Dorresteyn-de Bok, J. (2000). On accuracy and precision of a HPLC method for measurement of urine porphyrin concentrations. *Clin Chem Lab Med*, 38(3), 227-230. doi:10.1515/CCLM.2000.033

Vedlegg

Vedlegg 1 Framleggingsvurdering fra REK

Emne: Sv: Sammenligning av metoder for prøveopparbeidelse og kromatografi for fraksjonering av porfyriner i urin og feces.

Fra: post@helseforskning.etikkom.no

Dato: 27.11.2018 13:30

Til: phri@helse-bergen.no

Kopi:

Vår ref. nr.: 2018/2284

Prosjekttittel: "Sammenligning av metoder for prøveopparbeidelse og kromatografi for fraksjonering av porfyriner i urin og feces."

Prosjektleder: Philip Webber

Til Philip Webber.

Vi viser til Framleggingsvurdering innsendt 02.11.2018. REK vest ved leder vurderte saken.

Dette prosjektet skal bruke restmateriale fra diagnostiske prøver for å teste ut en forbedret metode for analyse av porfyriner i urin og feces. Resultatene skal presenteres som en innerrapport i Helse Bergen og som en masteroppgave.

Vurdering

Helseforskningsloven gjelder for medisinsk og helsefaglig forskning på mennesker, humant biologisk materiale eller helseopplysninger, jf. hfl § 2. Medisinsk og helsefaglig forskning defineres som virksomhet som utføres med vitenskapelig metodikk for å skaffe til veie ny kunnskap om helse og sykdom, jf. hfl § 4.

I Helse- og omsorgsdepartementets veileder til helseforskningsloven, kapittel 2.4, defineres kvalitetssikring som "prosjekter, undersøkelser, evalueringer o.l. som har som formål å kontrollere at diagnostikk og behandling faktisk gir de intenderte resultater".

REK vest legger vekt på at resultatene av prosjektet, bortsett fra masteroppgaven, er for intern bruk i helseforetaket. REK vest vurderer derfor prosjektet som intern kvalitetssikring som ikke trenger å søke REK. Jeg gjør oppmerksom på at konklusjonen er veiledende, jf. forvaltningsloven § 11.

Komiteen tar dette til orientering.

Med vennlig hilsen

Jessica Svård

rådgiver

post@helseforskning.etikkom.no

T: 55978497

**Regional komité for medisinsk og helsefaglig
forskningsetikk REK vest-Norge (REK vest)**

<http://helseforskning.etikkom.no>

Vedlegg 2 Uttalelse fra personvernombudet



Philip Richard Webber
Haukeland Universitetssykehus/Laboratorieklinikken
Philip Richard Webber

Deres ref:

Vår ref:
2019/B927

Saksbehandler
Christer Kleppe, 55975558

Bergen,
19. mars 2019

Uttalelse fra personvernombudet

Viser til innsendt melding om behandling av personopplysninger i prosjektet
«Sammenligning av metoder for prøveoppbeidelse og kromatografi for fraksjonering av porfyriener i urin og feces».

Informasjon om prosjektet blir registrert i Helse Bergen HF sin offentlige protokoll over pågående prosjekter.

Personvernombudet har ikke innvendinger til at prosjektet gjennomføres gitt at forutsetningene nedenfor er oppfylt og prosjektet gjennomføres i samsvar med foretakets interne rutiner.

Vær oppmerksom på at personvernombudets uttalelse er veiledende. Helse Bergen HF, utførende avdeling og prosjektleder har en plikt til å sikre at personopplysninger behandles lovlig og i samsvar med interne rutiner.

Manglende etterlevelse av interne rutiner skal håndteres som avvik, og ut fra omstendighetene i den konkrete saken kan avvik utløse varslingsplikt til Datatilsynet, Helsetilsynet og evt. også andre offentlige myndigheter.

Formål og rettsgrunnlag:

I meldeskjema er det angitt at formålet med behandlingen av personopplysninger er intern kvalitetssikring i samsvar med helsepersonelloven § 26.

Helsepersonelloven § 26 gir et begrenset rom for å behandle pasientopplysninger uten hinder av taushetsplikten dersom det er nødvendig for å gjennomføre kvalitetssikring på oppdrag fra ledelsen.

Dersom databehandlingen i dette prosjektet utelukkende har til formål å gjennomføre lovpålagt kvalitetssikring etter oppdrag fra ledelsen, legger personvernombudet til grunn at

§ 26 får anvendelse. Rettsgrunnlag for databehandlingen vil da være pasientjournalloven § 6 og personvernforordningen artikkel 6(1)(c) og art. 9(2)(h).

Dersom prosjektet ikke gjennomføres etter oppdrag fra ledelsen, eller dersom personopplysninger også skal brukes for formål som går utover det formålet som er bestemt av ledelsen, må det søkes et eget rettsgrunnlag for denne delen av databehandlingen. Dersom det skulle være aktuelt, er det sannsynlig at det må innhentes samtykke fra de registrerte, eller vedtak om dispensasjon fra taushetsplikten fra REK.

Kort om helsepersonelloven § 26:

Helsepersonelloven § 26 gir helsepersonell adgang for å gi informasjon til ledelsen til bruk for intern kvalitetssikring initiert av ledelsen. Opplysningene skal så langt det er mulig gis uten individualiserende kjennetegn.

Som utgangspunkt bør bare helsepersonell med ansvar for pasient, eller helsepersonell med faglig ansvar for forløpet behandler identifiserbare pasientopplysninger.

Dersom annet personell skal behandle pasientopplysninger, f.eks. i forbindelse med kvalitetssikring, forutsettes ansvarlig leder å ha vurdert om de aktuelle personene har tjenstlig behov for tilgang til identifiserbare opplysninger og evt. autorisere prosjektmedarbeidere for tilgang til opplysninger som er nødvendige for å gjennomføre prosjektet.

Dersom det er grunn til å tro at pasienter ville motsette seg at noen prosjektmedarbeidere får tilgang til deres opplysninger til bruk for prosjektet, skal de aktuelle pasientene spørres først.

Kort om grensedragningen mot forskning:

Grensedragningen mellom intern kvalitetssikring som kan gjøres uten hinder av taushetsplikten og annen forskning kan i mange tilfeller være uklare. REK kan gi uttrykk for at prosjekter er intern kvalitetssikring, uten at de kjenner til om prosjektet har en slik forankring i sykehuset som kreves for at helsepersonelloven § 26 skal få anvendelse.

I noen grad er det et spørsmål om hvem som «eier» prosjektet, og som bestemmer formålet og virkemidlene ved gjennomføringen av prosjektet. Det fremgår av prosjektbeskrivelsen del av en masteroppgave ved Universitetet i Bergen. Det fremkommer det også at det er søkt om forskningsmidler for prosjektet. Det er ikke dermed sagt at prosjektet ikke kan gjennomføres som intern kvalitetssikring, men bare dersom prosjektet eies av ledelsen i sykehuset, og at personopplysninger ikke behandles på en annen måte enn hva som ellers ville vært gjort som ledd i intern kvalitetssikring. Dersom personopplysninger skal behandles på en annen måte, f.eks. dersom de skal deles med flere, dersom det samles inn mer informasjon, eller dersom opplysninger skal lagres lengre enn hva som var nødvendig for å ivareta ledelsen sitt behov for en rapport om metoden som evalueres, må det gjøres en egen vurdering for den delen av databehandlingen.

Dataminimering og lagringsbegrensning:

Det skal behandles begrenset med personopplysninger i prosjektet, og prosjektet har relativt kort lagringstid. All informasjon skal behandles avidentifisert. Personvernombudet legger til grunn at krav til dataminimering og lagringsbegrensning kan anses ivarettatt.

Integritet, konfidensialitet og riktighet:

I meldeskjema er det angitt at personopplysninger skal lagres på avdelingens fellesområder. Det er ikke i samsvar med interne rutiner i Helse Bergen HF. Fellesområdet gir generelt dårligere garantier for ivaretagelsen av krav til integritet, konfidensialitet og riktighet, og personvernombudet fraråder derfor at personopplysninger fra pasienter lagres der. Kvalitetsserveren forutsettes å kunne brukes for gjennomføringen av prosjektet.

Biologisk materiale:

Det forutsettes at biologisk materiale som brukes i prosjektet er innhentet som ledd i ordinær klinisk virksomhet, og at materialet inngår i diagnostisk biobank. Det forutsettes også at det ikke tas prøver fra pasienter utover det som ellers ville vært gjort. Endelig forutsettes at prosjektet ikke medfører at biologisk materiale lagres for en lengre periode enn hva som ville vært gjort dersom prosjektet ikke var planlagt gjennomført. Prosjektleder er informert om at utvidet lagring av biologisk materiale fra diagnostisk biobank kan utløse behov for opprettelse av prosjektspesifikk biobank med egen godkjenning fra REK.

Prosjektslutt:

Prosjektleder og ansvarlig avdeling i Helse Bergen HF forutsettes å selv sikre at prosjektet avsluttes og at alle innsamlede opplysninger slettes innen angitt prosjektslutt dato.

Videre forutsettes det at prosjektleder og ansvarlig avdeling kan sikre at biologisk materiale håndteres i samsvar med godkjenning for diagnostisk biobank, og at det søkes REK om godkjenning for prosjektspesifikk biobank dersom biologisk materiale i den grad det skulle være nødvendig. Urettmessig lagring av biologisk materiale kan utløse varslingsplikt til helsetilsynet.

Generelle forutsetninger for gjennomføringen av intern kvalitetssikring:

1. Avdelings-/klinikkdirektør som har besluttet at dette prosjektet skal gjennomføres for å sikre kvaliteten på tjenestetilbudet internt.
2. Opplysninger skal bare samles inn og behandles i den grad det er nødvendig for å ivareta formålet med prosjektet.
3. Behandling av helse- og personopplysningene skjer i samsvar med og innenfor det formål som er oppgitt i meldingen.
4. Tilgangen til registeret skjer i overensstemmelse med taushetspliktbestemmelsene.
5. Data som ikke kan behandle anonymt lagres avidentifisert på helseforetakets Kvalitetsserver. [Søknadskjema](#) sendes til Helse Vest IKT AS.
6. Annen elektronisk lagringsform forutsetter gjennomføring av en risikovurdering som må godkjennes av foretakets IKT-sikkerhetsleder/personvernombud.
7. Kryssliste som kobler avidentifiserte data med personopplysninger lagres enten elektronisk på tildelt område på Kvalitetsserveren eller nedlast på prosjektleders kontor.

8. Data slettes eller anonymiseres (ved at krysslisten slettes) senest innen prosjektslutt. Når formålet med registeret er oppfylt sendes melding om bekreftet sletting til personvernombudet.
9. Prosjektet kvalifiserer ikke som medisinsk- og helsefaglig forskning slik det er definert i helseforskningsloven, men kan bli publisert som "sykehusets erfaring" eller i "quality improvement reports", som for eksempel i British Medical Journal. Du kan be om å få en bekreftelse fra Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK) om at prosjektet ikke er fremleggingspliktig, dersom dette kreves av tidsskriftet. *Som følge av REK sin praksis, bør slik forespørsel rettes til REK før prosjektet begynner.*
10. Dersom det senere blir aktuelt å forske på det innsamlede materialet, må det søkes om godkjenning fra REK før forskningen starter, se <http://forskning.ihelse.net>.
11. Dersom formålet eller databehandlingen endres må personvernombudet informeres om dette.

Vennlig hilsen



Christer Kleppe
Personvernombud
Helse Bergen HF

Kopi til:
Gunnar Mellgren
Anne Grete Sælen Thue

Vedlegg 3: Bio-bank

Andersen, Line Lerpold

Fra: Aasgaard, Karoline <Karoline.Aasgaard@fhi.no>
Sendt: mandag 3. desember 2018 12:41
Til: Andersen, Line Lerpold; Aarsand, Aasne Karine
Kopit: biobankregisteret
Emne: Opprettelse av diagnostikk-/behandlingsbiobank 3270 Forbedring av prøveoppbevaring og analyse for porfyrianalyser, Helse Bergen, Haukeland Universitetssykehus, Avd. for medisinsk biokjemi og farmakologi (MBF)

Oppfølgingsflagg: Følg opp
Status for flagg: Flagg et

Hei

Jeg bekrefter her ved at **biobank 3270 Forbedring av prøveoppbevaring og analyse for porfyrianalyser, Helse Bergen, Haukeland Universitetssykehus, Avd. for medisinsk biokjemi og farmakologi (MBF)** er opprettet og publisert i biobankregisteret.

Takk for registreringen, og ikke nøl med å ta kontakt hvis dere skulle ha spørsmål knyttet til registeret.

Informasjon om diagnostikk- og behandlingsbiobank nr. 3270

Navn	Forbedring av prøveoppbevaring for porfyrianalyser, Helse Bergen, Haukeland Universitetssykehus, Avd. for medisinsk biokjemi og farma (MBF)
Biobanknummer	3270
Ansvarshavende person	Aasne K. Aarsand E-post: aasne.aarsand@helse-bergen.no Tlf: <i>Ikke oppgitt</i>
Ansvarshavende institusjon	Haukeland universitetssykehus
Avdeling	Avdeling for medisinsk biokjemi og farmakologi
Databehandler	<i>Databehandler er samme som Ansvarshavende institusjon</i>
<hr/>	
Årstall for opprettelse	2018
Biobankens varighet	2021
<hr/>	
Finansiering	Offentlig finansiering
Hva skjer med materialet ved opphør av biobanken	Anonymiseres
Hvordan materialet innhentes	Fra levende donorer
Hvordan samtykke er innhentet	Presumptivt samtykke ved at person har samtykket til behandling
Sikkerhetstiltak ved biobankfasilitet	Sertifisert/akkreditert laboratorium
Sikkerhetstiltak for oppbevaring av biologisk materiale	Åpen fryser/enhet i rom med tilgangskontroll
Antall personer	0-100

Vennlig hilsen

Karoline Aasgaard
Seniorrådgiver

Avdeling for helseundersøkelser
Folkehelseinstituttet
Postadresse: Folkehelseinstituttet Postboks 222 Skøyen 0213 Oslo
Besøksadresse: Sandakerveien 24 C 0473 Oslo
Tlf: 21 07 70 00
Tlf. dir: 21 07 81 29
www.fhi.no
karoline.aasgaard@fhi.no



Appendix

Mobilfase

1,0 M Ammoniumacetat buffer (pH 5,16)

- 154,16 g ammoniumacetat, pro analysi (NH₄Ac, Merck 1.01116) løses i ca 1600 mL ddH₂O
- pH justeres til 5,16 med eddiksyre, pro analysi 100 % (CH₃COOH, Merck 1.00063) ved hjelp av SensION™+ MM340 pH-meter.
- Etterfylles med destillert H₂O til 2000 mL i målekolbe.
- Oppbevares i kjøleskap.

0,1 % Trifluoreddiksyre

- Fyll en 1000 mL målekolbe nesten full med dd H₂O
- Tilsett en ampulle (1 gram) TFA (Trikloroacetic acid) (PIERCE 28902).
- Fyll opp til merket med dd H₂O.

50 % Metanol

- Tilsett 100 mL metanol, Optima LCMS grade (Fisher Chemicals A456-212)
- Tilsett 100 mL med dd H₂O og bland.
- Nylages hver måned.

Løsninger brukt ved opparbeidelse

0,1 M fosfatbuffer

- Vei opp 26,7 g natriumdihydrogenfosfat-monohydrat (Merck 1.06346) og løs i ca. 1500 mL H₂O.
- Juster pH til 3,5 med 0,1 M Orto-Fosforsyre (H₃PO₄ 85%, Merck 1.00573)
- Overfør til målekolbe og fyll opp til 2000 mL
- Filtrer med millipore 0,45 µM filter og vannsug

7 M saltsyre (HCl)

- Tilsett 300 mL destilert vann i målekolbe
- Tilsett 583 mL HCl
- Fyll opp til 1000 mL med destillert vann
-

20% trikloreddiksyre (TCA)

- Vei inn 20,00 g TCA og løs opp i destillert H₂O
- Overfør til målekolbe og fyll opp med destillert H₂O til totalvolum på 100 mL.

3 M saltsyre (HCl)

- Tilsett 500 mL H₂O i målekolbe
- Tilsett 248 mL Saltsyre (HCl, merck ???)
- Fyll opp til 1000 mL med destilert H₂O

1,0 M Natriumhydroksid (NaOH)

Vei opp 4 g NaOH perler (Merck 1.06498) og løs i 100 mL destillert H₂O.

0,01 M Natriumhydroksid (NaOH)

Tilsett 5 mL av 1,0 M NaOH og fyll opp til 500 mL med H₂O

Utstyr

Utstyr som HPCL vialer og korker, glassutstyr, plast kopper (1,5 mL) og plastrør med skrukort er vurdert i forhold til bruk med saltsyre, Triklorediksyre, dimetylsulfoksid, metanol og fosfatbuffer. Plast brukt i opparbeidelse av urin er laget av polypropylen og tåler løsningene benyttet i opparbeidelsen.

Tabell XXII. Utstyr

Utstyr
Brune glass reagensrør
Culture tubes 7x75 mm
Engangsrør med skrukork (gul kork), 25 mL
Konisk rør med skrukork, 15 mL
Mikrorør, 2 mL
Bond Elut SPE kolonner C8, 200 mg fra Varian
Reservoar til SPE kolonner
Chromacol prøverør (2-CV) og aluminiumskork (cremp caps) (11-AC-ST15)
Aluminiumsfolie
Finnpipette 5–40 µL
Finnpipette 40–200 µL
Finnpipette 200–1000 µL
Finnpipette 1–5 mL
IKA Minishaker
Vekt Mettler AE 163
Vekt Mettler Toledo
Målekolber
Målesylindre
Begerglass
Glassflasker
Milli-Q

Anlegg for destillert vann
pH-meter Sension MM340 pH METER
Millex-HA filter (millipore), 0,45 µm

Instrumenter:

Agilent 1100 HPLC består av delene:

Instrument del	Modul nr
Degasser:	G1322A
Pumpe:	G1311A
Autosampler:	G1329A
ALS termostat:	G1330A
Kolonnetermomodul:	G1316A
Detektor:	L-7485 FL
Agilent Interface 35900E:	

Agilent 1200 HPLC består av delene: Modul nummer

Pumpe/degasser (Quaternary Pump):	VL G1311C:
Autosampler:	ALS G1329B:
Termostat:	G1330B:
Kolonnetermomodul	TCC G1316A:
Detektor	FLD G1321B:

pH meter: SensION™+ MM340 pH-meter

vakuumpumpe med SPE manifold

Kjemikalier

Tabell XXIII: Kjemikalier brukt i oppgaven

Reagensnavn	Leverandør og produktnr.
Saltsyre 37 %, pro analysis (HCl)	WVR, Merck 1.00317
Natriumhydroksid-perler (NaOH)	WVR, Merck 1.06498
Kaliumhydroksid-perler (KOH)	WVR, Merck 1.05033
Ortho-Fosforsyre 85 % (H ₃ PO ₄)	WVR, Merck 1.00573
Natriumdihydrogenfosfat-monohydrat (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	WVR, Merck 1.06346
N,N-Dimetylformamid (DMF)	WVR, Merck 1.10983
Metanol, Optima LC/MS grade (MEOH)	Fisher Scientific, 11473493
Ammoniumacetat, pro analysis (NH ₄ Ac)	WVR, Merck 1.01116
Triklorediksyre (TFA)	WVR, Pierce 28902
Dimetylsulfoksid (DMSO)	WVR, Merck 1.02952

Acetonitril, HPLC grade (ACN)	Fisher Scientific, 11499292
Triklorediksyre (TCA)	VWR,

Tabell XXIV: Tørrstoff av porfyriner til tillaging av stockløsninger

Reagens	Produsent	Ordrenr.
Uroporfyrin I dihydroklorid	Frontier Scientific	U830-1
Uroporfyrin III dihydroklorid	Frontier Scientific	U830-3
Pentakarboksyloporfyrin I dihydroklorid	Frontier Scientific	P769-ID
Heksakarboksyloporfyrin I dihydroklorid	Frontier Scientific	H827-ID
Heptakarboksyloporfyrin I dihydroklorid	Frontier Scientific	H885-ID
Koproporfyrin I dihydroklorid	Frontier Scientific	C654-1
Koproporfyrin III dihydroklorid	Frontier Scientific	C654-3
Deuteroporphyrin IX dihydroklorid	Frontier Scientific	D510-9
Protoporphyrin IX dihydroklorid	Frontier Scientific	P562-9

Ekstinksjonskoeffisienter ($E_{\mu\text{M}}$)

Tabell XXV: Oversikt ekstrinksjonskoeffisienter

Porfyrin	Fortynn i	Topp/nm	Ekstinksjonskoeffisient ($E_{\mu\text{M}}$) $10^{-6} \epsilon (\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$
Uroporfyrin I dihydroklorid Uroporfyrin III dihydroklorid	0,5 M HCl	405	0,541
Heptakarboksyloporfyrin I dihydroklorid	0,5 M HCl	404	0,528
Heksakarboksyloporfyrin I dihydroklorid	0,5 M HCl	403	0,515
Pentakarboksyloporfyrin I dihydroklorid	0,1 M HCl	401	0,502
Koproporfyrin I dihydroklorid Koproporfyrin III dihydroklorid	0,1 M HCl	400	0,489
Deuteroporphyrin IX dihydroklorid	0,1 M HCl	398	0,433
Protoporphyrin IX dihydroklorid	2,7 M HCl	409	0,262

For ekstinksjonskoeffisienter er det valgt å bruke de som er i bruk ved MBF ved HUS (Rimington, 1960; Rimington & Sveinsson, 1950)

Ekstinksjonskoeffisient for heptaporfyrin, heksaporfyrin og pentaporfyrin er ikke litteratur og er derfor estimert ved lineær regresjon mot antall karboksylsyrer i isomerene og molar absorpsjon av uroporfyrin og koproporfyrin. Koproporfyrin III er regnet ut fra koproporfyrin I.

Konsentrasjon og renhet til stockløsninger

Tabell XXVIII: Konsentrasjon og renhet av stockløsninger

Porfyrin	Konsentrasjon (µM)	Porfyriner tilstede	VIS (403 nm) distribusjon/%	Faktisk konsentrasjon
Uroporfyrin I dihydroklorid	195,9	Uro I Uro III	94,9 3,9	185,9 7,6
Uroporfyrin III dihydroklorid	190,9	Uro III Uro I	89,1 6,1	170,1 11,6
Heptakarboksyldiuroporfyrin I dihydroklorid	259,3	Hepta I Heksa I (cis+trans)	98,7 0,49	255,9 1,3
Heksakarboksyldiuroporfyrin I dihydrochloride	246,0	Heksa I (cis+trans) Hepta I	97,4 0,15	239,7 0,4
Pentakarboksyldiuroporfyrin I dihydroklorid	252,3	Penta I	78,0	196,9
Koproporfyrin I dihydroklorid	239,9	Copro I Copro III	97,4 2,5	233,6 6,0
Koproporfyrin III dihydroklorid	245,2	Copro III Copro I	94,8 0,2	232,4 0,5

Linearitet

Tabell XXVII: Oversikt over tillaging av løsninger til linearitetsforsøk

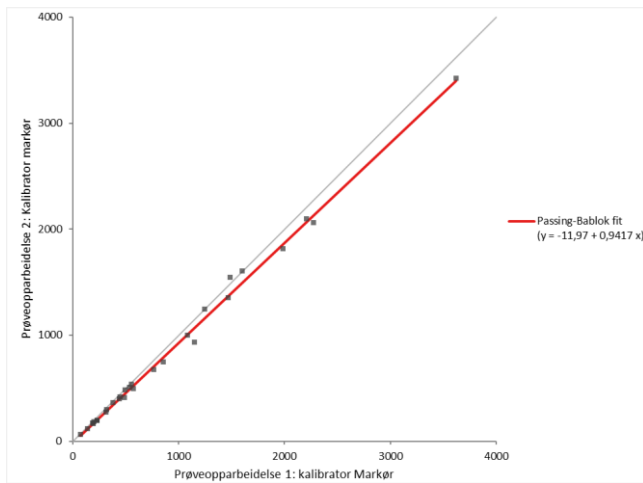
Fortynning til lavere konsentrasjoner	Høy prøve mL	Normal urin mL	
Løsning 1	4	1,00	
Løsning 2	3	2,00	
Løsning 3	2	3,00	
Løsning 4	1	4,00	
Løsning 5	0,2	4,80	
Løsning 6	0,05	4,95	
Løsning 7	0,02	4,98	
Total volum μL	10,27	24,73	
	Tilsetter i urin (μL)	Kons. Løsning 0 nmol/L	Lot nr
Stockløsning:			
Uroporfyrin I	55,0	546,2	URO-S-1
Uroporfyrin III	60,0	531,3	PPSS-003
Heptaporfyrin I	80,0	1024,5	PPSS-003
Hexaporfyrin I	45,0	544,4	PPSS-003
Pentaporfyrin I	55,0	541,5	PPSS-003
Koproporfyrin I	45,0	526,6	PPSS-003
Koproporfyrin III	45,0	536,6	PPSS-003
Normal urin	19615		
Totalt volum stockløsning	385,0		

Oversikt holdbarhet av løsninger

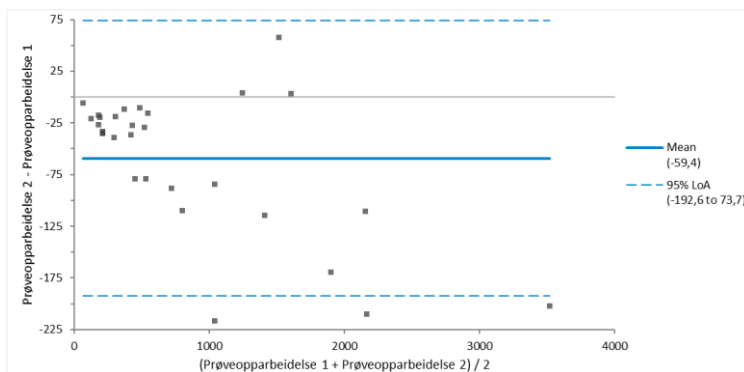
Tabell XXIX: Holdbarhet

	Holdbarhet	Temperatur
0,1 % Trifluoreddiksyre	2 måneder	4-8 °C
1,0 M Ammoniumacetat buffer (pH 5,15)	2 måneder	4-8 °C
0,1 M Fosfatbuffer	2 måneder	4-8 °C
0,1 M HCL	1 år	18-24 °C
Intern kvalitetskontroll	2 år	-80 °C
Urinkalibrator	2 år	-80 °C
Stockløsninger	2 år	4-8 °C
20 % Triklorediksyre	1 år	4-8 °C
Chromatographic marker kit løst i HCl	3 måneder	4-8 °C
Markør	8 timer 24 timer	18-24 °C 8 °C

Passing-Bablok regresjon og Bland-Altman plot kromatografi metode A kalibrert med markør



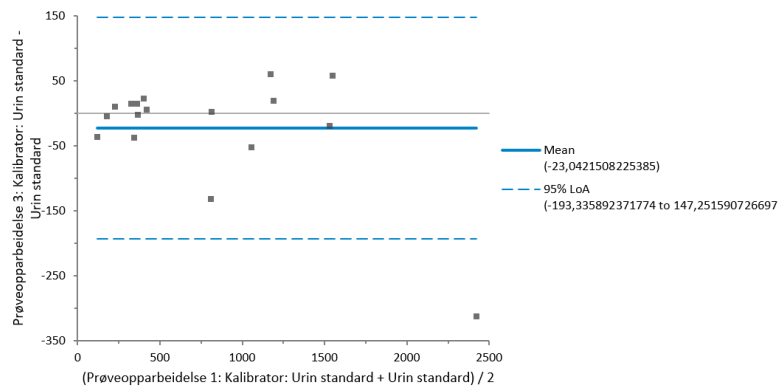
Figur 26: Passing bablok for totalporfyrin (prøveopparbeidelse 1 vs prøveopparbeidelse 2)



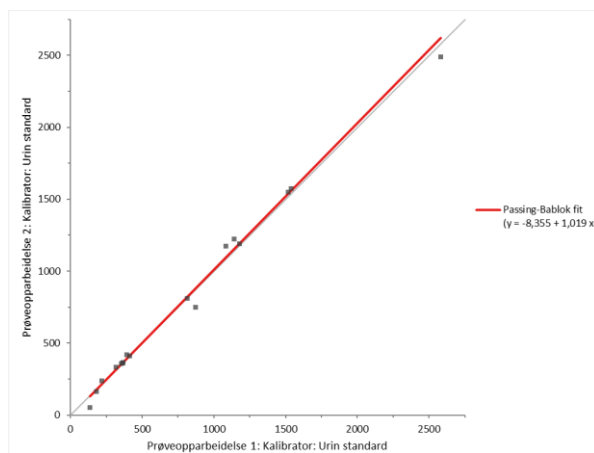
Figur 27: Bland-Altman for totalporfyrin (prøveopparbeidelse 1 vs prøveopparbeidelse 2)

Passing-Bablok regresjon og Bland-Altman plot for kromatografi metode A kalibrert med urinkalibrator

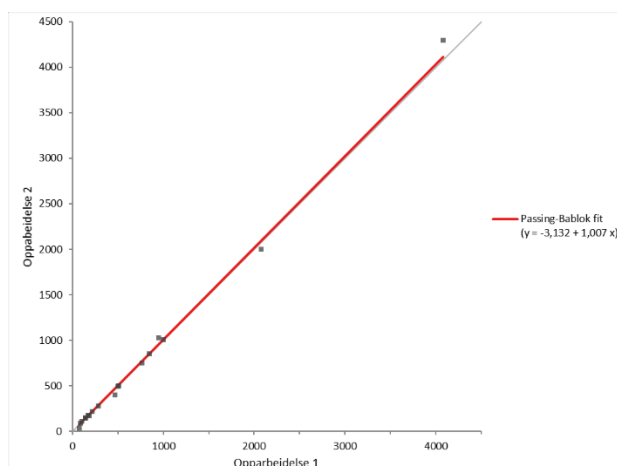
Dataene som Passing-Bablok regresjons plottene under er basert på er regnet ut i nmol/L.



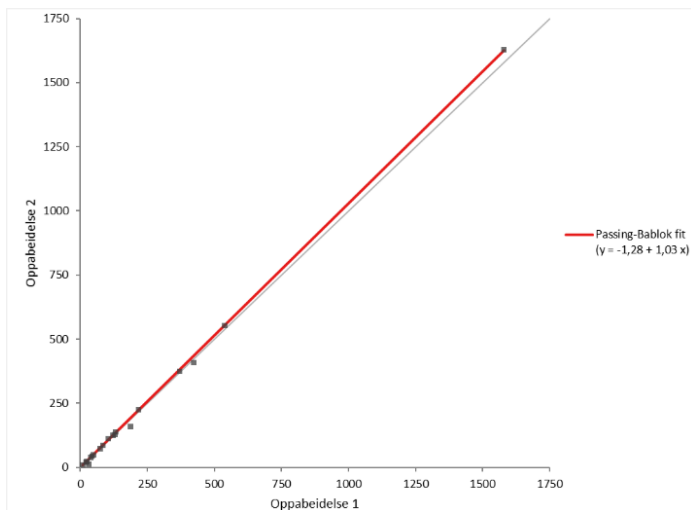
Figur 28: Bland-Altman plot for totalporfyrin (prøveopparbeidelse 1 vs prøveopparbeidelse 2)



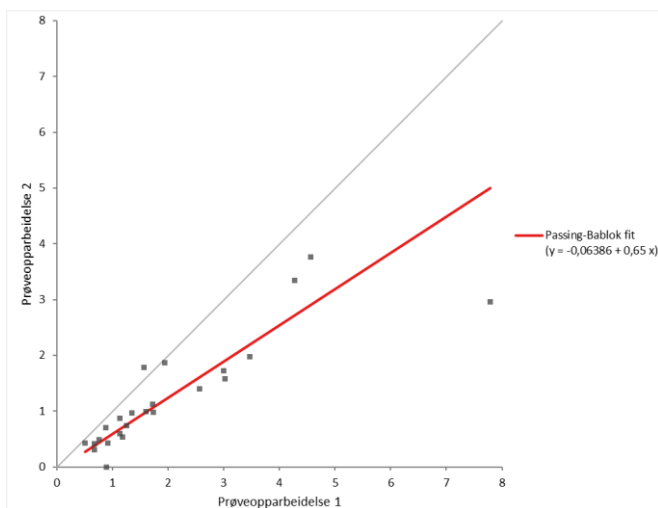
Figur 29: Totalporfyriner (prøveopparbeidelse 1 vs prøveopparbeidelse 2)



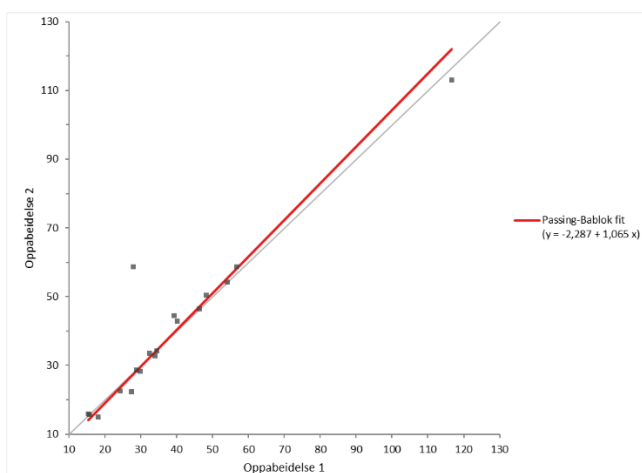
Figur 30: Uroporfyrin (prøveopparbeidelse 1 vs prøveopparbeidelse 2)



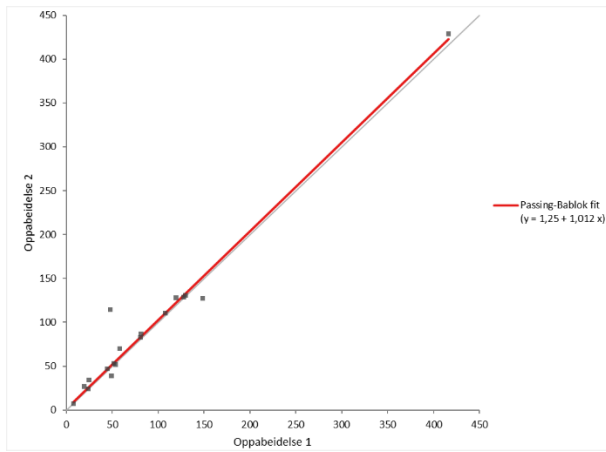
Figur 31: Heptaporfyryn (Prøveopparbeidelse 1 vs prøveopparbeidelse 2)



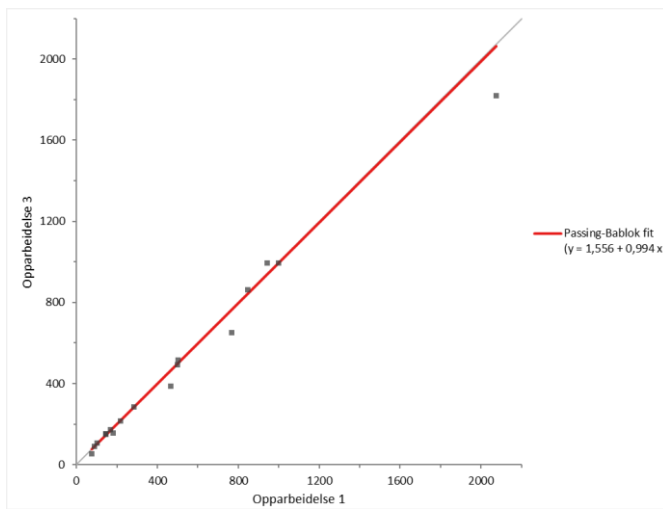
Figur 32: Pentaporfyryn I (Prøveopparbeidelse 1 vs prøveopparbeidelse 2)



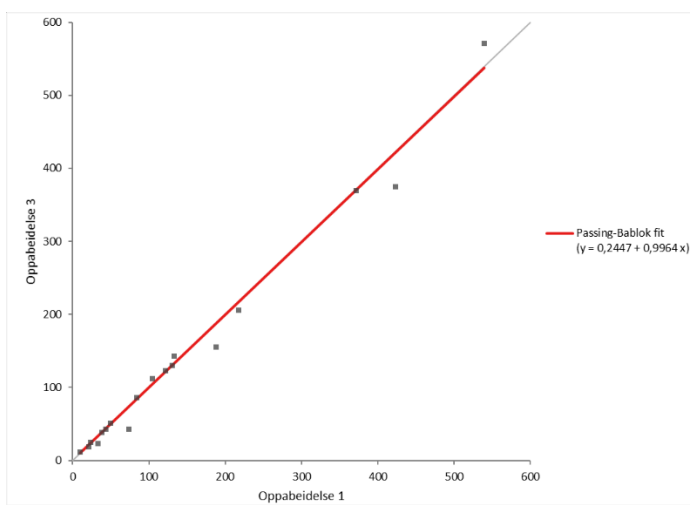
Figur 33: Koproporfyryn I (Prøveopparbeidelse 1 vs prøveopparbeidelse 2)



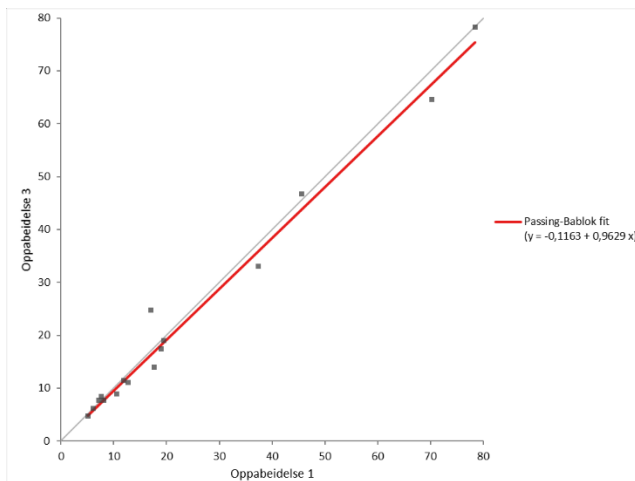
Figur 34: Koproporfyrin III (Prøveopparbeidelse 1 vs prøveopparbeidelse 2)



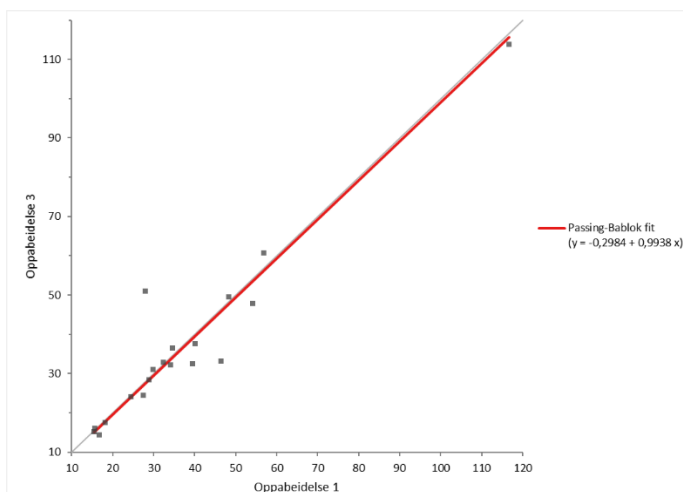
Figur 35: Uroporfyrin (prøveopparbeidelse 1 vs prøveopparbeidelse 3)



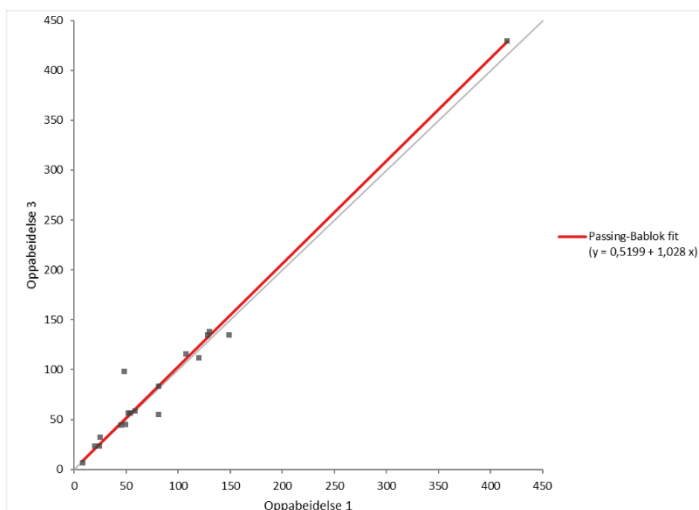
Figur 36: Heptaporfyrin (prøveopparbeidelse 1 vs prøveopparbeidelse 3)



Figur 37: Pentaporfyrin (prøveopparbeidelse 1 vs prøveopparbeidelse 3)

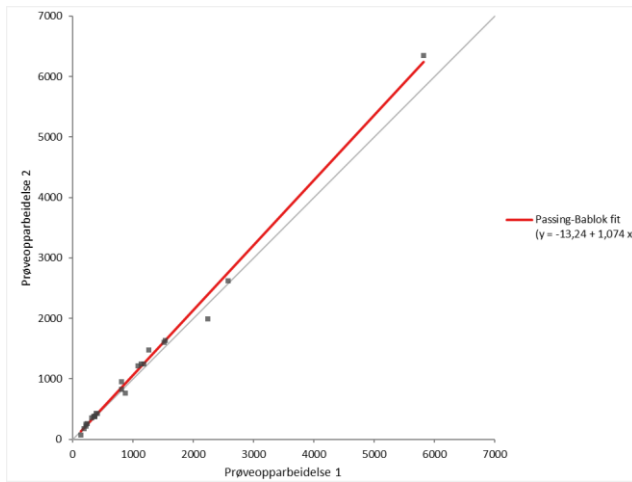


Figur 38: Koproporfyrin I (prøveopparbeidelse 1 vs prøveopparbeidelse 3)

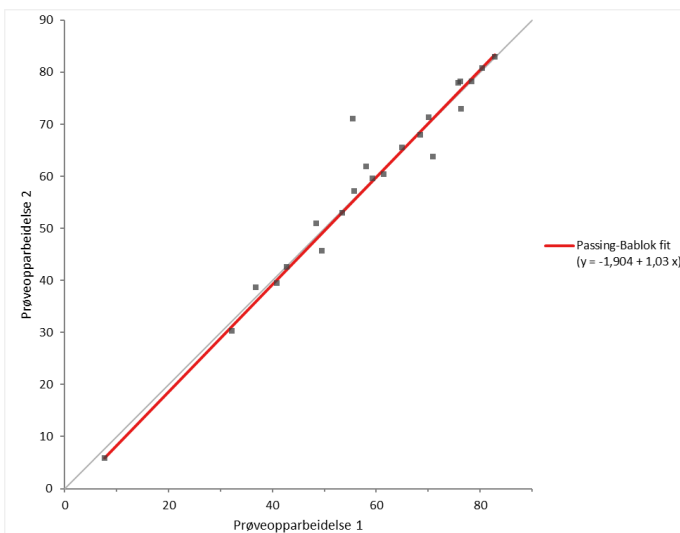


Figur 39: Koproporfyrin III (prøveopparbeidelse 1 vs prøveopparbeidelse 3)

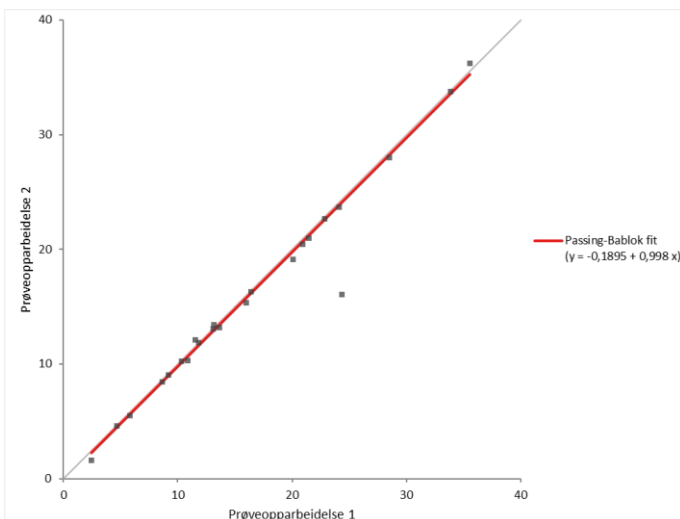
Passing-Bablok regresjon for kromatografi metode B kalibrert med urinkalibrator



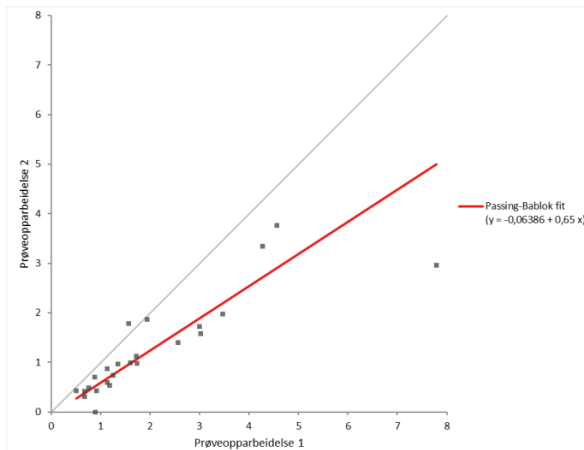
Figur 40: Totalporfyrin (prøveopparbeidelse 1 vs prøveopparbeidelse 2)



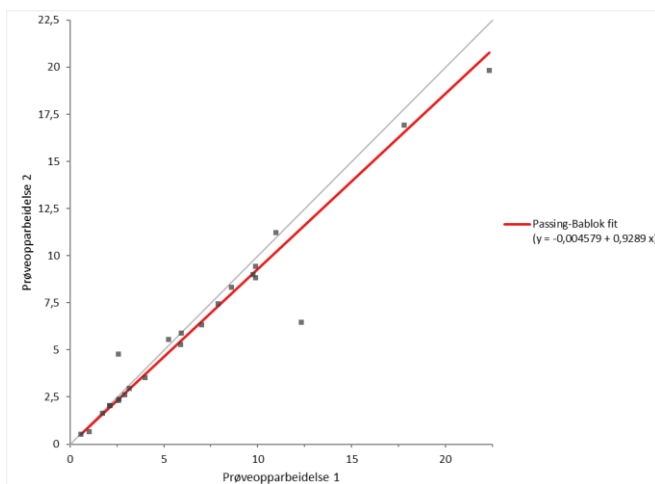
Figur 41: Uroporfyrin (Prøveopparbeidelse 1 vs 2)



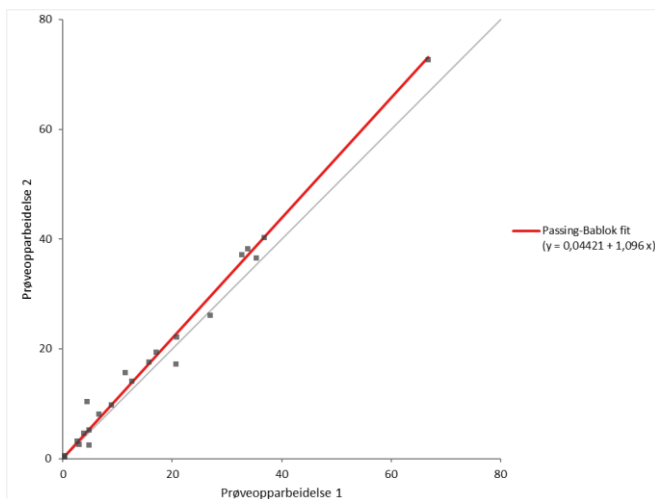
Figur 42: Heptaporfyrin (Prøveopparbeidelse 1 vs 2)



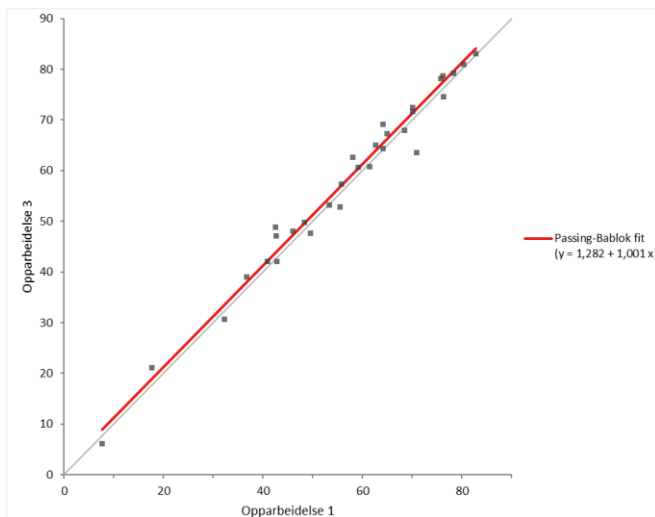
Figur 43: Pentaporfyrin (Prøveopparbeidelse 1 vs 2)



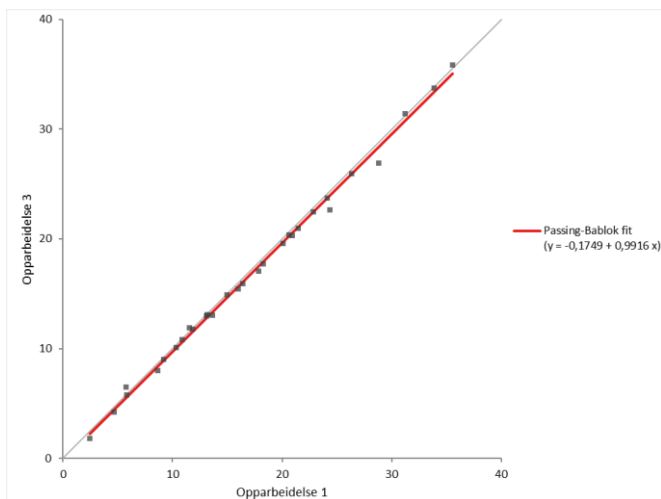
Figur 44: Koproporfyrin I (Prøveopparbeidelse 1 vs 2)



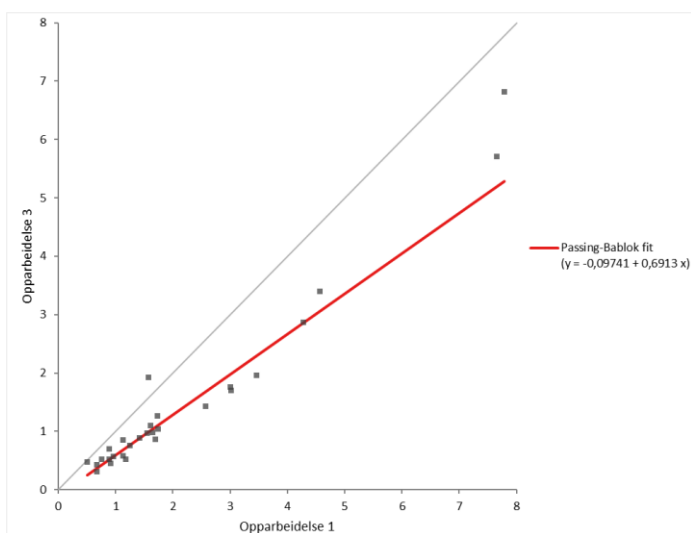
Figur 45: Koproporfyrin III (Prøveopparbeidelse 1 vs 2)



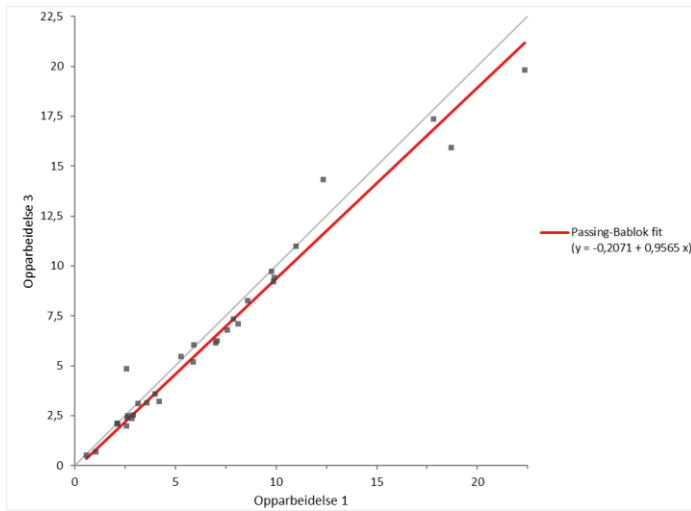
Figur 46: uroporfyrin (prøveopparbeidelse 1 vs 3)



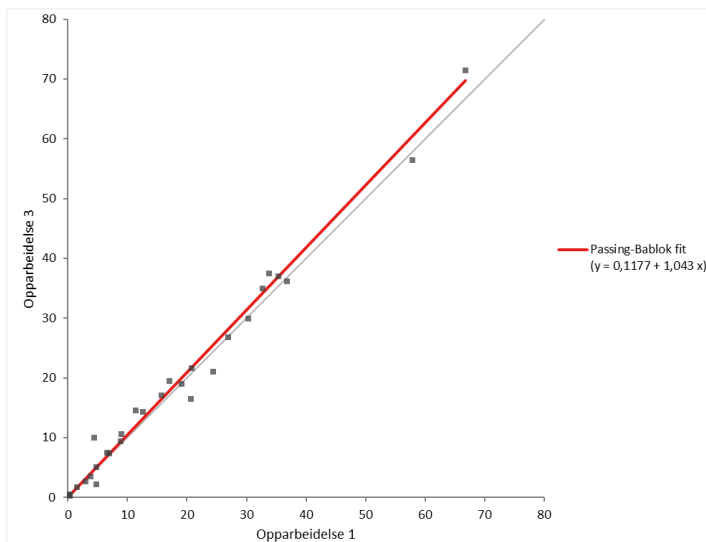
Figur 47: Heptaporfyrin (prøveopparbeidelse 1 vs 3)



Figur 48: Pentaporfyrin (prøveopparbeidelse 1 vs 3)

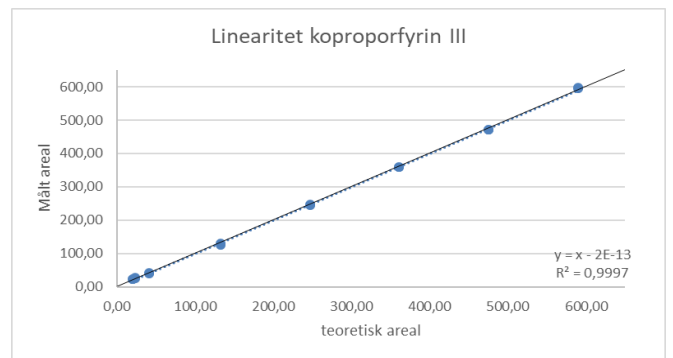
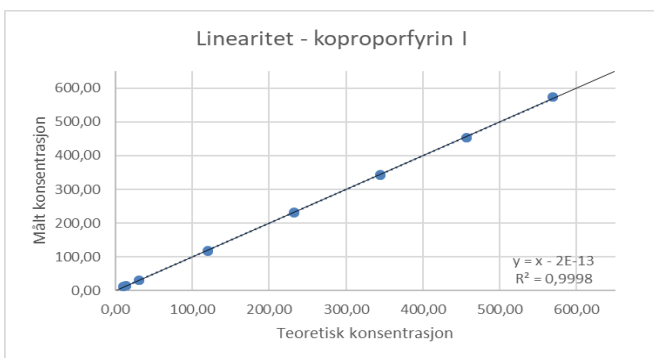
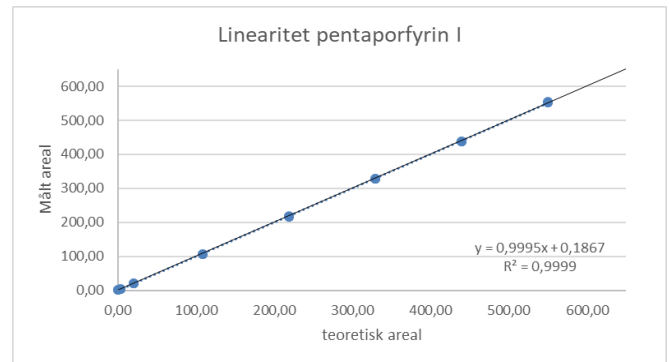
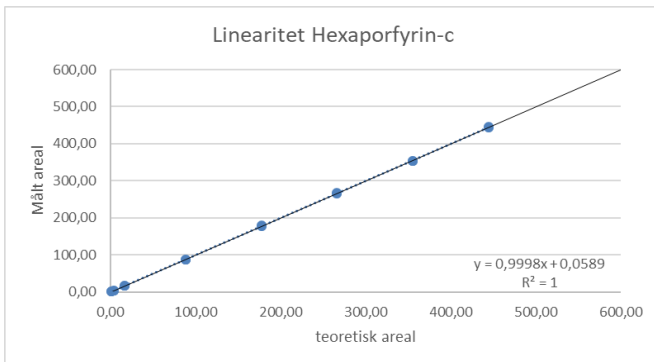
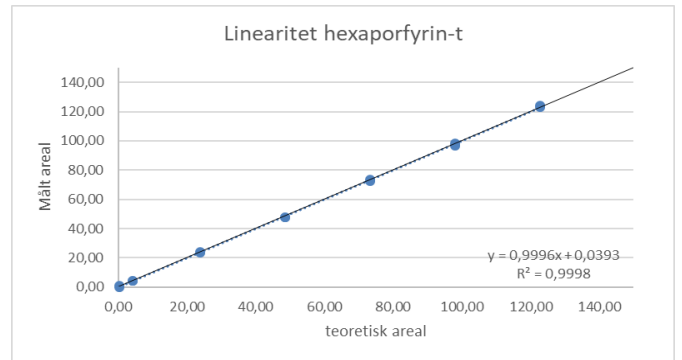
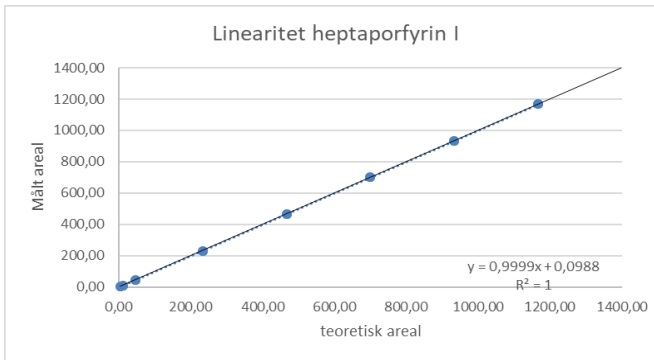
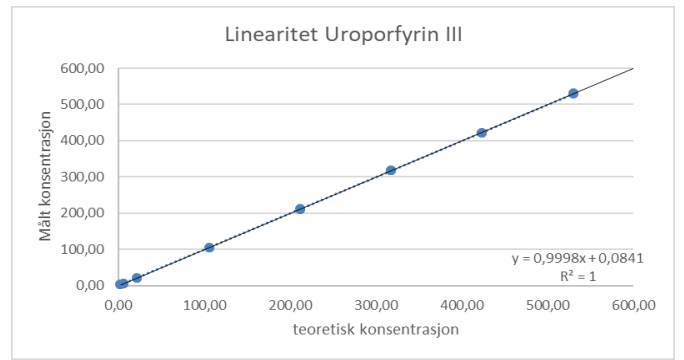
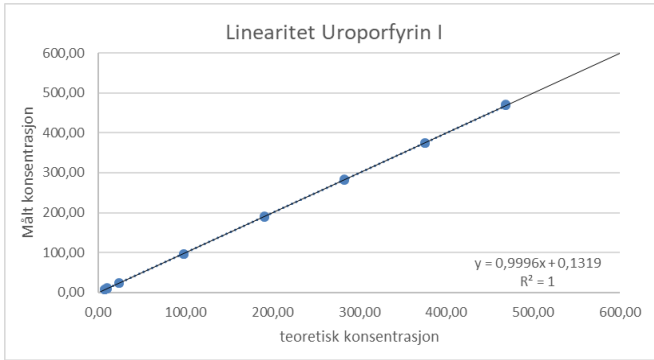


Figur 49: Koproporfyrin I (prøveoppbeidelse 1 vs 3)

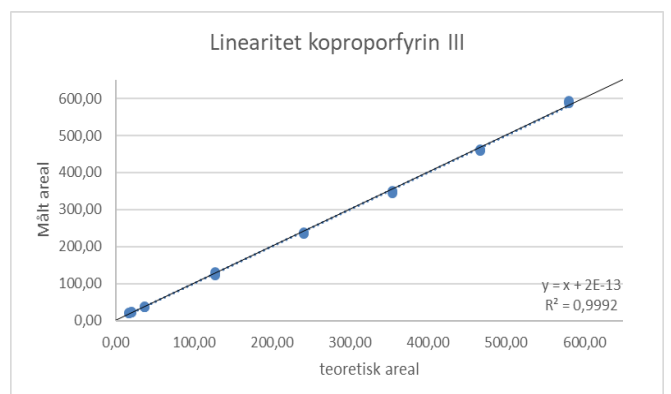
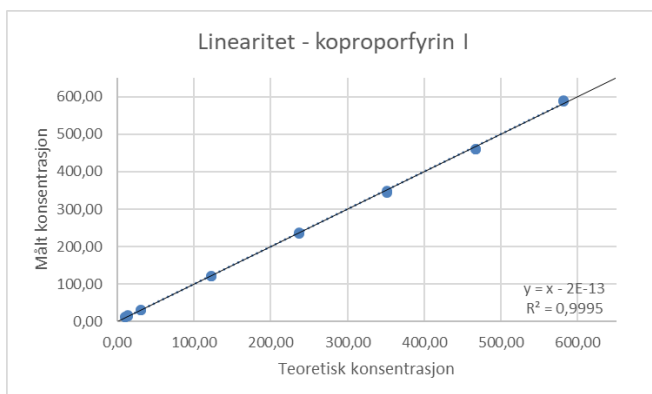
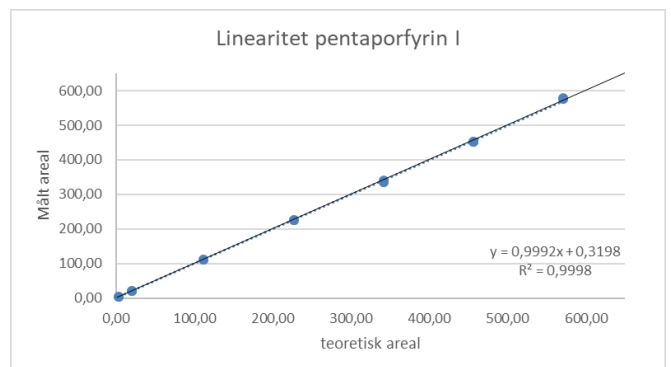
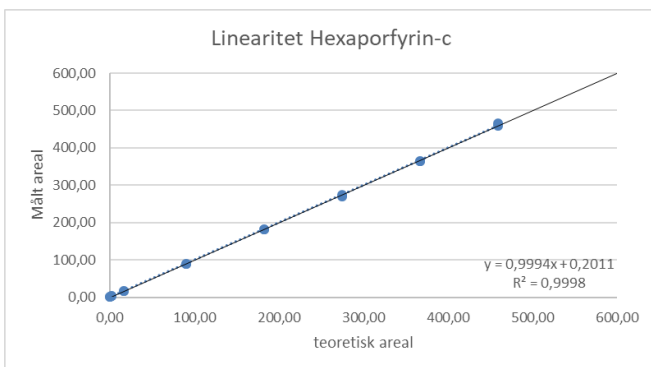
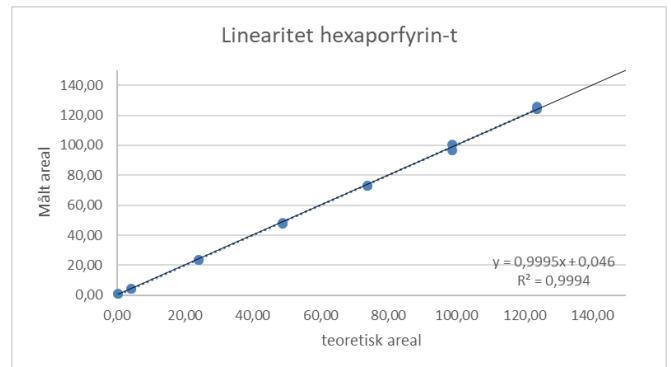
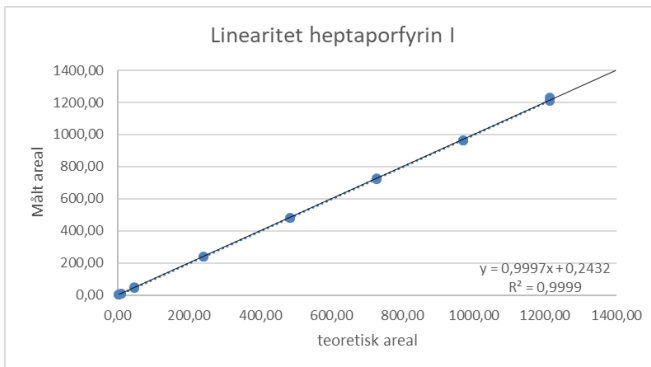
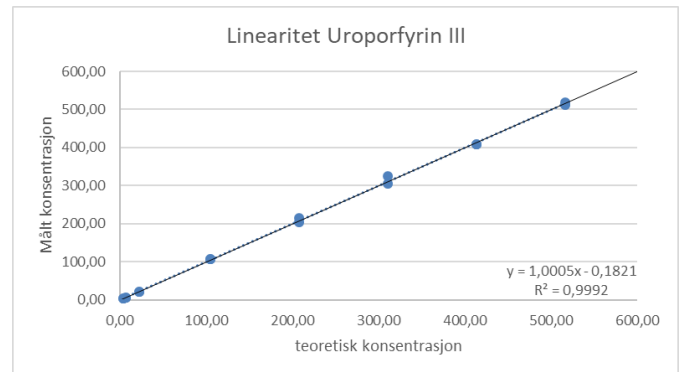
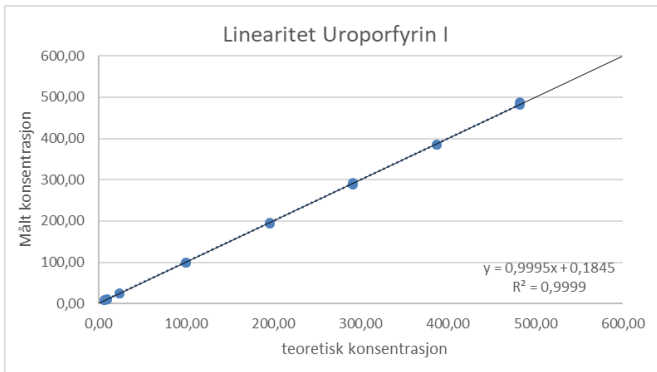


Figur 50: Koproporfyrin III (prøveoppbeidelse 1 vs 3)

Linearitet prøveopparbeidelse 2



Linearitet prøveopparbeidelse 3



Carry-over

Tabell XXVIII: Carry-over for prøveopparbeidelse 2.

Prøve ID	Uroporfyrin I	Blank	Blank	Uroporfyrin III	Blank	Blank	Heptaporfyrin I	Blank	Blank
Carry-over 3	611,0	0,0	0,0	247,9	0,0	0,0	201,3	0,0	0,0
Carry-over 1	1473,4	0,5	0,0	643,6	0,4	0,0	1399,0	0,5	0,0
Carry-over 2	1880,1	0,0	0,0	708,2	0,0	0,0	23,0	0,0	0,0
Prøve ID	Heptaporfyrin III	Blank	Blank	Hexaporfyrin-tris	Blank	Blank	Hexaporfyrin-tris	Blank	Blank
Carry-over 3	271,7	0,0	0,0						
Carry-over 1	1045,1	0,5	0,0	267,6	0,0	0,0	1104,1	0,7	0,0
Carry-over 2	579,9	0,0	0,0						
Prøve ID	Pentaporfyrin	Blank	Blank	Koproporfyrin I	Blank	Blank	Koproporfyrin III	Blank	Blank
Carry-over 3							161,0	0,0	0,0
Carry-over 1	2173,4	0,7	0,0	2526,0	0,5	0,0	2839,0	0,9	0,0
Carry-over 2	44,2	0,0	0,0						

Tabell XXIX: Carry-over for prøveopparbeidelse 3.

Prøve ID	Uroporfyrin I	Blank	Blank	Uroporfyrin III	Blank	Blank	Heptaporfyrin I	Blank	Blank
Carry-over 3	602,3	0,0	0,0	245,4	0,0	0,0	233,4	0,0	0,0
Carry-over 1	899,7	0,2	0,0	391,6	0,2	0,0	1073,8	0,4	0,0
Carry-over 2	1926,4	0,7	0,0	718,8	0,5	0,0	23,3	0,0	0,0
Prøve ID	Heptaporfyrin III	Blank	Blank	Hexaporfyrin-tris	Blank	Blank	Hexaporfyrin-tris	Blank	Blank
Carry-over 3	301,3	0,0	0,0						
Carry-over 1	616,9	0,2	0,0	196,3	0,0	0,0	745,7	0,3	0,0
Carry-over 2	565,5	0,0	0,0						
Prøve ID	Pentaporfyrin	Blank	Blank	Koproporfyrin I	Blank	Blank	Koproporfyrin III	Blank	Blank
Carry-over 2	45,1	0,0	0,0						
Carry-over 1	1325,6	0,5	0,0	1360,3	0,5	0,0	1443,4	0,0	0,0
Carry-over 3							211,9	0,0	0,0