

Arbeitsanleitung / Manual

*Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal /
For professional use only*

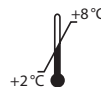
Zinc-Protoporphyrin/ Protoporphyrin HPLC Kit

*Zur Bestimmung von Zink-Protoporphyrin/Protoporphyrin
in EDTA-Vollblut*

*For the determination of zinc-protoporphyrin/
protoporphyrin in EDTA whole blood*

Gültig ab / Valid from 2023-10-19

REF **KC2700**



IVD **CE**



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Sicherheitshinweise

Dieses Zubehör ist ausschließlich nach der beigefügten Arbeitsanleitung zu nutzen. Wichtige Sicherheitshinweise zu diesem Produkt sind dem Kapitel 15 zu entnehmen.

Inhalt

1. ZWECKBESTIMMUNG	2
2. EINLEITUNG	2
3. TESTPRINZIP	2
4. INHALT DER TESTPACKUNG	3
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
6. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	4
7. PROBENVORBEREITUNG	4
8. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Arbeitsschema</i>	5
<i>Chromatographische Bedingungen</i>	5
9. BEHANDLUNG DER TRENNsäULE	5
10. AUSWERTUNG	6
<i>Berechnung</i>	6
<i>Musterchromatogramm</i>	7
11. QUALITÄTSKONTROLLE	7
<i>Referenzbereich</i>	7
<i>Kontrollen</i>	8
12. TESTCHARAKTERISTIKA	8
<i>Analytische Sensitivität</i>	8
<i>Analytische Spezifität</i>	8
13. ENTSORGUNG	8
14. MASSNAHMEN BEI STÖRUNGEN	9
15. VORSICHTSMASSNAHMEN	10
16. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	10
17. LITERATUR	11
18. SYMBOLE	11

1. ZWECKBESTIMMUNG

Diese HPLC-Applikation ist für die Bestimmung von Zink-Protoporphyrin und Protoporphyrin aus EDTA-Vollblut geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Zink-Protoporphyrin (ZPP) wird als Metabolit bei der Hämoglobin-Synthese in den Erythrozyten gebildet. Bei einem Eisenmangel kommt es während der Erythropoese zu einem ersatzweisen Einbau von Zink in den Protoporphyrin-Komplex. Dadurch wird anstelle von Hämoglobin Zink-Protoporphyrin gebildet. Daher kommt es bei einer Eisenmangelanämie zu einer erhöhten Zink-Protoporphyrin-Konzentration in den Erythrozyten.

Indikationen

- Bleivergiftung
- Eisenmangel
- Sichelzellanämie
- Sideroblastische Anämie
- Anämie durch chronische Erkrankungen
- Vanadiumbelastung

3. TESTPRINZIP

Zur Bestimmung des Zink-Protoporphyrins bzw. des Protoporphyrins wird im ersten Schritt eine sehr einfache Probenvorbereitung durchgeführt. Diese besteht aus einem Zellaufschluss und einer Fällung, um höhermolekulare Substanzen abzutrennen. Die Trennung mittels HPLC erfolgt in einem isokratischen Verfahren bei 30°C auf einer reversed-phase-Säule. Die Aufnahme der Chromatogramme erfolgt mit einem Fluoreszenzdetektor. Die Trennung benötigt ca. 4 Minuten für einen Lauf. Die Quantifizierung erfolgt über die mitgelieferten Kalibratoren und die Berechnung der Ergebnisse wird über die externe-Standard-Methode, anhand der Integration der Peakfläche und einer Kalibriergerade, durchgeführt.

Es sollte parallel eine Hämoglobinbestimmung durchgeführt werden, da die Werte für Zink-Protoporphyrin stets auf die Hämoglobinkonzentration bezogen werden müssen.

Zusammenfassung

Der hier vorliegende Komplettkit zur Bestimmung des Zink-Protoporphyrins bzw. des Protoporphyrins ermöglicht eine einfache, schnelle und präzise quantitative Bestimmung.

Dieser Komplettkit enthält gebrauchsfertig alle Reagenzien und Verbrauchsmaterialien für die Aufbereitung der Proben und die analytische HPLC-Trennung.

Wie auch bei vielen anderen Parametern liegt der Vorteil der HPLC-Analytik in der gleichzeitigen Abarbeitung vieler Analyte in einem Test. Die HPLC-System-Komplettlösung ermöglicht auch Laboratorien, die bislang noch keine Erfahrung mit Hochdruckflüssigkeitschromatographie haben, diese Technik schnell und problemlos für klinisch-chemische Routinezwecke einzusetzen. Eine Automatisierung der Probenaufgabe und der Auswertung ist möglich, sodass auch größere Probenzahlen fast unbeaufsichtigt abgearbeitet werden können.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 0005.15	RECSOL	Rekonstitutionslösung, gebrauchsfertig	15 ml
KC2700	CAL1	Kalibrator 1, lyophilisiert	4 x
	CAL2	Kalibrator 2, lyophilisiert	4 x
	CAL3	Kalibrator 3, lyophilisiert	4 x
	CTRL1	Kontrolle 1, lyophilisiert	4 x
	CTRL2	Kontrolle 2, lyophilisiert	4 x
	INTSTD	Interner Standard, lyophilisiert	4 x
	MOPHA	Laufmittel, gebrauchsfertig (Wichtig: nicht rezirkulieren)	2 x 1 000 ml
	PREC	Fällungsreagenz, gebrauchsfertig	150 ml
	SOLA	Lysereagenz, gebrauchsfertig	20 ml

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

Die HPLC-Trennsäule (KC2700RP), kann separat bei Immundiagnostik AG bestellt werden. Um die Lebensdauer Ihrer HPLC-Trennsäule zu verlängern, sollten idealerweise Vorsäulen (KC2700VS) verwendet werden. Diese und auch die Vorsäulenhalter (KC2700VH) können ebenfalls bei Immundiagnostik AG bestellt werden. Neben den kompletten Kits können auch alle Komponenten einzeln bestellt werden. Bitte fordern Sie unsere Einzelkomponentenpreisliste an.

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- 2 ml-Reaktionsgefäße (z. B. Eppendorf)
- Zentrifuge mit Kühlfunktion
- diverse Pipetten
- HPLC-System mit Fluoreszenz-Detektor
- reversed phase C₁₈-Säule
- Vortex-Mixer

6. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Die lyophilisierten Kalibratoren (**CAL1–3**) werden vor Gebrauch in **500 µl** Rekonstitutionslösung (**RECSOL**) resuspendiert. Der Gehalt an Zink-Protoporphyrin bzw. Protoporphyrin ändert sich geringfügig von Charge zu Charge. Der genaue Gehalt ist der entsprechenden Produktspezifikation zu entnehmen. **Kalibrator (rekonstituierter CAL) ist nicht stabil und kann nicht gelagert werden.**
- Die lyophilisierten Kontrollen (**CTRL1** und **CTRL2**) werden vor Gebrauch in je **250 µl** Rekonstitutionslösung (**RECSOL**) resuspendiert. Der Gehalt an Zink-Protoporphyrin bzw. Protoporphyrin ändert sich geringfügig von Charge zu Charge. Der genaue Gehalt ist der entsprechenden Produktspezifikation zu entnehmen. **Kontrollen (rekonstituierte CTRL1 und CTRL2) sind nicht stabil und können nicht gelagert werden.**
- Der lyophilisierte interne Standard (**INTSTD**) wird vor Gebrauch in **2 ml** Fällungsreagenz (**PREC**) resuspendiert. **Interner Standard (rekonstituierter INTSTD) ist nicht stabil und kann nicht gelagert werden.**
- Alle Testreagenzien sind bei **2–8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. PROBENVORBEREITUNG

Als Probe eignet sich EDTA-Vollblut, welches aus venösem Nüchternblut gewonnen wurde. Zur Freisetzung des Zink-Protoporphyrins bzw. des Protoporphyrins aus den Erythrozyten wird die Probe vor der Aufarbeitung eingefroren und wieder aufgetaut. Da Zink-Protoporphyrin bzw. Protoporphyrin lichtempfindlich ist, sollte die Probe lichtgeschützt versendet werden.

8. TESTDURCHFÜHRUNG

Arbeitsschema

1.	Proben gut homogenisieren, z.B. auf einem Schüttler für ~ 3 min.
2.	100 µl Probe, CAL1–3 und CTRL1–2 in 2 ml Reaktionsgefäße füllen.
3.	Je 150 µl SOLA zugeben.
4.	Je 10 µl INTSTD hinzugeben und gut mischen (mind. 30 s vortexen).
5.	5 min bei Raumtemperatur inkubieren.
6.	Je 1 000 µl PREC zügig zugeben, gut mischen (mind. 30 s vortexen).
7.	Für 10 min bei 4 °C und 10 000 g zentrifugieren (Kühlzentrifuge).
8.	~ 190 µl Überstand in HPLC-Vials mit Inserts überführen.

Chromatographische Bedingungen

Säulenmaterial:	Bischoff Prontosil 120-5-C18 ace EPS; 5 µm
Säulendimension:	125 mm × 4 mm
Fluss:	2,0 ml/min
Fluoreszenzdetektion:	Exzitation: 417 nm Emission: 635 nm
Temperatur:	30 °C
Auftragsvolumen:	50 µl
Laufzeit:	4,2 Minuten

9. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE

Wir empfehlen die Verwendung einer Vorsäule, um die Säulenhaltbarkeit zu verlängern.

Nach der Analyse sollte die Trennsäule mit ca. 30 ml Reinstwasser bei einem Fluss von 1 ml/min gespült werden. Anschließend wird die Säule in 50% Methanol in Wasser gelagert (ca. 30 ml, Fluss 0,5 ml/min).

Zur Wiederinbetriebnahme wird das ganze System mit ca. 60 ml Laufmittel (**MOPHA**) äquilibriert.

10. AUSWERTUNG

Berechnung

Die erhaltenen Peakflächen werden an der Fläche des internen Standards der jeweiligen Probe normalisiert.

$$y = \frac{y_a}{y_i}$$

Mit dem normalisierten Signal der Kalibratoren (**CAL1–3**) und den Konzentrationswerten (siehe Spezifikationsdatenblatt) wird eine Kalibriergerade erstellt. Diese hat folgende Kalibrierfunktion:

$$\frac{y_a}{y_i} = b_0 + b_1 \times c_A$$

Errechnung der Konzentration des Analyten in den Proben und den **CTRL1** und **2** erfolgt mit folgender Formel:

$$c_A = \frac{(y_A/y_i) - b_0}{b_1}$$

b_0 = y-Achsenabschnitt der Kalibriergeraden

b_1 = Steigung der Kalibriergeraden

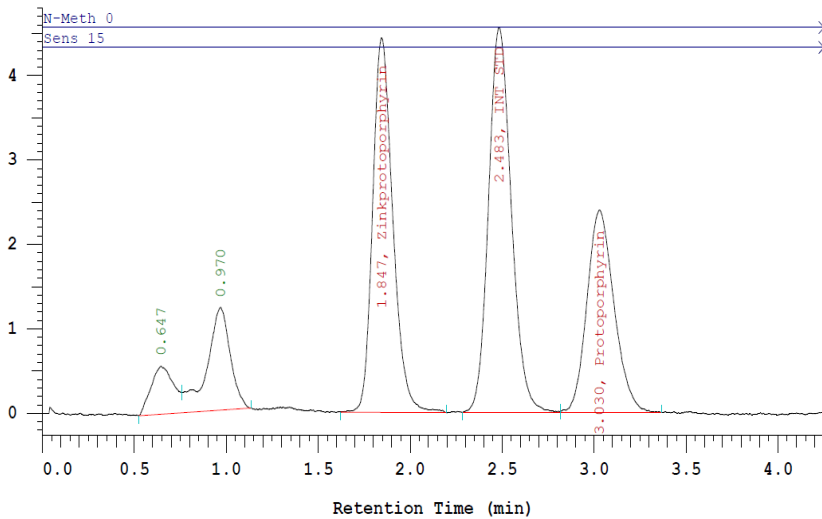
y = Signal

A = Analyt (Zinc-Protoporphyrin oder Protoporphyrin)

i = interner Standard

c = Konzentration

Musterchromatogramm



11. QUALITÄTSKONTROLLE

Referenzbereich

	Zink-Protoporphyrin [$\mu\text{mol/mol Häm}$]
Adäquate Eisenversorgung	0–40
Inadäquate Eisenversorgung möglich, Bestätigung durch weiteren Parameter empfohlen	> 40 < 80
Inadäquate Eisenversorgung	> 80

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren. Die Angabe des Referenzbereichs dient lediglich der Orientierung und kann von anderen publizierten Daten abweichen.

Kontrollen

Wir empfehlen bei jedem Testansatz Kontrollen mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

12. TESTCHARAKTERISTIKA

Analytische Sensitivität

LoD Zink-Protoporphyrin:	9,32 nmol/l
LoD Protoporphyrin:	2,67 nmol/l
LoQ Zink-Protoporphyrin:	31,1 nmol/l
LoQ Protoporphyrin:	8,90 nmol/l

Analytische Spezifität

Es wurden keine Interferenzen durch andere Blutbestandteile gefunden.

13. ENTSORGUNG

Das Laufmittel (**MOPHA**) und das Fällungsreagenz (**PREC**) müssen als halogenfreier Lösungsmittelabfall entsorgt werden. Bitte beachten Sie die entsprechenden nationalen Richtlinien.

14. MASSNAHMEN BEI STÖRUNGEN

Problemstellung	Mögliche Ursache	Behebung
Kein Signal	Keine oder defekte Verbindung zur Auswerteeinheit.	Signalkabel und Anschluss prüfen.
	Detektorlampe zu alt	Ggf. Lampe erneuern
Keine Peaks	Injektor verstopft	Injektor überprüfen
Doppelpeaks	Totvolumen an Fittings und/oder Säule	Fittings und/oder Säule erneuern
Störpeaks	Injektor verunreinigt	Injektor reinigen
	Kontamination am Säulenkopf	Säule umdrehen und 30 min bei niedrigem Fluß (0,2 ml/min) mit Laufmittel spülen
	Luft im System	Pumpe entgasen
	Autosamplergefäße verunreinigt	Neue oder mit Methanol gespülte Autosamplergefäße verwenden
Breite Peaks, Tailing	Vorsäule/Säule zu alt	Neue Vorsäule/ neue Säule verwenden
Veränderte Retentionszeit	Temperaturdrift	Säulenofen verwenden
	Pumpe fördert ungenau	Pumpe überprüfen, entlüften
	System noch nicht im Gleichgewicht	System mit mobiler Phase 15 min spülen
Basislinie driftet	Detektorlampe noch kalt	Betriebstemperatur abwarten
	Detektorlampe zu alt	Ggf. Lampe erneuern
	System noch nicht im Gleichgewicht	System mit mobiler Phase 15 min spülen
	Pumpe fördert ungenau	Pumpe überprüfen, entlüften
Unruhige Basislinie	Pumpe fördert ungenau	Pumpe überprüfen, entlüften
	Detektorzelle verschmutzt	Detektorzelle reinigen

15. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Reagenzien dieser Testpackung enthalten organische Lösungsmittel. Berührungen mit der Haut oder den Schleimhäuten sind zu vermeiden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.



16. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Sämtliche in der Testpackung enthaltene Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik eingesetzt werden.
- Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden (Verfallsdatum siehe Testpackung).
- Einzelkomponenten mit unterschiedlichen Lot-Nummern aus verschiedenen Testpackungen nicht mischen oder austauschen.
- Für die Qualitätskontrolle sind die dafür erstellten Richtlinien für medizinische Laboratorien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettierolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.
- Qualitätskontrollen immer mitmessen.
- Die Bestimmung ist immer nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Schwerwiegende Vorfälle sind der Immundiagnostik AG und den nationalen Aufsichtsbehörden zu melden.

17. LITERATUR

1. Hastka, J., Heimpel, H., & Metzgeroth, G. (2011). Eisenmangel und Eisenmangelanämie. DGHO - Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und klinische Onkologie.

18. SYMBOLE

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Enthält Plasmaderivate oder menschliches Blut		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Nicht wiederverwenden
	eindeutige Produktidentifizierung		Enthält Material tierischen Ursprungs
	medizinische Substanz		Enthält Material humanen Ursprungs

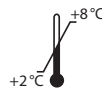
Manual

Zinc-Protoporphyrin/ Protoporphyrin HPLC Kit

*For the determination of zinc-protoporphyrin/
protoporphyrin in EDTA whole blood*

Valid from 2023-10-19

REF **KC2700**



IVD **CE**



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Safety information

These accessories are to be used exclusively in accordance with the enclosed instructions for use. Important safety information for this product can be found in chapter 15.

Table of Contents

1. INTENDED PURPOSE	16
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	16
3. PRINCIPLE OF THE TEST	16
4. MATERIAL SUPPLIED	17
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
6. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	18
7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	18
8. ASSAY PROCEDURE	19
<i>Test procedure</i>	19
<i>Chromatographic conditions</i>	19
9. TREATMENT OF THE COLUMN	19
10. RESULTS	20
<i>Calculation</i>	20
<i>Typical chromatogram</i>	21
11. QUALITY CONTROL	21
<i>Reference range</i>	21
<i>Controls</i>	22
12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	22
<i>Analytical sensitivity</i>	22
<i>Analytical specificity</i>	22
13. DISPOSAL	22
14. TROUBLESHOOTING	23
15. PRECAUTIONS	24
16. GENERAL NOTES ON THE TEST	24
17. REFERENCES	25
18. SYMBOL EXPLANATION	25

1. INTENDED PURPOSE

This HPLC application is intended for the quantitative determination of zinc-protoporphyrin and protoporphyrin in EDTA whole blood. For *in vitro* diagnostic use only.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Zinc protoporphyrin (ZPP) is a metabolite formed in erythrocytes during hemoglobin synthesis. In the case of iron deficiency, zinc is incorporated into the protoporphyrin complex during erythropoiesis as a substitute. As a result, zinc-protoporphyrin is produced instead of hemoglobin. As a consequence, in the case of iron deficiency anemia, the zinc protoporphyrin concentration in the erythrocytes is elevated.

Indications

- Lead poisoning
- Iron deficiency
- Sickle cell anemia
- Sideroblastic anemia
- Anemia of chronic disease
- Vanadium exposure

3. PRINCIPLE OF THE TEST

To determine the zinc protoporphyrin or the protoporphyrin, a cell disruption is the first step. In a second step, precipitation is carried out to separate higher-molecular substances. After their removal by centrifugation, the supernatant is injected into the HPLC system.

The separation via HPLC follows an isocratic method at 30 °C using a reversed phase column. Each run lasts approx. 4 minutes. The chromatograms are recorded by a fluorescence detector. The quantification is performed with the delivered calibrators and the calculation of the results is carried out via the external standard method, using the integration of the peak area and a calibration line.

In parallel measurements of the hemoglobin concentration are required, because the zinc-protoporphyrin concentration is related to the hemoglobin concentration.

Summary

This HPLC technique provides an easy, fast and precise method for the quantitative determination of zinc-protoporphyrin and protoporphyrin. The kit contains all reagents necessary for sample preparation and separation in ready-to-use form.

As for many other parameters, the advantage of HPLC analytics is the simultaneous handling of many analytes in a single test. The HPLC complete system enables even laboratories without experience in high performance liquid chromatography to use this technique for clinical chemical routines quickly and precisely. It is possible to automate the sample application and calculation of the results so that an even higher number of samples can be handled nearly without supervision.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 0005.15	RECSOL	Reconstitution solution, ready-to-use	15 ml
KC2700	CAL1	Calibrator 1, lyophilised	4 x
	CAL2	Calibrator 2, lyophilised	4 x
	CAL3	Calibrator 3, lyophilised	4 x
	CTRL1	Control 1, lyophilised	4 x
	CTRL2	Control 2, lyophilised	4 x
	INTSTD	Internal Standard, lyophilised	4 x
	MOPHA	Mobile phase, ready-to-use (important: do not recirculate)	2 x 1 000 ml
	PREC	Precipitation reagent, ready-to-use	150 ml
	SOLA	Lysis reagent, ready-to-use	20 ml

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

The HPLC column (KC2700RP), can be ordered separately from Immundiagnostik AG. To extend the lifetime of your HPLC column, pre-columns (KC2700VS) are highly recommended. These and also the pre-column holders (KC2700VH) can also be ordered from Immundiagnostik AG. In addition to the complete kits, all components can also be ordered separately. Please ask for our single component price list.

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- 2 ml reaction tubes (e. g. Eppendorf)
- Centrifuge with cooling function
- Various pipettes
- HPLC-system with fluorescence detector
- Reversed phase C₁₈ column
- Vortex

6. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- The lyophilised calibrators (**CAL1–3**) have to be reconstituted with **500 µl** reconstitution solution (**RECSOL**) before use. The concentration of zinc-protoporphyrin slightly changes from lot to lot, the exact concentration is stated in the corresponding product specification. **Calibrator (reconstituted CAL1–3) is not stable and cannot be stored.**
- The lyophilised controls (**CTRL1 and CTRL2**) have to be reconstituted each with **250 µl** reconstitution solution (**RECSOL**) before use. The concentration of zinc-protoporphyrin slightly changes from lot to lot, the exact concentration is stated in the corresponding product specification. **Controls (reconstituted CTRL1 and CTRL2) are not stable and cannot be stored.**
- **The lyophilised internal standard (INTSTD)** has to be reconstituted with **2 ml** precipitation reagent (**PREC**). **Internal standard (reconstituted INTSTD) is not stable and cannot be stored.**
- All other test reagents are ready-to-use. All test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2–8 °C**.

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

EDTA whole blood obtained from venous fasting blood is suitable for this test. Before analysis, the erythrocytes are lysed by freezing and thawing in order to release zinc-protoporphyrin and protoporphyrin.

Zinc-protoporphyrin as well as protoporphyrin are light sensitive. Samples should be transported protected from light.

8. ASSAY PROCEDURE

Test procedure

1.	Homogenise samples well, e.g. on a shaker for ~3 min.
2.	Fill 100 µl sample, CAL 1–3 and CTRL 1–2 into 2 ml reaction tubes.
3.	Add 150 µl SOLA to each tube.
4.	Add 10 µl INTSTD and mix well (vortex for at least 30 s.)
5.	Incubate for 5 min at room temperature.
6.	Quickly add 1 000 µl PREC , mix well (vortex for at least 30 s.)
7.	Centrifuge for 10 min at 4 °C and 10 000 g (cooling centrifuge).
8.	transfer ~190 µl supernatant into HPLC vials with inserts.

Chromatographic conditions

Column material:	Bischoff Prontoasil 120-5-C18 ace EPS; 5 µm	
Column dimension:	125 mm × 4 mm	
Flow rate:	2.0 ml/min	
Fluorescence detection::	Excitation:	417 nm
	Emission:	635 nm
Temperature:	30 °C	
Injection volume:	50 µl	
Running time:	4.2 min	

9. TREATMENT OF THE COLUMN

It is recommended to use a guard column to extend column life.

After analysis, the column should be flushed with 30 ml ultra pure water (1 ml/min) and stored in 50% methanol in water (~30 ml, flow 0.5 ml/min). Before use, the system should be equilibrated with ~60 ml mobile phase (MOPHA).

10. RESULTS

Calculation

The obtained peak areas are normalised to the area of the internal standard of the respective sample.

$$y = \frac{y_a}{y_i}$$

With the normalised signal of the calibrators (**CAL1–3**) and the concentration values (see specification data sheet) a calibration line has to be created. This calibration line has the following calibration function:

$$\frac{y_a}{y_i} = b_0 + b_1 \times c_A$$

The calculation of the concentration of the analyte in the samples and the **CTRL1** and **CTRL 2** is then done with the following formula:

$$c_A = \frac{(y_A/y_i) - b_0}{b_1}$$

b_0 = y-axis intercept of the calibration line

b_1 = slope of the calibration line

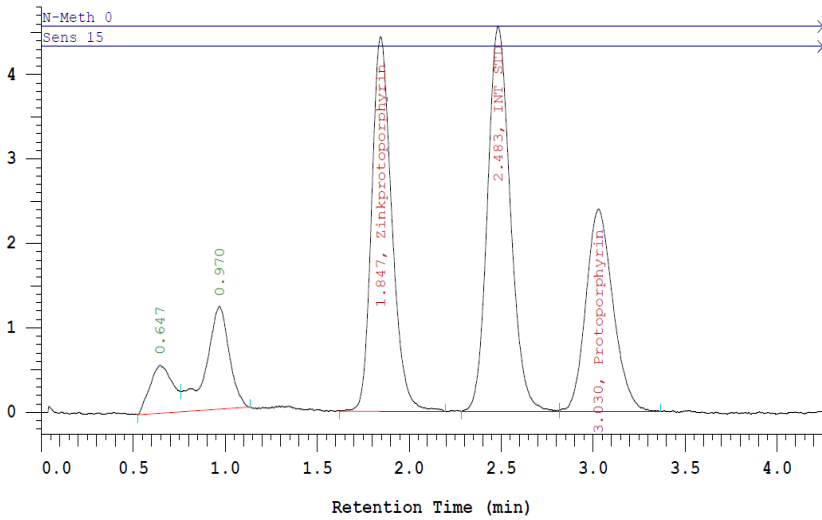
y = signal

A = analyte (zinc protoporphyrin or protoporphyrin)

i = internal standard

c = concentration

Typical chromatogram



11. QUALITY CONTROL

Reference range

	Zink-Protoporphyrin [µmol/mol Häm]
adequate supply of iron	0–40
inadequate supply of iron possible, confirmation by further parameter strongly recommended	> 40 < 80
inadequate supply of iron	> 80

We recommend each laboratory to establish its own reference range. The values mentioned above are only for orientation and may deviate from other published data.

Controls

Control samples should be analysed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Analytical sensitivity

LoD Zink-Protoporphyrin:	9.32 nmol/l
LoD Protoporphyrin:	2.67 nmol/l
LoQ Zink-Protoporphyrin:	31.1 nmol/l
LoQ Protoporphyrin:	8.90 nmol/l

Analytical specificity

No interference from other blood components was found.

13. DISPOSAL

The mobile phase (**MOPHA**) and precipitation reagent (**PREC**) must be disposed as non-halogenated solvents.

Please refer to the appropriate national guidelines.

14. TROUBLESHOOTING

Problem	Possible cause	Solution
No signal	No or defect connection to evaluation system	Check signal cord and connection
	Detector lamp is too old	Change lamp
No peaks	Injector is congested	Check injector
Double peaks	Dead volume in fittings and/or column	Renew fittings and/or column
Contaminating peaks	Injector dirty	Clean injector
	Contamination at the head of the column	Change direction of the column and rinse for 30 min at low flow rate (0.2 ml/min) with mobile phase
	Air in the system	Degas pump
	Auto sampler vials contaminated	Use new vials or clean them with methanol
Broad peaks, tailing	Precolumn/column exhausted	Use new precolumn/column
Variable retention times	Drift in temperature	Use a column oven
	Pump conveys inaccurately	Check pump, degas the system
	System is not in steady state yet	Rinse system mobile phase for 15 min
Baseline is drifting	Detector lamp did not reach working temperature yet	Wait for operating temperature
	Detector lamp is too old	Renew lamp
	System is not in steady state yet	Rinse system mobile phase for 15 min
	Pump conveys inaccurately	Check pump, degas the system
Baseline is not smooth	Pump conveys inaccurately	Check pump, degas the system
	Detector flow cell is dirty	Clean flow cell

15. PRECAUTIONS

- The test components contain organic solvents. Contact with skin or mucous membranes must be avoided.
- The human material used for the kit components was tested for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C and found to be negative. However, it is recommended that, as a precaution, the kit components always be treated as potentially infectious material.

















16. GENERAL NOTES ON THE TEST

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Do not use reagents beyond the expiration date stated on the kit label.
- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Follow the guidelines for medical laboratories.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which has not been consulted with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be made within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.
- Analyse controls with each run.
- Always perform the assay according to the enclosed manual.
- Serious incidents are to be reported to Immundiagnostik AG and the national regulatory authorities.

17. REFERENCES

1. Hastka, J., Heimpel, H., & Metzgeroth, G. (2011). Eisenmangel und Eisenmangelanämie. DGHO - Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und klinische Onkologie.

18. SYMBOL EXPLANATION

	Temperature limitation		Catalogue number
	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Content sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Contains plasma derivatives or human blood		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		Do not re-use
	Unique Device Identification		Contains material of animal origin
	Medicinal substance		Contains material of human origin

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

