

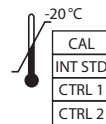
# Zinc-Protoporphyrin/ Protoporphyrin HPLC Kit

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

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

Gültig ab / Valid from 2018-04-06

**REF** **KC2700**



**IVD** **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)



# Inhalt

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

## 1. VERWENDUNGSZWECK

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 lediglich aus einem Fällungsschritt, 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. 10 Minuten für einen Lauf. Die Quantifizierung erfolgt über den mitgelieferten Kalibrator und die Berechnung der Ergebnisse wird über die externe-Standard-Methode anhand der Integration der Peakfläche/-höhe 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 Ver-

brauchsmaterialien 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. Für die Kalibrierung des Testsystems ist meist eine Einpunkt-Kalibrierung ausreichend, im Gegensatz zu Immunassays mit bis zu 6 Kalibratoren pro Testansatz. Eine Automatisierung der Probenaufgabe und der Auswertung ist möglich, sodass auch größere Probenzahlen fast unbeaufsichtigt abgearbeitet werden können. Bei kurzen Serienlängen ist die Einpunktkalibrierung sehr viel wirtschaftlicher gegenüber der 6-Punkt-Kalibrierung bei Immunassays.

#### 4. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KC2700LM	MOPHA	Laufmittel	1000 ml
KC2700KA	CAL	Kalibrator (500 µl lyoph.; Konzentration siehe Spezifikationsdatenblatt)	5 Fläschchen
KC2700IS	INT STD	Interner Standard (2 ml lyoph.)	4 x 1 Fläschchen
KC2700RE	RECSOL	Rekonstitutionslösung	15 ml
KC2700FR	PREC	Fällungsreagenz	150 ml
KC2700KO	CTRL 1 CTRL 2	Kontrolle 1 und 2 (250 µl lyoph.; Konzentration siehe Spezifikationsdatenblatt)	2 x 3 Fläschchen

Die HPLC-Trennsäule (KC2700RP) kann separat bei Immundiagnostik bestellt werden. Neben den kompletten Kits können auch alle Komponenten einzeln bestellt werden. Bitte fordern Sie unsere Einzelkomponentenpreisliste an.

#### 5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser\*
- 2-ml-Reaktionsgefäße (z. B. Eppendorf)
- Zentrifuge
- diverse Pipetten

- HPLC-Gerät mit Fluoreszenz-Detektor
- reversed phase C<sub>18</sub>-Säule
- Vortex-Wirbelmischer

\* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

## 6. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- **Der lyophilisierte Kalibrator (CAL)** ist bei **-20 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor Gebrauch wird er in **500 µl Rekonstitutionslösung (RECSOL)** resuspendiert. Der Gehalt an Zink-Protoporphyrin bzw. Protoporphyrin ändert sich geringfügig von Charge zu Charge, der genaue Gehalt ist dem Spezifikationsdatenblatt zu entnehmen. **Kalibrator** (rekonstituierter CAL) **ist nicht stabil und kann nicht gelagert werden.**
- **Die lyophilisierten Kontrollen 1 und 2 (CTRL 1 und CTRL 2)** sind bei **-20 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor Gebrauch werden sie 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 dem Spezifikationsdatenblatt zu entnehmen. **Kontrollen** (rekonstituierte CTRL 1 und 2) **sind nicht stabil und können nicht gelagert werden.**
- **Das Fällungsreagenz (PREC)** muss vor der Verwendung auf **Raumtemperatur (15–30 °C)** gebracht werden.
- **Der lyophilisierte interne Standard (INT STD)** ist bei **-20 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor Gebrauch wird er in **2 ml Fällungsreagenz (PREC)** resuspendiert. **Interner Standard** (rekonstituierter INT STD) **ist nicht stabil und kann nicht gelagert werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2–8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

## 7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- 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.

- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

## 8. 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.

Da Zink-Protoporphyrin bzw. Protoporphyrin lichtempfindlich ist, sollte die Probe lichtgeschützt versendet werden.

## 9. TESTDURCHFÜHRUNG

### *Hinweise*

- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina 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.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Als Nadelspülung sollte Laufmittel (MOPHA) verwendet werden, um Verschleppungen zu vermeiden.

### *Arbeitsschema*

Je <b>200 µl Probe, Kalibrator</b> oder <b>Kontrolle 1 oder 2</b> in ein 2-ml-Reaktionsgefäß pipettieren.
Je <b>10 µl internen Standard</b> hinzugeben.
Je <b>1,2 ml Fällungsreagenz</b> (PREC) zugeben, gut <b>mischen</b> (mind. 15 s vortexen).
Für <b>10 min</b> bei <b>10 000 g</b> zentrifugieren, den Überstand abnehmen.
Je <b>100 µl Überstand</b> in das HPLC-System injizieren.

## Chromatographische Bedingungen

Säulenmaterial:	Bischoff Prontosil 120-5-C18 ace EPS; 5 µm
Säulendimension:	125 mm × 4 mm
Fluss:	1,0 ml/min der genaue Fluss ist auf der Produktspezifikation der jeweiligen Säule angegeben
Fluoreszenzdetektion:	Exzitation: 417 nm Emission: 635 nm
Temperatur:	30 °C
Auftragsvolumen:	100 µl
Laufzeit:	10 Minuten

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

## 10. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE

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. 30 ml Laufmittel (MOPHA) äquilibriert.

## 11. AUSWERTUNG

### Berechnung

$$\frac{\text{Peakhöhe Probe} \times \text{Kalibratorkonzentration}^*}{\text{Peakhöhe interner Standard der Probe}} \times F = \text{Probenkonzentration}$$

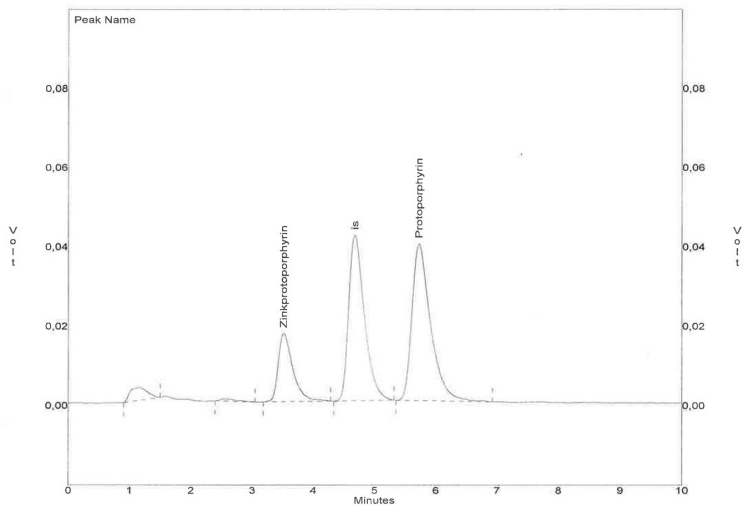
$$F = \frac{\text{Peakhöhe interner Standard des Kalibrators}}{\text{Peakhöhe Kalibrator}}$$

\* siehe Spezifikationsdatenblatt

**Hinweis:** Alternativ zur Peakhöhe kann auch die Peakfläche zur Auswertung herangezogen werden.



## Musterchromatogramm



## 12. QUALITÄTSKONTROLLE

### Referenzbereich

Zink-Protoporphyrin: < 40  $\mu\text{mol/mol Häm}$ <sup>[1]</sup>

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 die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

### 13. TESTCHARAKTERISTIKA

#### *Genauigkeit – Präzision*

##### **Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n=10**

Die Wiederholbarkeit wurde mit 2 EDTA-Vollblut-Proben unter gleichbleibenden Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe		Mittelwert [nmol/l]	CV [%]
1	Zink-Protoporphyrin	348,6	3,0
	Protoporphyrin	197,8	5,5
2	Zink-Protoporphyrin	148,8	8,3
	Protoporphyrin	59,0	5,7

##### **Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n=10**

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 2 EDTA-Vollblut-Proben unter variablen Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe		Mittelwert [nmol/l]	CV [%]
1	Zink-Protoporphyrin	341,1	8,7
	Protoporphyrin	270,6	9,7
2	Zink-Protoporphyrin	133,3	9,1
	Protoporphyrin	76,9	8,8

#### *Genauigkeit – Richtigkeit*

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. Dafür wurden 9 EDTA-Vollblut-Proben mit bekannten Konzentrationen gemessen und die Wiederfindung berechnet.

Die Wiederfindung für Zink-Protoporphyrin lag im Bereich 94,2 bis 107,9 %.

Die Wiederfindung für Protoporphyrin lag im Bereich 100,5 bis 106,2 %.

## Analytische Sensitivität

### Unterer Messbereich

Die **Nachweisgrenze** (*limit of detection, LoD*) wird definiert als Basisrauschen mal Faktor 3. Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$\frac{(3 \times \text{Peakhöhe Basisrauschen}) \times \text{Konzentration Kalibrator [nmol/l]}}{\text{Peakhöhe Kalibrator}} = \text{LoD [nmol/l]}$$

LoD Zink-Protoporphyrin:	13,81 nmol/l
LoD Protoporphyrin:	9,43 nmol/l

Die **Bestimmungsgrenze** (*limit of quantitation, LoQ*) wird definiert als Basisrauschen mal Faktor 10. Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$\frac{(10 \times \text{Peakhöhe Basisrauschen}) \times \text{Konzentration Kalibrator [nmol/l]}}{\text{Peakhöhe Kalibrator}} = \text{LoQ [nmol/l]}$$

LoQ Zink-Protoporphyrin:	46,02 nmol/l
LoQ Protoporphyrin:	31,42 nmol/l

### Oberer Messbereich & Linearität

Die obere Messbereichsgrenze gibt an, bis zu welcher Probenkonzentration eine Methode ein lineares Messsignal liefert.

Zink-Protoporphyrin:	1000 nmol/l
Protoporphyrin:	1000 nmol/l

Es ist zu beachten, dass der Messbereich sowohl geräte- als auch applikationsabhängig ist.

## Analytische Spezifität

Es wurden keine Interferenzen durch andere Blutbestandteile gefunden.

## 14. ENTSORGUNG

Das Laufmittel (MOPHA) und das Fällungsreagenz (PREC) müssen als halogenfreier Lösungsmittelabfall entsorgt werden.

## 15. 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 mit niedrigem Fluß (0,2 ml/min) 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 / 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	Warten
	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











## 16. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Reagenzien dieser Testpackung enthalten organische Lösungsmittel. Berührungen mit der Haut oder den Schleimhäuten sind zu vermeiden.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien 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.

## 17. LITERATUR

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

**Verwendete Symbole:**

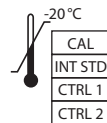
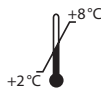
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten

# Zinc-Protoporphyrin/ Protoporphyrin HPLC Kit

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

Valid from 2018-04-06

**REF** **KC2700**



**IVD** **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

# Table of Contents

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



## 1. INTENDED USE

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. By iron deficiency during erythropoiesis, instead of incorporating a ferrous ion to form the hem precursor, zinc becomes an alternative metal ion in the protoporphyrin complex. As a result, zinc-protoporphyrin is produced instead of hemoglobin. As a consequence, in cases 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

The first step in the determination of zinc-protoporphyrin and protoporphyrin is precipitation of the higher molecular components. 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. One run lasts 10 minutes. The chromatograms are recorded by a fluorescence detector. The quantification is performed with the delivered calibrator; the concentration is calculated via integration of the peak areas/heights by the external standard method.

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 quantitative determination of zinc-protoporphyrin and protoporphyrin. Except the column, 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. Mostly, a one-point calibration is sufficient for calibrating the test system – unlike immunoassays with up to 6 calibrators per test. It is possible to automate the sample application and calculation of the results so that even higher number of samples can be handled nearly without control. With short test series, the one-point calibration is much more economic than 6-point calibration for immunoassays.

#### 4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
KC2700LM	MOPHA	Mobile phase	1000 ml
KC2700KA	CAL	Calibrator (500 µl lyoph.; see specification data sheet for concentration)	5 vials
KC2700IS	INT STD	Internal Standard (2 ml lyoph.)	4 x 1 vials
KC2700RE	RECSOL	Reconstitution solution	15 ml
KC2700FR	PREC	Precipitation reagent	150 ml
KC2700KO	CTRL 1 CTRL 2	Control 1 and 2 (250 µl lyoph.; see specification data sheet for concentration)	2 x 3 vials

The HPLC column (KC2700RP) as well as individual components can be ordered separately from Immundiagnostik. Please ask for the price list of the individual components.

#### 5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water\*
- 2 ml reaction tubes (e. g. Eppendorf)
- Centrifuge
- Various pipettes
- HPLC with fluorescence detector
- Reversed phase C<sub>18</sub> column
- Vortex

\* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

## 6. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- **The lyophilised calibrator (CAL)** is stable at **-20°C** until the expiry date stated on the label. Before use, the CAL has to be reconstituted with **500 µl reconstitution solution (RECSOL)**. The concentration of zinc-protoporphyrin slightly changes from lot to lot, the exact concentration is stated on the specification data sheet. **Calibrator (reconstituted CAL) is not stable and cannot be stored.**
- **The lyophilised controls 1 and 2 (CTRL 1 and CTRL 2)** are stable at **-20°C** until the expiry date stated on the label. Before use, they have to be reconstituted with each **250 µl reconstitution solution (RECSOL)**. The concentration of zinc-protoporphyrin slightly changes from lot to lot, the exact concentration is stated on the specification data sheet. **Controls (reconstituted CTRL 1 and 2) are not stable and cannot be stored.**
- **The precipitation reagent (PREC)** has to reach **room temperature (15–30°C)** before use.
- **The lyophilised internal standard (INT STD)** is stable at **-20°C** until the expiry date stated on the label. Before use, the INT STD has to be reconstituted with **2 ml precipitation reagent (PREC)**. **Internal standard (reconstituted INT STD) is not stable and cannot be stored.**
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2–8°C**.

## 7. PRECAUTIONS

- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.

## 8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

EDTA whole blood is suited 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 lightproof.

## 9. ASSAY PROCEDURE

### *Procedural notes*

- Quality control guidelines should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated 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.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.
- Use mobile phase (MOPHA) for needle wash in order to avoid sample carry-over.

### *Test procedure*

Pipet each <b>200 µl sample, calibrator or control 1 or 2</b> into a 2 ml reaction tube.
Add each <b>10 µl internal standard</b> .
Add each <b>1.2 ml precipitation reagent (PREC)</b> and mix well (vortex for at least 15 s).
Centrifuge for <b>10 min at 10000 g</b> and take the supernatant.
Inject <b>100 µl</b> supernatant into the HPLC system.

### *Chromatographic conditions*

Column material: Bischoff Prontoasil 120-5-C18 ace EPS; 5 µm

Column dimension: 125 mm × 4 mm

Flow rate: 1.0 ml/min

Please refer to the quality certificate of the column

Fluorescence detection:: Excitation: 417 nm

Emission: 635 nm

Temperature: 30 °C

Injection volume: 100 µl

Running time: 10 min

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

## 10. TREATMENT OF THE COLUMN

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 ~ 30 ml mobile phase (MOPHA).

## 11. RESULTS

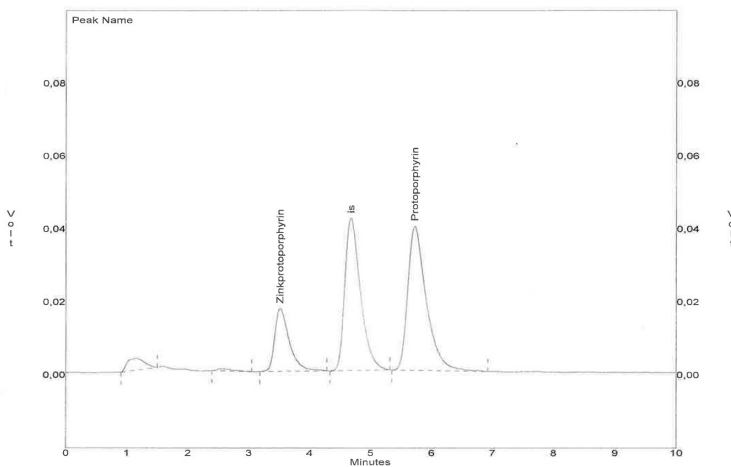
### Calculation

$$\frac{\text{Peak height sample} \times \text{calibrator concentration}^*}{\text{Peak height internal standard of the sample}} \times F = \text{sample concentration}$$
$$F = \frac{\text{Peak height internal standard of the calibrator}}{\text{Peak height calibrator}}$$

\* see specification data sheet

**Tip:** Alternatively, the peak area instead of the peak height can be used for quantification.

### Typical chromatogram



## 12. QUALITY CONTROL

### *Reference range*

Zinc-Protoporphyrin: < 40 µmol/mol haem<sup>[1]</sup>

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.

## 13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Accuracy – Precision*

#### **Repeatability (Intra-Assay); n=10**

The repeatability was assessed according to CLSI guideline EP5-A2 with 2 EDTA whole blood samples under constant parameters (same operator, measurement system, day and kit lot).

	<b>Sample</b>	<b>Mean value [nmol/l]</b>	<b>CV [%]</b>
1	Zinc-Protoporphyrin	348.6	3.0
	Protoporphyrin	197.8	5.5
2	Zinc-Protoporphyrin	148.8	8.3
	Protoporphyrin	59.0	5.7

#### **Reproducibility (Inter-Assay); n=10**

The reproducibility was assessed according to CLSI guideline EP5-A2 with 2 EDTA whole blood samples under varying parameters (different operators, measurement systems, days and kit lots).

	Sample	Mean value [nmol/l]	CV [%]
1	Zinc-Protoporphyrin	341.1	8.7
	Protoporphyrin	270.6	9.7
2	Zinc-Protoporphyrin	133.3	9.1
	Protoporphyrin	76.9	8.8

### Accuracy – Trueness

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore, 9 EDTA whole blood samples with known concentrations were measured and the recovery was calculated.

The recovery for Zinc-Protoporphyrin was found between 94.2 and 107.9%.

The recovery for Protoporphyrin was found between 100.5 and 106.2%.

### Lower detection limit

The limit of detection (LoD) is defined as 3 times the background noise. It is calculated by the formula below:

$$\frac{(3 \times \text{peak height background noise}) \times \text{concentration calibrator [nmol/l]}}{\text{Peak height calibrator}} = \text{LoD [nmol/l]}$$

LoD Zinc-Protoporphyrin: 13.81 nmol/l

LoD Protoporphyrin: 9.43 nmol/l

The limit of quantitation (LoQ) is defined as 10 times the background noise. It is calculated by the formula below:

$$\frac{(10 \times \text{peak height background noise}) \times \text{concentration calibrator [nmol/l]}}{\text{Peak height calibrator}} = \text{LoQ [nmol/l]}$$

LoQ Zinc-Protoporphyrin: 46.02 nmol/l

LoQ Protoporphyrin: 31.42 nmol/l

### Analytical sensitivity

#### Upper detection limit & linearity

The upper limit of detection states up to which concentration a method results in a linear signal.

Zinc-Protoporphyrin: 1000 nmol/l

Protoporphyrin: 1000 nmol/l

It should be noted that the detection limits depend on the instrument as well as on the application.

### *Analytical specificity*

There were no known interferences to other blood components found.

## 14. DISPOSAL

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

Please refer to the appropriate national guidelines.

## 15. TROUBLESHOOTING

Problem	Possible cause	Solution
No signal	No or defect connection to evaluation system	Check signal cord and connection
	Detector lamp is altered	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



Problem	Possible cause	Solution
Variable retention times	Drift in temperature	Use a column oven
	Pump delivers imprecise	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
	Detector lamp is too old	Renew lamp
	System is not in steady state yet	Rinse system mobile phase for 15 min
	Pump delivers imprecise	Check pump, degas the system
Baseline is not smooth	Pump delivers imprecise	Check pump, degas the system
	Detector flow cell is dirty	Clean flow cell

## 16. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The test components contain organic solvents. Contact with skin or mucous membranes must be avoided.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated 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 logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

## 17. REFERENCES

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

### Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue Number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		Consult instructions for use