

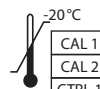
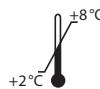
Hepcidin 25 LC-MS/MS Kit

Zur Bestimmung von Hepcidin in Serum

For the determination of hepcidin in serum

Gültig ab / Valid from 13.05.2014

REF **KM4000**



CAL 1
CAL 2
CTRL 1
CTRL 2
INT STD

IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. TESTPRINZIP	2
4. INHALT DER TESTPACKUNG	3
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	4
<i>Lagerung</i>	4
<i>Vorbereitung Laufmittel</i>	4
<i>Vorbereitung Kalibratoren, Kontrollen und interner Standard</i>	4
7. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG	4
8. TESTDURCHFÜHRUNG	5
9. CHROMATOGRAPHISCHE BEDINGUNGEN	5
10. MS/MS-METHODE (BEISPIELHAFT AUFGEFÜHRT FÜR EIN WATERS QUATTRO PREMIER XE TANDEM MASSENSPEKTROMETER)	6
<i>MRM-Übergänge (m/z)</i>	6
11. AUSWERTUNG	6
12. MUSTERCHROMATOGRAMME	7
13. QUALITÄTSKONTROLLE	8
<i>Referenzwerte</i>	8
14. TESTCHARAKTERISTIKA	8
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	8
<i>Nachweisgrenze</i>	8
15. ENTSORGUNG	9
16. VORSICHTSMASSNAHMEN	9
17. TECHNISCHE MERKMALE	9
18. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	9
19. LITERATUR	10

1. VERWENDUNGSZWECK

Die hier beschriebene LC-MS/MS-Applikation ist für die quantitative Bestimmung von Hepcidin in Serum geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Hepcidin ist ein kleines cysteinereiches Peptid, welches in der Leber produziert wird. Es reguliert die Eisenabsorption im Körper. Hepcidin wurde zunächst als ein zirkulierendes antimikrobielles 25-Aminosäuren-Peptid aus menschlichem Urin und Blut isoliert. Humanes Hepcidin wird als Pro-Hepcidin, ein 84-Aminosäuren-Vorläufer, mit einem Signalpeptid aus 24 Aminosäuren synthetisiert.

Aus humanem Urin wurden zwei Hauptformen charakterisiert, Hepcidin-20 und Hepcidin-25, die sich durch eine aminoternale Verkürzung unterscheiden, aus 20 bzw. 25 Aminosäuren bestehen und acht durch intramolekulare Disulfidbrücken verknüpfte Cysteine enthalten. Es wurde gezeigt, dass Hepcidin-Überexpression zu einer starken Eisenmangel-Anämie in transgenen Mäusen führt, ein Hinweis auf die entscheidende Rolle von Hepcidin im Eisenmetabolismus. Neuere Studien haben eine abnormale Hepcidin-Expression und gestörte Hepcidin-Regulation des Hämochromatose-Gens gezeigt. Eine Störung des Hepcidin-Regulationsmechanismus hat somit eine direkte Auswirkung auf den Eisenmetabolismus im Organismus. Reduzierte Hepcidin-Expression, beispielsweise durch einen genetischen Defekt, führt unmittelbar zu einer Überladung an Eisen, was unter der Eisenspeicherkrankheit Hämochromatose bekannt ist. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde geschlossen, dass Hepcidin eine Schlüsselkomponente der Eisenhomöostase ist und als negativer Regulator der zellularen Eisenaufnahme in den Dünndarm-Mukosazellen und Abgabe in den Makrophagen wirkt.

Hepcidin kann unabhängig von Begleiterkrankungen als früher prädiktiver Marker eines funktionellen Eisenmangels und/oder abweichender Eisennutzung dienen.

3. TESTPRINZIP

Zur Bestimmung von Hepcidin 25 stehen je nach Empfindlichkeit des LC-MS/MS-Systems unterschiedliche Probenvorbereitungen zur Verfügung:

1. Für alle LC-MS/MS-Geräte geeignet ist die Probenvorbereitung über eine SPE-Aufarbeitung mittels μ Elution 96-well-plate.
2. Für empfindliche LC-MS/MS-Geräte ist auch eine Probenvorbereitung über 1 ml-Kartuschen geeignet.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KM4000LA	MOPHA A	Laufmittel A	1000 ml
KM4000LB	MOPHA B	Laufmittel B	1000 ml
KM4000KA	CAL 1 CAL 2	Kalibratoren 1 und 2 (-20°C; lyophilisiert; Konzentration, siehe Produktspezifikation)	je 3 Fläschchen
KM4000KO	CTRL 1 CTRL 2	Kontrollen 1 und 2 (-20°C; lyophilisiert; Konzentration, siehe Produktspezifikation)	je 3 Fläschchen
KM4000IS	INT STD	Interner Standard (lyophilisiert)	5 x 2 ml
KM4000AC	ACTSOL	Aktivierungsreagenz	2,5 ml
KM4000W1	WASH 1	Waschlösung 1	50 ml
KM4000W2	WASH 2	Waschlösung 2	20 ml
KM4000EL	ELUSOL	Elutionslösung	10 ml
KM4000RE	RECSOL	Rekonstitutionslösung	25 ml

Die UPLC Trennsäule (KM4000RP), die Reinsubstanzen zum Tunen der Geräte, sowie die μ Elutionsplatten (KM4000PL) bzw. Oasis®HLB, 1cc (10 mg) Kartuschen (KM4000CK) können separat bei der Firma 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

- μ Elution 96 well plate (z. B. Oasis® HLB, 30 μ m) bzw. Oasis®HLB, 1cc (10 mg) Kartuschen
- Reagenzgefäße aus Glas, LC-MS/MS-geeignet
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10–1000 μ l
- Vakuumstation für μ Elutionsplatten bzw. Absaugereinheit für Festphasenextraktionskartuschen
- Vortex-Mixer
- LC-MS/MS-Anlage
- RP-C₁₈ Säule, z. B. XSelect CSH C18 (2,1 x 50 mm), 2,5 μ m
- Methanol p. a.
- Reinstwasser*

* 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 μ m) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 μ S/cm bei 25 °C (\geq 18,2 M Ω cm).

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

Lagerung

Die Testreagenzien sind bei 2–8 °C, die Kalibratoren (CAL 1 und CAL 2) und die Kontrollen (CTRL 1 und CTRL 2) bei -20 °C bis zum Verfallsdatum verwendbar.

Achtung: Die -20 °C-Komponenten sollten nicht wiederholt eingefroren werden.

Vorbereitung Laufmittel

Die Laufmittel (MOPHA A und MOPHA B) müssen vor Gebrauch mit 0,1 % Aktivierungsreagenz (ACTSOL) versetzt werden, z. B.

500 ml MOPHA + 500 µl ACTSOL

Die hergestellten Lösungen sind dann noch 2 Wochen verwendbar, es wird daher empfohlen, nur so viel anzusetzen, wie für den Testansatz benötigt wird.

Achtung: Das Aktivierungsreagenz muss unter dem Abzug zugesetzt werden. Alle zu verwendenden Gefäße müssen absolut sauber und detergentienfrei und vorzugsweise aus LC-MS/MS-geeignetem Glas sein.

Vorbereitung Kalibratoren, Kontrollen und interner Standard

Die **Kalibratoren** (CAL 1, CAL 2) werden in 500 µl, die **Kontrollen** (CTRL 1, CTRL 2) in 250 µl Rekonstitutionslösung (RECSOL) gelöst.

Der **interne Standard** (INT STD) wird in 2 ml Rekonstitutionslösung (RECSOL) gelöst. Die hergestellte Lösung ist dann noch 1 Woche verwendbar.

7. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG

Als Probe eignet sich Serum. Die Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.

Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, die Raumtemperatur (18–26 °C) aufweisen.

Vor Gebrauch Reagenzien und Proben gut mischen.

Vorbereitung der 96-Well-µElutionsplatte bzw. der 1-ml-Kartuschen

Konditionieren der benötigten wells bzw. Kartuschen mit 200 µl Methanol und anschließendes Äquilibrieren mit 200 µl Reinstwasser.

8. TESTDURCHFÜHRUNG

1.	In die vorbereiteten wells/Kartuschen werden pipettiert: 200 µl Probe, Kalibrator (CAL 1 und CAL 2) oder Kontrolle (CTRL 1, CTRL 2) + 100 µl interner Standard (INT STD), absaugen
1.	200 µl Waschlösung 1 (WASH 1), absaugen
2.	200 µl Waschlösung 2 (WASH 2), absaugen
3.	200 µl Waschlösung 1 (WASH 1), absaugen
4.	Anschließend werden die wells / Kartuschen mit 100 µl Elutionslösung (ELUSOL) eluiert
6.	Das Eluat wird 1:1 mit Waschlösung 1 (WASH 1) verdünnt, z. B. 75 µl Eluat + 75 µl WASH 1 Von der so enthaltenen Verdünnung werden 50 µl in das LC-MS/MS-System injiziert

9. CHROMATOGRAPHISCHE BEDINGUNGEN

Säulenmaterial: XSelect CSH C18

Säulendimension: 2,1 x 50 mm

Fluss: 0,4 ml/min

Säulentemperatur: 35 °C

Auftragsvolumen: 50 µl

Laufzeit: 6 Minuten

Gradient:

Zeit	% A	% B
0 min	90	10
1,5 min	90	10
3,0 min	5	95
4,0 min	5	95
5,0 min	90	10
6,0 min	90	10

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

Nach der Analyse sollte die Trennsäule mit ca. 20 ml 50% Methanol gespült werden. Die Säule kann in 50% Methanol gelagert werden.

10. MS/MS-METHODE (BEISPIELHAFT AUFGEFÜHRT FÜR EIN WATERS QUATTRO PREMIER XE TANDEM MASSENSPEKTROMETER)

Modus:	MRM
Polarität:	ESI ⁺
Kapillarspannung (kV):	4
Konusspannung (V):	var.
Extraktor (V):	4
RF-Linse (V):	0
Quellentemperatur (°C):	130
Desolvation-Temperatur (°C):	500
Gasfluss am Konus (l/h):	300
Desolvation-Gasfluss (l/h):	950
Kollisionsgasfluss (ml/min):	0,25

MRM-Übergänge (m/z)

Hepcidin 25 (Molekulargewicht: 2789,4 g/mol)

698,41 > 644,54	Konusspannung: 37	Kollisionsenergie: 23
698,41 > 354,09	Konusspannung: 37	Kollisionsenergie: 33

Das gefundene Vorläuferion entspricht der vierfach geladenen Masse.

Interner Standard (Calcitonin Gene Related Peptide human; Molekulargewicht: 3789,31 g/mol)

758,91 > 718,83	Konusspannung: 40	Kollisionsenergie: 25
758,91 > 689,5	Konusspannung: 40	Kollisionsenergie: 25

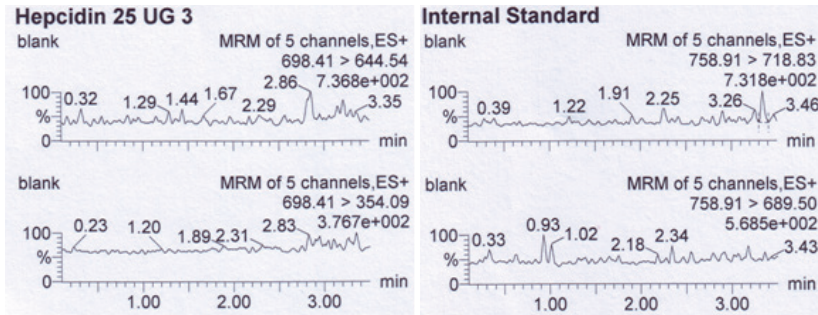
Das gefundene Vorläuferion entspricht der fünffach geladenen Masse.

11. AUSWERTUNG

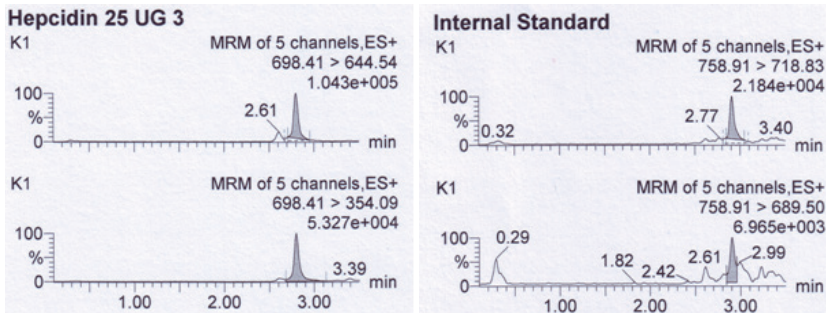
Als Modell zur Auswertung kann die lineare Regression unter Berücksichtigung des internen Standards verwendet werden. Zwischen den beiden Kalibratorkonzentrationen wird eine Gerade gelegt. Anhand dieser können dann die Proben berechnet werden.

12. MUSTERCHROMATOGRAMME

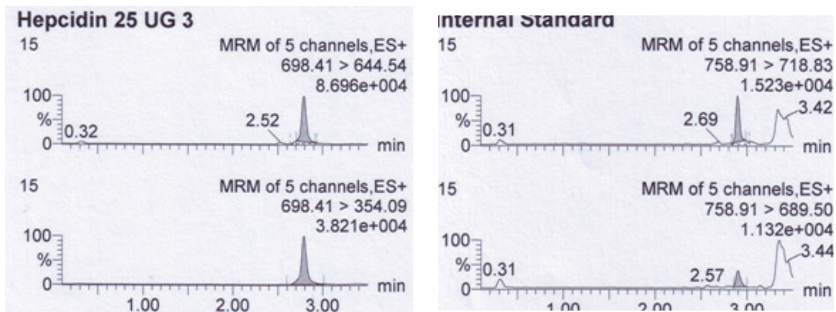
Blank



Kalibrator



Probe



13. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

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.

Referenzwerte

Vorläufiger Referenzbereich (Serum): $\leq 4 \text{ nmol/l}$ (11,15 ng/ml)

Thomas et al., 2011

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

14. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 4)

Probe	Hepcidin 25 [ng/ml]	VK [%]
1	63,8	2,6

Inter-Assay (n = 10)

Probe	Hepcidin 25 [ng/ml]	VK [%]
1	68,7	7,3
2	124,5	3,8

Nachweisgrenze

Nachweisgrenze Hepcidin 25: 1 ng/ml

Es muss beachtet werden, dass die Bestimmung der Nachweisgrenze nicht ausschließlich applikations-, sondern auch geräteabhängig ist.

15. ENTSORGUNG

Laufmittel (MOPHA), Elutionslösung (ELUSOL), Aktivierungsreagenz (ACTSOL) und Waschlösung 2 (WASH 2) müssen als halogenfreier Lösungsmittelabfall entsorgt werden.

16. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- 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.

17. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

18. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- 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.

- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

19. LITERATUR

1. Bridle, K.R. et al., 2003. Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis. *Lancet*, 361(9358), pp.669–73.
2. Ganz, T., 2003. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood*, 102(3), pp.783–8.
3. Krause, a et al., 2000. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS letters*, 480(2-3), pp.147–50.
4. Kulaksiz, H. et al., 2004. Pro-hepcidin: expression and cell specific localisation in the liver and its regulation in hereditary haemochromatosis, chronic renal insufficiency, and renal anaemia. *Gut*, 53(5), pp.735–43.
5. Nemeth, E. et al., 2003. Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood*, 101(7), pp.2461–3.
6. Nicolas, G., Viatte, L., et al., 2002. Hepcidin, a new iron regulatory peptide. *Blood cells, molecules & diseases*, 29(3), pp.327–35.
7. Nicolas, G. et al., 2001. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(15), pp.8780–5.
8. Nicolas, G., Bennoun, M., et al., 2002. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(7), pp.4596–601.
9. Park, C.H. et al., 2001. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *The Journal of biological chemistry*, 276(11), pp.7806–10.
10. Roetto, A. et al., 2003. Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nature genetics*, 33(1), pp.21–2.
11. Thomas, C., Kobold, U. & Thomas, L., 2011. Serum hepcidin-25 in comparison to biochemical markers and hematological indices for the differentiation of iron-restricted erythropoiesis. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*, 49(2), pp.207–13.

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer

*In-Vitro*-Diagnostikum

Zu verwenden mit



Hersteller

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Chargenbezeichnung



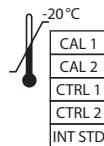
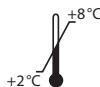
Verwendbar bis

Hepcidin 25 LC-MS/MS Kit

For the determination of hepcidin in serum

Valid from 13.05.2014

REF **KM4000**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	15
2. INTRODUCTION	15
3. PRINCIPLE OF THE TEST	15
4. MATERIAL SUPPLIED	16
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	16
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	17
<i>Mobile phases</i>	17
<i>Calibrators, controls and internal standard</i>	17
7. SAMPLE PREPARATION	17
8. TEST PROCEDURE	18
9. CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS	18
10. MS/MS-METHOD (LISTED AS AN EXAMPLE FOR A WATERS QUATTRO PREMIER XE TANDEM MASS SPECTROMETER)	19
<i>MRM transitions (m/z)</i>	19
11. CALCULATION	19
12. EXAMPLES OF CHROMATOGRAMS	20
13. QUALITY CONTROL	21
14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	21
<i>Precision and reproducibility</i>	21
<i>Detection limit</i>	21
15. DISPOSAL	21
16. PRECAUTIONS	22
17. TECHNICAL HINTS	22
18. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	22
19. REFERENCES	22

1. INTENDED USE

The described LC-MS/MS application is intended for the quantitative determination of hepcidin in serum. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Hepcidin is a small cystein-rich peptide produced in the liver. It regulates the absorption of iron in the body. Hepcidin was initially isolated as a circulating, antimicrobial 25 amino acid peptide in human urine and blood. Human hepcidin is synthesized as prohepcidin, a 84 amino acid precursor, including a putative signal peptide of 24 amino acids. From human urine, two predominant forms, hepcidin-20 and hepcidin-25, differing by amino-terminal truncation, were characterized as 20 and 25 amino acid residues with 8 cysteines connected by intramolecular disulfide bonds. An over-expression of hepcidin was shown to result in severe iron deficiency anemia in transgenic mice, indicating that hepcidin plays a pivotal role in iron metabolism. Recent studies have found abnormal hepcidin expression and disrupted hepcidin regulation in hemochromatosis gene. A disturbed hepcidin regulation mechanism has a direct effect on the iron metabolism in the organism. Decreased hepcidin expression, e.g. due to a genetic defect, results in a direct iron overload, known as the iron disease hemochromatosis. Based on these observations, it has been suggested that hepcidin is a key component of iron homeostasis that acts as a negative regulator of iron absorption in the small intestine and of iron release from macrophages.

Hepcidin can be used independently of accompanying diseases as an early predictive marker for functional iron deficiency and/or anomalous iron utilization.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

For the determination of Hepcidin 25 samples, we developed two sample extraction methods depending on the LC-MS/MS system used.

1. Suitable for all LC-MS/MS systems is the procedure using a SPE μ Elution 96 well plate.
2. Suitable for high sensitive LC-MS/MS systems is also a SPE procedure using 1 ml cartridges.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
KM4000LA	MOPHA A	Mobile phase A	1000 ml
KM4000LB	MOPHA B	Mobile phase B	1000 ml
KM4000KA	CAL 1 CAL 2	Calibrators 1 and 2 (-20°C; lyophilized; concentration, see product specification)	3 vials each
KM4000KO	CTRL 1 CTRL 2	Controls 1 and 2 (-20°C; lyophilized; concentration, see product specification)	3 vials each
KM4000IS	INT STD	Internal Standard (lyophilized)	5 x 2 ml
KM4000AC	ACTSOL	Activation solution	2.5 ml
KM4000W1	WASH 1	Wash solution 1	50 ml
KM4000W2	WASH 2	Wash solution 2	20 ml
KM4000EL	ELUSOL	Elution solution	10 ml
KM4000RE	RECSOL	Reconstitution solution	25 ml

The UPLC separation column (KM4000RP), the pure substances for instrument tuning, as well as the μ Elution plates (KM4000PL) and the Oasis®HLB, 1cc (10 mg) cartridges (KM4000CK) can be ordered separately from Immundiagnostik AG. The complete Kit as well as all individual components can be ordered separately. Please ask for our single component price list.

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- μ Elution 96 well plate (e.g. Oasis®HLB, 30 μ m) / Oasis®HLB, 1cc (10 mg) cartridges
- Glass vials; LC-MS/MS-suitable
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10-1000 μ l
- Vacuum station for μ Elution plates / 1 ml cartridges
- Vortex-Mixer
- LC-MS/MS equipment
- RP-C18 column, e.g. XSelect CSH C18 (2,1 x 50 mm), 2,5 μ m
- Methanol p.a.
- Ultra pure water*

* 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 μ m) with an electrical conductivity of 0.055 μ S/cm at 25 °C (\geq 18.2 M Ω cm).

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

The test reagents are stable until the expiry date when stored at 2–8 °C; calibrators (CAL 1 and CAL 2) and controls (CTRL 1 and CTRL 2) at -20 °C.

WARNING: Do not repeatedly freeze and thaw the -20 °C components.

Mobile phases

Before use, a 0,1 % activation reagent (ACTSOL) must be added to the mobile phases (MOPHA A and MOPHA B), e. g.

500 ml MOPHA + 500 µl ACTSOL

The prepared solutions can be used within 2 weeks. For this reason, it is recommended to prepare only the desired amount necessary for each assay.

WARNING: The activation reagent (ACTSOL) must be added under the fume hood. All vials to be used must be absolutely clean, detergent-free and preferably made of a LC-MS/MS suitable glass.

Calibrators, controls and internal standard

Dissolve **calibrators** (CAL 1, CAL 2) in 500 µl and **controls** (CTRL 1, CTRL 2) in 250 µl of reconstitution solution (RECSOL).

Dissolve **internal standard** (INT STD) in 2 ml of reconstitution solution (RECSOL). The prepared solutions can be used within 1 week.

7. SAMPLE PREPARATION

Use serum as sample material for the assay.

The quality controls should be analyzed with each run.

Prior to use in the assay, allow all samples and reagents to come to room temperature (18–26 °C). Mix well samples and reagents before use.

Preparation of the 96-well µElution plate / 1 ml cartridges

Conditioning of the wells / cartridges needed with 200 µl methanol and subsequent equilibration with 200 µl ultra pure water.

8. TEST PROCEDURE

1.	Pipet in the prepared wells / cartridges: 200 µl sample, calibrator (CAL 1 und CAL 2) or control (CTRL 1, CTRL 2) + 100 µl internal standard (INTSTD), evacuate
2.	200 µl wash solution 1 (WASH 1), evacuate
3.	200 µl wash solution 2 (WASH 2), evacuate
4.	200 µl wash solution 1 (WASH 1), evacuate
5.	Afterwards, elute the wells / cartridges with 100 µl elution solution (ELU-SOL)
6.	Dilute the eluate 1:1 with wash solution 1 (WASH 1), e. g. 75 µl eluate + 75 µl WASH 1 Inject 50 µl of diluted solution into the LC-MS/MS system

9. CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS

Column material: e.g. XSelect CSH C18 (2,1 x 50 mm), 2,5 µm

Column dimension: 2.1 x 50 mm

Flow: 0.4 ml/min

Column temperature: 35 °C

Inject volume: 50 µl

Run time: 6 min

Gradient:

Time	% A	% B
0 min	90	10
1,5 min	90	10
3,0 min	5	95
4,0 min	5	95
5,0 min	90	10
6,0 min	90	10

We recommend to use a guard column/filter to extend column's life.

After the analysis, the separation column should be washed with ~20 ml of 50% me-

thanol. The column can be stored in 50% methanol.

10. MS/MS-METHOD (LISTED AS AN EXAMPLE FOR A WATERS QUATTRO PREMIER XE TANDEM MASS SPECTROMETER)

Mode:	MRM
Polarity:	ESI+
Capillary (kV):	4
Cone (V):	var.
Extracor (V):	4
RF Lens (V):	0
Source temperature (°C):	130
Desolvation Temperatur (°C):	500
Cone Gas Flow (l/h):	300
Desolvation Gas Flow (l/h):	950
Collision Gas Flow (ml/min):	0,25

MRM transitions (m/z)

Hepcidin-25 (Molecular weight: 2789.4 g/mol)

698.41 > 644.54 Cone voltage: 37 Collision energy: 23

698.41 > 354.09 Cone voltage: 37 Collision energy: 33

The detected precursor ion corresponds to the 4-fold charged mass.

Internal Standard (Calcitonin Gene Related Peptide human; Molecular weight: 3789,31 g/mol)

758.91 > 718.83 Cone voltage: 40 Collision energy: 25

758.91 > 689.5 Cone voltage: 40 Collision energy: 25

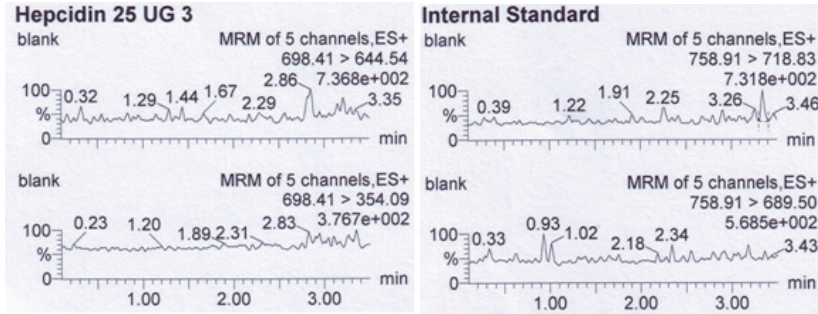
The detected precursor ion corresponds to the 5-fold charged mass.

11. CALCULATION

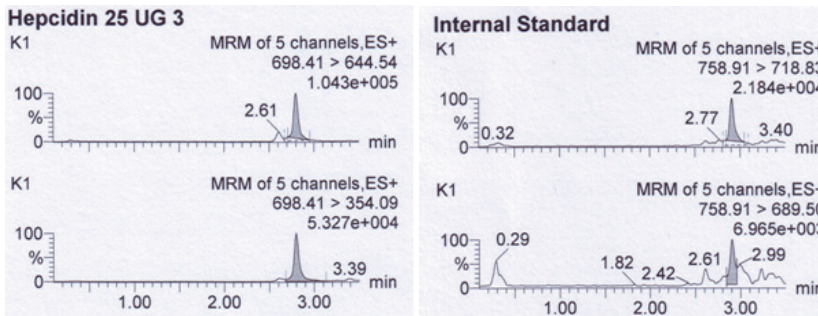
The linear regression can be used as model for evaluation of the results, whereby the internal standard should be considered. The two calibrator concentration points are connected by a straight line. The samples can be calculated using the obtained line.

12. EXAMPLES OF CHROMATOGRAMS

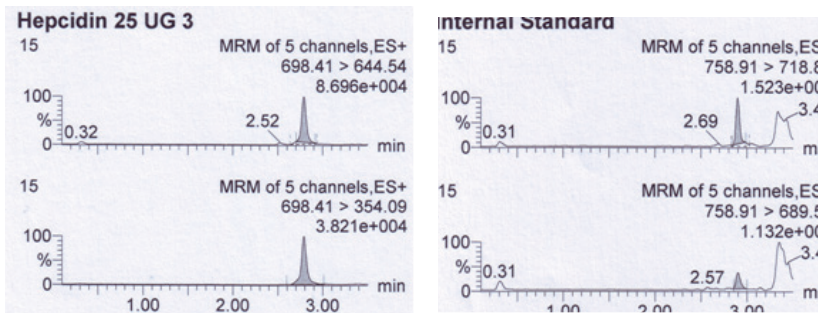
Blank



Calibrator



Sample



13. QUALITY CONTROL

Control samples should be analyzed 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.

Reference values

Preliminary reference range (serum): ≤ 4 nmol/l (11,15 ng/ml)

(Thomas et al., 2011)

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 4)

Sample	Hepcidin 25 [ng/ml]	CV [%]
1	63.8	2.6

Inter-Assay (n = 10)

Sample	Hepcidin 25 [ng/ml]	CV [%]
1	68.7	7.3
2	124.5	3.8

Detection limit

Detection limit Hepcidin 25: 1 ng/ml

It should be noted that the determination of the detection limit depends not only on the application method but also on the instrument.

15. DISPOSAL

Mobile phase (MOPHA), elution solution (ELUSOL), activation reagent (ACTSOL) and wash solution 2 (WASH 2) must be disposed as non-halogenated solvents.

16. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Human material used in the kit components was 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.

17. TECHNICAL HINTS

- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- Control samples should be analyzed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

18. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- 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.
- 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 wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be lodged within 14 days after receipt of the product. The product shall be send to Immundiagnostik AG together with a written complaint.

19. REFERENCES

1. Bridle, K.R. et al., 2003. Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis. *Lancet*, 361(9358), pp.669–73.
2. Ganz, T., 2003. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of ane-

- mia of inflammation. *Blood*, 102(3), pp.783–8.
3. Krause, a et al., 2000. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS letters*, 480(2-3), pp.147–50.
 4. Kulaksiz, H. et al., 2004. Pro-hepcidin: expression and cell specific localisation in the liver and its regulation in hereditary haemochromatosis, chronic renal insufficiency, and renal anaemia. *Gut*, 53(5), pp.735–43.
 5. Nemeth, E. et al., 2003. Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood*, 101(7), pp.2461–3.
 6. Nicolas, G., Viatte, L., et al., 2002. Hepcidin, a new iron regulatory peptide. *Blood cells, molecules & diseases*, 29(3), pp.327–35.
 7. Nicolas, G. et al., 2001. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(15), pp.8780–5.
 8. Nicolas, G., Bennoun, M., et al., 2002. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(7), pp.4596–601.
 9. Park, C.H. et al., 2001. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *The Journal of biological chemistry*, 276(11), pp.7806–10.
 10. Roetto, A. et al., 2003. Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nature genetics*, 33(1), pp.21–2.
 11. Thomas, C., Kobold, U. & Thomas, L., 2011. Serum hepcidin-25 in comparison to biochemical markers and hematological indices for the differentiation of iron-restricted erythropoiesis. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*, 49(2), pp.207–13.

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