

Hepcidin 25 LC-MS/MS Tuning Kit

Zur Bestimmung der optimalen LC-MS/MS Einstellungen

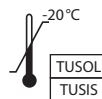
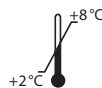
For determination of the optimal LC-MS/MS settings

EU: IVD / CE

US: Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Gültig ab / Valid from 13.05.2014

REF **KM4001**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

e.mail: info@immundiagnostik.com

Fax: + 49 6251 849430

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. INHALT DER TESTPACKUNG	2
3. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	2
4. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	2
5. TESTDURCHFÜHRUNG	3
<i>Tuning</i>	3
<i>Empfindlichkeitstest</i>	4
6. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE	5
7. AUSWERTUNG	5
8. ENTSORGUNG	6
9. VORSICHTSMASSNAHMEN	6
10. TECHNISCHE MERKMALE	6
11. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	6

1. VERWENDUNGSZWECK

Zur Vorbereitung der Immundiagnostik Hepcidin 25 LC-MS/MS-Applikation ist das Tuning notwendig. Der Tuning-Kit ist für die Findung der optimalen LC-MS/MS-Einstellungen sowie für die Überprüfung ausreichender Empfindlichkeit geeignet.

Die von Immundiagnostik AG empfohlenen MS/MS-Parameter dienen lediglich der Orientierung und müssen von jedem Labor für die Messung optimiert werden.

2. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KM4000LA	MOPHA A	Laufmittel A	1000 ml
KM4000LB	MOPHA B	Laufmittel B	1000 ml
KM4000AC	ACTSOL	Aktivierungsreagenz	2,5 ml
KM4001TU	TUSOL	Tuning-Lösung	5 ml
KM4001TS	TUSIS	Tuning-Lösung interner Standard (lyophilisiert)	2 ml
KM4001SO	SOL A	Lösung A	25 ml

Die UPLC-Trennsäule mit Inline-Filter (KM4000RP) kann separat bei Immundiagnostik bestellt werden.

3. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Vortexer
- 2-ml-Glasgefäße, LC-MS/MS-geeignet
- 500-ml-Messzylinder, LC-MS/MS-geeignet
- Diverse Pipetten
- LC-MS/MS-Anlage
- RP-C₁₈ Säule, z. B. XSelect CSH C18 (2,1 x 50 mm), 2,5 µm

4. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

Laufmittel und Lösung A

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

z. B. 500 ml MOPHA (MOPHA A oder MOPHA B) + 500 µl ACTSOL

Die hergestellten Lösungen sind dann noch 2 Wochen verwendbar.

ACHTUNG: Das Aktivierungsreagenz muss unter dem Abzug zugesetzt werden. Alle

zu verwendenden Gefäße müssen absolut sauber und detergentienfrei sein und vorzugsweise aus LC-MS/MS-geeignetem Glas.

Tuning-Lösung interner Standard

Tuning-Lösung interner Standard (TUSIS) wird mit 2 ml aktivierter Lösung A gelöst. Die hergestellte Lösung ist maximal 1 Woche verwendbar.

Tuning-Lösung

Tuning-Lösung (TUSOL) ist bei -20 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum verwendbar.

Sonstige Reagenzien

Alle anderen Reagenzien sind bei 2–8 °C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar.

5. TESTDURCHFÜHRUNG

Tuning

Wir empfehlen das Tuning mit einem T-Stück (UPLC/HPLC-Fluss und Spritzenpumpe) durchzuführen. Die Tuning-Lösungen (TUSOL, TUSIS) bestehen aus hochreinem Hepcidin 25 und internem Standard (human Calcitonin Gene Related Peptide) mit einer Konzentration von 1 µg/ml.

HPLC/UPLC Fluss von aktiviertem MOPHA A: 0,2 ml/min

Fluss der Spritzenpumpe mit den Tuning-Lösungen (TUSOL, TUSIS): 10–20 µl/min

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.

Empfindlichkeitstest

Ist das Mutterion stabil und können zufriedenstellende Fragmente gefunden werden, sollte eine Verdünnungsreihe der Tuning-Lösung erstellt werden. Mit dieser Verdünnungsreihe kann die Linearität und Empfindlichkeit des LC-MS/MS-Systems geprüft werden.

Erstellung der Verdünnungsreihe

Die Tuning-Lösung (TUSOL) wird in aktivierter Lösung A (SOL A) wie folgt verdünnt:

1.) Erstellen der höchsten Konzentration:

TUSOL 1:2 in SOL A

z.B. 500 µl TUSOL in 500 µl SOL A (500 ng/ml)

2.) Erstellung der Verdünnungsreihe:

			Konzentration [ng/ml]
1000 µl	500 ng/ml		500
500 µl	500 ng/ml	500 µl SOL A	250
400 µl	250 ng/ml	600 µl SOL A	100
100 µl	100 ng/ml	900 µl SOL A	10
100 µl	10 ng/ml	900 µl SOL A	1
		1000 µl SOL A	Blank

50 µl der Proben können direkt in das LC-MS/MS-System injiziert werden. Wir empfehlen, die Proben in Doppelwerten zu injizieren. Zur Ermittlung der Retentionszeit kann auch im ersten Schritt nur die höchste Konzentration 500 ng/ml injiziert werden.

Chromatographische Bedingungen:

Säulenmaterial: z. B. XSelect CSH C18 (2,1 x 50 mm), 2,5 µm

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.

6. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE

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

7. AUSWERTUNG

Die erhaltenen Flächen werden gegen die Konzentrationen aufgetragen und es wird eine Regressionsgerade erstellt. Die niedrigste Konzentration 1 ng/ml sollte gefunden werden, um die notwendige Empfindlichkeit zu erhalten.

Sind die Ergebnisse zufriedenstellend, kann mit dem Hepcidin 25 LC-MS/MS-Kit der Immundiagnostik AG aus Serum gemessen werden.

8. ENTSORGUNG

Laufmittel (MOPHA), Tuning-Lösungen (TUSOL, TUSIS), Aktivierungsreagenz (ACTSOL) und Lösung A (SOL A) müssen als halogenfreier Lösungsmittelabfall entsorgt werden.

9. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Reagenzien dieser Testpackung enthalten organische Lösungsmittel. Berührungen mit der Haut oder den Schleimhäuten sind zu vermeiden.
- Die Laufmittel (MOPHA A und MOPHA B), Tuning-Lösungen (TUSOL, TUSIS) und Lösung A (SOL A) enthalten organische Lösungsmittel und müssen mit Vorsicht behandelt werden. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille in einem Abzug gearbeitet werden.
- Das ACTSOL (Aktivierungsreagenz) besteht aus einer starken Säure und muss mit Vorsicht benutzt werden. ACTSOL (Aktivierungsreagenz) verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

10. TECHNISCHE MERKMALE

- Einzelkomponenten mit unterschiedlichen Lot-Nummern aus verschiedenen Testpackungen sollten nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.

11. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- 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.

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

Hepcidin 25 LC-MS/MS Tuning Kit

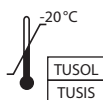
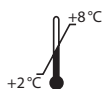
For determination of the optimal LC-MS/MS settings

EU: IVD / CE

US: Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Valid from 13.05.2014

REF **KM4001**



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

Table of Contents

1. INTENDED USE	11
2. MATERIAL SUPPLIED	11
3. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	11
4. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	11
5. ASSAY PROCEDURE	12
<i>Tuning</i>	12
<i>Sensitivity test</i>	13
6. TREATMENT OF THE COLUMN	14
7. RESULTS	14
8. DISPOSAL	15
9. PRECAUTIONS	15
10. TECHNICAL HINTS	15
11. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	15

1. INTENDED USE

In preparation for the Immundiagnostik Hepcidin 25 LC-MS/MS application, an instrument tuning is necessary. The tuning kit is intended for determination of the optimal LC-MS/MS settings as well as for testing the sensitivity of the instrument.

The MS/MS parameters recommended by Immundiagnostik AG are only for orientation and must be optimized for each instrument.

2. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
KM4000LA	MOPHA A	Mobile Phase A	1000 ml
KM4000LB	MOPHA B	Mobile Phase A	1000 ml
KM4000AC	ACTSOL	Activating reagent	2.5 ml
KM4001TU	TUSOL	Tuning solution	5 ml
KM4001TS	TUSIS	Tuning solution, internal Standard (lyophilized)	2 ml
KM4001SO	SOL A	Solution A	25 ml

The UPLC column with inline filter (KM4000RP) can be ordered separately from Immundiagnostik.

3. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Vortex mixer
- 2 ml glass vials, suitable for LC-MS/MS
- 500 ml measuring cylinder, suitable for LC-MS/MS
- Different pipettors
- LC-MS/MS instrument
- RP-C18 column, e.g. XSelect CSH C18 (2,1 x 50 mm), 2,5 µm

4. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

Mobile phases and solution A

Add 0.1 % activation reagent (ACTSOL) to the mobile phases (MOPHA A, MOPHA B) and solution A (SOL A) before use:

e.g. 500 ml MOPHA (MOPHA A or MOPHA B) + 500 µl ACTSOL

The obtained solutions are stable for 2 weeks.

Warning: The activation reagent (ACTSOL) must be added under the fume hood. All vials to be used must be absolutely clean and detergent-free as well as preferentially made of glass suitable for LC-MS/MS analysis.

Tuning solution internal standard

Dissolve tuning solution internal standard (TUSIS) in 2 ml of activated solution A. The reconstituted solution is stable for maximally 1 week.

Tuning solution

Tuning solution (TUSOL) can be stored at -20°C and used until the expiration date given on the label.

Other reagents

All other reagents are stable at 2–8°C up to the date of expiry stated on the label.

5. ASSAY PROCEDURE

Tuning

We recommend tuning with a T-fitting (UPLC/HPLC flow rate and a syringe pump). The tuning solutions (TUSOL, TUSIS) consist of a highly pure hepcidin 25 and an internal standard (human calcitonin gene related peptide), with a concentration of 1 µg/ml each.

HPLC/UPLC flow rate of activated MOPHA A: 0.2 ml/min

Flow rate of syringe pump with the tuning solutions (TUSOL, TUSIS): 10–20 µl/min

MS/MS method (e. g. 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.

Sensitivity test

After obtaining a stable precursor ion and the corresponding fragment ions, a dilution series of the tuning solution are prepared to test the linearity and sensitivity of the LC-MS/MS system.

Preparation of the dilution series

The tuning solution (TUSOL) is diluted with activated solution A (SOL A) as follows:

1.) Preparation of the highest concentration:

TUSOL 1:2 in SOL A

e.g. 500 µl TUSOL in 500 µl SOL A (500 ng/ml)

2.) Preparation of the dilution series:

			Concentration [ng/ml]
1000 µl	500 ng/ml		500
500 µl	500 ng/ml	500 µl SOL A	250
400 µl	250 ng/ml	600 µl SOL A	100
100 µl	100 ng/ml	900 µl SOL A	10
100 µl	10 ng/ml	900 µl SOL A	1
		1000 µl SOL A	Blank

50 µl of the samples can be injected directly in the LC-MS/MS system. A duplicate injection of the samples is recommended. For determination of the retention time, solely the highest concentration of 500 ng/ml can be injected in the first step.

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

It is recommended that a guard column or inline filter is used to extend column life.

6. TREATMENT OF THE COLUMN

After the analysis, the column should be washed with ~20 ml of 50 % methanol. The column can be stored in 50 % methanol.

7. RESULTS

The obtained areas are plotted against the concentrations and a linear regression curve is generated. The lowest concentration of 1 ng/ml should be found to obtain the necessary sensitivity.

When the obtained results are satisfying, the hepcidin 25 LC-MS/MS kit of Immundiagnostik AG can be used for measurement of hepcidin 25 in serum.

8. DISPOSAL

The mobile phases (MOPHA A, MOPHA B), tuning solutions (TUSOL, TUSIS), activating reagent (ACTSOL) and solution A (SOL A) must be disposed as non-halogenated solvents.

Please refer to the appropriate national guidelines.

9. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- The mobile phases (MOPHA A and MOPHA B) as well as tuning solutions (TUSOL, TUSIS) and solution (SOL A) contain organic solvents and must be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing in a hood.
- The ACTSOL (activation reagent) consists of a strong acid and must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.

10. TECHNICAL HINTS

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

11. 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.
- 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 Im-mundiagnostik AG together with a written complaint.

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue Number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		Contains sufficient for <n> tests
	Manufacturer		Use by
	Lot number		