

25-OH Vitamin D₃ / D₂ HPLC Kit

*Zur Bestimmung von 25-OH Vitamin D₃ und 25-OH Vitamin D₂
in Plasma und Serum*

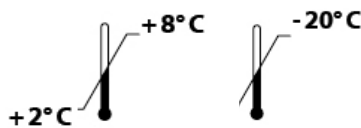
25-OH Vitamin D₃ / D₂ HPLC Kit

*For the determination of 25-OH Vitamin D₃ and
25-OH Vitamin D₂ in plasma and serum*

Gültig ab/valid from 07.01.2009

REF

KC 3420



CAL
CTRL 1
CTRL 2
STD 2
STD 3

CE

IVD



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

Inhaltsverzeichnis/Table of contents	Seite/Page
1. VERWENDUNGSZWECK	3
2. EINLEITUNG	3
3. TESTPRINZIP	3
4. INHALT DER TESTPACKUNG	5
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	5
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	6
7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	6
8. PROBENVORBEREITUNG	7
9. TESTDURCHFÜHRUNG	7
HINWEISE	7
VORBEREITUNG DER KARTUSCHEN:	7
REGENERIERUNG DER KARTUSCHEN:	7
ARBEITSSCHEMA	8
CHROMATOGRAPHISCHE BEDINGUNGEN	8
10. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE	9
11. AUSWERTUNG	9
BERECHNUNG	9
MUSTERCHROMATOGRAMM	9
12. EINSCHRÄNKUNGEN	10
13. QUALITÄTSKONTROLLE	10
NORMWERT-BEREICHE FÜR 25-OH-VITAMIN D	10
KONTROLLEN	11
14. TESTCHARAKTERISTIKA	11
PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT	11
LINEARITÄT	11
NACHWEISGRENZE	11
WIEDERFINDUNG	11
15. ENTSORGUNG	11
16. MASSNAHMEN BEI STÖRUNGEN	12
17. LITERATUR	13
18. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	13

1. INTENDED USE	15
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	15
3. PRINCIPLE OF THE TEST	15
4. MATERIAL SUPPLIED	16
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	17
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	17
7. PRECAUTIONS	17
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	18
9. ASSAY PROCEDURE	18
PROCEDURAL NOTES	18
PREPARATION OF THE SPE-CARTRIDGES	18
REGENERATION OF THE SPE-CARTRIDGES	18
SAMPLE AND STANDARD PREPARATION	19
CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS	20
10. TREATMENT OF THE COLUMN	20
11. RESULTS	21
CALCULATION	21
TYPICAL CHROMATOGRAM	21
12. LIMITATIONS	21
13. QUALITY CONTROL	22
EXPECTED VALUES	22
CONTROLS	23
14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	23
PRECISION AND REPRODUCIBILITY	23
LINEARITY	23
DETECTION LIMIT	23
RECOVERY	23
15. DISPOSAL	23
16. TROUBLESHOOTING	24
17. REFERENCES	25
18. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	25

1. VERWENDUNGSZWECK

Die HPLC-Applikation ist für die Bestimmung von 25 OH Vitamin D₃ und 25 OH Vitamin D₂ aus Serum und Plasma geeignet. Nur zur in vitro Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Die D-Vitamine oder Calciferole entstehen aus Provitaminen aufgrund einer durch die UV-Strahlung des Sonnenlichtes katalysierten Spaltung des B-Rings im Sterangerüst. Die beiden wichtigsten D-Vitamine sind Vitamin D₃ und Vitamin D₂. Im Gegensatz zum Provitamin D₂, das mit der Nahrung aufgenommen werden muß, kann das Provitamin D₃ auch in der Leber gebildet werden.

In der Haut gebildetes, oder mit der Nahrung gemeinsam mit Vitamin D₂ aufgenommenes Vitamin-D₃, wird an Vitamin-D-bindendes Protein im Plasma gebunden, zur Leber transportiert und dort in Position 25 unter Bildung von 25-OH-D hydroxyliert. Über 95% des im Serum meßbaren 25-OH-D ist 25-OH-D₃. Das 25-OH-D₂ wird nur bei Patienten unter Medikation mit Vitamin D₂ gemessen.

3. TESTPRINZIP

Zur Bestimmung des 25-OH Vitamin D₃ und 25 OH Vitamin D₂ wird im ersten Schritt eine Probenvorbereitung durchgeführt. Einem Fällungsschritt, zur Abtrennung höher molekularer Substanzen, folgt eine Festphasenextraktion auf C₁₈-Kartuschen. Das Eluat wird unter Stickstoff eingedampft, in Laufmittel aufgenommen und in das HPLC-System injiziert.

Die Trennung mittels HPLC erfolgt in einem isokratischen Verfahren bei 30 °C auf einer "normal phase" Säule. Die Aufnahme der Chromatogramme erfolgt mit einem UV-Detektor. Die Trennung benötigt ca. 20 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 durchgeführt. Die ethanolischen Standardlösungen dienen der Peakerkennung.

Zusammenfassung

Dieser Komplettkit enthält alle Reagenzien für die analytische HPLC-Trennung, sowie bis auf die Probenvorbereitungssäulen auch alle Reagenzien für die Probenextraktion.

Wie auch bei vielen anderen Parametern liegt der Vorteil der HPLC-Analytik in der gleichzeitigen Abarbeitung vieler Analyten 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 von Immunoassays 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 Immuno-Assays).

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
KC3420LM	MOPHA	Laufmittel	1000 ml
KC3420KA	CAL	Kalibrator (lyoph. 6 ml; Konzentration siehe Etikett)	2 Fläschchen
KC3420ST	STD2 STD3	Ethanolischer Standard D ₂ Ethanolischer Standard D ₃	je 1 ml
KC3420RE	RECSOL	Rekonstitutionslösung	20 ml
KC3420FR	PREC	Fällungsreagenz (enthält Azetonitril)	50 ml
KC3420WL	WASHSOL	Waschlösung	300 ml
KC3420EL	ELUSOL	Elutionslösung (enthält Azetonitril)	400 ml
KC3420RL	REGSOL	Regenerationslösung für C18-Kartuschen	300 ml
KC3420KO	CTRL1 CTRL2	Kontrolle 1 und 2 (lyoph. 0,6 ml; Konzentration siehe Produktspezifikation)	2 x 3 Fläschchen

Die HPLC Trennsäule (KC 3420RP) 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

- Zentrifuge
- Vortexer
- Glasröhrchen, mit Spitzboden
- 1.5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf)
- Diverse Pipetten
- HPLC-Anlage mit UV-Detektor
- Anlage zum Verdampfen von Proben
- Absaugeinheit für Festphasenextraktionskartuschen
- Methanol p.A.
- Kieselgelsäule, 4 µm, 125 x 4 mm
- Sep-Pack C18 Kartuschen, können bei Bedarf bei Immundiagnostik bezogen werden. (Art-Nr. KC3420CK)

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

Alle Testreagenzien werden gebrauchsfertig in gelöster Form geliefert, mit Ausnahme des Kalibrators und der Kontrollen.

Vorbereitung des Kalibrators und der Kontrollen

- Der **Kalibrator** (CAL) (EDTA-Plasma mit definierter Menge 25-OH Vitamin D₃ und 25-OH Vitamin D₂) wird in 6 ml Rekonstitutionslösung (RECSOL) gelöst, aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert. Der Gehalt an 25-OH Vitamin D₃ und 25-OH Vitamin D₂ ändert sich geringfügig von Charge zu Charge, der genaue Gehalt ist auf dem Etikett angegeben.
- Die **Kontrollen** (CTRL1, CTRL2) werden in 0,6 ml RECSOL resuspendiert.
- Die Testreagenzien sind bei 2-8°C, die Standardlösungen (STD2 und STD3), die Kontrollen (CTRL1, CTRL2) und der Kalibrator (CAL) gekühlt bei -20 °C, bis zum Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Kalibrator (CAL) und Kontrollen (CTRL1, CTRL2) sind auf Humanplasma aufgebaut. Sie sind auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befundet worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Das Fällungsreagenz (PREC) und die Elutionslösung (ELUSOL) bestehen aus Azetonitril und müssen mit Vorsicht behandelt werden. Azetonitril ist leicht entzündlich und giftig beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille in einem Abzug gearbeitet werden. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort einen Arzt hinzuziehen.
- Das Laufmittel (MOPHA) besteht aus n-Hexan und muss mit Vorsicht behandelt werden. Hexan ist leicht entzündlich und giftig beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille in einem Abzug gearbeitet werden. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort einen Arzt hinzuziehen.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

8. PROBENVORBEREITUNG

Als Probenmaterial kann Serum und Plasma verwendet werden. Die Proben sollten bis zu ihrer Messung bei -20 °C gelagert werden.

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik übernimmt keine Haftung.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung abzuarbeiten.

Vorbereitung der Kartuschen:

Spülen Sie die Kartuschen mit 5 ml Methanol und 5 ml Aqua dest.

Regenerierung der Kartuschen:

Spülen Sie die Kartuschen direkt nach der Aufbereitung mit 3 ml Regenerierungslösung (REGSOL). Die Lagerung erfolgt dann in einem abgeschlossenen Plastikbeutel. Bei der nächsten Probenvorbereitung werden die Kartuschen dann erneut konditioniert und eingesetzt. Eine Kartusche kann auf diese Weise fünf Mal verwendet werden.

Arbeitsschema

- Zu **0,5 ml** Serum, Kontrollen (CTRL1, CTRL2) oder Kalibrator (CAL) werden **0,5 ml** Fällungsreagenz (PREC) gegeben.

Vorsicht - mit Acetonitril nur unter einem Abzug arbeiten!

- Vortexen, **10 min bei 4 °C** inkubieren und anschließend bei 10.000 g für 3 Minuten zentrifugieren.
- Überstand auf die vorbereiteten Kartuschen geben und einziehen lassen.
- Mit **3 ml** Waschlösung (WASHSOL) spülen.
- Mit **4 ml** Elutionslösung (ELUSOL) eluieren. **Der Elutionsvorgang muss sich mindestens über 60 Sekunden erstrecken, da sonst keine optimale Wiederfindung garantiert werden kann.**
- Eluat unter Stickstoff oder mit einer Vakuumzentrifuge eindampfen.

Vorsicht - mit Acetonitril nur unter einem Abzug arbeiten!

- Eingedampfte Probe in **150 µl** Laufmittel (MOPHA) aufnehmen und **100 µl** in das HPLC-System injizieren.

Chromatographische Bedingungen

Säulenmaterial:	Kieselgelsäule, 4 µm	
Säulendimension:	125 mm x 4 mm	
Fluss:	0,75 ml/min (der genaue Fluss ist auf der Produktspezifikation der jeweiligen Säule angegeben.)	
Temperatur:	30 °C	
Detektion:	UV Detektor	264 nm
Auftragsvolumen:	100 µl	
Laufzeit:	ca. 20 Minuten	

Vor jeder Messung sollte zur Ermittlung der Retentionszeiten ein Lauf der ethanolischen Standards (STD2 und STD 3) durchgeführt werden. Hierzu werden je 100 µl der ethanolischen Standards (STD2 und STD3) unter Stickstoff bzw. in der Vakuumzentrifuge eingedunstet, in Laufmittel aufgenommen und in das HPLC-System injiziert.

10. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE

Nach der Analyse kann die Trennsäule, fest verschlossen, im Laufmittel belassen werden. Zur Wiederinbetriebnahme wird das ganze System mit ca. 50 ml Laufmittel äquilibriert: Erst ohne Säule mit 20 ml, dann mit Säule 30 ml. Die Strecke muss wasserfrei sein.

11. AUSWERTUNG

Die Auswertung der Proben erfolgt über den mitgelieferten Kalibrator über die externe Standard Methode.

Berechnung

$$\text{Konzentration Probe} = \frac{\text{Peakhöhe Probe} \times \text{Konzentration des Kalibrators}}{\text{Peakhöhe Kalibrator}}$$

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

Umrechnungsfaktoren:

für 25-OH-Vitamin D₃

1 ng/ml = 2,5 nmol/l

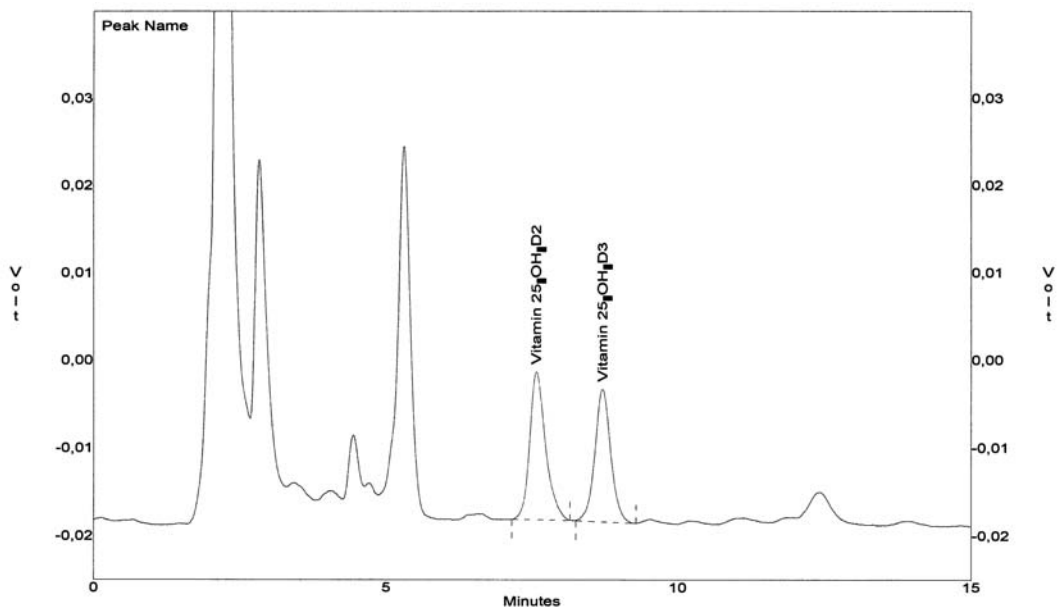
1 nmol/l = 0,4 ng/ml

für 25-OH-Vitamin D₂

1 ng/ml = 2,42 nmol/l

1 nmol/l = 0,412 ng/ml

Musterchromatogramm



12. EINSCHRÄNKUNGEN

Der Test ist nicht geeignet für die Messung von EDTA-Vollblut.

13. QUALITÄTSKONTROLLE

Normwert-Bereiche für 25-OH-Vitamin D

Information vom ASBMR 2006

Defizienz (schwerer Mangel)	< 12 ng/ml	bzw. < 30 nmol/l
Insuffizienz (Mangel)	12 – 30 ng/ml	bzw. 30 – 75 nmol/l
Suffizienz (gut versorgt)	> 30 ng/ml	bzw. > 75 nmol/l

Bund der Osteologen **SACHSEN E. V.**

http://osteologie-sachsen.de/aktuelles_vitamin_d.html

Achtung

Die Produktion von Vitamin D in der Haut ist hoch variabel und abhängig von Jahres- und Tageszeit, Breitengrad, Alter, Sonnenschutz u. a.

Die Referenzbereiche sind von der verwendeten Untersuchungsmethode abhängig (z. B. Vitamin-D-Freisetzung von dem Vitamin D Bindeprotein, DBP) und können daher nur zur Orientierung dienen.

Literaturreferenzen

Visser M, Deeg DJ, Puts MT, Seidell JC, Lips P. (2006) Low serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D in older persons and the risk of nursing home admission. *Am J Clin Nutr.* Sep;84(3):616-22; quiz 671-2

Grant WB, Holick MF. Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review. (2005) *Altern Med Rev.* Jun;10(2):94-111. Review

Wicherts IS, van Schoor NM, Boeke AJ, Visser M, Deeg DJ, Smit J, Knol DL, Lips P. (2007) Vitamin D status predicts physical performance and its decline in older persons. *J Clin Endocrinol Metab.* Jun;92(6):2058-65

Wir empfehlen jedem Labor seinen eigenen Normalwerte-Bereich zu erstellen, weil Referenzbereiche stark von der Auswahl des Probandenkollektivs abhängig sind.

Kontrollen

Zur Überwachung der Qualität der Analyse sollten bei jedem Lauf Kontrollen mitgeführt werden. Wenn eine oder mehrere Kontrollen eines Laufs außerhalb ihres Bereichs liegen, ist es möglich, dass auch die Patientenproben falsch ermittelt wurden.

14. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Inter-Assay VK:	25-OH Vitamin D ₃	4,58 % (54 nmol/l)	[n = 11]
	25-OH Vitamin D ₂	9,07 % (104 nmol/l)	[n = 11]
Intra-Assay VK:	25-OH Vitamin D ₃	5,08 % (52 nmol/l)	[n = 11]
	25-OH Vitamin D ₂	8,39 % (96 nmol/l)	[n = 11]

Linearität	25-OH Vitamin D ₃	bis 1250 nmol/l
	25-OH Vitamin D ₂	

Nachweisgrenze	25-OH Vitamin D ₃	6,2 nmol/l
	25-OH Vitamin D ₂	5,9 nmol/l

Wiederfindung	25-OH Vitamin D ₃	94,82 %
	25-OH Vitamin D ₂	96,65 %

15. ENTSORGUNG

Das Laufmittel (MOPHA), ethanolischer Standard (STD), Fällungsreagenz (PREC), Waschlösung (WASHSOL), Elutionslösung (ELUSOL) und Regenerationslösung (REGSOL) müssen als halogenfreier Lösungsmittelabfall entsorgt werden.

16. 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

17. LITERATUR

- Merke et al. (1986) *Med Wochenschr* Vol. 9:345-349.
Reichel et al. (1989) *New Engl J Med* Vol 320:980-991.
Schmidt-Gayk et al. (1991) *Klin Lab* Vol 37:219.
Visser M et al. (2006) *Am J Clin Nutr* 84(3):616-22; quiz 671-2
Grant WB et al. (2005) *Altern Med Rev* 10(2):94-111
Wicherts IS et al. (2007) *J Clin Endocrinol Metab* 92(6):2058-65

18. 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.
- Sämtliche in der Testpackung enthaltene Reagenzien dürfen ausschließlich zur in-vitro-Diagnostik eingesetzt werden.
- Die Reagenzien sollten nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden (Verfallsdatum siehe Testpackung).
- Einzelkomponenten mit unterschiedlichen Lot-Nummern aus verschiedenen Testpackungen sollten nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die dafür erstellten Richtlinien für medizinische Laboratorien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten und der Aufbereitung der Proben wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für direkt daraus resultierende Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

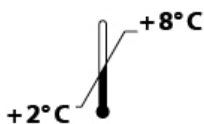
25-OH Vitamin D₃ / D₂ HPLC Kit

*For the determination of 25-OH Vitamin D₃ and
25-OH Vitamin D₂ in plasma and serum*

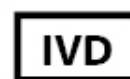
Valid from 07.01.2009



KC 3420



CAL
CTRL 1
CTRL 2
STD 2
STD 3



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

1. INTENDED USE

The *Immundiagnostik* assay is intended for the quantitative determination of 25-(OH) Vitamin D₃ and 25-(OH) Vitamin D₂ in serum and plasma. This assay is designed for *in vitro* diagnostic use only.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

D-vitamins and calciferols arise from provitamins by the UV radiation of sunlight catalysed splitting of the B-ring of the steran backbone. The two most important D-vitamins are vitamin D₃ and vitamin D₂. In the contrary to vitamin D₂ which has to be added via food, vitamin D₃ can be produced in the liver.

In the skin formed or together with vitamin D₂ by food ingested vitamin D₃ is bound to a vitamin D binding-protein in the plasma, transported into the liver and hydroxylated in position 25 to form 25-OH-D. More than 95% of 25-OH-D is 25-OH-D₃. 25-OH-D₂ is only detectable in patients with medication of vitamin D₂.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

For the determination of 25-OH vitamin D₃ and 25-(OH) Vitamin D₂ samples have to be prepared as follows. To get rid of high molecular weight substances the samples are precipitated and solid phase extracted with C₁₈-cartridges. The eluat is evaporated with nitrogen, suspended in mobile phase and injected into the HPLC system.

The HPLC separation works with an isocratic method at 30 °C with a "normal phase" column. Chromatograms are detected by an UV-detector. The separation takes 20 minutes for each run. Results are quantified by the delivered calibrator and calculated by the "external standard-method" by integration of the peak area. The ethanol solutions of standards are used for the recognition of the peaks.

Summary

This complete kit includes all reagents for analytical HPLC separation and for the extraction of the samples but no columns for the preparation of the samples.

As with many other parameters the advantage of HPLC analytic is the simultaneous handling of many analytes in one 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 without difficulties. Mostly a one-point calibration is sufficient for calibrating the test system - unlike immuno assays with up to 6 calibrators per test. It is possible to automate the sample application and calculation of the results, so that even higher numbers 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 immuno assays.)

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Content	Kit Components	Quantity
KC3420LM	MOPHA	Mobile Phase	1000 ml
KC3420KA	CAL	Calibrator (lyoph. 6 ml; Concentration is given on the label)	2 vials
KC3420ST	STD2 STD3	Ethanollic Standard D ₂ Ethanollic Standard D ₃	each 1 ml
KC3420RE	RECSOL	Reconstitution solution	20 ml
KC3420FR	PREC	Precipitation reagent (contains acetonitril)	50 ml
KC3420WL	WASHSOL	Washing solution	300 ml
KC3420EL	ELUSOL	Elution solution (contains acetonitril)	400 ml
KC3420RL	REGSOL	Regeneration solution for C18-Cartridges	300 ml
KC3420KO	CTRL1 CTRL2	Control 1 and 2; 0.6 ml lyophilized	2 x 3 vials

HPLC column (KC 3420RP) 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

- Centrifuge
- Vortex mixer
- Pointed-bottomed glass tubes
- 1.5 ml reaction tubes (Eppendorf)
- Various pipettes
- HPLC with UV-detector
- Sample evaporation unit
- Solid phase extraction unit
- Methanol p.A.
- Silica column, 4 µm, 125 x 4 mm
- Sep-Pack C₁₈ cartridges, available by Immundiagnostik (KC3420CK).

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- Reconstitute **calibrator** (CAL) in 6 ml, and **controls** (CTRL1, CTRL2) in 600 µl reconstitution solution (RECSOL), divide calibrator (CAL) in several aliquots and store at -20 °C. Avoid thawing and freezing several times. The content of 25-OH vitamin D₃ and 25-OH vitamin D₂ might have minor changes from lot to lot.
- STD2 and STD3 should be stored at -20 °C. All other test reagents are stable at 2-8 °C up to the date of expiry stated on the label.

7. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- This product contains human source material which was tested and found to be non-reactive to HBsAg, anti-HIV-1/2, and anti-HCV. Since no method can offer complete assurance that hepatitis B virus, HIV-1/2, HVC or other infectious agents are absent, these reagents should be handled as if potentially infectious.
- The precipitating reagent (PREC) and the elution solution (ELUSOL) contain acetonitril and must be handled carefully. Acetonitril is highly flammable and toxic by inhalation or contact the skin. It should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing in a hood. Any spill should be wiped out immediately with copious quantities of water. Do not breathe vapor and avoid inhalation. In case of an accident or indisposition contact immediately a physician.

- The mobile phase (MOPHA) contains n-hexan. Hexan is highly flammable and toxic if inhaled or contact the skin. It should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing in a hood. Do not breathe vapor and avoid inhalation. In case of an accident or indisposition contact immediately a physician
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on kit label.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum and plasma could be used. The samples should be stored at -20°C until testing.

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 wrong use.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

Preparation of the SPE-cartridges

Rinse the cartridge with 5 ml methanol and 5 ml aqua dest.

Regeneration of the SPE-cartridges

Rinse the cartridges immediately after the sample preparation with 3 ml of regeneration solution (REGSOL). Store the cartridges in a closed plastic sack. Before the next sample preparation, prepare the cartridges should as mentioned above. One cartridge can be used five times.

Sample and standard preparation

- Add 0.5 ml precipitation reagent (PREC) to 0.5 ml serum, calibrator (CAL) or controls (CTRL1, CTRL2).
Attention - Always work with acetonitril in a fume hood!
- Vortex, incubate for 10 min at 4 °C and then centrifuge with 10.000 g for 3 minutes.
- Pipette supernatant on the prepared cartridges and let it soak in.
- Rinse with 3 ml washing solution (WASHSOL).
- Elute with 4 ml elution solution (ELUSOL). **For optimal recovery, the elution must be performed for minimum 60 seconds.**
- Evaporate the elute with nitrogen or with a vacuum centrifuge.
Attention - Always work with acetonitril in a fume hood!
- Dissolve evaporated sample in 150 µl running mobile phase (MOPHA) and mix well. Incubate for **10 min** at 2-8°C and centrifuge for **10 min** at 10.000 g. The prepared sample is stable for min. 6 days at 2-8°C.
- Inject **100 µl** of the supernatant into the HPLC system.

Chromatographic conditions

Column material	: Silica column, 4 µm
Column dimension	: 125 mm x 4 mm
Temperature	: 30 °C
UV-Detector	: 264 nm
Flowing	: 0,75 ml / min
Injection volume	: 100 µl

Running time / chromatogram : ca. 20 min.

For the determination of retention time a run with the ethanolic standards are recommended before each test. For this reason 100 µl of ethanolic standards are evaporated under nitrogen or in the vacuum centrifuge, resuspended in mobile phase and injected into the HPLC-system.

Notice: The mobile phase (MOPHA) can be recirculated. The mobile phase (MOPHA) should be renewed after analysis of 100 samples.

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

10. TREATMENT OF THE COLUMN

The HPLC column is filled with silica (normal-phase). **Do not use water** in the system, because water damages silica columns. After the analysis, the column should be stored in HPLC-eluent.

Before use, the system should be equilibrated with 50 ml eluent: Run first 20 ml without column, and then the remaining 30 ml with integrated column.

11. RESULTS

Calculation

$$\text{Concentration sample} = \frac{\text{Peak height sample} \times \text{Concentration of the calibrator}}{\text{Peak height calibrator}}$$

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

Conversion factors:

for 25-OH-Vitamin D₃

1 ng/ml = 2.5 nmol/l

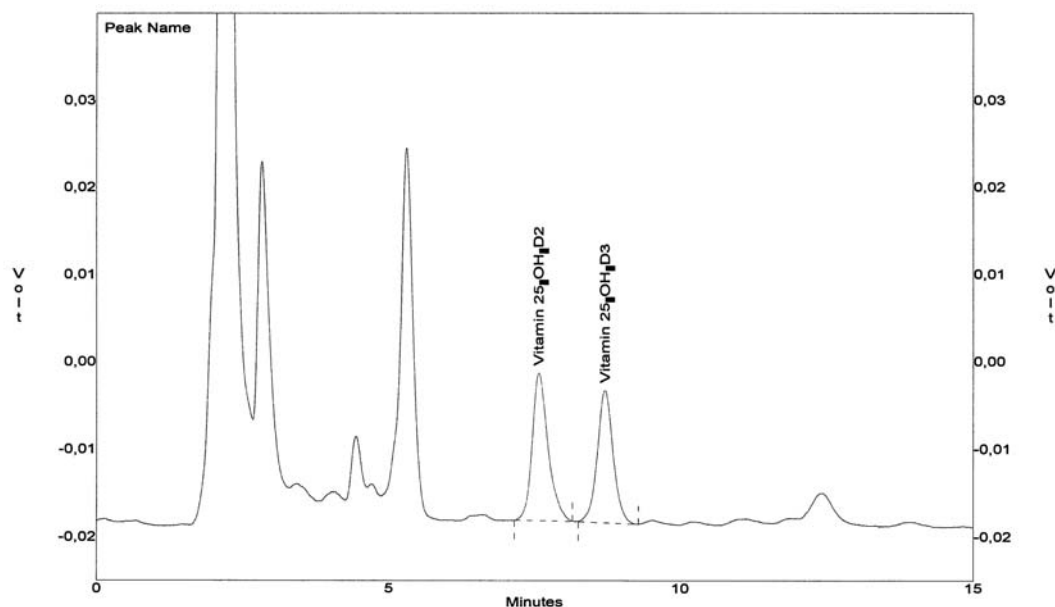
1 nmol/l = 0.4 ng/ml

for 25-OH-Vitamin D₂

1 ng/ml = 2.42 nmol/l

1 nmol/l = 0.412 ng/ml

Typical chromatogram



12. LIMITATIONS

Do not use whole blood.

13. QUALITY CONTROL

Expected values

Normal ranges for 25-OH-Vitamin D

Information from ASBMR 2006

Deficiency (seriously deficient)	< 12 ng/ml	resp. < 30 nmol/l
Insufficiency (deficient) nmol/l	12 - 30 ng/ml	resp. 30 - 75
Sufficiency (adequately supplied)	> 30 ng/ml	resp. > 75 nmol/l

Society of Osteology SACHSEN E. V.

http://osteologie-sachsen.de/aktuelles_vitamin_d.html

Note

The vitamin D production in the skin is high variable and depends on the season- and daily time, degree of latitude, age, sun protection etc.

The normal ranges depend on the method used (e. g. vitamin-D-release from the vitamin D binding protein, DBP) and serve only as orientation.

Literature references

Visser M, Deeg DJ, Puts MT, Seidell JC, Lips P (2006) Low serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D in older persons and the risk of nursing home admission. *Am J Clin Nutr.* Sep;84(3):616-22; quiz 671-2

Grant WB, Holick MF. Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review. (2005) *Altern Med Rev.* Jun;10(2):94-111. Review

Wicherts IS, van Schoor NM, Boeke AJ, Visser M, Deeg DJ, Smit J, Knol DL, Lips P. (2007) Vitamin D status predicts physical performance and its decline in older persons. *J Clin Endocrinol Metab.* Jun;92(6):2058-65

It is recommended that each laboratory should establish its own normal range. Above mentioned values are only for orientation and may vary from other published data.

Controls

Control samples or serum pools should be analyzed with each run of calibrators and patient samples. Results generated from the analysis of the control samples should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. In assays in which one or more of the quality control sample values lie outside the acceptable limits, the results for the patient sample may not be valid.

14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Inter-Assay CV:	25-OH Vitamin D ₃	4,58 % (54 nmol/l)	[n = 11]
	25-OH Vitamin D ₂	9,07 % (104 nmol/l)	[n = 11]
Intra-Assay CV:	25-OH Vitamin D ₃	5,08 % (52 nmol/l)	[n = 11]
	25-OH Vitamin D ₂	8,39 % (96 nmol/l)	[n = 11]

Linearity

25-OH Vitamin D ₃	Up to 1250 nmol/l
25-OH Vitamin D ₂	

Detection limit

25-OH Vitamin D ₃	6,2 nmol/l
25-OH Vitamin D ₂	5,9 nmol/l

Recovery

25-OH Vitamin D ₃	94,82 %
25-OH Vitamin D ₂	96,65 %

15. DISPOSAL

The mobile phase (MOPHA), ethanolic standard (STD), precipitation solution (PREC), washing solution (WASHSOL), elution solution (ELUSOL) and regeneration solution (REGSOL) must be disposed as non-halogenated solvent. Please refer to the appropriate national guidelines.

16. TROUBLESHOOTING

Problem	Possible reason	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
Doublepeaks	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
	Autosampler 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 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

17. REFERENCES

- Merke et al. (1986) *Med Wochenschr* Vol. 9:345-349.
Reichel et al. (1989) *New Engl J Med* Vol 320:980-991.
Schmidt-Gayk et al. (1991) *Klin Lab* Vol 37:219.
Visser M et al. (2006) *Am J Clin Nutr* 84(3):616-22; quiz 671-2
Grant WB et al. (2005) *Altern Med Rev* 10(2):94-111
Wicherts IS et al, (2007) *J Clin Endocrinol Metab* 92(6):2058-65

18. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market 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 test package are for *in-vitro* diagnostic use only.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- 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 wrong use.

Used symbols:

Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number