

1,25-(OH)₂-Vitamin D₃/D₂ ImmuTube[®] LC-MS/MS Kit

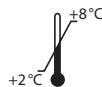
*Zur Bestimmung von 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃/D₂
in Plasma und Serum*

*For the determination of 1,25-(OH)₂ vitamin D₃/D₂
in plasma and serum*

Gültig ab / Valid from 2015-02-25



KM1000



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. INHALT DER TESTPACKUNG	5
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	5
5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	5
6. PROBENVORBEREITUNG	6
7. CHROMATOGRAPHISCHE BEDINGUNGEN	6
8. MS/MS-METHODE	7
9. AUSWERTUNG	8
10. MUSTERCHROMATOGRAMME	8
11. QUALITÄTSKONTROLLE	9
12. TESTCHARAKTERISTIKA	10
13. VORSICHTSMASSNAHMEN	10
14. TECHNISCHE MERKMALE	10
15. ENTSORGUNG	11
16. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11
17. LITERATUR	11
6. SAMPLE PREPARATION	19

1. VERWENDUNGSZWECK

Die hier beschriebene ImmuTube® LC-MS/MS-Applikation ist für die quantitative Bestimmung von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃/D₂ in Serum und Plasma geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Vitamin D wird entweder in der Haut (unter Einfluss von UV-Licht) gebildet oder aus der Nahrung aufgenommen. In der Leber entsteht die Speicherform des Vitamin D, das 25-Hydroxy-Vitamin D. In der Niere wird in einem zweiten Hydroxylierungsschritt die Hormonform des Vitamin D, das 1,25-Dihydroxy-Vitamin D (D-Hormon) gebildet. Das dafür verantwortliche Enzym, die 1 α -Hydroxylase der Niere, unterliegt einer strengen Kontrolle durch Hormone (insbesondere Parathormon) und wird in seiner Aktivität auch durch die Serumkonzentrationen von Calcium und Phosphat beeinflusst.

Die Serumkonzentration von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D richtet sich also normalerweise nach den Erfordernissen des Stoffwechsels. Abweichungen der 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Konzentration von der Norm müssen also immer im Kontext mit den übrigen Parametern des Calciumstoffwechsels interpretiert werden. Erst bei ausgeprägtem Vitamin-D-Mangel wird auch die Serumkonzentration von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D absinken. Zur Diagnostik des Vitamin-D-Mangels sollte man deshalb den Vorläufermetaboliten, das 25-Hydroxy-Vitamin D messen. Ursachen für einen unphysiologischen Mangel an 1,25-Dihydroxy-Vitamin D können jedoch Metabolisierungsstörungen entweder aufgrund genetischer Defekte der 1 α -Hydroxylase (selten) oder aufgrund von Nierenfunktionsstörungen (häufiger) auftreten. Bereits bei leicht eingeschränkter Nierenfunktion kommt es zu einem Abfall der 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Konzentration.

Da 1,25-Dihydroxy-Vitamin D wichtige Funktionen im Calciumstoffwechsel innehat und insbesondere auch die Parathormonsekretion in den Nebenschilddrüsen supprimiert, kommt es mit zunehmender Niereninsuffizienz zur Ausbildung der renalen Osteopathie, die durch Mineralisierungsstörungen (Osteomalazie) und fibröse Veränderungen (Osteitis fibrosa) gekennzeichnet ist.

Die Behandlung der renalen Osteopathie besteht in der Gabe von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D (Calcitriol) oder des Prohormons 1 α -Hydroxy-Vitamin D. Erniedrigte oder relativ niedrige 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Spiegel findet man bei renalen Tubulusfunktionsstörungen (z.B. Phosphatdiabetes, Fanconi-Syndrom). Eine unphysiologische Überproduktion von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D tritt bei granulomatösen Systemerkrankungen (z.B. Sarkoidose) auf, wo eine extrarenale 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Synthese stattfindet. Diese kann zur Hypercalciämie führen. Auch bei der

idiopathischen Hypercalciurie findet man relativ hohe 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Spiegel. Erhöhte 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Konzentrationen wurden des Weiteren in folgenden Fällen ermittelt: bei Störungen des Vitamin-D-Rezeptors (selten), bei calciumarmer Ernährung sowie bei Parathormonüberschuss (primärer Hyperparathyreoidismus) und bei manchen Tumorarten (infolge der Sekretion von parathormonähnlichem Peptid, PTHrP).

Zur Vitamin-D-Supplementierung werden zwei verschiedene Formen kommerziell angeboten: Ergocalciferol (Vitamin D₂) und Cholecalciferol (Vitamin D₃). Offiziell betrachten die Pharmakopöen diese zwei Formen als äquivalent und austauschbar aufgrund von Studien zur Rachitisprävention bei Kindern. Die 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D₃/D₂-Bestimmung dient als Maßstab für den 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Status und liefert objektive, quantitative Information über die biologische Antwort auf die Einnahme von Vitamin-D-Präparaten.

Indikationen

- Nierenfunktionsstörungen
Chronische Niereninsuffizienz
Hämodialyse nach Nierentransplantation
- Renale Osteopathie
- Osteomalazie bei gestörtem Vitamin D-Metabolismus ausgelöst durch viele verschiedene Erkrankungen
- Nierentubulusfunktionsstörungen (Phosphatdiabetes, Fanconi-Syndrom)
- Überwachung einer Therapie mit aktiven Vitamin D-Metaboliten
- Ideopathische Hypercalciurie
- Hypercalciämie

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KM1000LA	MOPHA A	Laufmittel A	1000 ml
KM1000LB	MOPHA B	Laufmittel B	1000 ml
KM1000KA	CAL 1 CAL 2	Kalibrator 1 und 2 (lyophilisiert, wird in 600 µl RECSOL rekonstituiert; Konzentration siehe Etikett)	2 x 5 Fläschchen
KM1000KO	CTRL1 CTRL2	Kontrolle 1 und 2 (lyophilisiert, wird in 600 µl RECSOL rekonstituiert; Konzentration siehe Produktspezifikation)	2 x 5 Fläschchen
KM1000RE	RECSOL	Rekonstitutionslösung	15 ml
KM1000SO	SOL A	Lösung A	25 ml
KM1000AC	ACTSOL	Aktivierungsreagenz	2,5 ml
KM1000IS	INT STD	Interner Standard	600 µl
KM1100		Extraktionskit	Siehe Punkt 4.

Zur Vorbereitung der Immundiagnostik 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃/D₂ LC-MS/MS-Applikation ist das Tuning notwendig. Das Tuning ist für die Findung der optimalen LC-MS/MS-Einstellungen, sowie für die Überprüfung der ausreichenden Empfindlichkeit erforderlich. Die UPLC Trennsäule (KM1000RP) kann separat bei Immundiagnostik bestellt werden.

4. INHALT DES EXTRAKTIONSKITS

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KM1100SI	COLUMNS	ImmuTube®-Säulen zur Trennung des 1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₃ /D ₂ aus der Probe	50 Stück
KM1100ER	ELUREAG	Elutionsreagenz für ImmuTube®, gebrauchsfertig	20 ml
KM1100WL	WASHSOL	Waschlösung für ImmuTube®, gebrauchsfertig	80 ml

Der Extraktionskit kann unter der Artikelnummer KM1100 separat bei der Firma Immundiagnostik AG bestellt werden.

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reagenzgefäße aus Glas, LC-MS/MS-geeignet
- 500 ml Messzylinder, LC-MS/MS geeignet
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Multipipette
- Zentrifuge, 10 000 x g für 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße bzw. 550 x g für Reagenzgefäße
- Vortex-Mixer
- Vakuumzentrifuge oder Stickstoffverteiler
- Laborübliche Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Überkopfschüttler
- LC-MS/MS-Anlage
- RP-C18 Säule, z. B. Acquity BEH C18, 1,7 µm (2,1 x 50 mm), Zorbax Eclipse Plus C18, 1,8 µm (2,1 x 100 mm)

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Der **interne Standard** (INT STD) ist bei **-20 °C** bis zum angegebenen Verfallsdatum verwendbar.
- 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 + 500 µl ACTSOL

12,5 ml SOL A + 12,5 µl ACTSOL

Die hergestellten Lösungen sind dann noch 2 Wochen verwendbar, es wird deshalb empfohlen nur soviel 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 sein und vorzugsweise aus LC-MS/MS geeignetem Glas.

- Die **Kalibratoren** (CAL 1 und CAL 2) und **Kontrollen** (CTRL 1 und CTRL 2) werden in je **600 µl Rekonstitutionslösung** (RECSOL) gelöst.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2–8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. PROBENVORBEREITUNG MITTELS IMMUTUBE®-EXTRAKTION FÜR 50 PROBEN

Als Probe eignet sich Serum und Plasma. Proben müssen vor dem Einsatz zentrifugiert werden (mind. 5 min bei 10000 g).

Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.

1.	Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, die Raumtemperatur (18–26 °C) aufweisen. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben gut mischen.
2.	ImmuTubes® vorsichtig vortexen, in einen geeigneten Ständer stellen und sicherstellen, dass die enthaltene Suspension nicht im Deckel verbleibt.
3.	Deckel der ImmuTubes® beschriften, öffnen, 500 µl CAL/SAMPLE/CTRL (Kalibrator/Probe/Kontrolle) zügig pipettieren. Anschließend 10 µl INT STD (interner Standard) in jedes ImmuTube® pipettieren, ImmuTubes® verschließen und den Inhalt vorsichtig mischen.
4.	Intensives "Mixing-Rotation" (end-over-end Rotation) für 1 Std bei RT. Das restliche Trennmaterail auf der Innenseite des Deckels nach unten fließen lassen.
5.	Verschlossene ImmuTubes® in Plastikreagenzgefäße setzen, 1 min bei 550 g zentrifugieren.
6.	ImmuTubes® erst den Deckel abschrauben und dann am Auslass öffnen und 2 min bei 550 g bis zum Eintrocknen zentrifugieren. Durchlauf verwerfen
7.	500 µl WASHSOL pipettieren und 2 min bei 550 g bis zum Eintrocknen zentrifugieren. Durchlauf verwerfen. Den Schritt 2-mal wiederholen.
8.	FrISCHE Glasröhrchen beschriften, ImmuTubes® in die Glasröhrchen setzen.
9.	250 µl ELUREAG (Elutionsreagenz für ImmuTubes®) pipettieren, 2 min bei 550 g zentrifugieren und das Eluat mit dem 1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₃ /D ₂ in das Glasröhrchen sammeln.
10.	Das Eluat unter Stickstoffstrom bei 37 °C oder in einer Vakuumzentrifuge trocknen.
11.	Den Rückstand in 165 µl aktivierter Lösung A durch 1 min intensives Vortexen lösen; 50 µl in das UPLC-System bzw. 100 µl in die HPLC injizieren.

8. CHROMATOGRAPHISCHE BEDINGUNGEN

UPLC-Methode

Säulenmaterial:	z. B. Acquity BEH C18, 1,7 µm (2,1 × 50 mm), Zorbax Eclipse Plus C18, 1,8 µm (2,1 × 100 mm)
Fluss:	0,3 ml/min
Säulentemperatur:	45 °C
Auftragsvolumen:	50 µl
Gradient:	

Acquity		
0 min	100 % A	0 % B
2 min	0 % A	100 % B
2,1 min	0 % A	100 % B
2,2 min	100 % A	0 % B
3,5 min	100 % A	0 % B

Zorbax Eclipse		
0 min	100 % A	0 % B
4,5 min	0 % A	100 % B
6,0 min	0 % A	100 % B
6,1 min	100 % A	0 % B
8,0 min	100 % A	0 % B

Beispiel einer vergleichbaren HPLC-Methode (abgeleitet von der UPLC-Methode)

Säulenmaterial:	z. B. XBridge™C18; 5 µm
Säulendimension:	3 × 150 mm
Fluss:	0,5 ml/min
Säulentemperatur:	45 °C
Auftragsvolumen:	100 µl
Laufzeit:	13 min
Gradient:	

0 min	100 % A	0 % B
7,4 min	0 % A	100 % B
7,8 min	0 % A	100 % B
8,2 min	100 % A	0 % B
13 min	100 % A	0 % B

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.

9. MS/MS-METHODE

Die MS/MS-Methode ist beispielhaft aufgeführt für ein Waters Quattro Premier XE Tandem-Massenspektrometer.

Modus:	MRM
Polarität:	ESI ⁺
Kapillarspannung (kV):	3
Konusspannung (V):	var.
Extraktor (V):	4
RF Linse (V):	0
Quellentemperatur (°C):	130
Desolvation Temperatur (°C):	450
Gasfluss am Konus (l/h):	50
Desolvation Gasfluss (l/h):	950
Kollision-Gasfluss (ml/min):	0,15

MRM Übergänge (m/z):

1,25-(OH)₂-Vitamin D₃

399,11 > 134,58	Konusspannung: 30	Kollisionsenergie: 22
399,11 > 150,64	Konusspannung: 30	Kollisionsenergie: 22

1,25-(OH)₂-Vitamin D₂

411 > 134,8	Konusspannung: 30	Kollisionsenergie: 23
411 > 150,7	Konusspannung: 30	Kollisionsenergie: 26

Interner Standard (isotopisch markiertes 1,25-(OH)₂-Vitamin-D₃-d6):

405,21 > 134,68	Konusspannung: 35	Kollisionsenergie: 20
405,21 > 150,62	Konusspannung: 35	Kollisionsenergie: 23

1,25-(OH)₂-Vitamin D₃ hat die molare Masse 416,64 Da, 1,25-(OH)₂-Vitamin D₂ hat die molare Masse 428,65 Da und das isotopisch markierte 1,25-(OH)₂-Vitamin-D₃-d6 die molare Masse 422,65 Da.

399,11 Da, 411 Da und 405,21 Da entsprechen jeweils dem Wasserverlust.

10. AUSWERTUNG

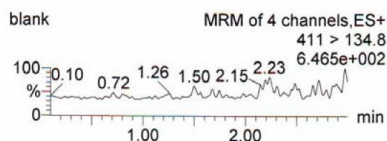
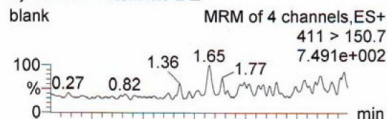
Als Modell zur Auswertung kann die lineare Regression verwendet werden. Zwischen den beiden Kalibratorkonzentrationen wird eine Gerade gelegt. Anhand dieser können dann die Proben berechnet werden.

11. MUSTERCHROMATOGRAMME

Beispielchromatogramme für 1,25-(OH)₂-Vitamin D₂

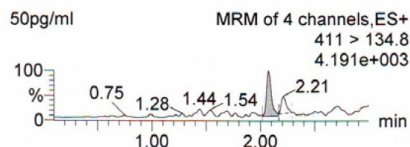
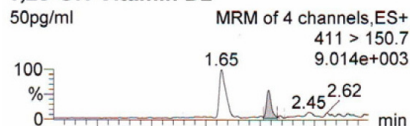
Blank:

1,25-OH-Vitamin D₂

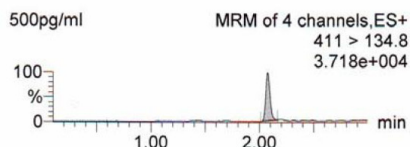
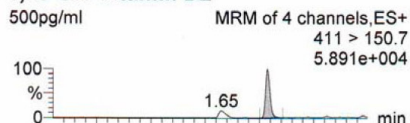


Standards:

1,25-OH-Vitamin D₂

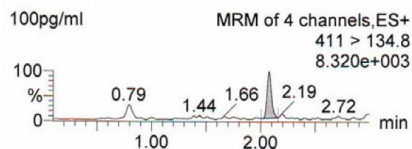
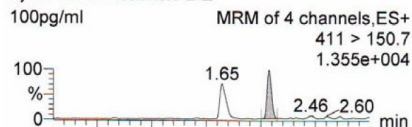


1,25-OH-Vitamin D₂



Probe:

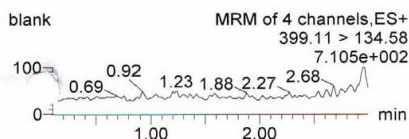
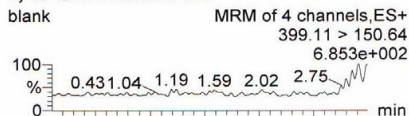
1,25-OH-Vitamin D₂



Beispielchromatogramme für 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃

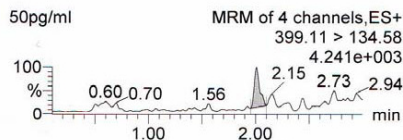
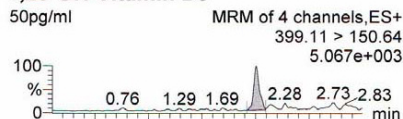
Blank:

1,25-OH-Vitamin D₃

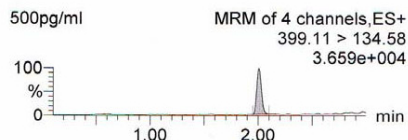
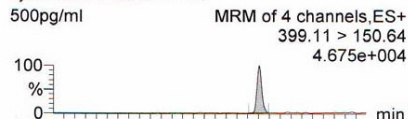


Standards:

1,25-OH-Vitamin D₃

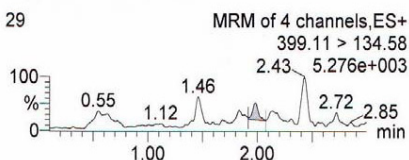
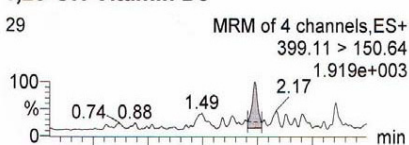


1,25-OH-Vitamin D₃

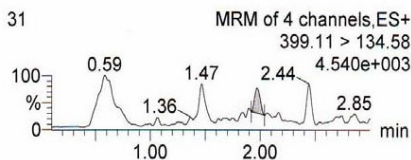
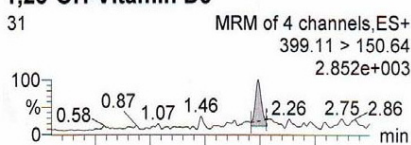


Proben:

1,25-OH-Vitamin D₃



1,25-OH-Vitamin D₃



12. QUALITÄTSKONTROLLE

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

Normbereich (Plasma oder Serum)

Gesunde Erwachsene 20-50 Jahre:	17–53 pg/ml
Kinder bis 12 Jahre:	bis zu 40 % höhere Werte
Schwangere (8.-42. Gestationswoche):	bis zu 60 % höhere Werte
Personen über 70 Jahre:	bis zu 40 % niedrigere Werte

Es treten keine jahreszeitlichen Schwankungen auf.

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

13. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

1,25-(OH)₂-Vitamin D₃

Inter-Assay (n = 10)

Probe	1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₃ [pg/ml]	VK [%]
1	116,4	5,8

Intra-Assay (n = 16)

Probe	1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₃ [pg/ml]	VK [%]
1	118,76	12,2

1,25-(OH)₂-Vitamin D₂**Inter-Assay (n = 10)**

Probe	1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₂ [pg/ml]	VK [%]
1	107,47	5,9

Intra-Assay (n = 16)

Probe	1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₂ [pg/ml]	VK [%]
1	119,14	6,7

Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde mit der Kalibriergeradenmethode (DIN 32645) festgelegt. Gemessen wurden 10 Konzentrationen von 10–100 pg/ml in 5-fach Bestimmungen.

Nachweisgrenze 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃: 5,68 pg/ml

Nachweisgrenze 1,25-(OH)₂-Vitamin D₂: 12,01 pg/ml

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

14. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen 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.

15. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.

- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

16. ENTSORGUNG

Laufmittel (MOPHA A, MOPHA B), Lösung A (SOL A), Aktivierungsreagenz (ACTSOL) und Elutionsreagenz für ImmuTube® (ELUREAG) müssen als halogenfreier Lösungsmittelabfall entsorgt werden.

17. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- 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, zurück zu senden.

18. LITERATUR

1. Armbruster, F. et al., 1990. Extraktion und chromatographische Trennung von 1,25-(OH)₂-Vitamin D aus Serum oder Plasma ohne Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC). *Das Ärztliche Laboratorium*, **36**, pp.75–80.
2. Durham, B. et al., 1995. Comparison of the IDS Gamma-B 1,25 dihydroxy vitamin D assay system with the Nichols Institute radioreceptor assay system. In *Proceedings of the ACB National Meeting*. Glasgow, UK: The Association of Clinical Biochemists.

3. Hollis, B.W., 1995. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-26,23-lactone interferes in determination of 1,25-dihydroxyvitamin D by RIA after immunoextraction. *Clinical chemistry*, **41**(9), pp.1313–4.
4. Hollis, B.W., 1996. Assessment of vitamin D nutritional and hormonal status: what to measure and how to do it. *Calcified tissue international*, **58**(1), pp.4–5.
5. Iqbal, S.J. et al., 1996. Possible interference with calcipotriol on new IDS RIA for 1,25-dihydroxyvitamin D. *Clinical chemistry*, **42**(1), pp.112–3.
6. Schilling, M., Armbruster, F.P. & Schmidt-Gayk, H., 1987. Rapid, selective separation of 1 alpha, 25-dihydroxy-vitamin D₃ from serum with Extrelut-1 columns. *Clinical chemistry*, **33**(1), p.187.
7. Wildermuth, S. et al., 1993. Scintillation proximity assay for calcitriol in serum without high pressure liquid chromatography. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, **220**(1), pp.61–70.
8. Withold, W. et al., 1995. Evaluation of a radioimmunoassay for determination of calcitriol in human sera employing a 125I-labelled tracer. *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry : journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies*, **33**(12), pp.959–63.
9. Yuan, C. et al., 2011. Sensitive measurement of serum 1α,25-dihydroxyvitamin D by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after removing interference with immunoaffinity extraction. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, **25**(9), pp.1241–9.

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung

REF

Bestellnummer

IVD

In-Vitro-Diagnostikum

→ REF

Zu verwenden mit



Hersteller



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen

LOT

Chargenbezeichnung

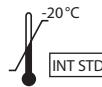
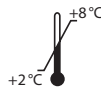


Verwendbar bis

1,25-(OH)₂-Vitamin D₃/D₂ ImmuTube[®] LC-MS/MS Kit

*For the determination of 1,25-(OH)₂ vitamin D₃/D₂
in plasma and serum*

Valid from 2015-02-25



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. MATERIAL SUPPLIED	18
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	18
7. CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS	19
8. MS/MS METHOD	20
9. CALCULATION	21
10. EXAMPLES OF CHROMATOGRAMS	21
11. QUALITY CONTROL	22
12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	23
13. PRECAUTIONS	23
14. TECHNICAL HINTS	23
15. DISPOSAL	23
16. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	24
17. REFERENCES	24

1. INTENDED USE

The described ImmuTube® LC-MS/MS application is intended for the quantitative determination of 1,25-dihydroxy vitamin D₃/D₂ in serum and plasma. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Vitamin D is either produced in the skin (under the influence of UV light) or taken up from nourishment. The storage type of vitamin D, namely 25-hydroxy vitamin D, is formed in the liver. The hormone 1,25-dihydroxy vitamin D (D hormone) is formed in a second hydroxylation step in the kidney. The responsible enzyme, the kidney 1 α -hydroxylase, is subjected to a rigid control through hormones (especially parathyroid hormone) and its activity is influenced by the serum concentrations of calcium and phosphate.

The serum concentration of 1,25-dihydroxy vitamin D normally re-adjusts itself to the demands of metabolism. Deviations from the normal range of 1,25-dihydroxy vitamin D must therefore always be interpreted in the context of the remaining parameters of the calcium metabolism. The serum concentration of 1,25-dihydroxy vitamin D decreases only in seldom cases of vitamin D deficiency. For the diagnosis of vitamin D deficiency the precursor metabolite, 25-hydroxyvitamin D, should be measured.

The reason for a non-physiological deficiency of 1,25-dihydroxy vitamin D can be found in metabolic disturbances, caused either by genetic defects of the enzyme 1 α -hydroxylase (rare) or kidney malfunctions (more common). Even a slightly impaired kidney function can lead to a decrease of the 1,25-dihydroxy vitamin D concentration.

Since 1,25-dihydroxy vitamin D has important functions in calcium metabolism as well as supplementing secretion of parathyroid hormone from the parathyroid glands, increasing kidney malfunctioning leads to development of renal osteopathy, which is characterized by osteomalacia and osteitis fibrosa.

Treatment of renal osteopathy consists of the administration of 1,25-dihydroxy vitamin D (calcitriol) or the prohormone 1 α -hydroxy vitamin D. In renal tubules malfunctions decreased or relatively low levels of 1,25-dihydroxy vitamin D (e.g. diabetes insipidus, Fanconi syndrome) are found. A non-physiological over-production of 1,25-dihydroxy vitamin D arises in granulomatosis (e.g. sarcoidosis), where extra-renal synthesis of 1,25-dihydroxy vitamin D occurs. This can lead to hypercalcaemia. Also in idiopathic hypercalciuria a relatively high level of 1,25-dihydroxy vitamin D is found. Increased concentrations of 1,25-dihydroxy vitamin D can be seen in case of non-functional vitamin D receptors (rare), during calcium deficient nutrition, as well

as a result from overproduction of parathyroid hormone (primary hyperthyroidism). Supplemental vitamin D is available in two distinct forms: ergocalciferol (vitamin D₂) and cholecalciferol (vitamin D₃). Pharmacopoeias have officially regarded these two forms as equivalent and interchangeable, based on studies of rickets prevention in infants. The determination of 1,25 dihydroxy vitamin D₃/D₂ as a measure of 1,25 dihydroxy vitamin D status provides an objective, quantitative measure of the biological response to vitamin D administration.

Indications

- Defect of kidney functions
Chronic kidney failure
Haemodialysis following kidney transplantation
- Renal osteopathy
- Osteomalacia from various types of vitamin D metabolism disturbances
- Kidney tubules function disturbances (diabetes insipidus, Fanconi-Syndrom)
- Monitoring of therapy with active vitamin D metabolites
- Ideopathic hypercalciuria
- Hypercalcaemia

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
KM1000LA	MOPHA A	Mobile phase A	1000 ml
KM1000LB	MOPHA B	Mobile phase B	1000 ml
KM1000KA	CAL 1 CAL 2	Calibrator 1 and 2 (lyophilized, reconstitute in 600 µl RECSOL; see label for concentration)	2 x 5 vials
KM1000KO	CTRL1 CTRL2	Control 1 and 2 (lyophilized, reconstitute in 600 µl RECSOL; for concentration, see product specification)	2 x 5 vials
KM1000RE	RECSOL	Reconstitution solution	15 ml
KM1000SO	SOL A	Solution A	25 ml
KM1000AC	ACTSOL	Activation reagent	2.5 ml
KM1000IS	INT STD	Internal Standard	600 µl
KM1100		Extraction kit	see point 4.

As a first step for the application of the Immundiagnostik 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃/D₂ LC-MS/MS-Kit, a tuning is necessary to estimate the optimal LC-MS/MS-set-

tings as well as to assess the sufficiency of the sensitivity. The UPLC separation column (KM1000RP) can be ordered separately from Immundiagnostik AG.

4. CONTENT OF THE EXTRACTION KIT

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
KM1100SI	COLUMNS	ImmuTube®-Columns for isolation of 1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₃ from the sample	50 Columns
KM1100ER	ELUREAG	Elution reagent for ImmuTube®, ready to use	20 ml
KM1100WL	WASHSOL	Wash solution for ImmuTube®	80 ml

The extraction kit can be ordered separately from Immundiagnostik AG under catalog number KM1100.

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Glass tubes; LC-MS/MS-suitable
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10–1000 µl
- 500 ml graduated cylinder, LC-MS/MS suitable
- A repeating dispenser
- Centrifuge capable of 10000 *g* for 1.5 ml Eppendorf reaction tubes and 550 *g* for glass tubes, respectively
- Vortex mixer
- Vacuum centrifuge or nitrogen distributor
- Standard laboratory disposable plastic reagent vials
- Upside-down shaker
- LC-MS/MS equipment
- RP-C18 column, e.g. Acquity BEH C18, 1.7 µm (2.1 x 50 mm), Zorbax Eclipse Plus C18, 1.8 µm (2.1 x 100 mm)

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- The **internal standard** (INT STD) must be stored at **-20 °C** and used until the expiration date given on the label.
- Before use, **0.1% activation reagent** (ACTSOL) must be added to the **mobile phases** (MOPHA A, MOPHA B) and **solution A** (SOL A), e.g.

500 ml MOPHA + 500 µl ACTSOL

12,5 ml SOL A + 12,5 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.

- Before use, dissolve **calibrators** (CAL 1 and CAL 2) and **controls** (CTRL 1 and CTRL 2) in each **600 µl** of **reconstitution solution** (RECSOL).
- 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**.

6. SAMPLE PREPARATION WITH IMMUTUBE EXTRACTIONS FOR 50 SAMPLES

Serum and plasma samples are suited for the assay. The samples must be centrifuged before use (minimum 5 min at 10 000 g).

Control samples should be analyzed with each run.

1.	Prior to use in the assay, allow all samples and reagents to come to room temperature (18–26 °C). Mix samples and reagents well before use.
2.	Vortex ImmuTubes® carefully, place them in a suitable rack and make sure that no suspension remained on the ImmuTubes® cover.
3.	Label the covers of ImmuTubes®, open ImmuTubes®, add quickly 500 µl of CAL/SAMPLE/CTRL (calibrator/sample/control), add 10 µl of INT STD (internal standard) in each ImmuTube®, close ImmuTubes® and mix gently.
4.	“Mix-rotate” (end-over-end rotation) intensively for 1 h at RT. Let the remaining separation material on the inner side of the cover flow down.
5.	Insert closed ImmuTubes® in plastic reagent vials, centrifuge for 1 min at 550 g.
6.	Open the cover and then the outlet the ImmuTubes® and centrifuge for 2 min at 550 g to dryness. Discard flow-through.
7.	Add 500 µl of WASHSOL and centrifuge for 2 min at 550 g to dryness. Discard flow-through. Repeat this step twice.
8.	Label fresh glass tubes, place ImmuTubes® in the labeled glass tubes.

9.	Add 250 µl of ELUREAG (elution reagent for Imm Tubes®), centrifuge for 2 min at 550 g and collect the 1,25-(OH) ₂ vitamin D ₃ /D ₂ eluates in the glass tubes.
10.	Evaporate the eluate under a nitrogen stream at 37 °C or in a vacuum centrifuge.
11.	Vortex the remainder for 1 min in 165 µl of activated solution A; inject 50 µl in the UPLC system, respectively 100 µl in the HPLC system.

8. CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS

UPLC-Method

Column material:	e.g. Acquity BEH C18, 1.7 µm (2.1 x 50 mm), Zorbax Eclipse Plus C18, 1.8 µm (2.1 x 100 mm)
Flow rate:	0.3 ml/min
Column temperature:	45 °C
Injection volume:	50 µl
Gradient:	

Acquity		
0 min	100 % A	0 % B
2 min	0 % A	100 % B
2.1 min	0 % A	100 % B
2.2 min	100 % A	0 % B
3.5 min	100 % A	0 % B

Zorbax Eclipse		
0 min	100 % A	0 % B
4.5 min	0 % A	100 % B
6.0 min	0 % A	100 % B
6.1 min	100 % A	0 % B
8.0 min	100 % A	0 % B

*Example for a comparable HPLC method (derived from the UPLC method)***Column material:** e.g. XBridge™ C18; 5 µm**Column dimension:** 3 x 150 mm**Flow rate:** 0.5 ml/min**Column temperature:** 45 °C**Injection volume:** 100 µl**Running time:** 13 min**Gradient:**

0 min	100 % A	0 % B
7.4 min	0 % A	100 % B
7.8 min	0 % A	100 % B
8.2 min	100 % A	0 % B
13 min	100 % A	0 % B

It is recommended that a guard column/filter is used to extend column's life.

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

9. MS/MS METHOD

The MS/MS method listed here is an example for a Waters Quattro Premier XE tandem mass spectrometer.

Mode: MRM**Polarity:** ESI⁺**Capillary (kV):** 3**Cone (V):** var.**Extractor (V):** 4**RF Lens (V):** 0**Source Temperature (°C):** 130**Desolvation Temperature (°C):** 450**Cone Gas Flow (L/Hr):** 50**Desolvation Gas Flow (L/Hr):** 950**Collision Gas Flow (mL/Min):** 0.15

*MRM transitions (m/z)***1,25-(OH)₂ vitamin D₃**

399.11 > 134.58	Cone Voltage: 30	Collision Energy: 22
399.11 > 150.64	Cone Voltage: 30	Collision Energy: 22

1.25-(OH)₂ vitamin D₂

411 > 134.8	Cone Voltage: 30	Collision Energy: 23
411 > 150.7	Cone Voltage: 30	Collision Energy: 26

Internal standard (isotopically labelled 1.25-(OH)₂ vitamin-D₃-d6):

405.21 > 134.68	Cone Voltage: 35	Collision Energy: 20
405.21 > 150.62	Cone Voltage: 35	Collision Energy: 23

1,25-(OH)₂ vitamin D₃ has a molecular mass of 416.64 Da, 1,25-(OH)₂ vitamin D₂ 428.65 Da and isotopically labeled 1,25-(OH)₂ vitamin D₃-d6 422.65 Da.

The masses of 399.11 Da, 411 Da and 405.21 Da correspond to a loss of a molecule of water, respectively.

10. CALCULATION

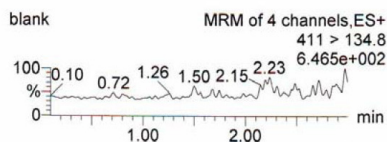
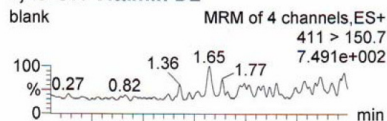
The linear regression can be used as model for evaluation of the results. The two calibrator concentration points are connected by a straight line. The samples can be calculated using the obtained line.

10. EXAMPLES OF CHROMATOGRAMS

Examples of chromatograms for 1,25-(OH)₂ vitamin D₂

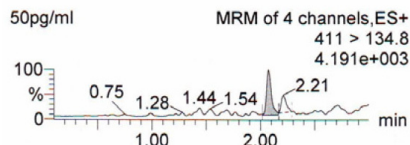
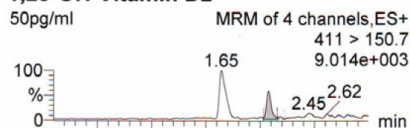
Blank:

1,25-OH-Vitamin D₂

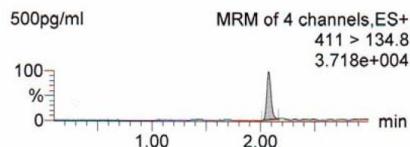
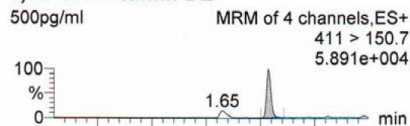


Standards:

1,25-OH-Vitamin D₂

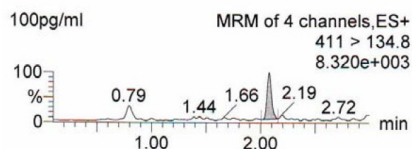
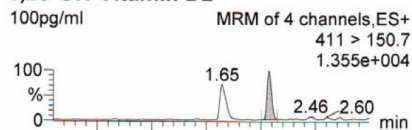


1,25-OH-Vitamin D₂



Sample:

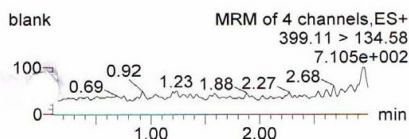
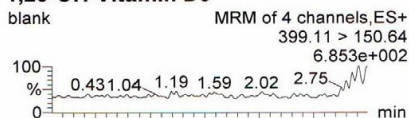
1,25-OH-Vitamin D₂



Examples of chromatograms for 1,25-(OH)₂ vitamin D₃

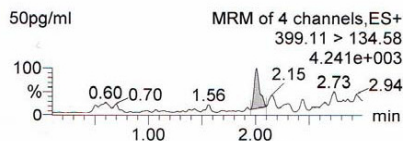
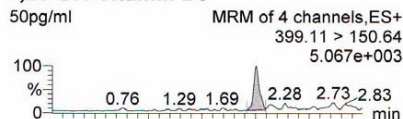
Blank:

1,25-OH-Vitamin D3

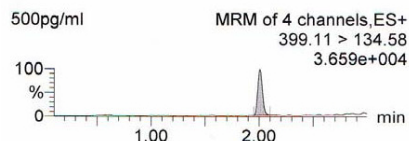
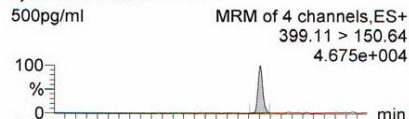


Standards:

1,25-OH-Vitamin D3

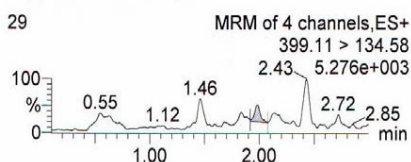
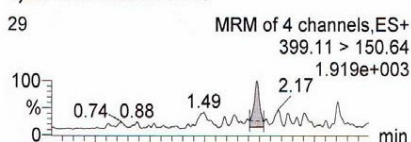


1,25-OH-Vitamin D3

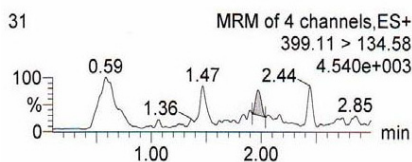
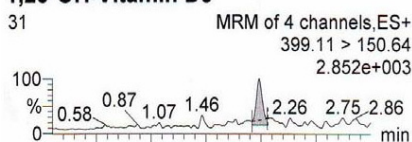


Samples:

1,25-OH-Vitamin D3



1,25-OH-Vitamin D3



12. 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.

Normal range (plasma or serum)

Healthy adults (age 20-50) :	17 - 53 pg/ml
Children up to 12:	ca. 40% higher values
Pregnant women (8-42 week):	ca. 60% higher values
Persons older than 70:	ca. 40% lower values

The normal range is independent of the season.

We recommend each laboratory to establish its own norm concentration range.

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

1,25-(OH)₂-Vitamin D₃

Inter-Assay (n = 10)

Probe	1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₃ [pg/ml]	VK [%]
1	116,4	5,8

Intra-Assay (n = 16)

Probe	1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₃ [pg/ml]	VK [%]
1	118,76	12,2

1,25-(OH)₂-Vitamin D₂***Inter-Assay (n = 10)***

Probe	1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₂ [pg/ml]	VK [%]
1	107,47	5,9

Intra-Assay (n = 16)

Probe	1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₂ [pg/ml]	VK [%]
1	119,14	6,7

Sensitivity

The detection limit was calculated with the formulas for linear calibration from DIN 32645. 10 concentrations in the range of 10–100 pg/ml were measured 5 times.

Detection limit of 1,25-(OH)₂ vitamin D₃: 5.68 pg/ml

Detection limit of 1,25-(OH)₂ vitamin D₂: 12.01 pg/ml

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

14. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- The quality control guidelines should be followed.
- 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.

15. 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.

16. DISPOSAL

Mobile phases (MOPHA A, MOPHA B), solution A (SOL A), activation reagent (ACT-SOL) and elution reagent for ImmuTube® (ELUREAG) must be disposed as non-halogenated solvents.

17. 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 sent to Immundiagnostik AG together with a written complaint.

18. REFERENCES

1. Armbruster, F. et al., 1990. Extraktion und chromatographische Trennung von 1,25-(OH)₂-Vitamin D aus Serum oder Plasma ohne Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC). *Das Ärztliche Laboratorium*, **36**, pp.75–80.
2. Durham, B. et al., 1995. Comparison of the IDS Gamma-B 1,25 dihydroxy vitamin D assay system with the Nichols Institute radioreceptor assay system. In *Proceedings of the ACB National Meeting*. Glasgow, UK: The Association of Clinical Biochemists.
3. Hollis, B.W., 1995. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-26,23-lactone interferes in determination of 1,25-dihydroxyvitamin D by RIA after immunoextraction. *Clinical chemistry*, **41**(9), pp.1313–4.
4. Hollis, B.W., 1996. Assessment of vitamin D nutritional and hormonal status: what to measure and how to do it. *Calcified tissue international*, **58**(1), pp.4–5.
5. Iqbal, S.J. et al., 1996. Possible interference with calcipotriol on new IDS RIA for 1,25-dihydroxyvitamin D. *Clinical chemistry*, **42**(1), pp.112–3.
6. Schilling, M., Armbruster, F.P. & Schmidt-Gayk, H., 1987. Rapid, selective separa-

tion of 1 alpha, 25-dihydroxy-vitamin D3 from serum with Extrelut-1 columns. *Clinical chemistry*, **33**(1), p.187.

7. Wildermuth, S. et al., 1993. Scintillation proximity assay for calcitriol in serum without high pressure liquid chromatography. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, **220**(1), pp.61–70.

8. Withold, W. et al., 1995. Evaluation of a radioimmunoassay for determination of calcitriol in human sera employing a 125I-labelled tracer. *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry : journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies*, **33**(12), pp.959–63.

9. Yuan, C. et al., 2011. Sensitive measurement of serum 1α,25-dihydroxyvitamin D by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after removing interference with immunoaffinity extraction. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, **25**(9), pp.1241–9.

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