

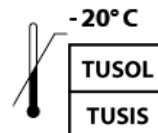
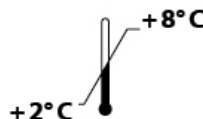
1,25-(OH)₂ Vitamin D₃/D₂ LC-MS/MS Tuning Kit

Zur Bestimmung der optimalen LC-MS/MS Einstellungen
For determination of the optimal LC-MS/MS settings

Gültig ab/valid from 25.10.2013



KM 1001



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. INHALT DER TESTPACKUNG	3
3. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
4. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	4
5. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	4
6. TESTDURCHFÜHRUNG	5
HINWEISE	5
6. 1. TUNING	5
6.2. EMPFINDLICHKEITSTEST	5
7. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE	7
8. AUSWERTUNG	7
9. ENTSORGUNG	8
10. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	8

Table of contents	Page
1. INTENDED USE	10
2. MATERIAL SUPPLIED	10
3. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	10
4. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	11
5. PRECAUTIONS	11
6. ASSAY PROCEDURE	11
PROCEDURAL NOTES	11
6. 1.TUNING	12
6.2. SENSITIVITY TEST	12
7. TREATMENT OF THE COLUMN	14
8. RESULTS	14
9. DISPOSAL	15
10. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	15

1. VERWENDUNGSZWECK

Zur Vorbereitung der Immundiagnostik 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃/D₂ LC-MS/MS-Applikation ist das Tuning notwendig. Das Tuning-Kit ist für die Findung der optimalen LC-MS/MS-Einstellungen, sowie für die Überprüfung der ausreichenden 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

Artikel Nr.	Abkürzung	Kit Komponenten	Menge
KM1000LA	MOPHA A	Laufmittel A	1000 ml
KM1000LB	MOPHA B	Laufmittel B	1000 ml
KM1000AC	ACTSOL	Aktivierungsreagenz	2,5 ml
KM1001TU	TUSOL	Tuning-Lösung 1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₃ /D ₂	5 ml
KM1002TU	TUSIS	Tuning-Lösung Interner Standard	2 ml
KM1000SO	SOL A	Lösung A	25 ml

Die UPLC Trennsäule mit Inline Filter (KM1000RP) 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. Acquity BEH C18, 1,7 µm (2,1 x 50 mm),
Zorbax Eclipse Plus C18, 1,8 µm (2,1 x 100 mm)

4. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

Laufmittel:

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-Lösungen (TUSOL, TUSIS) sind bei -20°C bis zum angegebenen Verfallsdatum verwendbar. Alle anderen Reagenzien sind bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar.

5. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zur *in vitro* Diagnostik.
- Die Laufmittel (MOPHA A und MOPHA B) bzw. Tuninglösungen (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.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

6. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung abzuarbeiten.

6. 1.TUNING

Wir empfehlen das Tuning mit einem T-Stück (UPLC/HPLC-Fluss und Spritzenpumpe). Die Tuninglösungen (TUSOL, TUSIS) enthalten hochreines 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃/D₂ bzw. das isotopisch markierte 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃-d₆ mit je einer Konzentration von 1 µg/ml.

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

Fluss der Spritzenpumpe mit Tuning-Lösung: 10 -20 µl/min

MS / MS-Methode (beispielhaft aufgeführt für ein Waters Quattro Premier XE Tandem Massenspektrometer):

Mode:	MRM
Polarity:	ESI+
Capillary (kV):	3
Cone (V):	var.
Extractor (V):	4
RF Lens (V):	0
Source Temperatur (°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 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.

6.2. EMPFINDLICHKEITSTEST

Ist das Mutterion stabil und können zufrieden stellende 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 1:1000 in SOL A

z.B. 10 µl TUSOL in 9990 µl SOL A (1000 pg/ml)

2.) Erstellung der Verdünnungsreihe:

			Konzentration [pg/ml]
1000 µl	1000 pg/ml		1000
500 µl	1000 pg/ml +	500 µl SOL A	500
500 µl	500 pg/ml +	500 µl SOL A	250
500 µl	250 pg/ml +	500 µl SOL A	125
200 µl	125 pg/ml +	800 µl SOL A	25
		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 1000 pg/ml injiziert werden.

Chromatographische Bedingungen:

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)

Fluss: 0,3 ml/min

Säulentemperatur: 45°C

Auftragsvolumen: 50 µl

Gradient:	Acquity			Zorbax Eclipse		
	Time	% A	% B	Time	% A	% B
	0 min	100% A	0% B	0 min	100% A	0% B
	2 min	0% A	100% B	4,5 min	0% A	100% B
	2,1 min	0% A	100% B	6,0 min	0% A	100% B
	2,2 min	100% A	0% B	6,1 min	100% A	0% B
	3,5 min	100% A	0% B	8,0 min	100% A	0% B

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

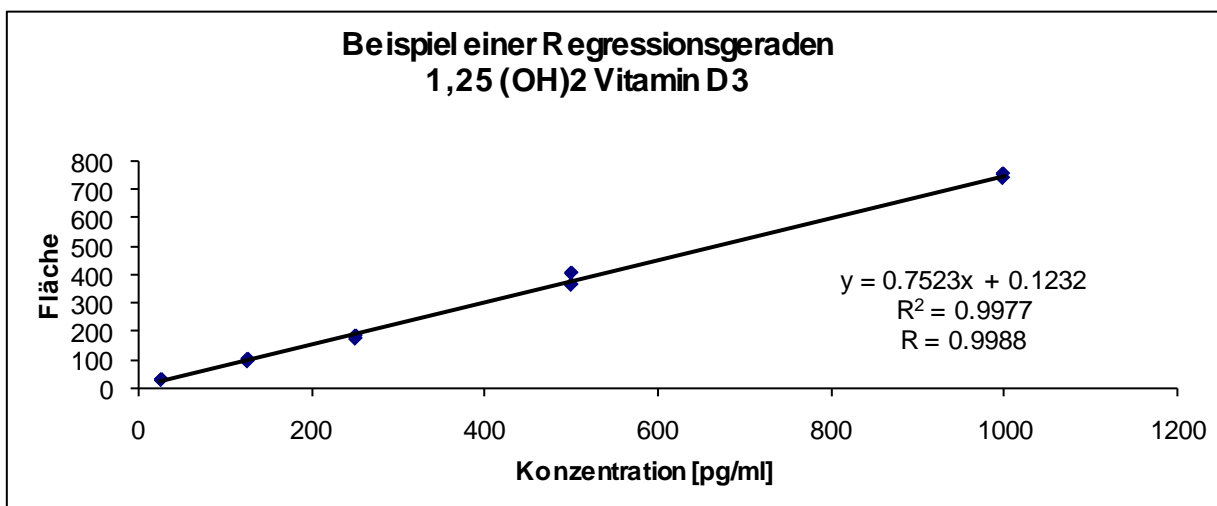
7. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE

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

8. AUSWERTUNG

Die erhaltenen Flächen werden gegen die Konzentrationen aufgetragen und es wird eine Regressionsgerade erstellt. Die niedrigste Konzentration 25 pg/ml sollte gefunden werden um die notwendige Empfindlichkeit zu erhalten.

Sind die Ergebnisse zufrieden stellend kann mit dem 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃/D₂-ImmuTube[®] LC-MS/MS Kit der Immundiagnostik AG aus Plasma und Serum gemessen werden.



9. ENTSORGUNG

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

10. 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.

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

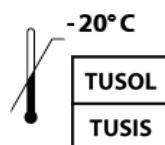
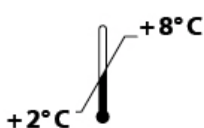
1,25-(OH)₂ Vitamin D₃/D₂ LC-MS/MS Tuning Kit

For determination of the optimal LC-MS/MS settings

Valid from 25.10.2013



KM 1001



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

In preparation for the Immundiagnostik 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃/D₂ 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
KM1000LA	MOPHA A	Mobile Phase A	1000 ml
KM1000LB	MOPHA B	Mobile Phase A	1000 ml
KM1000AC	ACTSOL	Activating reagent	2,5 ml
KM1001TU	TUSOL	Tuning solution 1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₃ /D ₂	5 ml
KM1002TU	TUSIS	Tuning solution Internal Standard	2 ml
KM1000SO	SOL A	Solution A	25 ml

The UPLC column with Inline Filter (KM1000RP) 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. Acquity BEH C18, 1,7 µm (2,1 x 50 mm),
Zorbax Eclipse Plus C18, 1,8 µm (2,1 x 100 mm)

4. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

Mobile phases:

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 solutions (TUSOL, TUSIS) must be stored at -20°C and used until the expiration date given on the label. All other reagents are stable at 2-8 °C up to the date of expiry stated on the label.

5. PRECAUTIONS

- 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.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on kit label.

6. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

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

6. 1.TUNING

We recommend tuning with a T-fitting (UPLC/HPLC flow rate and a syringe pump). The tuning solutions (TUSOL, TUSIS) consist of highly pure 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃/D₂ or isotopically labeled 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃-d₆, each with a concentration of 1 µg/ml.

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

Flow rate of the syringe pump with a tuning solution: 10 -20 µl/min

MS/MS method (e. g. 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	Collisions Energy: 22
399.11 > 150.64	Cone Voltage: 30	Collisions Energy: 22

1,25-(OH)₂-Vitamin D₂

411 > 134.8	Cone Voltage: 20	Collisions Energy: 23
411 > 150.7	Cone Voltage: 30	Collisions Energy: 26

Internal Standard / Isotopically labeled 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃-d₆

405.21 > 134.68	Cone Voltage: 35	Collisions Energy: 20
405.21 > 150.62	Cone Voltage: 35	Collisions 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.

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

6.2. 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 1:1000 in SOL A

e.g. 10 µl TUSOL in 9990 µl SOL A (1000 pg/ml)

2.) Preparation of the dilution series:

			Concentration [pg/ml]
1000 µl	1000 pg/ml		1000
500 µl	1000 pg/ml +	500 µl SOL A	500
500 µl	500 pg/ml +	500 µl SOL A	250
500 µl	250 pg/ml +	500 µl SOL A	125
200 µl	125 pg/ml +	800 µl SOL A	25
		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 1000 pg/ml can be injected in the first step.

Chromatographic conditions:

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)
Flow rate:	0.3 ml/min
Column temperature:	45°C
Injection volume:	50 µl

Gradient:	Acquity			Zorbax Eclipse		
	Time	A	B	Time	A	B
	0 min	100% A	0% B	0 min	100% A	0% B
	2 min	0% A	100% B	4.5 min	0% A	100% B
	2.1 min	0% A	100% B	6.0 min	0% A	100% B
	2.2 min	100% A	0% B	6.1 min	100% A	0% B
	3.5 min	100% A	0% B	8.0 min	100% A	0% B

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

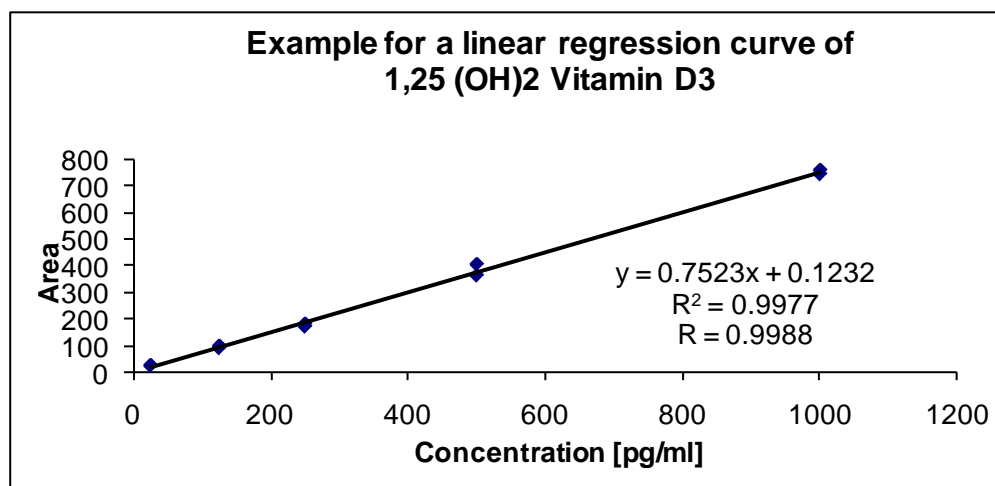
7. TREATMENT OF THE COLUMN

After the analysis, the column should be run with ca. 20 ml of 50% methanol stored in it.

8. RESULTS

The obtained areas are plotted against the concentrations and a linear regression curve is generated. The lowest concentration of 25 pg/ml should be found to obtain the necessary sensitivity.

When the obtained results are satisfying, the 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃/D₂-ImmuTube® LC-MS/MS Kit of Immundiagnostik AG can be used for measurement of 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃/D₂ in plasma and serum.



9. DISPOSAL

The mobile phases (MOPHA A, MOPHA B), activating reagent (ACTSOL) and Solution A (SOL A) must be disposed as non-halogenated solvents.

Please refer to the appropriate national guidelines.

10. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The test components contain organic solvents. Contact with skin or mucous membranes must be avoided.
- All reagents in the 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.

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number