

# 25-OH-VITAMIN D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> RP-HPLC KIT

*Zur Bestimmung von 25-OH-Vitamin D<sub>3</sub>  
und 25-OH Vitamin D<sub>2</sub> in Plasma und Serum*

*For the determination of 25-OH vitamin D<sub>3</sub> and  
25-OH vitamin D<sub>2</sub> in plasma and serum*

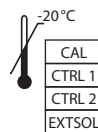
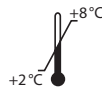
Gültig ab / Valid from 2015-06-18



KC3000



100



**Immundiagnostik AG**, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)



# Inhalt

<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>2</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
<b>3. TESTPRINZIP</b>	<b>2</b>
<b>4. INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>3</b>
<b>5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>3</b>
<b>6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>4</b>
<i>Vorbereitung</i>	4
<i>Lagerung</i>	4
<b>7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN</b>	<b>4</b>
<b>8. PROBENVORBEREITUNG</b>	<b>5</b>
<b>9. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>5</b>
<i>Hinweise</i>	5
<i>Arbeitsschema</i>	5
<i>Chromatographische Bedingungen</i>	6
<b>10. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE</b>	<b>6</b>
<b>11. AUSWERTUNG</b>	<b>6</b>
<i>Musterchromatogramm</i>	7
<b>12. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>7</b>
<b>13. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>7</b>
<i>Referenzbereiche für 25-OH-Vitamin D</i>	7
<b>14. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>8</b>
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	8
<i>Linearität</i>	9
<i>Nachweisgrenze</i>	9
<i>Wiederfindung</i>	9
<b>15. ENTSORGUNG</b>	<b>9</b>
<b>16. MASSNAHMEN BEI STÖRUNGEN</b>	<b>9</b>
<b>17. LITERATUR</b>	<b>10</b>
<b>18. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>11</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Diese Reversed-Phase-HPLC-Applikation ist für die Bestimmung von 25-OH-Vitamin D<sub>3</sub> und 25-OH-Vitamin D<sub>2</sub> 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 Sonnenlichts katalysierten Spaltung des B-Rings im Sterangerüst. Die beiden wichtigsten D-Vitamine sind Vitamin D<sub>3</sub> und Vitamin D<sub>2</sub>. Im Gegensatz zum Provitamin D<sub>2</sub>, das mit der Nahrung aufgenommen werden muss, kann das Provitamin D<sub>3</sub> auch in der Leber gebildet werden.

In der Haut gebildetes oder mit der Nahrung gemeinsam mit Vitamin D<sub>2</sub> aufgenommenes Vitamin D<sub>3</sub> 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-D<sub>3</sub>. Das 25-OH-D<sub>2</sub> wird nur bei Patienten unter Medikation mit Vitamin D<sub>2</sub> gemessen.

## 3. TESTPRINZIP

Zur Bestimmung des 25-OH-Vitamin D<sub>3</sub> und 25-OH-Vitamin D<sub>2</sub> wird eine sehr einfache Probenvorbereitung durchgeführt, die eine Fällung und eine Extraktion kombiniert.

Die Trennung mittels HPLC erfolgt in einem isokratischen Verfahren bei 30 °C auf einer „reversed-phase“-Säule. Die Aufnahme der Chromatogramme erfolgt mit einem UV-Detektor. Die Trennung benötigt ca. 12 Minuten für einen Lauf. Die Quantifizierung erfolgt über den mitgelieferten Kalibrator und die Berechnung der Ergebnisse wird über die „externe Standard-Methode“ anhand der Bestimmung der Peakhöhe durchgeführt.

### Zusammenfassung

Dieser Komplettkit enthält alle Reagenzien für die analytische HPLC-Trennung sowie die Reagenzien für die Probenvorbereitung.

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 zu Im-

munassays mit bis zu sechs 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 Einpunkt-Kalibrierung sehr viel wirtschaftlicher gegenüber der 6-Punkt-Kalibrierung bei Immunoassays.

#### 4. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KC3000LM	MOPHA	Laufmittel (enthält Acetonitril)	1000 ml
KC3000KA	CAL	Kalibrator (lyoph. 1,2 ml; Konzentration siehe Produktspezifikation)	3 Fläschchen
KC3000RE	RECSOL	Rekonstitutionslösung	15 ml
KC3000FR	PREC	Fällungsreagenz	50 ml
KC3000EX	EXTSOL	Extraktionslösung (enthält Acetonitril)	40 ml
KC3000KO	CTRL1 CTRL2	Kontrolle 1 und 2 (lyoph. 0,6 ml; Konzentration siehe Produktspezifikation)	2 x 3 Fläschchen

Die HPLC Trennsäule (KC3000RP) 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
- 2-ml-Reaktionsgefäße (Eppendorf)
- Diverse Pipetten
- HPLC-Anlage mit UV-Detektor
- HPLC-Säule Vitamin D KC3000RP

## 6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

### Vorbereitung

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

- Der **Kalibrator** (CAL), Plasma mit definierter Menge 25-OH-Vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub>, wird unmittelbar vor Gebrauch in **1,2 ml RECSOL** (Rekonstitutionslösung) gelöst, zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen und im Anschluss gründlich gemischt. Der Gehalt an 25-OH-Vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> ändert sich geringfügig von Charge zu Charge, der genaue Gehalt ist im Spezifikationsdatenblatt angegeben.
- Die **Kontrollen** (CTRL1, CTRL2) werden unmittelbar vor Gebrauch in **0,6 ml RECSOL** resuspendiert, zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen und im Anschluss gründlich gemischt. Der Gehalt an 25-OH-Vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> ändert sich geringfügig von Charge zu Charge, der genaue Gehalt ist im Spezifikationsdatenblatt angegeben.

### Lagerung

- Die lyophilisierten Kontrollen (**CTRL1, CTRL2**) und der lyophilisierte Kalibrator (**CAL**) sind bei **-20 °C** zu lagern und bis zum Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.
- Die Extraktionslösung (**EXTSOL**) **muss bei -20 °C gelagert werden** und darf nur unmittelbar zum Gebrauch aus der Kühlung genommen werden. Sie muss nach Gebrauch sofort wieder bei **-20 °C** gelagert werden.

Alle anderen Testreagenzien sind bei **2–8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen 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 befunden worden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Extraktionslösung (EXTSOL) und das Laufmittel (MOPHA) enthalten Acetonitril und müssen mit Vorsicht behandelt werden. Acetonitril 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. Bei -20 °C gelagerte Proben sind mindestens vier Wochen stabil.

## 9. TESTDURCHFÜHRUNG

### *Hinweise*

- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden.
- 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.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung abzuarbeiten.

### *Arbeitsschema*

1.	<b>500 µl Fällungsreagenz</b> (PREC) in 2-ml-Reaktionsgefäße vorlegen.
2.	<b>500 µl Kalibrator</b> (CAL), <b>Kontrolle</b> (CTRL1, CTRL2) oder <b>Probe</b> zugeben.
3.	<b>400 µl eiskalte Extraktionslösung</b> (EXTSOL) unter Abzug zugeben.
4.	<b>1 min</b> vortexen.
5.	<b>10 min</b> bei 10 000 g zentrifugieren.
6.	<b>100 µl Überstand</b> in das HPLC-System injizieren.

## Chromatographische Bedingungen

Säulendimension:	125 × 4 mm
Fluss:	1 ml/min (der genaue Fluss ist in der Produktspezifikation der jeweiligen Säule angegeben)
Temperatur:	30 °C
UV-Detektion:	264 nm
Auftragsvolumen:	100 µl
Laufzeit:	15 Minuten

---

## 10. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE

Nach der Analyse kann die Trennsäule fest verschlossen im Laufmittel belassen werden.

Zur Wiederinbetriebnahme wird das ganze System inklusive Säule mit ca. 30 ml MOPHA (Laufmittel) äquilibriert.

## 11. AUSWERTUNG

$$\frac{\text{Peakhöhe Probe} \times \text{Konzentration des Kalibrators}}{\text{Peakhöhe interner Standard der Probe}} \times F = \text{Konzentration Probe}$$

$$F = \frac{\text{Peakhöhe interner Standard des Kalibrators}}{\text{Peakhöhe Kalibrator}}$$

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

### Umrechnungsfaktoren:

für 25-OH-Vitamin D<sub>3</sub>

1 ng/ml = 2,5 nmol/l

1 nmol/l = 0,4 ng/ml

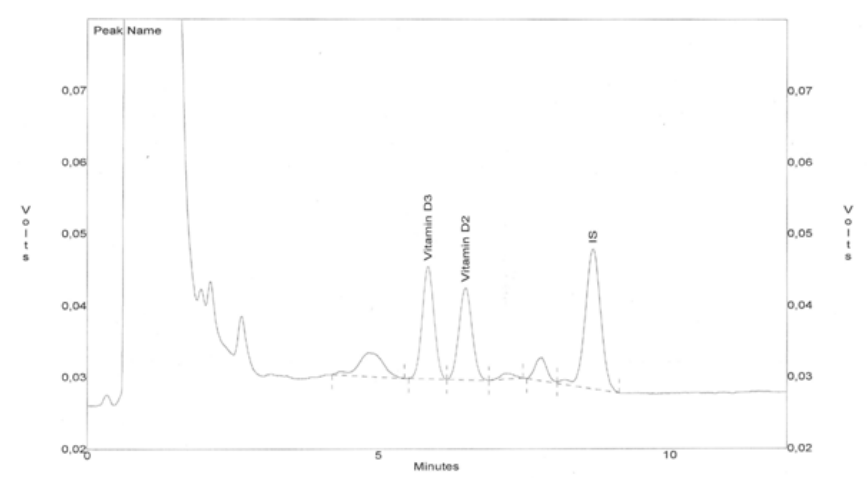
für 25-OH-Vitamin D<sub>2</sub>

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

### Referenzbereiche für 25-OH-Vitamin D

#### Information von ASBMR 2011

Defizienz (schwerer Mangel)	< 20 ng/ml	bzw.	< 50 nmol/l
Insuffizienz (Mangel)	20–29 ng/ml	bzw.	50–74 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](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 vom Vitamin-D-Bindeprotein, VDBP) und können daher nur zur Orientierung dienen.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

### 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.

### Literaturreferenzen

1. Visser, M. et al., 2006. Low serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D in older persons and the risk of nursing home admission. *The American journal of clinical nutrition*, **84**(3), pp.616–22; quiz 671–2.
2. Grant, W.B. & Holick, M.F., 2005. Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic*, **10**(2), pp.94–111.
3. Wicherts, I.S. et al., 2007. Vitamin D status predicts physical performance and its decline in older persons. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **92**(6), pp.2058–65.

## 14. TESTCHARAKTERISTIKA

### Präzision und Reproduzierbarkeit

#### Inter-Assay (n = 5)

Analyt	Probe	[nmol/l]	VK [%]
25-OH-Vitamin D <sub>3</sub>	1	121,4	4,5
	2	345,1	3,3
25-OH-Vitamin D <sub>2</sub>	1	146,0	4,2
	2	420,2	3,3

#### Intra-Assay (n = 11)

Analyt	Probe	[nmol/l]	VK [%]
25-OH-Vitamin D <sub>3</sub>	1	138,7	6,4
	2	428,9	6,7
25-OH-Vitamin D <sub>2</sub>	1	201,4	2,9
	2	463,2	3,2

### Linearität

Die Linearität für 25-OH-Vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> ist bis zu 1250 nmol/l gegeben.

### Nachweisgrenze

25-OH-Vitamin D <sub>3</sub>	7,0 nmol/l
25-OH-Vitamin D <sub>2</sub>	9,4 nmol/l

### Wiederfindung

25-OH-Vitamin D <sub>3</sub>	109,8%	n = 14
25-OH-Vitamin D <sub>2</sub>	102,8%	n = 14

## 15. ENTSORGUNG

Die Extraktionslösung (EXTSOL) muss 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

Problemstellung	Mögliche Ursache	Behebung
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









1. Merke, J., Ritz, E. & Schettler, G., 1986. New viewpoints on the role of vitamin D. Current knowledge and outlook. *Deutsche medizinische Wochenschrift* (1946), **111**(9), pp.345–349.
2. Reichel, H., Koeffler, H.P. & Norman, A.W., 1989. The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *The New England journal of medicine*, **320**(15), pp.980–991.
3. Visser, M. et al., 2006. Low serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D in older persons and the risk of nursing home admission. *The American journal of clinical nutrition*, **84**(3), pp.616–22; quiz 671–2.
4. Grant, W.B. & Holick, M.F., 2005. Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic*, **10**(2), pp.94–111.
5. Wicherts, I.S. et al., 2007. Vitamin D status predicts physical performance and its decline in older persons. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*,

92(6), pp.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 Chargennummern aus verschiedenen Testpackungen sollten nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die dafür erstellten Richtlinien für medizinische Laboratorien 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.

### Verwendete Symbole:

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis



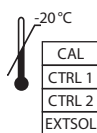
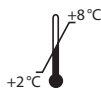
# 25-OH VITAMIN D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> RP-HPLC KIT

*For the determination of 25-OH vitamin D<sub>3</sub> and  
25-OH vitamin D<sub>2</sub> in plasma and serum*

Gültig ab / Valid from 2015-06-18



KC3000



**Immundiagnostik AG**, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

# Table of Contents

<b>1. INTENDED USE</b>	<b>15</b>
<b>2. INTRODUCTION</b>	<b>15</b>
<b>3. PRINCIPLE OF THE TEST</b>	<b>15</b>
<b>4. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>16</b>
<b>5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>16</b>
<b>6. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS</b>	<b>16</b>
<i>Preparation</i>	16
<i>Storage</i>	17
<b>7. PRECAUTIONS</b>	<b>17</b>
<b>8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION</b>	<b>17</b>
<b>9. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>18</b>
<i>Procedural notes</i>	18
<i>Test procedure</i>	18
<i>Chromatographic conditions</i>	18
<b>10. TREATMENT OF THE COLUMN</b>	<b>19</b>
<b>11. RESULTS</b>	<b>19</b>
<i>Typical chromatogram</i>	19
<b>12. LIMITATIONS</b>	<b>20</b>
<b>13. QUALITY CONTROL</b>	<b>20</b>
<i>Reference ranges for 25-OH vitamin D</i>	20
<b>14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>21</b>
<i>Precision and reproducibility</i>	21
<i>Linearity</i>	21
<i>Detection limit</i>	21
<i>Recovery</i>	21
<b>15. DISPOSAL</b>	<b>22</b>
<b>16. TROUBLESHOOTING</b>	<b>22</b>
<b>17. REFERENCES</b>	<b>23</b>
<b>18. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>23</b>



## 1. INTENDED USE

This reversed phase HPLC application is intended for the quantitative determination of 25-OH vitamin D<sub>3</sub> and 25-OH vitamin D<sub>2</sub> in serum and plasma. This assay is designed for *in vitro* diagnostic use only.

## 2. INTRODUCTION

D vitamins and calciferols arise from provitamins by the splitting of the B-ring of the steran backbone catalysed by UV radiation of sunlight. The two most important D vitamins are vitamin D<sub>3</sub> and vitamin D<sub>2</sub>. In the contrary to vitamin D<sub>2</sub> which has to be added via food, vitamin D<sub>3</sub> can be produced in the liver.

Vitamin D<sub>3</sub>, formed in the skin or ingested together with vitamin D<sub>2</sub> in food, 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-D<sub>3</sub>. 25-OH-D<sub>2</sub> is only detectable in patients with vitamin D<sub>2</sub> medication.

## 3. PRINCIPLE OF THE TEST

For the determination of 25-OH vitamin D<sub>3</sub> and 25-OH vitamin D<sub>2</sub> samples, a simple sample preparation is used, a combination of precipitation and extraction.

The HPLC separation works with an isocratic method at 30 °C with a „reversed phase“ column. Chromatograms are detected by an UV detector. The separation takes 12 minutes for each run. Results are quantified by the provided calibrator and calculated by the „external standard-method“ by determination of the peak height.

### Summary

This complete kit includes all reagents for analytical HPLC separation and 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 immunoassays 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 immunoassays.

#### 4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
KC3000LM	MOPHA	Mobile phase (contains acetonitrile)	1000 ml
KC3000KA	CAL	Calibrator (lyoph. 1.2 ml; see specification for concentration)	3 vials
KC3000RE	RECSOL	Reconstitution solution	15 ml
KC3000FR	PREC	Precipitation reagent	50 ml
KC3000EX	EXTSOL	Extraction solution (contains acetonitril)	40 ml
KC3000KO	CTRL1 CTRL2	Control 1 and 2 (0.6 ml lyophilized; see specification for concentration)	2 x 3 vials

HPLC column (KC3000RP) 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
- 2 ml reaction tubes (Eppendorf)
- Various pipettes
- HPLC with UV-detector
- HPLC column Vitamin D KC3000RP

#### 6. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

##### *Preparation*

All test reagents provided except calibrator and controls are in solution and ready to use:

- The **calibrator** (CAL), plasma containing a defined amount of 25-OH vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub>, have to be reconstituted directly before use in **1.2 ml RECSOL** (reconstitution solution): allow the vial content to dissolve for 10 min, then mix well. The exact amount of 25-OH vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> changes slightly from lot to lot, the exact amount is stated in the specification data sheet.

- The **controls** (CTRL1, CTRL2) have to be reconstituted directly before use in **0.6 ml RECSOL**: allow the vial content to dissolve for 10 min, then mix well. The exact amount of 25-OH vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> changes slightly from lot to lot, the exact amount is stated in the specification data sheet.

### Storage

- The lyophilised controls (**CTRL1, CTRL2**) and the lyophilised calibrator (**CAL**) have to be stored at **-20 °C** until expiry date stated on the label.
- The extraction solution (**EXTSOL**) **has to be stored at -20 °C** and must not be taken out of the freezer but for direct use. It must be stored again at **-20 °C** immediately after use.

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**.

## 7. PRECAUTIONS

- 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 extraction solution (EXTSOL) and the mobile phase (MOPHA) 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 the 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 can be used. The samples should be stored at **-20 °C** until testing. Samples are stable for at least four weeks when stored at **-20 °C**.

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

### *Test procedure*

1.	Pipet <b>500 µl precipitation reagent</b> (PREC) in 2 ml reaction tubes.
2.	Add <b>500 µl calibrator</b> (CAL), <b>control</b> (CTRL1, CTRL2) or <b>sample</b> .
3.	Add <b>400 µl</b> of <b>ice cold extraction solution</b> (EXTSOL) under the fume hood.
4.	Vortex for <b>1 min</b> .
5.	Centrifuge for <b>10 min</b> at 10 000 <i>g</i> .
6.	Inject <b>100 µl</b> of the <b>supernatant</b> into the HPLC system.

### *Chromatographic conditions*

Column dimension:	125 × 4 mm
Flow rate:	1 ml/min (the exact flow rate is given in the corresponding data sheet)
Temperature:	30 °C
UV detector:	264 nm
Injection volume:	100 µl
Running time / chromatogram:	15 minutes

### 10. TREATMENT OF THE COLUMN

After analysis, the separation column can be stored in the mobile phase, tightly closed.

Before use, the system including the column should be equilibrated with about 30 ml MOPHA (mobile phase).

### 11. RESULTS

$$\frac{\text{Peak height sample} \times \text{Calibrator concentration}}{\text{Peak height internal standard in the sample}} \times F = \text{Concentration of the sample}$$

$$F = \frac{\text{Peak height internal standard in the calibrator}}{\text{Peak height calibrator}}$$

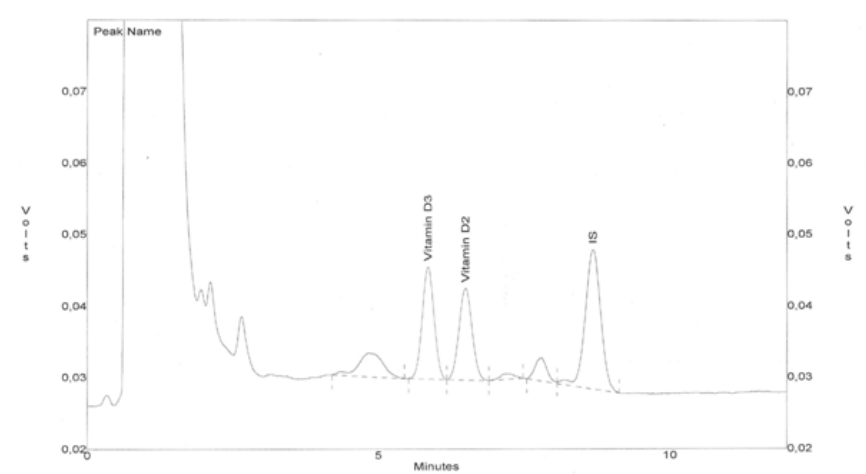
**Tip:** Alternatively, the peak area instead of the peak height can be used for quantification.

**Conversion factors:**

*for 25-OH vitamin D<sub>3</sub>*  
 1 ng/ml = 2.5 nmol/l  
 1 nmol/l = 0.4 ng/ml

*for 25-OH vitamin D<sub>2</sub>*  
 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

### *Reference ranges for 25-OH vitamin D*

#### **Information from ABMR 2011**

Deficiency (seriously deficient)	< 20 ng/ml	or	< 50 nmol/l
Insufficiency (deficient)	20–29 ng/ml	or	50–74 nmol/l
Sufficiency (adequately supplied)	> 30 ng/ml	or	> 75 nmol/l

Society of Osteologists SACHSEN E. V.

[http://osteologie-sachsen.de/aktuelles\\_vitamin\\_d.htm](http://osteologie-sachsen.de/aktuelles_vitamin_d.htm)

#### **Note**

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

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

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

#### **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.

#### **Literature references**

1. Visser, M. et al., 2006. Low serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D in older persons and the risk of nursing home admission. *The American journal of clinical nutrition*, **84**(3), pp.616–22; quiz 671–2.
2. Grant, W.B. & Holick, M.F., 2005. Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic*, **10**(2), pp.94–111.
3. Wicherts, I.S. et al., 2007. Vitamin D status predicts physical performance and its decline in older persons. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*,

92(6), pp.2058–65.

## 14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Precision and reproducibility*

#### **Inter-Assay (n = 5)**

Analyte	Sample	[nmol/l]	CV [%]
25-OH vitamin D <sub>3</sub>	1	121.4	4.5
	2	345.1	3.3
25-OH vitamin D <sub>2</sub>	1	146.0	4.2
	2	420.2	3.3

#### **Intra-Assay (n = 11)**

Analyte	Sample	[nmol/l]	CV [%]
25-OH vitamin D <sub>3</sub>	1	138.7	6.4
	2	428.9	6.7
25-OH vitamin D <sub>2</sub>	1	201.4	2.9
	2	463.2	3.2

### *Linearity*

The linearity for 25-OH vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> is given up to 1250 nmol/l.

### *Detection limit*

25-OH vitamin D<sub>3</sub>      7.0 nmol/l

25-OH vitamin D<sub>2</sub>      9.4 nmol/l

### *Recovery*

25-OH vitamin D<sub>3</sub>      109.8%      n = 14

25-OH vitamin D<sub>2</sub>      102.8%      n = 14

## 15. DISPOSAL

The extraction solution (EXTSOL) 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



Problem	Possible reason	Solution
Baseline is drifting	Detector lamp did not yet reach working temperature	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, J., Ritz, E. & Schettler, G., 1986. New viewpoints on the role of vitamin D. Current knowledge and outlook. *Deutsche medizinische Wochenschrift* (1946), **111**(9), pp.345–349.
- Reichel, H., Koeffler, H.P. & Norman, A.W., 1989. The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *The New England journal of medicine*, **320**(15), pp.980–991.
- Visser, M. et al., 2006. Low serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D in older persons and the risk of nursing home admission. *The American journal of clinical nutrition*, **84**(3), pp.616–22; quiz 671–2.
- Grant, W.B. & Holick, M.F., 2005. Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic*, **10**(2), pp.94–111.
- Wicherts, I.S. et al., 2007. Vitamin D status predicts physical performance and its decline in older persons. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **92**(6), pp.2058–65.

## 18. 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.
- 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 incorrect use.

**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