

# 25-OH-Vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> LC-MS/MS 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 2015-02-04

**REF** KM5000

$\Sigma$   
100

+2°C    +8°C

-20°C  
CAL  
CTRL 1  
CTRL 2  
PREC  
INT STD

**IVD** **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

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

Fax: + 49 6251 849430

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



# Inhalt

<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>2</b>
<b>2. EINLEITUNG / KLINISCHE RELEVANZ</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>6</b>
<b>6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>6</b>
<b>7. PROBENVORBEREITUNG</b>	<b>7</b>
<b>8. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>8</b>
<i>Ansatzprotokoll 1</i>	8
<i>Ansatzprotokoll 2</i>	8
<i>Ansatzprotokoll 3</i>	9
<b>9. CHROMATOGRAPHISCHE BEDINGUNGEN</b>	<b>10</b>
<b>10. MS/MS-METHODE (BEISPIELHAFT AUFGEFÜHRT FÜR EIN WATERS     QUATTRO PREMIER XE TANDEM MASSENSPEKTROMETER)</b>	<b>10</b>
<i>MRM-Übergänge (m/z)</i>	11
<b>11. AUSWERTUNG</b>	<b>11</b>
<b>12. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>11</b>
<b>13. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>12</b>
<i>Referenzwerte</i>	12
<b>14. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>13</b>
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	13
<i>Sensitivität</i>	14
<b>15. ENTSORGUNG</b>	<b>14</b>
<b>16. VORSICHTSMASSNAHMEN</b>	<b>14</b>
<b>17. TECHNISCHE MERKMALE</b>	<b>14</b>
<b>18. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>15</b>
<b>19. LITERATUR</b>	<b>15</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Die hier beschriebene LC-MS/MS-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. Der Kit ist nur zur *in-vitro*-Diagnostik geeignet.

## 2. EINLEITUNG / KLINISCHE RELEVANZ

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 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> stehen je nach Empfindlichkeit des LC-MS/MS-Systems unterschiedliche Probenvorbereitungen zur Verfügung (Ansatzprotokoll 1, 2 und 3).

### Ansatzprotokoll 1:

Für sehr empfindliche LC-MS/MS-Geräte ist eine einfache Proteinpräzipitation ausreichend.

### Ansatzprotokolle 2 und 3:

Sind für alle LC-MS/MS-Geräte geeignet. Die Probenvorbereitung entspricht einer SPE-Aufarbeitung über 1-ml-Kartuschen für Ansatzprotokoll 2 und für Ansatzprotokoll 3 einer SPE-Aufarbeitung im 96-well-Format.

## 4. INHALT DER TESTPACKUNG

### Für Ansatzprotokoll 1:

Bestimmung von 25-OH-Vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> über *Proteinpräzipitation*

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KM5000LA	MOPHA A	Laufmittel A	1000 ml
KM5000LB	MOPHA B	Laufmittel B	1000 ml
KM5000KA	CAL	Kalibrator (lyoph. 1,2 ml; Konzentration siehe Etikett)	5 Fläschchen
KM5000KO	CTRL1 CTRL2	Kontrolle 1 und 2 (lyoph. 0,6 ml; Konzentration siehe Produktspezifikation)	Je 2 x 5 Fläschchen
KM5000RE	RECSOL	Rekonstitutionslösung	10 ml
KM5000AC	ACTSOL	Aktivierungsreagenz	2,5 ml
KM5000FR	PREC	Fällungsreagenz (-20 °C)	45 ml
KM5000SO	SOL A	Lösung A	2 x 50 ml
KM5000IS	INT STD	Interner Standard	1,1 ml

Zur Vorbereitung der 25-OH-Vitamin-D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub>-Applikation ist das Tuning zur Findung der optimalen LC-MS/MS-Einstellungen notwendig. Die Tuninglösung (KM5000TU, 25-OH-Vitamin-D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> und INT STD als Reinsubstanzen), die Säule (KM5000RP) sowie alle anderen Einzelkomponenten können separat bei der Firma Immundiagnostik AG bestellt werden. Bitte fordern Sie unsere Einzelkomponentenpreisliste an.

**Für Ansatzprotokoll 2:**

Bestimmung von 25-OH-Vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> über *Kartuschenaufreinigung* (Waters Oasis HLB 30 mg, 1cc)

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KM5000LA	MOPHA A	Laufmittel A	1000 ml
KM5000LB	MOPHA B	Laufmittel B	1000 ml
KM5000KA	CAL	Kalibrator (lyoph. 1,2 ml; Konzentration siehe Etikett)	5 Fläschchen
KM5000KO	CTRL1 CTRL2	Kontrolle 1 und 2 (lyoph. 0,6 ml; Konzentration siehe Produktspezifikation)	Je 2 x 5 Fläschchen
KM5000RE	RECSOL	Rekonstitutionslösung	10 ml
KM5000AC	ACTSOL	Aktivierungsreagenz	2,5 ml
KM5000FR2	PREC	Fällungsreagenz (-20 °C)	55 ml
KM5000SO2	SOL A	Lösung A	25 ml
KM5000WL2	WASHSOL	Waschlösung	160 ml
KM5000EL2	ELUSOL	Elutionslösung (enthält Acetonitril)	210 ml
KM5000IS	INT STD	Interner Standard	1,1 ml

Zur Vorbereitung der 25-OH-Vitamin-D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub>-Applikation ist das Tuning zur Findung der optimalen LC-MS/MS-Einstellungen notwendig. Die Tuninglösung (KM5000TU, 25-OH-Vitamin-D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> und INT STD als Reinsubstanzen), die Säule (KM5000RP), die Oasis® HLB 30 mg, 1cc (KM5000CK) sowie alle anderen Einzelkomponenten können separat bei der Firma Immundiagnostik AG bestellt werden. Bitte fordern Sie unsere Einzelkomponentenpreisliste an.

**Für Ansatzprotokoll 3:**

Bestimmung von 25-OH-Vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> durch *Aufreinigung der Proben über eine 96-well-Platte (Oasis HLB  $\mu$ Elution plate)*.

**Achtung:** Anzahl der Bestimmungen auf 96 Proben beschränkt.

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KM5000LA	MOPHA A	Laufmittel A	1000 ml
KM5000LB	MOPHA B	Laufmittel B	1000 ml
KM5000KA	CAL	Kalibrator (lyoph. 1,2 ml; Konzentration siehe Etikett)	5 Fläschchen
KM5000KO	CTRL1 CTRL2	Kontrolle 1 und 2 (lyoph. 0,6 ml; Konzentration siehe Produktspezifikation)	Je 2 x 5 Fläschchen
KM5000RE	RECSOL	Rekonstitutionslösung	10 ml
KM5000AC	ACTSOL	Aktivierungsreagenz	2,5 ml
KM5000FR3	PREC	Fällungsreagenz (-20 °C)	20 ml
KM5000SO3	SOL A	Lösung A	10 ml
KM5000WL3	WASHSOL	Waschlösung	20 ml
KM5000EL3	ELUSOL	Elutionslösung (enthält Acetonitril)	10 ml
KM5000IS	INT STD	Interner Standard	1,1 ml

Zur Vorbereitung der 25-OH-Vitamin-D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub>-Applikation ist das Tuning zur Findung der optimalen LC-MS/MS-Einstellungen notwendig. Die Tuninglösung (KM5000TU, 25-OH-Vitamin-D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> und INT STD als Reinsubstanzen), die Säule (KM5000RP), die  $\mu$ Elutionsplatten (KM5000PL) sowie alle anderen Einzelkomponenten können separat bei der Firma Immundiagnostik AG bestellt werden. Bitte fordern Sie unsere Einzelkomponentenpreisliste an.

## 5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Vortex-Mixer
- 1,5-ml-Reaktionsgefäße (Eppendorf)
- Diverse Pipetten
- LC-MS/MS-Anlage
- UPLC-Säule C18, z. B. Acquity BEH C18, 1,7 µm (2,1 x 50 mm)
- Reagenzgefäße aus Glas, LC-MS/MS-geeignet
- 500-ml-Messzylinder, LC-MS/MS-geeignet
- Zentrifuge, auf 4 °C kühlbar

### Zusätzlich für Ansatzprotokoll 2:

Bestimmung von 25-OH-Vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> über Kartuschenaufreinigung (Waters Oasis HLB 30 mg, 1cc)

- Reinstwasser\*
- Methanol p. a.
- Oasis® HLB Kartuschen 30 µm, 1cc (KM5000CK)
- Absaugeinheit für Festphasenextraktionskartuschen

### Zusätzlich für Ansatzprotokoll 3:

Bestimmung von 25-OH-Vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> durch Aufreinigung der Proben über eine 96-well-Platte (Oasis HLB µElution plate)

- Methanol p. a.
- Reinstwasser\*
- µElution 96-well-plate (Oasis®, HLB 30 µm) (KM5000PL)
- Vakuumstation für µElutionsplatten

\* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

## 6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

Interner Standard (**INT STD**) und Fällungsreagenz (**PREC**) können bei **-20 °C** bis zum angegebenen Verfallsdatum gelagert werden.

### Laufmittel und Lösung A

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

z. B. 500 ml MOPHA + 500 µl ACTSOL

Die hergestellten Lösungen sind dann noch 2 Wochen verwendbar, es wird deshalb empfohlen, nur so viel 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.

### Kalibrator und Kontrollen

- Der **lyophilisierte Kalibrator** (CAL), Plasma mit definierter Menge 25-OH-Vitamin D<sub>3</sub> und 25-OH-Vitamin D<sub>2</sub>, wird bis zum Gebrauch bei **-20 °C** gelagert. Der Gehalt an 25-OH-Vitamin D<sub>3</sub> und 25-OH-Vitamin D<sub>2</sub> ändert sich geringfügig von Charge zu Charge, der genaue Gehalt ist auf dem Etikett angegeben. Vor Gebrauch wird der Kalibrator in **1,2 ml Rekonstitutionslösung** (RECSOL) **resuspendiert**. Rekonstituierter Kalibrator kann **nicht gelagert** werden.
- Die **lyophilisierten Kontrollen** (CTRL1, CTRL2) werden bis zum Gebrauch bei **-20 °C** gelagert. Vor Gebrauch werden sie in **0,6 ml RECSOL resuspendiert**. Rekonstituierte Kontrollen können **nicht gelagert** werden.

Alle anderen Testreagenzien sind bei **2–8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

## 7. 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.

## 8. TESTDURCHFÜHRUNG

### Ansatzprotokoll 1

Bestimmung von 25-OH-Vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> über *Proteinpräzipitation*.

1.	<b>200 µl</b> Kalibrator ( <b>CAL</b> ), Kontrollen ( <b>CTRL1</b> , <b>CTRL2</b> ) oder <b>Probe</b> in 1,5-ml-Reaktionsgefäße vorlegen
2.	<b>10 µl</b> internen Standard ( <b>INT STD</b> ) zugeben und mischen
3.	<b>400 µl</b> Fällungsreagenz ( <b>PREC</b> ) (eiskalt) zugeben
4.	<b>1 min</b> vortexen
5.	<b>10 min</b> bei <b>4 °C</b> stehen lassen
6.	<b>10 min</b> bei 10 000 rpm und <b>4 °C</b> zentrifugieren
7.	Überstand <b>1:10</b> mit <b>aktivierter SOL A</b> verdünnen (z.B. 100 µl Überstand + 900 µl SOL A)
8.	<b>50 µl</b> in die LC-MS/MS-Anlage injizieren

### Ansatzprotokoll 2

Bestimmung von 25-OH-Vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> über *Kartuschenaufreinigung (Waters Oasis HLB 30 mg, 1cc)*.

1.	Kartuschen erst mit 1 ml Methanol und dann mit 1 ml Reinstwasser equilibrieren
2.	<b>500 µl</b> Kalibrator ( <b>CAL</b> ), Kontrollen ( <b>CTRL1</b> , <b>CTRL2</b> ) oder <b>Probe</b> in 1,5-ml-Reaktionsgefäße vorlegen
3.	<b>10 µl</b> internen Standard ( <b>INT STD</b> ) zugeben und mischen
4.	<b>500 µl</b> Fällungsreagenz ( <b>PREC</b> ) (eiskalt) zugeben
5.	<b>1 min</b> vortexen
6.	<b>10 min</b> bei <b>4 °C</b> stehen lassen
7.	<b>10 min</b> bei 10 000 rpm und <b>4 °C</b> zentrifugieren
8.	<b>500 µl Überstand</b> auf die equilibrierten Kartuschen geben
9.	<b>3 x</b> mit <b>500 µl</b> WASHSOL waschen

10.	<b>2 x</b> mit <b>1 ml</b> ELUSOL eluieren
11.	Eluat unter Stickstoffstrom bei 37°C oder in einer Vakuumzentrifuge trocknen
12.	<b>200 µl aktiviertes SOL A</b> zugeben und den Rückstand durch 1 min intensives Vortexen lösen
13.	<b>50 µl</b> in die LC-MS/MS-Anlage injizieren

### Ansatzprotokoll 3

Bestimmung von 25-OH-Vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> durch *Aufreinigung der Proben über eine 96-well-Platte (Oasis HLB µElution plate)*

1.	µElutionplate erst mit 0,2ml Methanol und dann mit 0,2ml Reinstwasser equilibrieren
2.	<b>200 µl</b> Kalibrator ( <b>CAL</b> ), Kontrollen ( <b>CTRL1</b> , <b>CTRL2</b> ) oder <b>Probe</b> in 1,5-ml-Reaktionsgefäße vorlegen
3.	<b>10 µl</b> internen Standard ( <b>INT STD</b> ) zugeben und mischen
4.	<b>200 µl</b> Fällungsreagenz ( <b>PREC</b> ) (eiskalt) zugeben
5.	<b>1 min</b> vortexen
6.	<b>10 min</b> bei <b>4°C</b> stehen lassen
7.	<b>10 min</b> bei 10 000 rpm und <b>4°C</b> zentrifugieren
8.	<b>200 µl Überstand</b> auf die equilibrierten Kartuschen geben
9.	<b>3 x</b> mit <b>200 µl</b> WASHSOL waschen
10.	mit <b>100 µl</b> ELUSOL eluieren
11.	<b>100 µl aktivierter SOL A</b> zum Eluat zugeben
12.	<b>50 µl</b> in die LC-MS/MS Anlage injizieren

## 9. CHROMATOGRAPHISCHE BEDINGUNGEN

Säulenmaterial: z. B. Acquity BEH C18; 1,7 µm

Säulendimension: 2,1 x 50 mm

Fluss: 0,3 ml/min

Säulentemperatur: 45 °C

Auftragsvolumen: 50 µl

Laufzeit: 5 Minuten

Gradient:

Zeit	% A	% B
0 min	100	0
2 min	0	100
2,6 min	0	100
2,9 min	100	0
4,0 min	100	0

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

## 10. MS/MS-METHODE (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

Kollisionsgasfluss (ml/min): 0,15

## MRM-Übergänge (m/z)

### 25-OH-Vitamin D<sub>3</sub>

401,5 > 383,2	Konusspannung: 22	Kollisionsenergie: 10
401,5 > 159,0	Konusspannung: 22	Kollisionsenergie: 28

### 25-OH-Vitamin D<sub>2</sub>

413,4 > 395,3	Konusspannung: 20	Kollisionsenergie: 10
413,4 > 83,1	Konusspannung: 20	Kollisionsenergie: 25

### Interner Standard (25-OH-Vitamin-D<sub>3</sub>-d6)

407,5 > 389,4	Konusspannung: 22	Kollisionsenergie: 10
407,5 > 159,1	Konusspannung: 22	Kollisionsenergie: 28

## 11. AUSWERTUNG

### Berechnung

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

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

**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

## 12. EINSCHRÄNKUNGEN

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

### 13. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

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

#### Referenzwerte

##### 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)

##### Referenzbereiche für 25-Hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> (ng/ml), Männer und Frauen\*

Alter	n	2,5 %	97,5 %
0 bis < 3 Monate	131	5	42
3 bis < 6 Monate	135	9	60
6 Monate bis < 1 Jahr	147	18	58
1 bis < 3 Jahre	394	15	54
3 bis < 10 Jahre	619	14	46
10 bis < 13 Jahre	286	11	50
13 bis < 15 Jahre	275	10	44
15 bis < 18 Jahre	390	8	45
> 18 Jahre	421	8	56

\*Alle Jahreszeiten

(Soldin OP et al., 2009)

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

#### 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.

### Literaturreferenzen

Folgende Literaturreferenzen zum Vitamin-D-Referenzwert finden Sie im Literaturverzeichnis: Grant et al., Soldin et al., Visser et al., Wicherts et al.

## 14. TESTCHARAKTERISTIKA

### Präzision und Reproduzierbarkeit

#### 25-OH-Vitamin D<sub>3</sub>

##### *Intra-Assay (n = 6)*

Probe	25-OH-Vitamin D <sub>3</sub> [nmol/l]	VK [%]
1	84,4	2,9

##### *Inter-Assay (n = 18)*

Probe	25-OH-Vitamin D <sub>3</sub> [nmol/l]	VK [%]
1	83,4	6,6

#### 25-OH- Vitamin D<sub>2</sub>

##### *Intra-Assay (n = 6)*

Probe	25-OH-Vitamin D <sub>2</sub> [nmol/l]	VK [%]
1	43,9	7,5

##### *Inter-Assay (n = 18)*

Probe	25-OH-Vitamin D <sub>2</sub> [nmol/l]	VK [%]
1	48,2	12,1

## Sensitivität

Nachweisgrenze 25-OH-Vitamin D<sub>3</sub>: 0,64 nmol/l

Nachweisgrenze 25-OH-Vitamin D<sub>2</sub>: 5,4 nmol/l

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

## 15. ENTSORGUNG

Laufmittel (MOPHA A, MOPHA B), Lösung A (SOL A), Präzipitationslösung (PREC), Aktivierungsreagenz (ACTSOL), Waschlösung (WASHSOL) und Elutionslösung (ELUSOL) müssen als halogenfreier Lösungsmittelabfall entsorgt werden.

## 16. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Kalibrator (CAL) und Kontrollen (CTRL1, CTRL2) sind auf Humanplasma aufgebaut. Sie sind auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Reagenzien dieser Testpackung enthalten organische Lösungsmittel. Berührungen mit der Haut oder den Schleimhäuten sind zu vermeiden.

## 17. TECHNISCHE MERKMALE

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



## 18. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Pipettierolumina 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 die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

## 19. LITERATUR

1. Chapuy, M. C. et al. Healthy elderly French women living at home have secondary hyperparathyroidism and high bone turnover in winter. EPIDOS Study Group. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **81**, 1129–33 (1996).
2. Scharla, S. H. Prevalence of subclinical vitamin D deficiency in different European countries. *Osteoporosis international* **8** Suppl 2, S7–12 (1998).
3. Grant, W. B. & Holick, M. F. Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic* **10**, 94–111 (2005).
4. Visser, M., Deeg, D. J. H., Puts, M. T. E., Seidell, J. C. & Lips, P. Low serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D in older persons and the risk of nursing home admission. *The American journal of clinical nutrition* **84**, 616–22; quiz 671–2 (2006).
5. Wicherts, I. S. et al. Vitamin D status predicts physical performance and its decline in older persons. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **92**, 2058–65 (2007).
6. Wielders, J. P. M. & Wijnberg, F. A. Preanalytical stability of 25(OH)-vitamin D<sub>3</sub> in human blood or serum at room temperature: solid as a rock. *Clinical chemistry* **55**, 1584–5 (2009).
7. Soldin, O. P., Sharma, H., Husted, L. & Soldin, S. J. Pediatric reference intervals for aldosterone, 17alpha-hydroxyprogesterone, dehydroepiandrosterone, testosterone-

rone and 25-hydroxy vitamin D3 using tandem mass spectrometry. *Clinical biochemistry* **42**, 823–7 (2009).

**Verwendete Symbole:**



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



*In-Vitro*-Diagnostikum



Zu verwenden mit



Hersteller



Inhalt ausreichend für <n>  
Prüfungen



Chargenbezeichnung



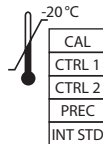
Verwendbar bis

# 25-OH Vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> LC-MS/MS Kit

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

Valid from 2015-02-04

**REF** KM5000



**IVD** **CE**



**Immundiagnostik AG**

# Table of Contents

<b>1. INTENDED USE</b>	<b>19</b>
<b>2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST</b>	<b>19</b>
<b>3. PRINCIPLE OF THE TEST</b>	<b>19</b>
<b>4. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>20</b>
<b>5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>23</b>
<b>6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS</b>	<b>23</b>
<b>7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION</b>	<b>24</b>
<b>8. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>24</b>
<i>Sample preparation 1</i>	24
<i>Sample preparation 2</i>	25
<i>Sample preparation 3</i>	26
<b>9. CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS</b>	<b>27</b>
<b>10. MS/MS METHOD (LISTED AS AN EXAMPLE FOR A WATERS QUATTRO PREMIER XE TANDEM MASS SPECTROMETER)</b>	<b>27</b>
<i>MRM transitions (m/z)</i>	28
<b>11. RESULTS</b>	<b>28</b>
<b>12. LIMITATIONS</b>	<b>28</b>
<b>13. QUALITY CONTROL</b>	<b>29</b>
<i>Reference ranges for 25(OH) vitamin D<sub>3</sub></i>	29
<b>14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>30</b>
<i>Precision and reproducibility</i>	30
<i>Sensitivity</i>	31
<b>15. DISPOSAL</b>	<b>31</b>
<b>16. PRECAUTIONS</b>	<b>31</b>
<b>17. TECHNICAL HINTS</b>	<b>31</b>
<b>18. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>31</b>
<b>19. REFERENCES</b>	<b>32</b>

## 1. INTENDED USE

The 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. 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 D<sub>3</sub> and vitamin D<sub>2</sub>. 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.

In the skin formed or together with vitamin D<sub>2</sub> by food ingested vitamin D<sub>3</sub> 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 medication of vitamin D<sub>2</sub>.

## 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, we developed three sample extraction methods depending on your LC-MS/MS-system (sample preparation 1, 2, 3).

### Sample preparation 1:

Suitable for a LC-MS/MS-system with high sensitivity.

### Sample preparation 2 and 3:

Suitable for all LC-MS/MS-systems. The test procedure is a SPE via 1 ml cartridges for test procedure 2 and for test procedure 3 a SPE via 96-well-plate.

## 4. MATERIAL SUPPLIED

### For sample preparation 1:

Determination of 25-OH vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> by *protein precipitation*

Cat. No	Content	Kit Components	Quantity
KM5000LA	MOPHA A	Mobile Phase A	1000 ml
KM5000LB	MOPHA B	Mobile Phase B	1000 ml
KM5000KA	CAL	Calibrator (lyoph. 1,2 ml; concentration is given on the label)	5 vials
KM5000KO	CTRL1 CTRL2	Control 1 and 2 (lyoph. 0,6 ml; for concentration see product specification)	2 x 5 vials each
KM5000RE	RECSOL	Reconstitution solution	10 ml
KM5000AC	ACTSOL	Activation reagent	2,5 ml
KM5000FR	PREC	Precipitation reagent (-20 °C)	45 ml
KM5000SO	SOL A	Solution A	2 x 50 ml
KM5000IS	INT STD	Internal Standard	1,1 ml

For the preparation of the 25-OH vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> application, tuning is necessary to find the ideal LC-MS/MS settings. The tuning solution (KM5000TU, 25-OH vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> and INT STD as pure substances), the column (KM5000RP) and all other individual components can be ordered separately. Please ask for our single component price list.

**For sample preparation 2:**

Determination of 25-OH vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> by purification via cartridges (Waters Oasis HLB 30 mg, 1cc)

Cat. No	Content	Kit Components	Quantity
KM5000LA	MOPHA A	Mobile Phase A	1000 ml
KM5000LB	MOPHA B	Mobile Phase B	1000 ml
KM5000KA	CAL	Calibrator (lyoph. 1,2 ml; concentration is given on the label)	5 vials
KM5000KO	CTRL1 CTRL2	Control 1 und 2 (lyoph. 0,6 ml; for concentration see product specification)	2x 5 vials each
KM5000RE	RECSOL	Reconstitution solution	10 ml
KM5000AC	ACTSOL	Activation reagent	2,5 ml
KM5000FR2	PREC	Precipitation reagent (-20 °C)	55 ml
KM5000SO2	SOL A	Solution A	25 ml
KM5000WL2	WASHSOL	Washing solution	160 ml
KM5000EL2	ELUSOL	Elution solution (contains acetonitril)	210 ml
KM5000IS	INT STD	Internal Standard	1,1 ml

For the preparation of the 25-OH vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> application, tuning is necessary to find the ideal LC-MS/MS settings. The tuning solution (KM5000TU, 25-OH vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> and INT STD as pure substances), the column (KM5000RP), Oasis® cartridges HLB 30 mg, 1cc (KM5000CK) and all other individual components can be ordered separately. Please ask for our single component price list.

**For sample preparation 3:**

Determination of 25-OH vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> by *purification via 96-well plate (Oasis HLB  $\mu$ Elution-plate)*

**Attention:** number of determinations is limited to 96.

Cat. No	Content	Kit Components	Quantity
KM5000LA	MOPHA A	Mobile Phase A	1000 ml
KM5000LB	MOPHA B	Mobile Phase B	1000 ml
KM5000KA	CAL	Calibrator (lyoph. 1,2 ml; concentration is given on the label)	5 vials
KM5000KO	CTRL1 CTRL2	Control 1 und 2 (lyoph. 0,6 ml; for concentration see product specification)	2x 5 vials each
KM5000RE	RECSOL	Reconstitution solution	10 ml
KM5000AC	ACTSOL	Activation reagent	2,5 ml
KM5000FR3	PREC	Precipitation reagent (-20 °C)	20 ml
KM5000SO3	SOL A	Solution A	10 ml
KM5000WL3	WASHSOL	Washing Solution	20 ml
KM5000EL3	ELUSOL	Elution solution (contains acetonitril)	10 ml
KM5000IS	INT STD	Internal Standard	1,1 ml

For the preparation of the 25-OH vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> application, tuning is necessary to find the ideal LC-MS/MS settings. The tuning solution (KM5000TU, 25-OH vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> and INT STD as pure substances), the column (KM5000RP), Oasis® 96-well- $\mu$ Elution plate HLB (KM5000PL) and all other individual components can be ordered separately. Please ask for our single component price list.



## 5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Centrifuge (4 °C)
- Vortex mixer
- 1.5 ml reaction tubes (Eppendorf)
- Various pipettes
- LC-MS/MS equipment
- Glass tubes, LC-MS/MS suitable
- 500 ml graduated cylinder, LC-MS/MS suitable
- UPLC column, e. g. Acquity BEH C18, 1.7 µm

### For sample preparation 2 you also need:

- Methanol p. a.
- Ultra pure water\*
- Oasis HLB cartridges 30 µm, 1cc (KM5000CK)
- Sample evaporation unit

### For sample preparation 3 you also need:

- Methanol p. a.
- Ultra pure water\*
- Oasis HLB 96-well µElution plate (KM5000PL)
- Sample evaporation unit for µElution plate

\* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

## 6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

Internal Standard (**INT STD**) and precipitation reagent (**PREC**) are stable at **-20 °C** until the expiry date stated on the label.

### Mobile phase and solution A

Before use, a 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

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.

## Calibrators and controls

- The **lyophilized calibrator** (CAL), plasma with a specific concentration of 25-OH vitamin D<sub>3</sub> and 25-OH vitamin D<sub>2</sub>, must be stored at **-20 °C** until use. The content of 25-OH vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> changes slightly from lot to lot, the exact concentration is stated on the label. Before use, the calibrator has to be **reconstituted in 1.2 ml reconstitution solution** (RECSOL). Reconstituted calibrator **cannot be stored**.
- The **lyophilized controls** (CTRL1, CTRL2) must be stored at **-20 °C** until use. Before use, they have to be **reconstituted** in each **0.6 ml of RECSOL**. Reconstituted controls **cannot be stored**.

All other test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2–8 °C**.

## 7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum and plasma could 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.

## 8. ASSAY PROCEDURE

### Sample preparation 1

Determination of 25-OH vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> by *protein precipitation*.

1.	Pipet <b>200 µl</b> of calibrator ( <b>CAL</b> ), controls ( <b>CTRL1, CTRL2</b> ) or sample in 1.5 ml reaction tubes
2.	Add <b>10 µl</b> of internal standard ( <b>INT STD</b> ) and mix
3.	Add <b>400 µl</b> of precipitation reagent ( <b>PREC</b> ) (ice-cold)
4.	Vortex for <b>1 min</b>
5.	Incubate <b>10 min</b> at <b>4 °C</b>
6.	Centrifuge for <b>10 min</b> at 10 000 rpm at <b>4 °C</b>
7.	Dilute supernatant <b>1:10</b> with <b>activated solution A</b> (SOL A) (e. g. 100 µl supernatant + 900 µl SOL A)
8.	Inject <b>50 µl</b> into the LC-MS/MS system

### Sample preparation 2

Determination of 25-OH vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> by purification via cartridges (Waters Oasis HLB 30 mg, 1cc).

1.	Equilibrate cartridges with 1 ml methanol and 1 ml ultra pure water, respectively
2.	Pipet <b>500 µl</b> of calibrator ( <b>CAL</b> ), controls ( <b>CTRL1</b> , <b>CTRL2</b> ) or <b>sample</b> in 1.5 ml reaction tubes
3.	Add <b>10 µl</b> of internal standard ( <b>INT STD</b> ) and mix
4.	Add <b>500 µl</b> of precipitation reagent ( <b>PREC</b> ) (ice-cold)
5.	Vortex for <b>1 min</b>
6.	Incubate <b>10 min</b> at <b>4 °C</b>
7.	Centrifuge for <b>10 min</b> at 10 000 rpm at <b>4 °C</b>
8.	Pipet <b>500 µl</b> of <b>supernatant</b> in cartridges
9.	Wash <b>3 x</b> with <b>500 µl</b> washing solution ( <b>WASHSOL</b> )
10.	Elute <b>2 x</b> with <b>1 ml</b> elution solution ( <b>ELUSOL</b> )
11.	Evaporate eluent
12.	Pipet <b>200 µl</b> of <b>activated solution A</b> (SOL A) and vortex for 1 min
13.	Inject <b>50 µl</b> into the LC-MS/MS system

### Sample preparation 3

Determination of 25-OH vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> by *purification via 96-well-plate (Oasis HLB μElution plate)*

1.	Equilibrate μElution plate with 0.2 ml methanol and 0.2 ml ultra pure water, respectively 0.2 ml water, respectively
2.	Pipet <b>200 μl</b> of calibrator ( <b>CAL</b> ), controls ( <b>CTRL1, CTRL2</b> ) or <b>sample</b> in 1.5 ml reaction tubes
3.	Add <b>10 μl</b> of internal standard ( <b>INT STD</b> ) and mix
4.	Add <b>200 μl</b> of precipitation reagent ( <b>PREC</b> ) (ice-cold)
5.	Vortex for <b>1 min</b>
6.	Incubate <b>10 min</b> at <b>4 °C</b>
7.	Centrifuge for <b>10 min</b> at 10 000 rpm at <b>4 °C</b>
8.	Pipet <b>200 μl</b> of <b>supernatant</b> in μElution wells
9.	Wash <b>3 x</b> with <b>200 μl</b> washing solution ( <b>WASHSOL</b> )
10.	Elute with 100 μl elution solution ( <b>ELUSOL</b> )
11.	Add <b>100 μl</b> of <b>activated solution A</b> (SOL A) to the eluent
12.	Inject <b>50 μl</b> into the LC-MS/MS system

## 9. CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS

Column material: e.g. Acquity BEH C18; 1.7 µm

Column dimension: 2.1 x 50 mm

Flow: 0.3 ml/min

Column temperature: 45 °C

Inject volume: 50 µl

Run time: 5 min

Gradient:

Time	% A	% B
0 min	100	0
2 min	0	100
2,6 min	0	100
2,9 min	100	0
4,0 min	100	0

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

## 10. MS/MS METHOD (LISTED AS AN EXAMPLE FOR A WATERS QUATTRO PREMIER XE TANDEM MASS SPECTROMETER)

Mode: MRM

Polarity: ESI+

Capillary (kV): 3

Cone (V): var.

Extracor (V): 4

RF Lens (V): 0

Source temperature (°C): 130

Desolvation Temperatur (°C): 450

Cone Gas Flow (l/h): 50

Desolvation Gas Flow (l/h): 950

Collision Gas Flow (ml/min): 0,15

*MRM transitions (m/z)***25-OH vitamin D<sub>3</sub>**

401.5 > 383.2	Cone voltage: 22	Collision energy: 10
401.5 > 159.0	Cone voltage: 22	Collision energy: 28

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

413.4 > 395.3	Cone voltage: 20	Collision energy: 10
413.4 > 83.1	Cone voltage: 20	Collision energy: 25

**Internal standard (25-OH-vitamin-D<sub>3</sub>-d6)**

407.5 > 389.4	Cone voltage: 22	Collision energy: 10
407.5 > 159.1	Cone voltage: 22	Collision energy: 28

**11. RESULTS****Calculation**

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

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

**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

**12. LIMITATIONS**

This test cannot be used with whole blood samples.

### 13. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analysed 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.

#### *Reference ranges for 25(OH) vitamin D<sub>3</sub>*

##### **Information from ASBMR 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)

#### **Reference intervals for 25(OH)-vitamin D<sub>3</sub> (ng/ml), males and females\***

Age	n	2.5%	97.5%
0 to < 3 months	131	5	42
3 to < 6 months	135	9	60
6 months to < 1 year	147	18	58
1 to < 3 years	394	15	54
3 to < 10 years	619	14	46
10 to < 13 years	286	11	50
13 to < 15 years	275	10	44
15 to < 18 years	390	8	45
> 18 years	421	8	56

\*All seasons

(Soldin et al., 2009)

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

#### **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, VDBP) and serve only as orientation.

### Literature references

The following literature references for the vitamin D reference values can be found in the references on page 28: Grant et al., Soldin et al., Visser et al., Wicherts et al.

## 14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Precision and reproducibility*

#### 25-OH vitamin D<sub>3</sub>

##### *Intra-Assay (n = 6)*

Sample	25-OH vitamin D <sub>3</sub> [nmol/l]	CV [%]
1	84.4	2.9

##### *Inter-Assay (n = 18)*

Sample	25-OH vitamin D <sub>3</sub> [nmol/l]	CV [%]
1	83.4	6.6

#### 25-OH vitamin D<sub>2</sub>

##### *Intra-Assay (n = 6)*

Sample	25-OH vitamin D <sub>2</sub> [nmol/l]	CV [%]
1	43.9	7.5

##### *Inter-Assay (n = 18)*

Sample	25-OH vitamin D <sub>2</sub> [nmol/l]	CV [%]
1	48.2	12.1



### *Sensitivity*

Detection limit of 25-OH vitamin D<sub>3</sub>: 0,64 nmol/l

Detection limit of 25-OH vitamin D<sub>2</sub>: 5,4 nmol/l

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

## **15. DISPOSAL**

The mobile phases (MOPHA A, MOPHA B), solution A (SOL A), precipitation reagent (PREC), activation reagent (ACTSOL), washing solution (WASHSOL) and elution reagent (ELUSOL) must be disposed as non-halogenated solvent. Please refer to the appropriate national guidelines.

## **16. PRECAUTIONS**

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Control samples should be analyzed with each run.
- 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 test components contain organic solvents. Contact with skin or mucous membranes must be avoided.

## **17. TECHNICAL HINTS**

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

## **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 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 incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

## 19. REFERENCES

1. Chapuy, M. C. et al. Healthy elderly French women living at home have secondary hyperparathyroidism and high bone turnover in winter. EPIDOS Study Group. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **81**, 1129–33 (1996).
2. Scharla, S. H. Prevalence of subclinical vitamin D deficiency in different European countries. *Osteoporosis international* **8** Suppl 2, S7–12 (1998).
3. Grant, W. B. & Holick, M. F. Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic* **10**, 94–111 (2005).
4. Visser, M., Deeg, D. J. H., Puts, M. T. E., Seidell, J. C. & Lips, P. Low serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D in older persons and the risk of nursing home admission. *The American journal of clinical nutrition* **84**, 616–22; quiz 671–2 (2006).
5. Wicherts, I. S. et al. Vitamin D status predicts physical performance and its decline in older persons. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **92**, 2058–65 (2007).
6. Wielders, J. P. M. & Wijnberg, F. A. Preanalytical stability of 25(OH)-vitamin D3 in human blood or serum at room temperature: solid as a rock. *Clinical chemistry* **55**, 1584–5 (2009).
7. Soldin, O. P., Sharma, H., Husted, L. & Soldin, S. J. Pediatric reference intervals for aldosterone, 17alpha-hydroxyprogesterone, dehydroepiandrosterone, testosterone and 25-hydroxy vitamin D3 using tandem mass spectrometry. *Clinical biochemistry* **42**, 823–7 (2009)

**Used symbols:**

Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



To be used with



Manufacturer



Contains sufficient for &lt;n&gt; tests



Lot number



Use by