

Arbeitsanleitung / Manual

**Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal /
For professional use only**

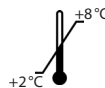
IDK[®] Vitamin B₁ & B₆ LC-MS/MS Kit

***Zur in-vitro-Bestimmung von Vitamin B₁ & B₆
in Vollblut***

***For the in vitro determination of vitamin B₁ & B₆
in whole blood***

Gültig ab / Valid from 2023-12-12

REF **KM5100**



IVD



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Sicherheitshinweise

Der Assay ist ausschließlich nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen. Wichtige Sicherheitshinweise zu diesem Produkt sind dem Kapitel 11 zu entnehmen.

Inhalt

1. ZWECKBESTIMMUNG	2
2. EINLEITUNG	2
3. MITGELIEFERTE MATERIALIEN	3
4. BENÖTIGTE MATERIALIEN (IM KIT NICHT ENTHALTEN)	4
5. VORBEREITUNG, LAGERUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN	4
<i>Kalibratoren und Kontrollen</i>	5
<i>Interner Standard</i>	5
<i>Mobile Phase A und B</i>	6
<i>Autosampler Waschlösung</i>	6
<i>Fällungsreagenz</i>	6
6. HALTBARKEIT, STABILITÄT UND VORBEREITUNG DER PROBE	7
7. LC-MS/MS METHODE	7
8. MUSTERCHROMATOGRAMME	8
9. QUALITÄTSKONTROLLE	9
<i>Referenzbereich</i>	9
10. TESTCHARAKTERISTIKA	9
<i>Messbereich mit Quantifizierungsgrenze (LLOQ)</i>	9
<i>Wiederholbarkeit</i>	9
11. VORSICHTSMASSNAHMEN	10
12. ENTSORGUNG	10
13. TECHNISCHE MERKMALE	10
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11
15. LITERATUR	11
16. SYMBOLE	12

1. ZWECKBESTIMMUNG

Der Verwendungszweck dieses Kits ist die Bewertung von Vitaminprofilen durch die Bestimmung des Gehalts an Vitamin B₁ und B₆ in Vollblut mittels automatisierter quantitativer LC-MS/MS-Assay-Technologie. Dieses Kit ist nur für den professionellen Gebrauch im Labor bestimmt.

2. EINLEITUNG

Wasserlösliche B-Vitamine sind wichtige Cofaktoren im Zellstoffwechsel. Zwei wasserlösliche Vitamine mit klinischer Bedeutung sind die Vitamine B₁ und B₆.

Thiaminpyrophosphat (TPP) ist die biologisch aktive Form von Vitamin B₁ und wird für verschiedene Stoffwechselfunktionen benötigt. TPP wird durch Phosphorylierung von Thiamin gebildet. Längerer Mangel kann zu Beriberi einer schwächenden neurologischen Erkrankung führen.¹

Vitamin B₆ ist eine Vitamingruppe aus Pyridoxin, Pyridoxal und Pyridoxamin sowie deren phosphorylierten Formen, die in die biologisch aktive Form Pyridoxal-5-phosphat (PLP) umgewandelt werden. PLP (hier als Vitamin B₆ bezeichnet) ist ein Coenzym für eine Reihe von Transaminationsreaktionen. PLP spielt eine entscheidende Rolle bei chronischen Krankheiten und entzündungsfördernden Reaktionen.² Darüber hinaus wurden sowohl Vitamin B₁ als auch B₆ mit einer erhöhten Überlebensrate bei älteren Menschen in Verbindung gebracht.³

Ein Thiaminmangel kann sich im Herz-Kreislauf-System und im Nervensystem bemerkbar machen. Es gibt zwei Formen: den trockenen Beriberi mit sensomotorischer Neuropathie und Wernicke-Korsakoff-Syndrom und den feuchten Beriberi mit Ödemen und kongestiver Herzinsuffizienz, aber wenig ZNS-Manifestationen. Das klinische Bild der Wernicke-Enzephalopathie mit oder ohne Korsakoff-Syndrom tritt häufig bei Alkoholikern auf, wobei die okulomotorische und zerebelläre Symptomatik vorherrscht, obwohl sie auch bei anderen Erkrankungen wie Hyperemesis, Dialysen und nach Magen-Darm-Operationen auftreten kann.

Ein ernährungsbedingter Pyridoxinmangel ist als seltene Ursache für schwere und sogar tödliche Krämpfe bei Neugeborenen und Säuglingen bekannt. Die Pyridoxin-Abhängigkeit entwickelt sich während des fötalen Lebens als genetische Störung und verursacht sowohl intrauterine als auch postnatale Krampfanfälle.

Neurologische Störungen, die sowohl einen Pyridoxinmangel als auch eine Pyridoxintoxizität widerspiegeln, sind bekannt. Sowohl eine Überdosierung als auch ein Mangel können eine periphere Neuropathie verursachen. Pyridoxinmangel führt zu einer Schädigung der motorischen und sensorischen Axone, während eine Überdosis Pyridoxin eine rein sensorische Neuropathie oder eine Neuronopathie mit sensorischer Ataxie verursacht.

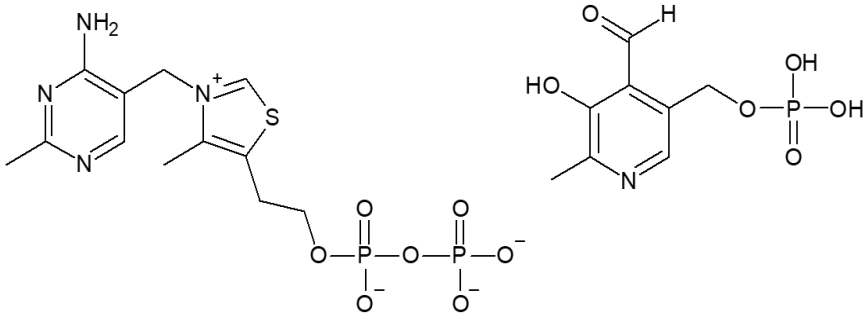


Abb. 1: Thiaminpyrophosphat (Vitamin B₁, links) und Pyridoxal-5'-Phosphat (Vitamin B₆, rechts)

3. MITGELIEFERTE MATERIALIEN

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KM5100	AUTOWASH	Autosampler Waschlösung	1 x 1 000 ml
	PREC	Fällungsreagenz	3 x 46 ml
	CAL1-6	Kalibratoren 1-6; lyophilisiert (Konzentration siehe Produktspezifikation)	2 Fläschchen (à 250 µl) pro Konzentration
	CTRL1-3	Kontrollen 1-3; lyophilisiert (Konzentration siehe Produktspezifikation)	3 Fläschchen (à 250 µl) pro Konzentration
	INTSTD	Interner Standard; lyophilisiert	3 x 6 ml
	MOPHAA	Laufmittel A	1 x 500 ml
	MOPHAB	Laufmittel B	1 x 250 ml

Bitte verwenden Sie für Nachbestellungen von Einzelkomponenten als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung ohne Leerzeichen.

4. BENÖTIGTE MATERIALIEN (IM KIT NICHT ENTHALTEN)

Folgendes Zubehör wird für die IDK® Vitamin B₁ & B₆ LC-MS/MS Applikation benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10–1 000 µl
- Zentrifuge, 10 000 g (je nach Testdurchführung für Reaktionsgefäße oder 96-Well-Platten)
- Vortex-Mixer
- Standard-Labor-Einmalreaktionsgefäße aus Kunststoff (z.B. 1,5 ml) und Schüttler (bei Testdurchführung in Reaktionsgefäßen)
- 2 ml 96-Well-Platte und Schüttler (bei Testdurchführung in 96-Well-Platte)
- LC-MS/MS-Anlage und passende LC-MS Probenvials / 96-Well-Platte für den Autosampler
- Reinstwasser*

* 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).

Folgendes Zubehör kann separat für die IDK® Vitamin B₁ & B₆ LC-MS/MS Applikation bei der Immundiagnostik AG bestellt werden:

- HPLC Säule (KM5100SP)
- alle Einzelkomponenten

Bitte kontaktieren Sie uns für Ihre individuelle Lösung und fordern Sie unsere Einzelkomponenten-Preisliste an.

5. VORBEREITUNG, LAGERUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN

Hinweis: Bitte nehmen Sie die Kit-Komponenten sofort nach Erhalt aus der Transportverpackung und beachten Sie die auf den Produktetiketten aufgedruckten Hinweise zu den Lagerbedingungen.

Alle Komponenten sollten lichtgeschützt, trocken und bei der angegebenen Lagertemperatur gelagert werden. Die so gelagerten Testreagenzien sind bis zum angegebenen Verfallsdatum verwendbar. Die angegebenen Stabilitäten gelten nur, wenn keine bakterielle Kontamination vorliegt.

Kalibratoren und Kontrollen

Handhabung:

Entfernen Sie die Kappe und den Gummistopfen stets vorsichtig (um Verluste des Inhalts zu vermeiden).

Rekonstituieren Sie die Kalibratoren und Kontrollen wie folgt:

- Rekonstituieren Sie jeden CAL und jede CTRL mit genau 250 µl destilliertem oder deionisiertem Wasser und inkubieren Sie diese 15 min bei Raumtemperatur.
- Die Komponente anschließend gründlich mischen, um sicherzustellen, dass sich das gesamte Trockenmaterial aufgelöst hat; dabei nicht zu stark schütteln, um Schaumbildung zu vermeiden.
- Die angesetzte Komponente während des Testverfahrens wie eine Patientenprobe handhaben.

Stabilität und Lagerung:

Vor der Rekonstitution:	2–8 °C	Bis zu dem auf dem Produktetikett angegebenen Verfallsdatum
nach der Rekonstitution:	2–8 °C	48 h
nach der Rekonstitution:	-20 °C	2 Wochen

Interner Standard

Handhabung:

Entfernen Sie die Kappe und den Gummistopfen stets vorsichtig (um Verluste des Inhalts zu vermeiden).

Rekonstituieren Sie den internen Standard wie folgt:

- Rekonstituieren Sie den INTSTD mit genau 6 ml destilliertem oder deionisiertem Wasser und inkubieren Sie diese 15 min bei Raumtemperatur.
- Die Komponente anschließend gründlich mischen, um sicherzustellen, dass sich das gesamte Trockenmaterial aufgelöst hat; dabei nicht zu stark schütteln, um Schaumbildung zu vermeiden.

Stabilität und Lagerung:

Vor der Rekonstitution:	2–8 °C	Bis zu dem auf dem Produktetikett angegebenen Verfallsdatum.
nach der Rekonstitution:	2–8 °C	48 h
nach der Rekonstitution:	-20 °C	2 Wochen

*Mobile Phase A und B***Handhabung:**

Die Komponente ist flüssig und gebrauchsfertig.

Stabilität und Lagerung:

Lagerung bei 2–8 °C	Die Komponente kann verschlossen bis zu 6 Wochen nach dem ersten Öffnen oder bis zu 2 Wochen auf der UHPLC verwendet werden.
Lagerung bei RT	Vor dem ersten Öffnen kann die Komponente für 12 Wochen bei Raumtemperatur gelagert werden.

*Autosampler Waschlösung***Handhabung:**

Das Produkt ist flüssig und gebrauchsfertig.

Stabilität und Lagerung:

Lagerung bei 2–8 °C	Die Komponente kann verschlossen bis zu 6 Wochen nach dem ersten Öffnen oder bis zu 2 Wochen auf der UHPLC verwendet werden.
---------------------	--

*Fällungsreagenz***Handhabung:**

Das Produkt ist flüssig und gebrauchsfertig.

Stabilität und Lagerung:

Lagerung bei 2–8 °C	Die Komponente kann nach dem ersten Öffnen bis zu 3 Wochen verwendet werden.
---------------------	--

6. HALTBARKEIT, STABILITÄT UND VORBEREITUNG DER PROBE

Stabilität und Lagerung:

Als Probe eignet sich Vollblut (EDTA- und Heparinröhrchen).

Wiederholte Auftau- und Einfrierzyklen sind zu vermeiden.

Proben können gelagert werden: 1 Monat bei -20°C

Probenvorbereitung

#	96-Well-Plate	1.5 ml Reaktionsgefäß
1.	50 µl INTSTD in eine Kavität bzw. ein Reaktionsgefäß vorlegen.	
2.	50 µl Probe, CAL oder CTRL zu dem vorgelegten INTSTD dazugeben. Gründlich mischen.	
3.	400 µl PREC hinzugeben.	
4.	Platte verschließen und mind. 30 min schütteln lassen.	Gefäß verschließen und 30 s vortexen.
5.	-	Die Gefäße für mind. 30 min schütteln lassen.
6.	Zentrifugation bei 10000 g für 5 min.	
7.	Die Platte direkt für den Autosampler verwenden oder 200 µl des Probenüberstandes (aus Schritt 6.) in ein passendes Probenvial oder Mikrotiterplatte für den Autosampler überführen.	200 µl des Probenüberstandes (aus Schritt 6.) in ein passendes Probenvial oder Mikrotiterplatte für den Autosampler überführen.
8.	Injektion in das LC-MS/MS System (siehe Application Note).	

7. LC-MS/MS METHODE

Die Parameter zur Einstellung der LC-MS/MS-Methode entnehmen Sie bitte der Application Note oder wenden Sie sich an lcms@immundiagnostik.com.

8. MUSTERCHROMATOGRAMME

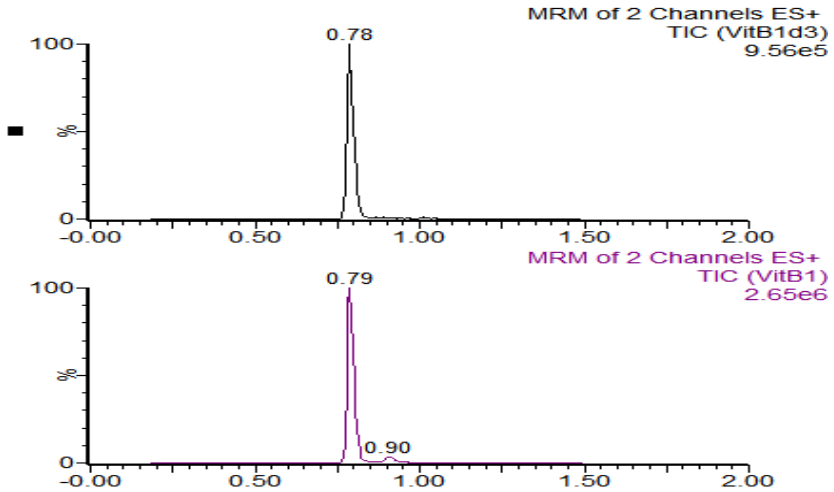


Abb. 2: Chromatogramm (mit einer Waters TQS LC-MS/MS aufgenommen) für den internen Standard (oben) und den Analyten (unten) von Vitamin B₁

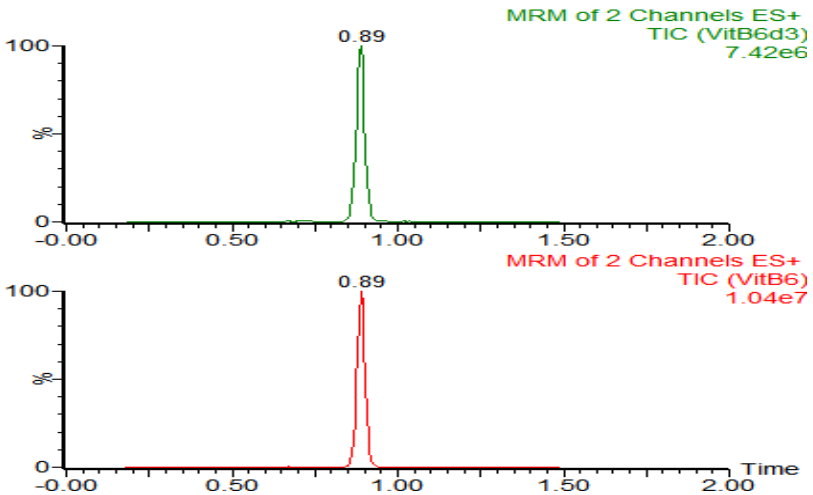


Abb. 3: Chromatogramm (mit einer Waters TQS LC-MS/MS aufgenommen) für den internen Standard (oben) und den Analyten (unten) von Vitamin B₆

9. QUALITÄTSKONTROLLE

Wir empfehlen Kontrollen bei jedem Testansatz mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen werden verwendet, um die Genauigkeit der Methode zu bestätigen. Liegen einer oder mehrere Werte der Qualitätskontrolle außerhalb des angegebenen Bereiches (siehe Produktspezifikation), kann Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Testergebnisse nicht gewährleisten.

Referenzbereich

Vitamin B ₁ :	60–120 nmol/l	(25,5–50,9 ng/ml)	4
Vitamin B ₆ :	35–110 nmol/l	(8,6–27,2 ng/ml)	5

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

10. TESTCHARAKTERISTIKA

Messbereich mit Quantifizierungsgrenze (LLOQ)

Analyt	nmol/l (ng/ml)
Vitamin B ₁	9,4–8 000 (4,0–3 394)
Vitamin B ₆	8,0–3 000 (2,0–741)

Wiederholbarkeit

Vitamin B₁

Level	Konzentration [nmol/l (ng/ml)]	Standardabweichung [nmol/l (ng/ml)]	CV (%)	N
Level I	41,1 (17,4)	1,0 (0,4)	2,4	20
Level II	212,1 (90,0)	4,0 (1,7)	1,9	20
Patientenprobe	147,5 (62,6)	2,9 (1,2)	1,9	20

Vitamin B₆

Level	Konzentration [nmol/l (ng/ml)]	Standardabweichung [nmol/l (ng/ml)]	CV (%)	N
Level I	22,5 (5,6)	0,5 (0,1)	2,4	20
Level II	122,7 (30,3)	2,5 (0,6)	2,1	20
Patientenprobe	90,9 (22,5)	2,0 (0,5)	2,2	20

11. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HBsAg, anti-HIV 1/2 und anti-HCV getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Es sind die auf den Einzelkomponenten angegebenen GHS-Symbole und Spezifikationen der Sicherheitsdatenblätter (auf Anfrage bei Immundiagnostik AG erhältlich) zu beachten. Beim Arbeiten mit diesen Reagenzien sind die gesetzlichen Schutzvorkehrungen einzuhalten.
- Reagenzien dieser Testpackung enthalten organische Lösungsmittel. Berührungen mit der Haut oder den Schleimhäuten sind zu vermeiden.

12. ENTSORGUNG

Autosampler Waschlösung (AUTOWASH), Fällungsreagenz (PREC), Laufmittel A (MOPHAA) und Laufmittel B (MOPHAB) müssen als halogenfreier Lösungsmittelabfall entsorgt werden.

Die Kalibratoren (CAL1–6) und Kontrollen (CTRL1–3) sollten als potentiell infektiöses Material gemäß der örtlichen Vorschriften entsorgt werden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Die Einzelkomponenten des Kits sind maximal für die angegebene Anzahl an Testdurchführungen ausgelegt. Ein bereits verwendeter Anteil der Komponenten darf nicht wiederverwendet werden.



14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- IDK® ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *In-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettierolumina 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.
- Schwerwiegende Vorkommnisse sind der Immundiagnostik AG und den nationalen Aufsichtsbehörden zu melden.
- Sollten eine oder mehrere Komponenten des Testkits beschädigt, unvollständig (siehe Liste der Testbestandteile) oder Präzipitate in den gebrauchsfertigen Lösungen sichtbar sein, kontaktieren Sie bitte Immundiagnostik AG.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

15. LITERATUR

1. Stanley, N. N. "Cardiac Beriberi: Two Modes of Presentation." *BMJ*: 567-569.
2. Huang, et al. "Vitamin B6 Supplementation Improves Pro-inflammatory Responses in Patients with Rheumatoid Arthritis." *European Journal of Clinical Nutrition* (2010): 1007-013.
3. Huang, et al. "Prediction of All-cause Mortality by B Group Vitamin Status in the Elderly." *Clinical Nutrition* (2011): 191-98.
4. Hooijkaas, et al. "Handboek medische laboratoriumdiagnostiek" (2013): 820 - 821.
5. Hooijkaas, et al. "Handboek medische laboratoriumdiagnostiek" (2013): 825.

16. SYMBOLE

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Enthält Plasmaderivate oder menschliches Blut		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Nicht wiederverwenden
	Herstellungskennung		Enthält Material tierischen Ursprungs
	medizinische Substanz		Enthält Material humanen Ursprungs

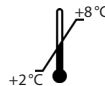
Manual
For professional use only

IDK[®] Vitamin B₁ & B₆ **LC-MS/MS Kit**

*For the in vitro determination of vitamin B₁ & B₆
in whole blood*

Valid from 2023-12-12

REF **KM5100**



IVD



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Safety information

The assay has to be performed exclusively according to the instructions for use enclosed with the kit. Important safety information for this product can be found in chapter 11.

Table of Contents

1. INTENDED USE	16
2. INTRODUCTION	16
3. MATERIAL SUPPLIED	17
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
5. PREPARATION, STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS	18
<i>Calibrators and controls</i>	18
<i>Internal standard</i>	19
<i>Mobile phases A and B</i>	19
<i>Autosampler wash solution</i>	20
<i>Precipitation solution</i>	20
6. STORAGE, STABILITY AND PREPARATION OF SAMPLE	20
7. LC-MS/MS METHOD	21
8. EXAMPLES OF CHROMATOGRAMS	21
9. QUALITY CONTROL	22
<i>Reference range</i>	22
10. TEST CHARACTERISTICS	22
<i>Measuring range with limit of quantification (LLOQ)</i>	22
<i>Repeatability</i>	23
11. PRECAUTIONS	23
12. DISPOSAL	23
13. TECHNICAL HINTS	24
14. GENERAL NOTES ON THE TEST	24
15. REFERENCES	25

1. INTENDED PURPOSE

The intended use of this device is assessment of vitamin profiles by determination of the levels of vitamin B₁ & B₆ in whole blood, performed by automated quantitative LC-MS/MS assay technology. This kit is designed for laboratory professional use.

2. INTRODUCTION

Water-soluble B vitamins are important cofactors in cell metabolism. Two water-soluble vitamins with clinical relevance are vitamins B₁ and B₆.

Thiamine pyrophosphate (TPP) is the biologically active form of vitamin B₁ and is required for various metabolic functions. TPP is formed by phosphorylation of thiamine. Prolonged deficiency can cause Beriberi, a debilitating neurological disease.¹

Vitamin B₆ is a vitamin group of pyridoxine, pyridoxal and pyridoxamine as well as their phosphorylated forms which are converted in the biologically active form pyridoxal 5-phosphate (PLP). PLP (here referred to as vitamin B₆) is a coenzyme for a number of transamination reactions. PLP plays critical roles in chronic disease and pro-inflammatory response.² Additionally, both vitamin B₁ and B₆ have also been linked to increased survival rates in the elderly.³

Thiamine deficiency may give rise to manifestations in the cardiovascular and nervous systems. There are two forms; dry Beriberi, which consists of sensorimotor neuropathy and Wernicke-Korsakoff syndrome, and wet Beriberi, which consists of edema and congestive heart failure, but little CNS manifestations. The clinical picture of Wernicke's encephalopathy, with or without Korsakoff syndrome, is frequently encountered in alcoholics, with predominant oculomotor and cerebellar symptomatology, although it can also be seen in other conditions, such as hyperemesis, dialyses, and post-gastrointestinal surgery.

Pyridoxine deficiency on a nutritional basis has been recognized as a rare cause of severe and even fatal convulsions in neonates and infants. Pyridoxine dependency develops during fetal life as a genetic disorder and causes both intrauterine and postnatal seizures.

Neurologic disorders reflecting both pyridoxine deficiency and pyridoxine toxicity have been recognized. Both overdose and deficiency may cause peripheral neuropathy. Pyridoxine deficiency causes injury of motor and sensory axons, whereas an overdose of pyridoxine causes a pure sensory neuropathy or neuropathy with sensory ataxia.

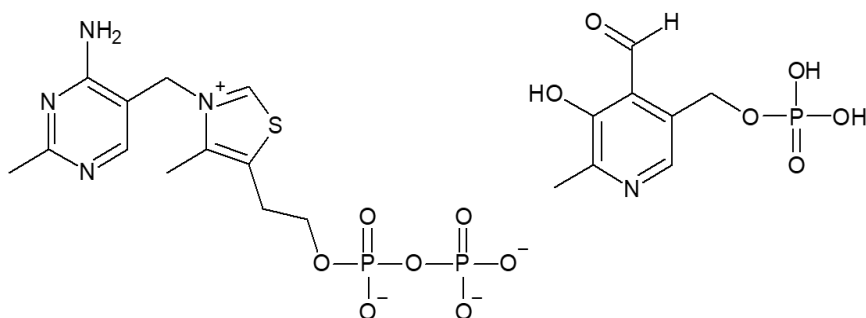


Fig 1: Thiamine pyrophosphate (vitamin B₁, left) and pyridoxal-5'-phosphate (vitamin B₆, right)

3. MATERIALS PROVIDED

Cat. No.	Identifier	Kit components	Quantity
KM5100	AUTOWASH	Autosampler wash solution	1 x 1 000 ml
	PREC	Precipitation solution	3 x 46 ml
	CAL1-6	Calibrators 1-6; lyophilised (see product specification for concentration)	2 vials (à 250 µl) per level
	CTRL1-3	Controls 1-3; lyophilised (see product specification for concentration)	3 vials (à 250 µl) per level
	INTSTD	Internal Standard; lyophilised	3 x 6 ml
	MOPHAA	Mobile phase A	1 x 500 ml
	MOPHAB	Mobile phase B	1 x 250 ml

For reorders of single components, please use the catalogue number followed by the identifier without space as product number.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

The following accessories are required for the IDK® Vitamin B₁ & B₆ LC-MS/MS application (not included in the kit):

- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10–1 000 µl
- Centrifuge, 10 000 g (for reagent tubes or 96-well plate, depending on test procedure)
- Vortex mixer
- Standard laboratory disposable plastic reagent tubes (e.g. 1.5 ml) and shaker for the reagent tubes (for test procedure in reagent tubes)
- 2 ml 96-well plate and shaker for the plate (for test procedure in 96-well plate)
- LC-MS/MS system and suitable LC-MS vials / 96-well plate for the autosampler
- Ultrapure water*

*Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure water (water type 1; ISO 3696/LC-MS grade), 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).

The following accessories for the IDK® Vitamin B₁ & B₆ LC-MS/MS application can be ordered separately at Immundiagnostik AG:

- HPLC column (KM5100SP)
- all single components

Please ask for our single component price list. Please contact us for customized inquiries.

5. PREPARATION, STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS

Note: Please unpack the kit components from the transport packaging immediately upon receipt and follow the instructions for storage conditions printed on the product labels.

All components should be stored protected from light, dry and at their given specified storage temperature. The test reagents stored in this way are usable until the indicated expiry date. The declared stated stabilities are only valid in case of no bacterial contamination.

Calibrators and controls

Handling:

Always remove the cap and rubber plug carefully (in order to avoid loss of content).

Reconstitute the calibrators and controls as follows:

- Reconstitute each calibrator and control with exactly 500 µl distilled or deionised water and incubate for 15 min at room temperature.

- Next, mix the component thoroughly to make sure that all dry material has dissolved; do not shake too vigorously to avoid foam formation.
- Handle the prepared component as a patient sample during the test procedure.

Stability and storage:

Before reconstitution: 2–8°C Until expiry date printed on the product label.
After reconstitution: 2–8°C 48 h
After reconstitution: -20°C 2 weeks

*Internal standard***Handling:**

Always remove the cap and rubber plug carefully (in order to avoid loss of content).

Reconstitute the internal standard as follows:

- Reconstitute each calibrator and control with exactly 6 ml distilled or deionised water and incubate for 15 min at room temperature.
- Next, mix the component thoroughly to make sure that all dry material has dissolved; do not shake too vigorously to avoid foam formation.

Stability and storage:

Before reconstitution: 2–8°C Until expiry date printed on the product label.
After reconstitution: 2–8°C 48 h
After reconstitution: -20°C 1 week

*Mobile phases A and B***Handling:**

The component is liquid and ready for use.

Stability and storage:

Store at 2–8°C After first opening the component can be used for 6 weeks if closed and stored at 2–8°C or 2 weeks on the UHPLC.
Store at RT Before first opening the component can be stored for 12 weeks at room temperature.

Autosampler wash solution

Handling:

The component is liquid and ready for use.

Stability and storage:

Store at 2–8 °C

After first opening the component can be used for 6 weeks if closed and stored at 2–8 °C or 2 weeks on the UHPLC.

Precipitation solution

Handling:

The component is liquid and ready for use.

Stability and storage:

Store at 2–8 °C

After first opening the component can be used for 3 weeks if closed and stored at 2–8 °C.

6. STORAGE, STABILITY AND PREPARATION OF SAMPLE

Storage and Stability

Use whole blood (EDTA- and Heparin-tubes).

Avoid freeze-thaw cycles.

Samples can be stored: 1 month (-20 °C)

Sample preparation

#	96-well plate	1.5 ml reaction tube
1.	Add 50 µl INTSTD in one well respectively reaction tube.	
2.	Add 50 µl sample, CAL or CTRL to the INTSTD presented. Mix thoroughly.	
3.	Add 400 µl PREC.	
4.	Seal plate and shake for at least 30 min.	Seal tubes and vortex for 30 s.
5.	-	Shake the tubes for at least 30 min.

6.	Centrifuge for 5 min at 10 000 <i>g</i> .	
7.	Use directly the plate for the autosampler or transfer 200 µl of the supernatant (from step 6.) in a suitable microtiter plate for the autosampler.	Transfer 200 µl of the supernatant (from step 6.) in a suitable vial or microtiter plate for the autosampler.
8.	Injection into the LC-MS system (see application note).	

7. LC-MS/MS METHOD

Please refer to the application note or contact lcms@immundiagnostik.com for the LC-MS/MS method parameters.

8. EXAMPLES OF CHROMATOGRAMS

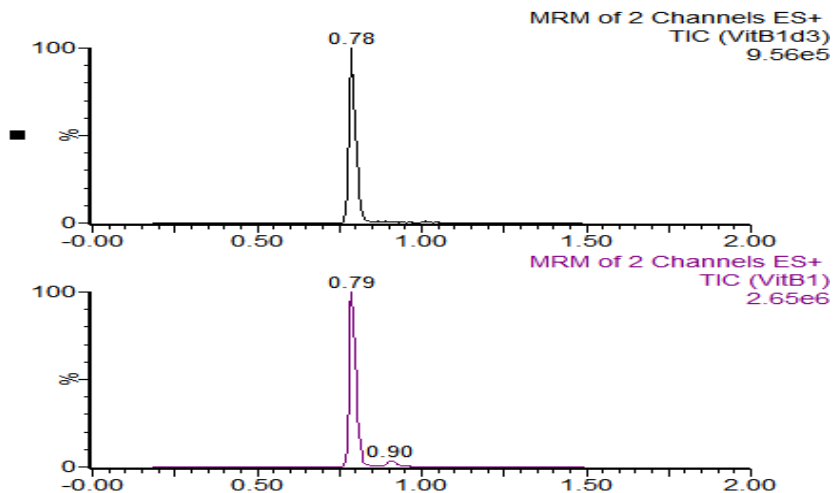


Fig. 2: Chromatogram (recorded with Waters TQS LC-MS/MS) for the internal standard (top) and analyte (bottom) of vitamin B₁

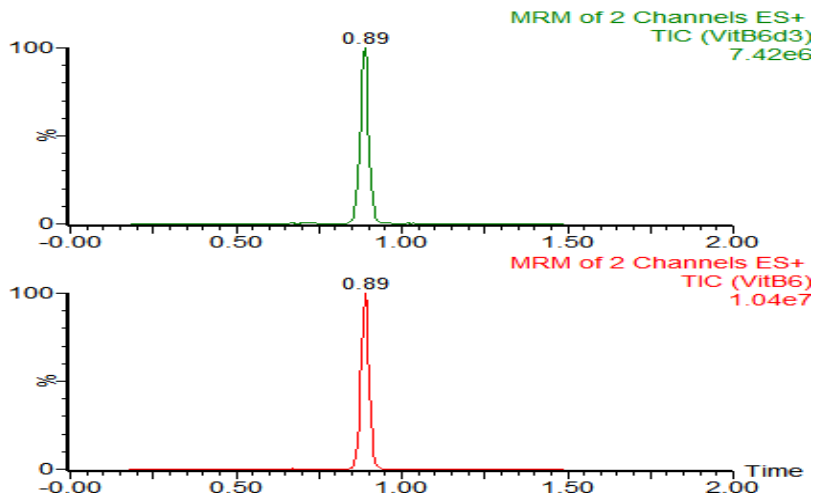


Fig. 3: Chromatogram (recorded with Waters TQS LC-MS/MS) for the internal standard (top) and analyte (bottom) of vitamin B₆

9. QUALITY CONTROL

Control samples should be analysed with each run. The results of the control samples are used to confirm the accuracy of the method. The test results may not be valid, if one or more values of the quality control sample are outside the acceptable range (see product specification).

Reference range

VitaVitamin B₁: 60–120 nmol/l (25.5–50.9 ng/ml) ⁴

Vitamin B₆: 35–110 nmol/l (8.6–27.2 ng/ml) ⁵

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

10. TEST CHARACTERISTICS

Measuring range with limit of quantification (LLOQ)

Analyte	nmol/l (ng/ml)
Vitamin B ₁	9.4–8 000 (4.0–3 394)
Vitamin B ₆	8.0–3 000 (2.0–741)

Repeatability

Vitamin B₁

Level	Measured value [nmol/l (ng/ml)]	Standard Deviation [nmol/l (ng/ml)]	CV (%)	N
Level I	41.1 (17.4)	1.0 (0.4)	2.4	20
Level II	212.1 (90.0)	4.0 (1.7)	1.9	20
Patient sample	147.5 (62.6)	2.9 (1.2)	1.9	20

Vitamin B₆

Level	Measured value [nmol/l (ng/ml)]	Standard Deviation [nmol/l (ng/ml)]	CV (%)	N
Level I	22.5 (5.6)	0.5 (0.1)	2.4	20
Level II	122.7 (30.3)	2.5 (0.6)	2.1	20
Patient sample	90.9 (22.5)	2.0 (0.5)	2.2	20

11. PRECAUTIONS

- Human material used in the kit components was tested and found to be negative for HBsAg, anti-HIV 1/2 and anti-HCV. Still, all kit components should be treated as potentially infectious.
- The GHS symbols indicated on the individual components and specifications of the material safety data sheets (available on request from Immundiagnostik AG) must be noted. When working with these reagents, the legal protective precautions must be adhered to.
- The test components contain organic solvents. Avoid contact with skin or mucous membranes.

12. DISPOSAL

Autosampler wash solution (AUTOWASH), precipitation solution (PREC), mobile phase A (MOPHAA) and mobile phase B (MOPHAB) must be disposed as nonhalogenated solvents.

Calibrators (CAL1–6) and controls (CTRL1–3) should be disposed as potentially infectious material in accordance with local regulations.

13. 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.
- Plugs and caps of different reagents should not be swapped.
- The individual components of the kit are designed for a maximum of the specified number of test runs. Any part of the components that has already been used must not be reused.

















14. GENERAL NOTES ON THE TEST

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- *IDK*® is a trademark of Immundiagnostik AG.
- 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.
- Serious incidents are to be reported to Immundiagnostik AG and the national regulatory authorities.
- Please contact Immundiagnostik AG if one or more components of the kit are damaged, missing (see material supplied) or precipitates are visible in the ready-to-use solutions.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be lodged within 14 days after receipt of the product. The product shall be send to Immundiagnostik AG together with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Stanley, N. N. "Cardiac Beriberi: Two Modes of Presentation." *BMJ*: 567-569.
2. Huang, et al. "Vitamin B6 Supplementation Improves Pro-inflammatory Responses in Patients with Rheumatoid Arthritis." *European Journal of Clinical Nutrition* (2010): 1007-013.
3. Huang, et al. "Prediction of All-cause Mortality by B Group Vitamin Status in the Elderly." *Clinical Nutrition* (2011): 191-98.
4. Hooijkaas, et al. "Handboek medische laboratoriumdiagnostiek" (2013): 820 - 821.
5. Hooijkaas, et al. "Handboek medische laboratoriumdiagnostiek" (2013): 825.

16. SYMBOL EXPLANATION

	Temperature limitation		Catalogue number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Contains plasma derivatives or human blood		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		Do not re-use
	Unique Device Identification		Contains material of animal origin
	Medicinal substance		Contains material of human origin

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

