

Vitamin B₁ HPLC Kit

*Zur Bestimmung von Vitamin B₁
(Thiaminpyrophosphat) in EDTA-Vollblut*

*For the determination of Vitamin B₁
(thiamin pyrophosphate) in EDTA-whole-blood*

Gültig ab / Valid from 2022-09-12

REF KC2201

Σ
100

+2°C ±8°C

-20°C
CAL
CTRL 1
CTRL 2

IVD **CE**



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

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. TESTPRINZIP	3
4. INHALT DER TESTPACKUNG	4
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
6. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	5
7. PROBENVORBEREITUNG	5
8. TESTDURCHFÜHRUNG	6
<i>Arbeitsschema</i>	6
<i>Chromatographische Bedingungen</i>	6
9. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE	7
10. AUSWERTUNG	7
<i>Berechnung</i>	7
<i>Musterchromatogramm</i>	7
11. EINSCHRÄNKUNGEN	8
12. QUALITÄTSKONTROLLE	8
<i>Normbereich</i>	8
<i>Kontrollen</i>	8
13. TESTCHARAKTERISTIKA	8
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	8
14. ENTSORGUNG	9
15. MASSNAHMEN BEI STÖRUNGEN	9
16. VORSICHTSMASSNAHMEN	10
16. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11
17. LITERATUR	11

1. VERWENDUNGSZWECK

Die HPLC-Applikation ist für die Bestimmung von Vitamin B₁ in EDTA-Vollblut geeignet. Nur zur *in vitro* Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Vitamin B₁ (Thiamin, Aneurin) ist ein wasserlösliches Vitamin, welches aus einem Pyrimidin- und einem Thiazolring besteht, die über eine Methylen-brücke miteinander verbunden sind. Es ist empfindlich gegenüber alkalischen Lösungen, sowie Oxidations- und Reduktionsmitteln.

Vitamin B₁ wird von Pflanzen und Mikroorganismen gebildet. Es kommt frei, proteingebunden, sowie als Mono-, Di- bzw. Triphosphatester vor. Tierische Organismen, wie auch der Mensch, müssen es mit der Nahrung zuführen. Die Aufnahme von Thiamin erfolgt im Darm über aktiven Transport sowie passive Diffusion. Durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung werden die einzelnen Phosphatester ineinander überführt. Die stoffwechselaktive Form stellt das Thiaminpyrophosphat, im Gehirnstoffwechsel das Thiaminriphosphat, dar. Die Ausscheidung erfolgt nach Dephosphorylierung in der Niere als freies Thiamin oder als konjugierte Schwefelsäureester im Urin.

Thiaminpyrophosphat ist als Coenzym ein Bestandteil von Enzymen, die im Kohlenhydrat- und Aminosäurestoffwechsel eine wichtige Rolle spielen. Es ist an der oxidativen Decarboxylierung (z.B. von Pyruvat zu Acetyl Coenzym A) beteiligt. Daneben tritt es als Coenzym von Transketolasen im Pentose-phosphatstoffwechselweg auf. Thiamin als solches wird im Nervensystem für die Nervenerregbarkeit benötigt. Daneben stimuliert es die Fettsäure- und Cholesterinsynthese im Nervengewebe.

Schwerer Vitamin-B₁-Mangel kombiniert mit eiweißarmer Ernährung führt zur Mangelkrankheit Beri-Beri. Sie wurde aus asiatischen Ländern bekannt, wenn die Bevölkerung überwiegend weißen Reis aß. Beri-Beri äußert sich durch Störungen im Nervensystem mit Lähmungserscheinungen, Muskelschwund, Ödemen und Herzfunktionsstörungen. Weitere Thiaminmangelkrankheiten sind die Wernicke-Enzephalopathie, das Korsakow-Syndrom und einige Formen der Landry'schen Paralyse. Daneben leiden viele Alkoholiker unter Thiaminmangel.

Indikationen

- Ermittlung des stoffwechselaktiven Vitamin B₁
- Störungen im Aminosäurestoffwechsel
- Malabsorption in Verbindung mit Alkoholismus
- Verdacht auf Neuritis

3. TESTPRINZIP

Zur Bestimmung des Vitamin B₁ wird im ersten Schritt eine Probenvorbereitung mit angeschlossener Derivatisierung durchgeführt. Zunächst erfolgt ein Fällungsschritt, bei dem höhermolekulare Substanzen abgetrennt werden. Der Überstand wird abgenommen und mit Reaktionspuffer sowie einer Derivatisierungslösung während 10 min bei 60°C inkubiert, wobei das Vitamin B₁ in ein fluoreszierendes Produkt umgesetzt wird. Die Probe wird abgekühlt (2–8°C), zentrifugiert und in die HPLC injiziert.

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

Zusammenfassung

Der hier vorliegende Komplettkit zur Bestimmung des Vitamin B₁ ermöglicht eine einfache, schnelle und präzise quantitative Bestimmung. Der Komplettkit enthält gebrauchsfertig alle Reagenzien und Verbrauchsmaterialien für die Aufbereitung der Proben und die analytische HPLC-Trennung.

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 Immunoassays mit bis zu 6 Kalibratoren pro Testansatz. Eine Automatisierung der Probenaufgabe und der Auswertung ist möglich, so dass auch größere Probenzahlen fast unbeaufsichtigt abgearbeitet werden können. (Bei kurzen Serienlängen ist die Einpunktkalibrierung sehr viel wirtschaftlicher gegenüber der 6-Punkt-Kalibrierung bei Immuno-Assays).

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KC2201	DIL	Verdünnungslösung	1 x 20 ml
	PREC	Fällungsreagenz (Säure)	1 x 5 ml
	MOPHA	Laufmittel, gebrauchsfertig (Wichtig: nicht rezirkulieren)	1 x 1 000 ml
	CAL	Kalibrator; lyophilisiert (Konzentration siehe Spezifikationsdatenblatt)	4 x
	REABUF	Reaktionspuffer	1 x 5 ml
	SOLC	Lösung C	1 x 5,5 ml
	DER	Derivatisierungslösung	1 x 5,5 ml
	CTRL1	Kontrolle1; lyophilisiert	4 x
	CTRL2	Kontrolle2; lyophilisiert	4 x

Die HPLC-Trennsäule (KC2201RP), kann separat bei Immundiagnostik bestellt werden. Um die Lebensdauer Ihrer HPLC-Trennsäule zu verlängern, sollten idealerweise Vorsäulen (KC2201VS) verwendet werden. Diese und auch die Vorsäulenhalter (KC2201VH) können ebenfalls 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

- 1,5-ml-Reaktionsgefäße (z. B. Eppendorf)
- Zentrifuge
- Vortex-Mischer
- diverse Pipetten
- HPLC-Gerät mit Fluoreszenz-Detektor
- beheizbarer Schüttler
- reversed phase C₁₈-Säule

6. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Der **lyophilisierte Kalibrator (CAL)**; EDTA-Vollblut mit definierter Menge Thiaminpyrophosphat) wird in 1 ml **Verdünnungslösung (DIL)** gelöst, aliquotiert und bis zum Gebrauch bei **-20 °C** gelagert. Der Gehalt an Thiaminpyrophosphat ändert sich geringfügig von Charge zu Charge, der genaue Gehalt ist auf dem Etikett angegeben.
- Die **lyophilisierten Kontrollen 1 und 2 (CTRL 1 und CTRL 2)** werden in 250 µl **Verdünnungslösung (DIL)** gelöst.
- Die **Derivatisierungslösung (DER)** wird mit 5,5 ml **Lösung C (SOLC)** resuspendiert. Die gelöste Derivatisierungslösung ist bei 2–8 °C 6 Monate stabil.
- **Alle anderen Testreagenzien** sind gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.
- Die Testreagenzien sind bei 2–8 °C, der **Kalibrator (CAL)** und die **Kontrollen (CTRL 1 und CTRL 2)** bei -20 °C bis zum Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. PROBENVORBEREITUNG

Als Probe eignet sich EDTA-Vollblut aus venösem Nüchternblut.

Da Vitamin B₁ sehr licht- und temperaturempfindlich ist, sollte die Probe vor Licht geschützt und gekühlt werden. Die Haltbarkeit der Probe beträgt bei 2–8 °C im Dunkeln ein Tag. Zur längeren Lagerung sollte die Probe bei -20 °C aufbewahrt werden. Die Probe darf **nicht** mehrfach eingefroren und aufgetaut werden

8. TESTDURCHFÜHRUNG

Arbeitsschema

Pipettieren Sie in 1,5-ml-Reaktionsgefäße (z. B. Eppendorf) 50 µl Patientenprobe, Kalibrator oder Kontrolle 1 oder 2.
150 µl Verdünnungslösung (DIL) und 50 µl Fällungsreagenz (PREC) zugeben, für mindestens 30 s vortexen
10 Minuten bei 2–8 °C inkubieren
Für 10 min bei 10 000 g zentrifugieren
150 µl Überstand mit 50 µl Reaktionspuffer (REABUF) und 50 µl Derivatisierungslösung (DER) versetzen, für mindestens 30 s vortexen
Für 10 min bei 60 °C auf einem Schüttler inkubieren
Bei 2–8 °C abkühlen
Für 5 min bei 10 000 g zentrifugieren
Den Überstand abnehmen (Überstand (Probe) ist 3 Tage bei 2–8 °C, im Dunkeln stabil)
50 µl Überstand ins HPLC-System injizieren

Chromatographische Bedingungen

Säulenmaterial:	Bischof Eurobond; 5 µm Lichrospher RP18; 5 µm Nucleodur Sphinx RP18; 5 µm
Säulendimension:	125 × 4 mm
Fluss:	0,8–1,2 ml/min (der genaue Fluss ist auf der Produktspezifikation der jeweiligen Säule angegeben)
Fluoreszenzdetektion:	Exzitation: 365 nm Emission: 440 nm
Auftragsvolumen	50 µl
Temperatur:	30 °C
Laufzeit:	12 Minuten

9. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE

Wir empfehlen die Verwendung einer Vorsäule (KC2201VS); um die Säulenhaltbarkeit zu verlängern.

Bei Verwendung der Nucleodur Sphinx RP18 Kartuschen sind extra Kartuschenhalterungen (KC2201RK) erforderlich, die aber immer wieder verwendet werden können.

Nach der Analyse sollte die Trennsäule mit ca. 30 ml Reinstwasser bei einem Fluss von 1 ml/min gespült werden. Anschließend wird die Säule in 50% Methanol in Wasser gelagert (ca. 30 ml, Fluss 0,7 ml/min).

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

10. AUSWERTUNG

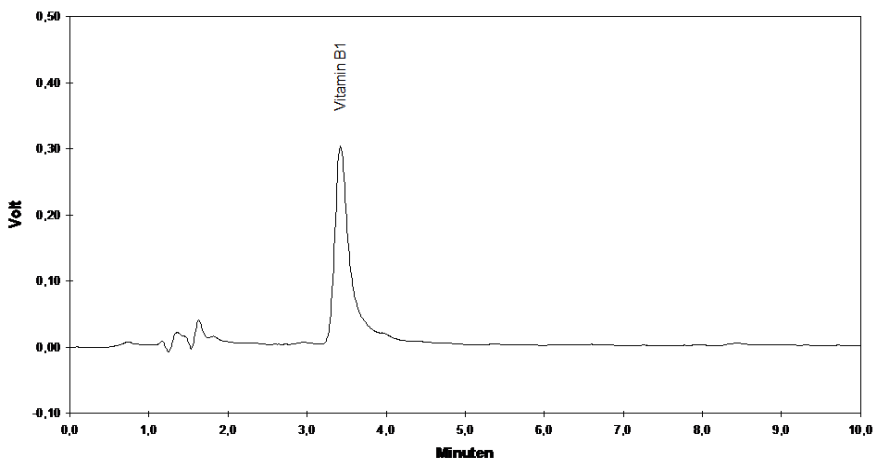
Berechnung

$$\text{Probenkonzentration} = \frac{\text{Peakhöhe Probe} \times \text{Kalibratorkonzentration}^*}{\text{Peakhöhe Kalibrator}}$$

* siehe Etikett

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

Musterchromatogramm



11. EINSCHRÄNKUNGEN

Die Thiaminpyrophosphat-Konzentrationen in Serum und Plasma liegen meist unterhalb der Nachweisgrenze. Wir raten von der Messung solcher Proben ab. Lipämische Proben sollten nicht gemessen werden.

12. QUALITÄTSKONTROLLE

Normbereich

32–95 ng/ml (Mittelwert \pm 2 SD)

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren. Die Angabe des Normbereich für Vitamin B₁ dient lediglich der Orientierung, da die Werte stark von der Auswahl des Probandenkollektivs abhängt. Die oben genannte Angabe kann daher von anderen publizierten Daten abweichen.

Kontrollen

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 AG die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

13. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay-VK:	3,3 % (31,2 ng/ml)	[n = 6]
	4,3 % (59,0 ng/ml)	[n = 6]
Inter-Assay-VK:	3,2 % (33,0 ng/ml)	[n = 12]
	4,7 % (62,3 ng/ml)	[n = 12]
Linearität:	bis 250 ng/ml	
Nachweisgrenze:	0,5 ng/ml	

14. ENTSORGUNG

Die Derivatisierungslösung (**DER**) kann mit Wasserstoffperoxid oxidiert werden und, nachdem der pH-Wert mit Natronlauge auf 6–8 eingestellt wurde, als wässrige Salzlösung entsorgt werden. Bitte beachten Sie die entsprechenden nationalen Richtlinien. Laufmittel (**MOPHA**) und Fällungsreagenz (**PREC**) können mit Natronlauge neutralisiert und bei neutralem pH als Salzlösung entsorgt werden.

Achtung: Wärmeentstehung!

15. 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
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

Problemstellung	Mögliche Ursache	Behebung
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

16. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg), HCV, HIV-1 und HIV-2 Antikörper getestet und für negativ befunden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Derivatisierungslösung (DER) sollte unter dem Abzug pipettiert werden, da sie KCN enthält.
- Das Fällungsreagenz (PREC) besteht aus Säure und muss mit Vorsicht benutzt werden. Es verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Als Vorsichtsmaßnahme wird empfohlen, das verwendete Humanmaterial immer als potentiell infektiös zu betrachten.
- Reagenzien dieser Testpackung enthalten organische Lösungsmittel. Berührungen mit der Haut oder den Schleimhäuten sind zu vermeiden.

16. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immunodiagnostik 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 Immunodiagnostik AG, zurückzusenden.
- Schwerwiegende Vorfälle sind der Immunodiagnostik AG und den nationalen Aufsichtsbehörden zu melden.

17. LITERATUR

1. Tallaksen C.M.E., T. Bohmer, H. Bell (1991). Concomitant determination of thiamin and its phosphate esters in human blood and serum by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 564, 127-136.
2. Herbeth B., J. Zittoun, L. Miravet, M. Boureay-Causse, G. Carre-Guery, E. Delacoux, C. Le Devehat, A. Lemoine, J.P. Mareschi, J. Martin, G. Portier de Courcy and J. Sancho (1986). Reference intervals for vitamin B1, B2, E, D, retinol, and folate in blood: Usefulness of dietary selection criteria. *Clin. Chem.* 32/9, 1756-1759.

Verwendete Symbole:

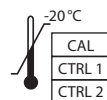
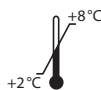
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Enthält Plasmoderivate oder menschliches Blut		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Nicht wiederverwenden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

Vitamin B₁ HPLC Kit

*For the determination of Vitamin B₁
(thiamin pyrophosphate) in EDTA-whole-blood*

Gültig ab / Valid from 2022-09-12

REF KC2201



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

Table of Contents

1. INTENDED USE	15
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	15
3. PRINCIPLE OF THE TEST	15
4. MATERIAL SUPPLIED	16
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	17
6. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	17
7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	17
8. ASSAY PROCEDURE	18
<i>Test procedure</i>	18
<i>Chromatographic conditions</i>	18
9. TREATMENT OF THE COLUMN	19
10. RESULTS	19
<i>Calculation</i>	19
<i>Typical chromatogram</i>	19
11. LIMITATIONS	20
12. QUALITY CONTROL	20
<i>Normal rang</i>	20
<i>Controls</i>	20
13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	20
<i>Precision and reproducibility</i>	20
14. DISPOSAL	21
15. TROUBLESHOOTING	21
16. PRECAUTIONS	22
17. GENERAL NOTES ON THE TEST	23
18. REFERENCES	24

1. INTENDED USE

The Immundiagnostik Assay is intended for the quantitative determination of Vitamin B₁ in EDTA-blood. For *in vitro* diagnostic use only.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Vitamin B₁ (thiamin) is a water-soluble Vitamin, which consists of a pyrimidine- and thiazolring linked via a methylene bridge. It is sensitive against alkaline solution, oxidation and reduction.

Vitamin B₁ is produced by plants and microorganisms. It is found free, peptide bound and as phosphoesters (mono-, di- and triphospho-esters). In animals and also in humans it is necessary to be supplemented by food. The intake of thiamin in the gut is maintained by active transport and passive diffusion. The different phosphoesters are synthesized by phosphorylation and dephosphorylation. The active form in metabolism is thiamin pyrophosphate and thiamin triphosphate in brain. After dephosphorylation thiamin is secreted by the kidney.

Thiamin pyrophosphate plays an important role as a co-enzyme in carbohydrate- and amino acid metabolism. An important reaction is the oxidative carboxylation. Thiamin itself is required for stimulating nerve cells. Beside this, it stimulates the fatty acid- and cholesterol-synthesis in nervous tissues.

A classical disease for the lack of Vitamin B₁ is Beri Beri, which is known from Asians eating predominantly white rice. The symptoms are paralysis, drop in muscle mass and heart failure. Other diseases are the Wernicke-encephalopathy, the Korsakow-syndrome and several forms of the Landry`s paralysis. Also many alcoholics have a deficient thiamin status.

Applications:

- determination of vitamin B₁ status
- disturbance in amino acid metabolism
- malabsorption caused by alcoholism
- suspicion for neuritis

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The first step in the determination of vitamin B₆ includes the sample preparation with additional derivatisation. During the precipitation, higher molecular substances are removed. After centrifugation the supernatant is used for derivatisation (10 min at 60°C), thereby transforming the vitamin B₁ into a fluorescent product. The sample is cooled, centrifuged and injected into the HPLC system.

The separation via HPLC follows an isocratic method at 30°C using a reversed phase column; one run lasts about 12 minutes. The quantification is performed with the delivered EDTA-whole blood calibrator; the concentration is calculated via integration of the peak area/heights.

Summary

This HPLC application for the quantitative determination of vitamin B₁ allows to determine the vitamin in an easy, fast and precise method. The kit includes all reagents in ready to use form for preparation and separation of the samples with exception of the column.

Besides many other parameters, the advantage of HPLC method lies in the simultaneous handling of many analytes in a single 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 precisely. 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 number 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	Content	Kit Components	Quantity
KC2201	DIL	Dilution solution	1 x 20 ml
	PREC	Precipitating reagent (Acid)	1 x 5 ml
	MOPHA	Mobile phase; ready to use (important: do not recirculate)	1 x 1 000 ml
	CAL	Calibrator, lyophilised (see specification data sheet for concentration)	4x
	REABUF	Reaction buffer	1 x 5 ml
	SOLC	Solution C	1 x 5.5 ml
	DER	Derivatisation solution	1 x 5.5 ml
	CTRL1	Control 1; lyophilised	4x
	CTRL2	Control 2; lyophilised	4x

The HPLC column (KC2201RP), can be ordered separately from Immundiagnostik. To extend the lifetime of your HPLC column, pre-columns (KC2201VS) are highly recommended. These and also the pre-column holders (KC2201VH) can also be ordered from Immundiagnostik. In addition to the complete kits, all components can also be ordered separately. Please ask for our single component price list.

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- 1.5 ml reaction tubes (e.g. Eppendorf)
- Centrifuge
- Various pipettes
- Vortex
- HPLC with fluorescence detector
- Reversed phase C₁₈ column
- Thermoshaker

6. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- **The lyophilised calibrator (CAL**, EDTA-whole blood with a defined thiamin pyrophosphate concentration) is stable at **-20°C** until the expiry date stated on the label. Before use, resuspend the **calibrator** with 1 ml **dilution solution (DIL)**, aliquote and store at -20°C. The concentration of vitamin B₁ slightly changes from lot to lot, the exact concentration is stated on the label.
- **The lyophilised controls 1 and 2 (CTRL 1 and CTRL 2)** are stable at **-20°C** until the expiry date stated on the label. Before use, they have to be reconstituted with each **250 µl dilution solution (DIL)**.
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at **2–8°C**.

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

EDTA-whole-blood is used in this assay.

Vitamin B₁ is light- and temperature-sensitive; therefore, samples have to be protected from light and cooled immediately after collection.

The samples are stable in the dark at 2–8°C for one day. For longer storage, samples should be frozen at -20°C. Do not re-freeze the samples.

8. ASSAY PROCEDURE

Test procedure

Pipet into 1.5 ml reaction tubes (e. g. Eppendorf) 50 µl sample (EDTA-whole blood), calibrator, or control 1 or 2
Add 150 µl dilution solution (DIL) and 50 µl precipitating reagent (PREC) , vortex for at least 30 s
Incubate for 10 min at 2–8 °C
Centrifuge for 10 min at 10 000 g
Add to each 150 µl supernatant 50 µl reaction buffer (REABUF) and 50 µl derivatisation solution (DER) , vortex for at least 30 s
Incubate for 10 min at 60 °C on a thermoshaker
Cool the tubes down at 2–8 °C
Centrifuge for 5 min at 10 000 g
Take the supernatant . (The sample is stable for 3 days at 2–8 °C in the dark)
Inject 50 µl of the supernatant for chromatography into the HPLC

Chromatographic conditions

Column material:	Bischoff Eurobond, 5 µm Lichrospher RP18 5 µm Nucleodur Sphinx RP18; 5 µm
Column dimension:	125 × 4 mm
Flow rate:	0.8–1.2 ml/min Please refer to the quality certificate of the column
Fluorescence detection:	Excitation: 365 nm Emission: 440 nm
Temperature:	30 °C
Injection volume:	50 µl
Running time:	12 min

Cartridge holder (KC2201RK) is necessary for the use of Nucleodur Sphinx RP18 cartridges. The cartridge holder can be used repeatedly.

9. TREATMENT OF THE COLUMN

It is recommended to use a guard column (KC2201VS) to extend column life.

After analysis, the column should be flushed with 30 ml ultrapure water (1 ml/min) and stored in 50% methanol in water (~ 30 ml, flow 0.7 ml/min). Before use, the system should be equilibrated with ~ 30 ml mobile phase (MOPHA).

10. RESULTS

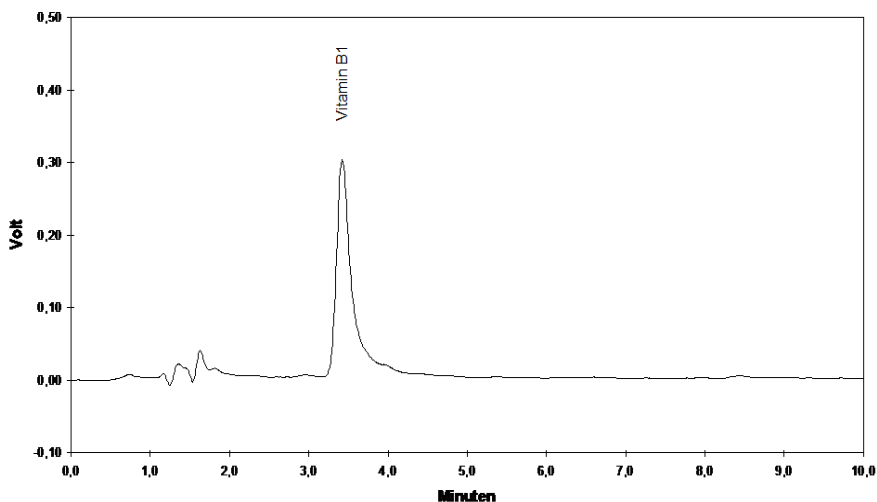
Calculation

$$\text{Sample concentration} = \frac{\text{Peak height sample} \times \text{calibrator concentration}^*}{\text{Peak height calibrator}}$$

* see label

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

Typical chromatogram



11. LIMITATIONS

We recommend not to measure lipaemic patient samples. The measurement of serum and plasma samples is possible but not recommended, because the concentration is mostly below the detection limit.

12. QUALITY CONTROL

Normal rang

EDTA-whole blood

32–95 ng/ml (Mean value \pm 2 SD)

We recommend each laboratory to establish its own reference range. The specification of the normal range for vitamin B₁ is for orientation purposes only, as the values depend strongly on the selection of the sample collective. The above information may therefore deviate from other published data.

Controls

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.

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay CV:	3.3 % (31.2 ng/ml)	[n = 6]
	4.3 % (59.0 ng/ml)	[n = 6]
Inter-Assay CV:	3.2 % (33.0 ng/ml)	[n = 12]
	4.7 % (63.3 ng/ml)	[n = 12]

Linearity:	up to 250 ng/ml
Detection limit:	0.5 ng/ml
Recovery:	84.1 % (whole blood)

14. DISPOSAL

The derivatisation solution (**DER**) must be oxidised with hydrogen peroxide, the pH value adjusted to 6–8, and disposed as aqueous salt solution. The mobile phase (**MOPHA**) and the precipitation reagent (**PREC**) must be neutralised with NaOH to neutral pH and disposed as salt solution.

Important: Reaction will produce heat, be careful!
Please refer to the appropriate national guidelines.

15. 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
Double peaks	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
	Auto sampler vials contaminated	Use new vials or clean them with methanol

Problem	Possible reason	Solution
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
Baseline is drifting	Detector lamp did not reach working temperature yet	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

16. PRECAUTIONS

- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- The precipitation reagent consists of an acid. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

- The test components contain organic solvents. Contact with skin or mucous membranes must be avoided.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- As a precaution, it is recommended that the human material used is always considered potentially infectious.
- As the derivatisation solution (DER) contains KCN, it should be pipetted under an fume hood.

















17. GENERAL NOTES ON THE TEST

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- 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.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

18. REFERENCES

1. Tallaksen C.M.E., T. Bohmer, H. Bell (1991). Concomitant determination of thiamin and its phosphate esters in human blood and serum by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr*, 564, 127-136.
2. Herbeth B., J. Zittoun, L. Miravet, M. Boureay-Cause, G. Carre-Guery, E. Delacoux, C. Le Devehat, A. Lemoine, J.P. Mareschi, J. Martin, G. Portier de Courcy and J. Sanchó (1986). Reference intervals for vitamin B1, B2, E, D, retinol, and folate in blood: Usefulness of dietary selection criteria. *Clin. Chem.* 32/9, 1756-1759.

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
	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

