

Arbeitsanleitung/Manual

Vitamin B₁ HPLC Kit

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

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

Gültig ab/valid from 26.08.2005

Artikelnummer/Catalogue no.: KC 2201

Packungsgröße/Package size: 100 Tests/100 Determinations

Lagerung/Storage: 4 °C, Kalibrator und Kontrollen bei -20 °C
4 °C, Calibrator and controls at -20 °C



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim
Tel.: ++49 6251 701900
Fax: ++ 49 6251 849430
e.mail: Info@immundiagnostik.com
www.immundiagnostik.com

Inhaltsverzeichnis/Table of contents	Seite/Page
1. VERWENDUNGSZWECK	4
2. EINLEITUNG	4
3. TESTPRINZIP	5
4. INHALT DER TESTPACKUNG	6
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	6
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	7
7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	7
8. PROBENVORBEREITUNG	7
9. TESTDURCHFÜHRUNG	8
HINWEISE	8
ARBEITSSCHEMA	8
CHROMATOGRAPHISCHE BEDINGUNGEN	9
10. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE	9
11. AUSWERTUNG	9
BERECHNUNG	9
MUSTERCHROMATOGRAMM	10
12. EINSCHRÄNKUNGEN	10
13. QUALITÄTSKONTROLLE	10
NORMBEREICH	10
KONTROLLEN	11
14. TESTCHARAKTERISTIKA	11
PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT	11
LINEARITÄT	11
NACHWEISGRENZE	11
15. ENTSORGUNG	11
16. MAßNAHMEN BEI STÖRUNGEN	12
17. LITERATUR	13
18. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	13

1. INTENDED USE	15
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	15
3. PRINCIPLE OF THE TEST	16
4. MATERIAL SUPPLIED	17
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	17
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	17
7. PRECAUTIONS	18
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	18
9. ASSAY PROCEDURE	18
PROCEDURAL NOTES	18
SAMPLE AND STANDARD PREPARATION	19
CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS	20
10. TREATMENT OF THE COLUMN	20
11. RESULTS	20
CALCULATION	20
TYPICAL CHROMATOGRAM	21
12. LIMITATIONS	21
13. QUALITY CONTROL	21
EXPECTED VALUES	21
CONTROLS	22
14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	22
PRECISION AND REPRODUCIBILITY	22
LINEARITY	22
DETECTION LIMIT	22
15. DISPOSAL	22
16. TROUBLESHOOTING	23
17. REFERENCES	24
18. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	24

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 Methylenbrücke 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 Thiamintriphosphat, 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 Pentosephosphatstoffwechselweg 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 15 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 25 °C auf einer "reversed phase" Säule. Die Aufnahme der Chromatogramme erfolgt mit einem Fluoreszenzdetektor. Die Trennung benötigt ca. 15 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 Peakflächen durchgeführt.

Zusammenfassung

Der hier vorliegende Komplettkit zur Bestimmung des Vitamin B₁ ermöglicht eine einfache, schnelle und präzise quantitative Bestimmung. Dieser 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, sodaß 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

Artikel Nr.	Kit Komponenten	Menge
KC2201LM	Laufmittel	1000 ml
KC2201KA	Kalibrator (lyoph. 1 ml; Konzentration siehe Etikett)	1 Fläschchen
KC2201FR	Fällungsreagenz	5 ml
KC2201VL	Verdünnungslösung	20 ml
KC2201RB	Reaktionspuffer	5 ml
KC2201DL	Derivatisierungslösung (lyophilisiert)	5,5 ml
KC2201LC	Lösung C	5,5 ml
KC2201KO	Kontrolle 1 und 2 (lyoph. 250 µl; Konzentration siehe Produktspezifikation)	2 x 3 Fläschchen

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Vortexer
- 1,5 ml Reaktionsgefäße (z.B. Eppendorf)
- diverse Pipetten
- HPLC Gerät mit Fluoreszenz-Detektor
- reversed phase C₁₈-Säule
- heizbarer Schüttler oder Wärmebad
- Zentrifuge

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Der **Kalibrator** (EDTA-Vollblut mit definierter Menge Thiaminpyrophosphat) wird in 1 ml Verdünnungslösung 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 **Kontrollen** werden in 250 µl Verdünnungslösung gelöst.
- Die **Derivatisierungslösung** wird mit 5,5 ml Lösung C resuspendiert. Die aufgelöste Derivatisierungslösung ist bei 2-8 °C 6 Monate stabil.
- Die **restlichen Testreagenzien** werden gebrauchsfertig in gelöster Form geliefert.
- Die Testreagenzien sind bei 2-8 °C, der **Kalibrator** und die **Kontrollen** bei -20 °C bis zum Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Standards und Kontrollen sind auf Humanblut aufgebaut. Sie sind auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befundet worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Das Fällungsreagenz besteht aus Säure und muß auch im verdünnten Zustand mit Vorsicht behandelt werden. Es verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muß die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

8. PROBENVORBEREITUNG

Als Probe eignet sich EDTA-Vollblut daß aus venösem Nüchternblut gewonnen wird.

Da Vitamin B₁ sehr licht- und temperaturempfindlich ist, muß die Probe gekühlt vor Licht geschützt werden.

Die Haltbarkeit der Probe beträgt bei 2-8 °C im Dunkeln 1 Tag. Zur längeren Lagerung sollte die Probe bei -20 °C aufbewahrt werden. Die Probe darf **nicht** mehrfach eingefroren und aufgetaut werden.

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumen sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik übernimmt keine Haftung.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung abzuarbeiten.

Arbeitsschema

In 1,5 ml Reaktionsgefäße (z.B. Eppendorf) werden pipettiert:

50 µl Patientenprobe (EDTA-Vollblut), Kalibrator oder Kontrolle

+

150 µl Verdünnungslösung

+

50 µl Fällungsreagenz

gut mischen, **10 Minuten bei 2-8 °C** stehen lassen und anschließend **10 min** bei 10.000 g zentrifugieren.

150 µl des Überstandes

+

50 µl Reaktionspuffer

+

50 µl Derivatisierungslösung

zugeben, mischen und **10 min bei 60 °C** auf Schüttler inkubieren.

bei 2-8 °C abkühlen. Anschließend 5 min bei 10.000 g zentrifugieren. Den Überstand abnehmen (Überstand ist 3 Tage bei 2-8 °C stabil)

50 µl in das HPLC-System injizieren.

Chromatographische Bedingungen

Säulen:	Bischof Eurobond; 5 µm; 125 x 4 mm Lichrospher RP 18; 125 x 4 mm
Fluß :	0,8 - 1,2 ml/min
Fluoreszenzdetektor :	Exzitation: 365 nm Emission: 440 nm
Laufzeit pro Chromatogramm :	12 Min.

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

10. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE

Nach der Analyse sollte die Trennsäule mit ca. 50 ml Aqua bidest bei einem Fluß von 1 ml/min gespült werden. Anschließend wird die Säule in 20% Methanol in Wasser gelagert (ca. 30 ml, Fluß 0,7 ml/min)

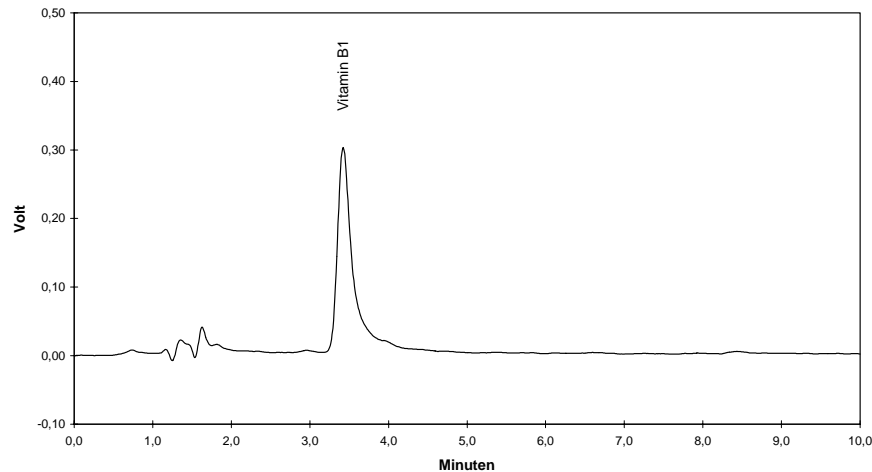
Zur Wiederinbetriebnahme wird das ganze System mit ca. 50 ml Laufmittel äquilibriert

11. AUSWERTUNG

Berechnung

$$C_{B_1 \text{ patient}} = \frac{\text{Peakhöhe Patient} \times \text{Konz. Kalibrator (ng/ml)}}{\text{Peakhöhe Kalibrator}}$$

Musterchromatogramm



12. EINSCHRÄNKUNGEN

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

13. QUALITÄTSKONTROLLE

Normbereich

32 - 95 ng/ml (Mittelwert \pm 2 SD).

Wir empfehlen, daß jedes Labor seinen eigenen Normalwerte-Bereich erstellt, weil Referenzbereiche stark von der Auswahl des Probandenkollektivs abhängig sind. Die Angabe des Normalbereichs für Thiaminpyrophosphat im EDTA-Vollblut zwischen 32 und 95 ng/ml dient lediglich der Orientierung und kann von anderen publizierten Daten abweichen.

Kontrollen

Zur Überwachung der Qualität der Analyse sollten bei jedem Lauf Kontrollen mitgeführt werden. Wenn eine oder mehrere Kontrollen eines Laufs ausserhalb ihres Bereichs liegen ist es möglich, dass auch die Patientenproben falsch ermittelt wurden.

14. 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

15. ENTSORGUNG

Das Laufmittel und die Derivatisierungslösung müssen als halogenfreier Lösungsmittelabfall entsorgt werden. Das Fällungsreagenz kann mit Natronlauge neutralisiert und bei neutralem pH als Salzlösung entsorgt werden. (**Achtung:** Wärmeentstehung)

16. MAßNAHMEN BEI STÖRUNGEN

Problemstellung	Mögliche Ursache	Behebung
Kein Signal	Keine oder defekte Verbindung zur Auswerteeinheit.	Signalkabel und Anschluss prüfen.
	Detektorlampe zu alt	Ggf. Lampe erneuern
Keine Peaks	Injektor verstopft	Injektor überprüfen
Doppelpeaks	Totvolumen an Fittings und / oder Säule	Fittings und / oder Säule erneuern
Störpeaks	Injektor verunreinigt	Injektor reinigen
	Kontamination am Säulenkopf	Säule umdrehen und 30 min mit niedrigem Fluß (0,2 ml/min) Laufmittel spülen
	Luft im System	Pumpe entgasen
	Autosamplergefäße verunreinigt	Neue oder mit Methanol gespülte Autosamplergefäße verwenden
Breite Peaks, Tailing	Vorsäule / Säule zu alt	Neue Vorsäule / Säule verwenden
Veränderte Retentionszeit	Temperaturdrift	Säulenofen verwenden
	Pumpe fördert ungenau	Pumpe überprüfen, entlüften
	System noch nicht im Gleichgewicht	System mit mobiler Phase 15 min spülen
Basislinie driftet	Detektorlampe noch kalt	Warten
	Detektorlampe zu alt	Ggf. Lampe erneuern
	System noch nicht im Gleichgewicht	System mit mobiler Phase 15 min spülen
	Pumpe fördert ungenau	Pumpe überprüfen, entlüften

Problemstellung	Mögliche Ursache	Behebung
Unruhige Basislinie	Pumpe fördert ungenau	Pumpe überprüfen, entlüften
	Detektorzelle verschmutzt	Detektorzelle reinigen

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-Cause, 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.

18. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Reagenzien dieser Testpackung enthalten organische Lösungsmittel. Berührungen mit der Haut oder den Schleimhäuten sind zu vermeiden.
- Sämtliche in der Testpackung enthaltene Reagenzien dürfen ausschließlich zur in-vitro-Diagnostik eingesetzt werden.
- Die Reagenzien sollten nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden (Verfallsdatum siehe Testpackung).
- Einzelkomponenten mit unterschiedlichen Lot-Nummern aus verschiedenen Testpackungen sollten nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die dafür erstellten Richtlinien für medizinische Laboratorien 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 Immunodiagnostik AG übernimmt für direkt daraus resultierende Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

Vitamin B₁ HPLC Kit

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

Valid from 26.08.2005

Artikelnummer/Catalogue no.: KC 2201

Packungsgröße/Package size: 100 Determinations

Lagerung/Storage: 4 °C, Calibrator and controls at -20 °C



1. INTENDED USE

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

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Vitamin B₁ (thiamin) is a watersoluble Vitamin, which consists of a pyrimidine- and thiazolring linked via a methylen 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 phospho-esters (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 phospho-esters 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-encephalopathie, the Korsakow-syndrome and several forms of the Landry's paralysis. Also many alcoholics have deficient thiamin status.

Applications:

- determination of Vitamin B₁ status
- disturbance in amino acid metabolism
- malabsorption (alcoholism)
- suspicion for neuritis

3. PRINCIPLE OF THE TEST

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

The separation via HPLC follows an isocratic method at 25°C using a „reversed phase“ column; one run lasts 15 minutes. The quantification is performed with the calibrator delivered; the concentration is calculated via integration of the peak areas.

Summary

The application of vitamin B1 for HPLC allows the determination of thiamin pyrophosphate in an easy, fast, and precise method. The kits includes all reagents in ready to use form for preparation and separation of the samples with exception of the columns.

As with many other parameters the advantage of HPLC measurements are the simultaneous handling of many analytes in a single test. The „complete HPLC-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 immuno assays 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 runs the one-point calibration is much more economic than 6-point calibration for immuno assays).

4. MATERIAL SUPPLIED

Catalogue No	Kit Components	Quantity
KC 2201LM	Mobile phase	1 x 1000 ml
KC 2201KA	Calibrator, lyophilized	1 vial
KC 2201FR	Precipitating reagent	5 ml
KC 2201VL	Dilution solution	20 ml
KC 2201RB	Reaction buffer	5 ml
KC 2201DL	Derivatisation solution (lyoph.)	5.5 ml
KC 2201LC	Solution C	5.5 ml
KC 2201KO	Control 1 and 2; 250 µl lyophilized	2 x 3 vials

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- 1.5 ml reaction tubes (Eppendorf)
- Centrifuge
- Various pipettes
- HPLC with Fluorescence-detector
- Reversed phase C₁₈-column
- Heatable shaker or waterbath
- Vortex mixer

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- The **calibrator**, EDTA- whole blood with a defined concentration of thiamin pyrophosphate should be resuspended with dilution solution (volume is given on the label), aliquoted and stored at -20 °C. The concentration of Vitamin B1 is varying slightly from batch to batch; the actual concentration is given on the label.

- Reconstitute the **controls** in **250 µl** dilution solution.
- Resuspend the **derivatisation solution** in 5.5 ml solution C. The dissolved derivatisation solution is stable for 6 month at 2-8 °C.
- All other test components are ready to use.
- Store test reagents at 2-8 °C, the **calibrator and the controls** at -20 °C. They are stable up to the expiry date which is given on the label.

7. PRECAUTIONS

- This product contains human source material which was tested and found to be non-reactive to HBsAg, anti-HIV-1/2, and anti-HCV. Since no method can offer complete assurance that hepatitis B virus, HIV-1/2, HCV or other infectious agents are absent, these reagents should be handled as if potentially infectious.
- The supplied reagents contain reagents like acetonitrile (mobile phase) and acid (precipitating reagent). Although diluted, it still must be handled with care and should only be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Do not breath vapor and avoid inhalation.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on kit label.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

EDTA-whole-blood has to be used in this assay.

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

The samples are stable in the dark at 2-8°C for 1 day. For longer storage samples should be frozen at -20°C. Do not freeze the samples a second time.

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- The quality control guidelines should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure, that are not coordinated with the producer, may influence the test results. Immundiagnostik can therefore not be held reliable for any damage resulting from this.

- The assay should always be performed due to the manual which is given in the kit.

Sample and standard preparation

Pipette into 1.5 ml reaction tubes:

50 µl sample (EDTA-whole blood), calibrator or control

+

150 µl dilution solution

+

50 µl precipitating reagent

Mix well. Leave the tubes for **10 minutes at 2-8°C** and centrifuge afterwards at 10.000 x g for 10 minutes.

Take **150 µl** supernatant

+

50 µl reaction buffer

+

50 µl derivatisation solution,

Incubate for **10 minutes at 60°C** on a shaker or in a waterbath.

Cool to 2-8°C. Centrifuge at 10.000 x g for 5 minutes.

Inject **50 µl** of the supernatant for chromatography into the HPLC-system

The prepared supernatant is stable for 3 days at 2-8 °C.

Chromatographic conditions

Column material:	Bischoff Prontosil Eurobond; 5 µm; 125 x 4 mm MERCK Lichrospher RP 18; 125 x 4 mm
Flow rate:	0.8 - 1.2 ml/min
Detection:	Fluorescence excitation: 365 nm emission: 440 nm
Running time per chromatogram:	12 minutes

10. TREATMENT OF THE COLUMN

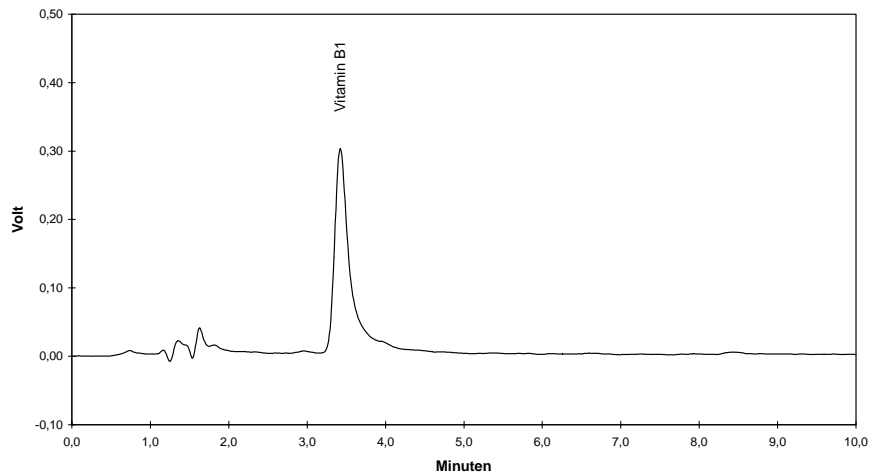
After the analysis the column should be flushed with 50 ml aqua bidest (1 ml/min) and stored in 20% methanol in aqua bidest (ca. 30 ml, flow 0.7 ml/min). Before use, the system should be equilibrated with ca. 50 ml mobile phase.

11. RESULTS

Calculation

$$c_{B_1 \text{ patient}} = \frac{\text{Peak height patient} \times \text{conc. calibrator (ng/ml)}}{\text{Peak height calibrator}}$$

Typical chromatogram



12. 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.

13. QUALITY CONTROL

Expected values

Vitamin B1 normal values: 32 – 95 ng/ml (mean \pm 2SD)

We recommend, that each laboratory should develop their own normal range. The values mentioned above are only for orientation and can deviate from other published data.

Controls

Control samples or EDTA-blood pools should be analyzed with each run of calibrators and patient samples. Results generated from the analysis of the control samples should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. In assays in which one or more of the quality control sample values lie outside the acceptable limits, the results for the patient sample may not be valid.

14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

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]

Linearity

up to 250 ng/ml

Detection limit

0.5 ng/ml

15. DISPOSAL

The mobile phase and derivatisation solution must be disposed as non-halogenated solvent. The precipitation solution could be neutralized with NaOH and if the pH value is neutral it can be disposed as salt solution. (**Important:** Reaction will produce heat, be careful)

Please refer to the appropriate national guidelines.

16. TROUBLESHOOTING

Problem	Possible reason	Solution
No signal	No or defect connection to evaluation system	Check signal cord and connection
	Detector lamp is altered	Change lamp
No peaks	Injector is congested	Check Injector
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
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 not smooth	Pump delivers imprecise	Check pump, degas the system
	Detector flow cell is dirty	Clean flow cell

17. 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-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.

18. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The test components contain organic solvents. Contact with skin or mucous membranes has to be avoided.
- All reagents in the test package are to be used for research only.
- The reagents should not be used after the date of expiry stated on the label.
- Single components with different lot numbers should not be mixed or exchanged.
- The guidelines for medical laboratories should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure, that are not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held reliable for any damage resulting from this.