

# CHROMSYSTEMS

DIAGNOSTICS BY HPLC & LC-MS/MS

KNOCHENSTOFFWECHSELMARKER  
OSTEOPOROSIS DIAGNOSIS  
DIAGNOSTIC DE L'OSTÉOPOROSE  
DIAGNOSI DI OSTEOPOROSI  
DIAGNÓSTICO DE OSTEOPOROSIS



Procedura per la determinazione LC-MS/MS

**MassChrom®**

**25-OH-vitamina D3/D2  
in siero/plasma**

incl. Upgrade 3-epi-25-OH-vitamina D3/D2

Codice 62000

CE 

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH è certificata in accordo con le norme ISO 9001 e ISO 13485 (incluso MDSAP). I nostri articoli vengono prodotti, confezionati e messi in circolazione in accordo alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro.

© This document is protected by copyright. All rights reserved.

**Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH**  
Am Haag 12  
82166 Gräfelfing  
Germania

Tel.: +49 89 18930-0  
Fax: +49 89 18930-299  
[www.chromsystems.com](http://www.chromsystems.com)

Indice.....	Pagina
1 Informazioni per l'ordine .....	4
2 Introduzione .....	7
2.1 Nozioni di base .....	7
2.2 Finalità applicative .....	9
2.3 Principio alla base del kit di reagenti.....	10
3 Sistema LC-MS/MS .....	11
3.1 Sistemi LC-MS/MS per il kit di reagenti <b>MassChrom</b> <sup>®</sup> 25-OH-vitamina D <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> in siero/plasma (codice 62000) .....	11
3.1.1 ...Parametri HPLC utilizzando due pompe HPLC isocratiche.....	11
3.1.2 ...Parametri HPLC utilizzando un sistema HPLC a gradiente binario ....	13
3.2 Sistemi LC-MS/MS per l'Upgrade per 3-epi-25-OH-vitamina D <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> .....	15
3.2.1 ...Parametri HPLC utilizzando un sistema HPLC a gradiente binario con pompa isocratica aggiuntiva.....	15
3.2.2 ...Parametri HPLC utilizzando un sistema HPLC a gradiente binario ....	17
3.3 Sistemi LC-MS/MS per il kit di reagenti <b>MassChrom</b> <sup>®</sup> 25-OH-vitamina D <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> e 3-epi-25-OH-vitamina D <sub>3</sub> in siero e plasma (codice 62062/1000/F) .....	19
3.3.1 ...Parametri HPLC utilizzando un sistema HPLC a gradiente binario con pompa isocratica aggiuntiva.....	19
3.3.2 ...Parametri HPLC utilizzando un sistema HPLC a gradiente binario ....	21
3.4 Misurazione MS/MS .....	22
3.5 Ottimizzazione delle transizioni MRM (tuning) .....	22
3.6 Messa in esercizio .....	23
3.7 Messa a riposo temporanea .....	23
4 Transizioni di massa .....	23
4.1 Transizioni di massa per la determinazione di 25-OH-D <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> .....	23
4.2 Transizioni di massa per l'Upgrade.....	24
4.3 Transizioni di massa per il kit di reagenti <b>MassChrom</b> <sup>®</sup> 25-OH-vitamina D <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> e 3-epi-25-OH-vitamina D <sub>3</sub> in siero e plasma (codice 62062/1000/F) .....	25
5 Preparazione dei campioni .....	26
5.1 Raccolta e conservazione dei campioni dei pazienti .....	26
5.2 Ricostituzione degli standard di calibrazione.....	26
5.3 Ricostituzione dei controlli.....	27
5.4 Preparazione dei campioni .....	27
5.4.1 ...Preparazione dei campioni manuale.....	27
5.4.2 ...Preparazione automatica dei campioni .....	28
5.5 Stabilità e stoccaggio dei campioni preparati.....	28
6 Equipaggiamento aggiuntivo necessario .....	28
7 Acquisizione e valutazione dei dati .....	28
8 Controllo di qualità .....	29
9 Intervalli di riferimento.....	29
10 Fattori di conversione .....	30
11 Stoccaggio e stabilità dei reagenti.....	30
12 Smaltimento dei rifiuti .....	31

# Indice ..... Pagina

13	Esempi di cromatogrammi.....	32
13.1	Esempi di cromatogrammi per il kit di reagenti <b>MassChrom</b> <sup>®</sup> 25-OH-vitamina D <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> in siero/plasma (codice 62000) .....	32
13.2	Esempi di cromatogrammi per l'Upgrade 3-epi-25-OH-vitamina D <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> .....	35
13.3	Esempi di cromatogrammi per il kit di reagenti <b>MassChrom</b> <sup>®</sup> 25-OH-vitamina D <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> e 3-epi-25-OH-vitamina D <sub>3</sub> in siero/plasma (codice 62062/1000/F).....	38
14	Valutazione delle interferenze .....	41
14.1	Kit di reagenti <b>MassChrom</b> <sup>®</sup> 25-OH-vitamina D <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> in siero/plasma (codice 62000) incl. Upgrade .....	41
14.2	Kit di reagenti <b>MassChrom</b> <sup>®</sup> 25-OH-vitamina D <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> e 3-epi-25-OH-vitamina D <sub>3</sub> in siero/plasma (codice 62062/1000/F).....	42
15	Limitazioni cliniche .....	43
16	Risoluzione dei problemi .....	43
17	Bibliografia .....	45
	Allegato I: Preparazione automatica dei campioni .....	46
	Allegato II: Avvertenze sulle sostanze pericolose .....	48
	Allegato III: Calcolo manuale .....	51
	Allegato IV: Dati relativi alle prestazioni.....	52
	Allegato V: Dichiarazione di conformità .....	60
	Allegato VI: Simboli .....	62

# 1 Informazioni per l'ordine

Codice	Prodotto	
62000	Kit di reagenti LC-MS/MS	
	<b>MassChrom® 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> in siero/plasma</b>	
	Contenuto per 200 determinazioni:	
	Mobile Phase A	1 x 1000 ml
	Mobile Phase B	1 x 1000 ml
	Precipitation Reagent	1 x 5 ml
	Internal Standard	1 x 40 ml
	Rinsing Solution	1 x 1000 ml
Vial di reazione	2 x 100 pezzi	
62000/1000	Kit di reagenti LC-MS/MS	
	<b>MassChrom® 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> in siero/plasma</b>	
	Contenuto per 1000 determinazioni:	
	Mobile Phase A	5 x 1000 ml
	Mobile Phase B	5 x 1000 ml
	Precipitation Reagent	5 x 5 ml
	Internal Standard	5 x 40 ml
	Rinsing Solution	2 x 1000 ml
	Vial di reazione	10 x 100 pezzi
	<b>3PLUS1® Multilevel Serum Calibrator Set</b>	4 x 1,0 ml (lyoph.)
	<b>MassCheck® 25-OH-Vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> Serum Control Level I</b>	5 x 1,0 ml (lyoph.)
	<b>MassCheck® 25-OH-Vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> Serum Control Level II</b>	5 x 1,0 ml (lyoph.)
	Colonna analitica (equilibrata, con cromatogramma test)	1 pezzo
Colonna "trap" (equilibrata, con cromatogramma test)	2 pezzi	
62000/1000/F	Kit di reagenti LC-MS/MS	
	<b>MassChrom® 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> in siero/plasma</b>	
	per la preparazione automatica dei campioni con piastre filtranti da 96 pozzetti.	
	Contenuto per 1000 determinazioni:	
	Mobile Phase A	5 x 1000 ml
	Mobile Phase B	5 x 1000 ml
	Precipitation Reagent	5 x 5 ml
	Internal Standard	5 x 40 ml
	Rinsing Solution	2 x 1000 ml
	Piastre filtranti da 96 pozzetti	4 x 3 pezzi
	Piastre di raccolta a 96 pozzetti	4 x 3 pezzi
	Pellicole adesive perforabili, per piastre da 96 pozzetti	4 x 3 pezzi
	<b>3PLUS1® Multilevel Serum Calibrator Set</b>	4 x 1,0 ml (lyoph.)
<b>MassCheck® 25-OH-Vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> Serum Control Level I</b>	5 x 1,0 ml (lyoph.)	
<b>MassCheck® 25-OH-Vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> Serum Control Level II</b>	5 x 1,0 ml (lyoph.)	
Colonna analitica (equilibrata, con cromatogramma test)	1 pezzo	
Colonna "trap" (equilibrata, con cromatogramma test)	2 pezzi	

Codice	Prodotto	
62062	<b>Kit di reagenti LC-MS/MS</b> <b>MassChrom® 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> e 3-epi-25-OH-vitamina D<sub>3</sub> in siero/plasma</b> Contenuto per 200 determinazioni:	
	Mobile Phase A	1 x 1000 ml
	Mobile Phase B	1 x 1000 ml
	Precipitation Reagent	1 x 5 ml
	Internal Standard Mix	1 x 40 ml
	Rinsing Solution	1 x 1000 ml
	Vial di reazione	2 x 100 pezzi
62062/1000	<b>Kit di reagenti LC-MS/MS</b> <b>MassChrom® 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> e 3-epi-25-OH-vitamina D<sub>3</sub> in siero/plasma</b> Contenuto per 1000 determinazioni:	
	Mobile Phase A	5 x 1000 ml
	Mobile Phase B	5 x 1000 ml
	Precipitation Reagent	5 x 5 ml
	Internal Standard Mix	5 x 40 ml
	Rinsing Solution	2 x 1000 ml
	Vial di reazione	10 x 100 pezzi
	3PLUS1® Multilevel Serum Calibrator Set	4 x 1,0 ml (lyoph.)
	<b>MassCheck® 3-epi-25-OH-Vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> and 25-OH- Vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub></b>	
	Serum Control Level I	5 x 1,0 ml (lyoph.)
	<b>MassCheck® 3-epi-25-OH-Vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> and 25-OH- Vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub></b>	
	Serum Control Level II	5 x 1,0 ml (lyoph.)
	Colonna analitica (equilibrata, con cromatogramma test)	1 pezzo
	<b>MassChrom® 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> e 3-epi-25-OH-Vitamin D<sub>3</sub></b>	
	Colonna "trap" (equilibrata, con cromatogramma test)	2 pezzi
62062/1000/F	<b>Kit di reagenti LC-MS/MS</b> <b>MassChrom® 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> e 3-epi-25-OH-vitamina D<sub>3</sub> in siero/plasma</b> per la preparazione automatica dei campioni con piastre filtranti da 96 pozzetti. Contenuto per 1000 determinazioni:	
	Mobile Phase A	5 x 1000 ml
	Mobile Phase B	5 x 1000 ml
	Precipitation Reagent	5 x 5 ml
	Internal Standard Mix	5 x 40 ml
	Rinsing Solution	2 x 1000 ml
	Piastre filtranti da 96 pozzetti	4 x 3 pezzi
	Piastre di raccolta a 96 pozzetti	4 x 3 pezzi
	Pellicole adesive perforabili, per piastre da 96 pozzetti	4 x 3 pezzi
	3PLUS1® Multilevel Serum Calibrator Set	4 x 1,0 ml (lyoph.)
	<b>MassCheck® 3-epi-25-OH-Vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> and 25-OH- Vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub></b>	
	Serum Control Level I	5 x 1,0 ml (lyoph.)
	<b>MassCheck® 3-epi-25-OH-Vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> and 25-OH- Vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub></b>	
	Serum Control Level II	5 x 1,0 ml (lyoph.)
	Colonna analitica (equilibrata, con cromatogramma test)	1 pezzo
	<b>MassChrom® 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> e 3-epi-25-OH-vitamina D<sub>3</sub></b>	
	Colonna "trap" (equilibrata, con cromatogramma test)	2 pezzi

Codice	Prodotto	
<b>Componenti ordinabili singolarmente per <i>MassChrom</i>® 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> in siero/plasma:</b>		
62001	Mobile Phase A	1000 ml
62002	Mobile Phase B	1000 ml
62003	Precipitation Reagent	5 ml
62004	Internal Standard	40 ml
62009	Rinsing Solution	1000 ml
3006	Vial di reazione	100 pezzi

<b>Equipaggiamento per <i>MassChrom</i>® 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> in siero/plasma:</b>		
62110	Colonna "trap" (equilibrata, con cromatogramma test)	1 pezzo
62100	Colonna analitica (equilibrata, con cromatogramma test)	1 pezzo
62015	Tuning Mix, Analytes and Internal Standard	2 ml
15010	Involucro prefiltro in PEEK	1 pezzo
15011	Prefiltro rivestito in PEEK, 2 µm	5 pezzi
15070	Involucro prefiltro in acciaio	1 pezzo
15071	Prefiltro in acciaio, 0,5 µm	5 pezzi

<b>Standard di calibrazione multilevel e controlli <i>MassCheck</i>® Chromsystems per <i>MassChrom</i>® 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> in siero/plasma:</b>		
62028	3PLUS1® Multilevel Serum Calibrator Set	4 x 1,0 ml (lyoph.)
62039	6PLUS1® Multilevel Serum Calibrator Set	7 x 1,0 ml (lyoph.)
0221	<i>MassCheck</i> ® 25-OH-Vitamin D <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> Serum Control Bi-Level (I + II)	2 x 5 x 1,0 ml (lyoph.)
0222	<i>MassCheck</i> ® 25-OH-Vitamin D <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> Serum Control Level I	5 x 1,0 ml (lyoph.)
0223	<i>MassCheck</i> ® 25-OH-Vitamin D <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> Serum Control Level II	5 x 1,0 ml (lyoph.)
0256	<i>MassCheck</i> ® 25-OH-Vitamin D <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> Serum Control Level III	5 x 1,0 ml (lyoph.)

<b>Componenti ordinabili singolarmente, standard di calibrazione multilevel, controlli <i>MassCheck</i>® Chromsystems e accessori per la separazione delle forme diastereomeriche <i>MassChrom</i>® 3-epi-25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> e 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> o <i>MassChrom</i>® 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> e 3-epi-25-OH-vitamina D<sub>3</sub> in siero/plasma</b>		
62011	Mobile Phase A	1000 ml
62022	Mobile Phase B	1000 ml
62044	Internal Standard Mix (per 200 analisi)	40 ml
62029	3PLUS1® Multilevel Serum Calibrator Set	4 x 1,0 ml (lyoph.)
0310	<i>MassCheck</i> ® 3-epi-25-OH-Vitamin D <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> and 25-OH- Vitamin D <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> Serum Control Bi-Level (I + II)	2 x 5 x 1,0 ml (lyoph.)
0311	<i>MassCheck</i> ® 3-epi-25-OH-Vitamin D <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> and 25-OH- Vitamin D <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> Serum Control Level I	5 x 1,0 ml (lyoph.)
0312	<i>MassCheck</i> ® 3-epi-25-OH-Vitamin D <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> and 25-OH- Vitamin D <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> Serum Control Level II	5 x 1,0 ml (lyoph.)
62110/Epi	Colonna "trap" (equilibrata, con cromatogramma test)	1 pezzo
62120	Colonna analitica (equilibrata, con cromatogramma test)	1 pezzo
62130	Colonna analitica (equilibrata, con cromatogramma test)	1 pezzo
62016	<i>MassChrom</i> ® 25-OH-vitamina D <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> e 3-epi-25-OH-vitamina D <sub>3</sub> Tuning Mix, Analytes and Internal Standards	1 ml

<b>Accessori per la preparazione dei campioni con piastre filtranti a 96 pozzetti</b>		
62057	Piastre filtranti a 96 pozzetti	4 x 3 pezzi
62058	Piastre di raccolta a 96 pozzetti	4 x 3 pezzi
62059	Pellicole adesive perforabili, per piastre a 96 pozzetti	4 x 3 pezzi

## 2 Introduzione

### 2.1 Nozioni di base

Il termine "vitamina D" indica una serie di composti liposolubili derivanti dal sistema ciclico del colesterolo. Le più importanti sono il coledcalciferolo (vitamina D<sub>3</sub>), presente nell'uomo e negli animali, e l'ergocalciferolo (vitamina D<sub>2</sub>) presente prevalentemente nelle piante e nei funghi. Il coledcalciferolo e l'ergocalciferolo derivano dalle rispettive provitamine naturali 7-deidrocolesterina e ergosterina.

Il termine "vitamina" ha origini storiche. Il coledcalciferolo, che può essere sintetizzato dall'organismo nella cute sotto l'azione dei raggi UV, non è propriamente una vitamina ma un proormone, che successivamente viene trasformato nel calcitriolo (1,25-(OH)<sub>2</sub> vitamina D<sub>3</sub>) fisiologicamente attivo. La sintesi fotodipendente del proormone spiega la diversa concentrazione sierica della vitamina D nelle varie stagioni dell'anno, infatti in estate i livelli sierici della 25-OH-vitamina D<sub>3</sub> sono molto più elevati che in inverno. Anche il tipo di pelle influisce in modo decisivo sulla biosintesi fotodipendente: rispetto agli individui con la pelle chiara, le persone con la pelle scura (elevata concentrazione di melanina) devono rimanere esposte fino a 5 volte più a lungo per formare quantità di vitamina D fisiologicamente sufficienti.

Soprattutto nei bambini di età inferiore a un anno, una parte considerevole della 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> può presentarsi sotto forma dell'epimero C3, nel quale varia solo l'orientamento spaziale della funzione idrossido nella posizione 3 della struttura dei secosteroidi. Una minima quantità delle forme epimeriche può essere rilevata anche in quasi tutti gli adulti se il livello di rivelazione è sufficientemente basso.

#### Effetti

La vitamina D svolge un'importante funzione regolatrice nell'omeostasi del calcio e nel metabolismo osseo; per questo motivo, la carenza di vitamina D determina ipocalcemia e difetti di mineralizzazione del tessuto osseo (rachitismo nei bambini, osteoporosi negli adulti). La correlazione esistente tra deficit di vitamina D e processi di riassorbimento osseo è stata confermata, in uno studio, dall'aumentata escrezione di legami crociati del collagene (legami crociati del piridinio).

Inoltre, una carenza di vitamina D favorisce l'insorgenza di determinate malattie croniche, tra cui le malattie autoimmuni, il diabete e diversi tipi di cancro. Infine, un basso livello di calcitriolo è considerato fattore di rischio per l'ipertensione arteriosa, le coronaropatie e l'insufficienza cardiaca e renale. Anche alcune malattie dell'apparato locomotore si possono ricondurre alla carenza di vitamina D.

I primi studi effettuati hanno evidenziato che l'attività biologica dei metaboliti downstream degli epimeri si differenzia anche marcatamente da quella delle forme non epimeriche. Vi sono ad esempio segni di marcata riduzione dell'effetto calcemico nella mineralizzazione ossea.

#### Metabolismo

La vitamina D assunta con l'alimentazione o sintetizzata nella pelle viene metabolizzata nel fegato per via enzimatica a 25-OH-vitamina D<sub>3</sub> (25-idrossicolecalciferolo, calcidiolo) (cfr fig. 1). Questo metabolita, che costituisce la riserva di vitamina D, entra in circolazione nel sangue legato a una proteina specifica (DBP). Il calcidiolo è il metabolita con il più elevato livello di concentrazione sierica ed è l'indicatore chimico-clinico utilizzato per la diagnosi delle carenze di vitamina D. La 25-OH-D<sub>3</sub> viene infine trasportata nei reni dove, tramite monossigenasi, avviene l'idrossilazione a 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamina D<sub>3</sub> (1,25-diidrossicolecalciferolo, calcitriolo). Questo metabolita è la forma biologicamente attiva della vitamina D, la cui produzione viene regolata dagli ormoni. Ricerche più recenti indicano che il calcitriolo viene prodotto anche in altri tessuti, dove regola la crescita cellulare, contrastando lo sviluppo dei tumori. Accanto alle forme 25-OH-D<sub>3</sub> e 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> sono noti più di 30 altri metaboliti che in massima parte non svolgono alcuna funzione fisiologica ma costituiscono soltanto prodotti di degradazione.

Assumendo integratori della meno efficace vitamina D<sub>2</sub>, attraverso la stessa reazione che produce la vitamina D<sub>3</sub> si producono lo stadio intermedio 25-OH-vitamina D<sub>2</sub> (25-idrossiergocalciferolo), rilevante dal

punto di vista diagnostico, e il metabolita attivo 1,25 (OH)<sub>2</sub> vitamina D<sub>2</sub>. In alcuni paesi, l'unico integratore ammesso per il trattamento delle carenze di vitamina D è la vitamina D<sub>2</sub>. In questi casi è di particolare importanza acquisire le due molecole, per escludere una scorretta valutazione del livello della vitamina D.

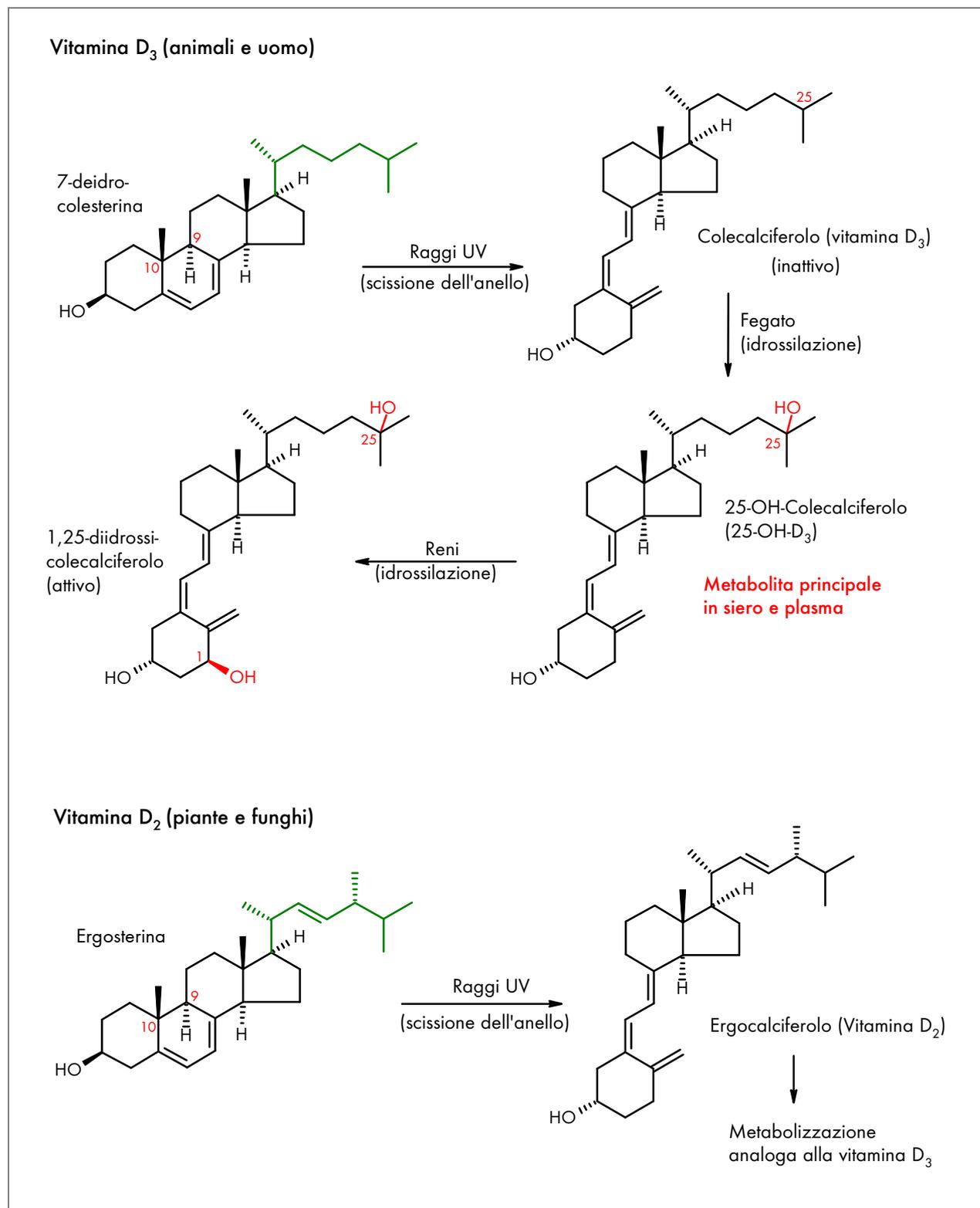


Figura 1: Biosintesi e metabolizzazione delle vitamine D

Poiché le forme epimeriche della 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> così come dei suoi metaboliti (v. Fig. 2) si presentano in quantità significative soprattutto nei bambini piccoli, si presume che ciò sia dovuto al metabolismo ancora immaturo della vitamina D. Le vie metaboliche non sono ancora state individuate con certezza.

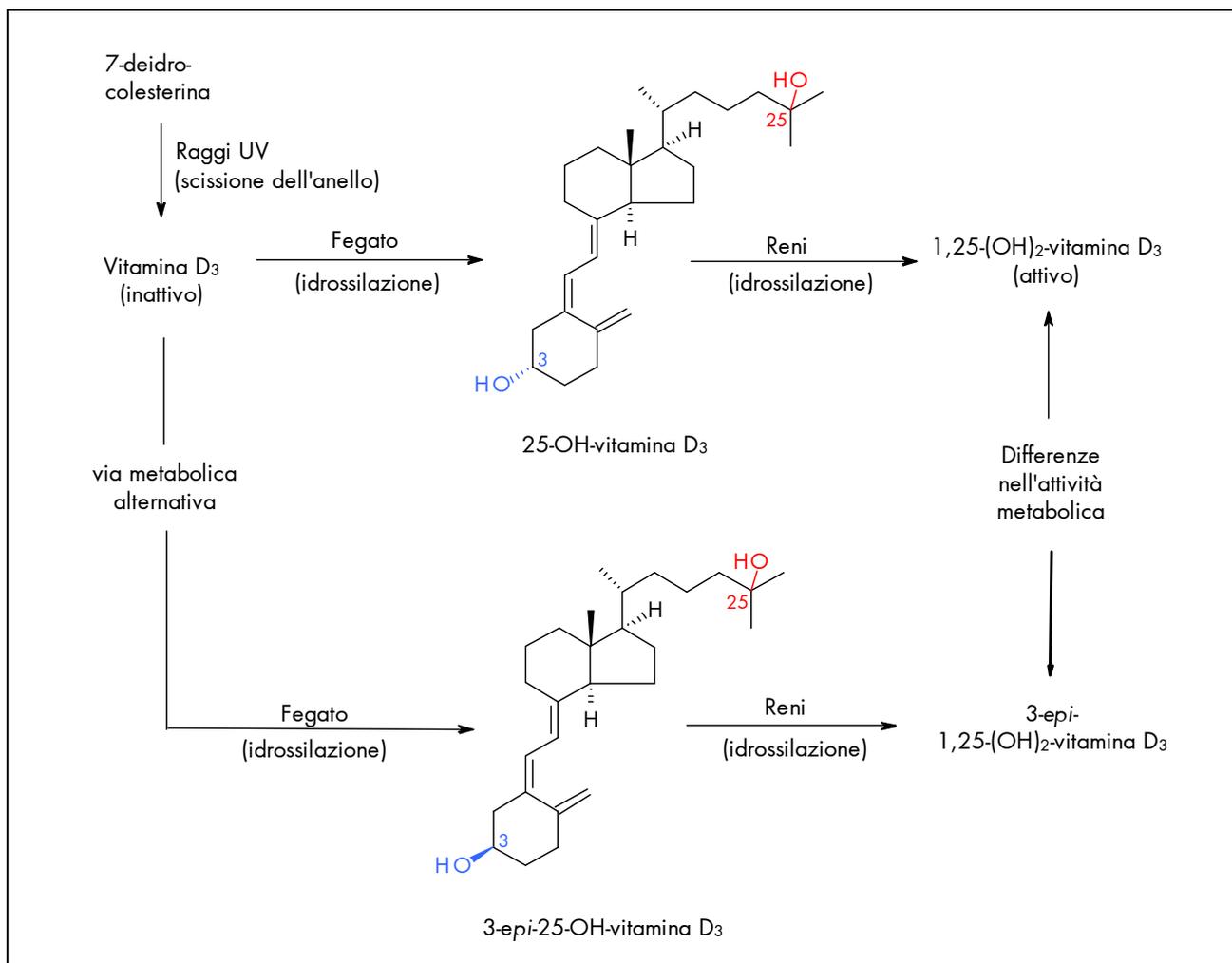


Figura 2: Biosintesi e metabolizzazione degli epimeri C3 in base all'esempio della 3-epi-25-OH-D<sub>3</sub>

## 2.2 Finalità applicative

Il kit di reagenti **MassChrom**<sup>®</sup> per l'analisi LC-MS/MS della 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> in siero e plasma è un prodotto per la diagnosi *in vitro* destinato ai laboratori chimici per la determinazione quantitativa dei metaboliti principali di vitamina D<sub>3</sub> e D<sub>2</sub>, 25-idrossicolecalciferolo e 25-idrossergocalciferolo, in campioni umani di plasma e siero mediante LC-MS/MS (cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa). Utilizzando l'accessorio per l'upgrade è possibile separare e determinare separatamente la 3-epi-25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub>. Il kit viene utilizzato come test in pazienti nei quali il tenore della vitamina D nelle urine assume valenza clinica.

## 2.3 Principio alla base del kit di reagenti

Questo kit di reagenti Chromsystems **MassChrom**<sup>®</sup> 25-OH-vitamina D<sub>3</sub> e D<sub>2</sub> (codice 62000) consente la determinazione specifica mediante LC-MS/MS del 25-idrossicolecalciferolo e 25-idrossiergocalciferolo come metaboliti principali della vitamina D<sub>3</sub> e D<sub>2</sub> in siero e plasma. Durante questo processo le forme epimeriche non vengono acquisite separatamente bensì insieme alla 25-OH-vitamina D<sub>3</sub> e/o alla 25-OH-vitamina D<sub>2</sub>.

La preparazione manuale dei campioni è limitata a una fase di precipitazione ad alta efficienza della proteina. L'arricchimento degli analiti e la separazione delle sostanze di disturbo avviene tramite una colonna di tipo "trap". Questa è collegata attraverso una valvola di commutazione flusso a 2 posizioni e 6 vie con la colonna analitica nella quale si svolge la separazione cromatografica. L'utilizzo di una fonte APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) per la ionizzazione e l'impiego di uno standard interno al deuterio garantiscono precisione affidabilità del metodo e riducono al minimo gli effetti matrice.

L'**Upgrade** per il **MassChrom**<sup>®</sup> per l'analisi della 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> consente la separazione dei metaboliti principali delle vitamine D<sub>3</sub> e D<sub>2</sub>, 25-idrossicolecalciferolo e 25-idrossiergocalciferolo, dalle loro forme epimeriche (3-*epi*-25-OH-vitamina D<sub>3</sub> e 3-*epi*-25-OH-vitamina D<sub>2</sub>) e quindi la loro quantificazione separata mediante LC-MS/MS.

Il **MassChrom**<sup>®</sup> 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> e 3-*epi*-25-OH-vitamina D<sub>3</sub> (codice 62062) consente la separazione dei metaboliti principali delle vitamine D<sub>3</sub> e D<sub>2</sub>, 25-idrossicolecalciferolo e 25-idrossiergo-calciferolo, dalle loro forme epimeriche 3-*epi*-25-OH-vitamina D<sub>3</sub> e 3-*epi*-25-OH-vitamina D<sub>2</sub>, nonché la quantificazione di 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> e 3-*epi*-25-OH-vitamina D<sub>3</sub> mediante LC-MS/MS.

La preparazione manuale del campione si limita come in precedenza a una semplice fase di precipitazione delle proteine ad alta efficienza. Come per la determinazione della 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub>, gli analiti vengono arricchiti utilizzando una colonna "trap" ONLINE e vengono quindi separati i componenti della matrice. Tramite una semplice valvola di commutazione, la colonna "trap" è collegata a una speciale colonna analitica ad alta risoluzione che consente la separazione cromatografica e la successiva purificazione di tutti gli analiti. Il metodo si distingue per l'uso della tecnica APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) e dello standard interno marcato con isotopi specifico per le forme epimeriche. Ciò consente di ridurre al minimo gli effetti matrice („soppressione ionica") e di ottimizzare la precisione e affidabilità del metodo. Il nuovo standard di calibrazione Multilevel (**3PLUS1**<sup>®</sup>, codice 62029) contiene inoltre le due forme epimeriche della 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> e garantisce una elevata precisione dei risultati.

### 3 Sistema LC-MS/MS

**Attenzione:**

Quando si manipolano i reagenti, consultare le avvertenze sulle sostanze pericolose all'allegato II.

Per la determinazione LC-MS/MS della 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> in siero e plasma senza o con l'acquisizione separata delle forme epimeriche occorrono un sistema di pompa HPLC, un campionatore automatico, una valvola di commutazione flusso comandabile tramite software e uno spettrometro di massa tandem (MS/MS) sufficientemente sensibile.

Mantenere le fasi mobili chiuse o coperte anche durante il funzionamento. Gli estratti dei campioni vengono purificati tramite una colonna di tipo "trap"; successivamente ha luogo la separazione degli analiti in una colonna analitica.

#### 3.1 Sistemi LC-MS/MS per il kit di reagenti *MassChrom*<sup>®</sup> 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> in siero/plasma (codice 62000)

Di seguito sono descritte due possibili configurazioni per HPLC, che si differenziano per i sistemi di pompa e le valvole di commutazione di flusso.

Nella configurazione che utilizza due pompe isocratiche HPLC (v. cap. 3.1.1) i volumi morti delle pompe HPLC non hanno alcuna influenza sullo svolgimento dell'analisi.

Nella configurazione con un sistema HPLC a gradiente binario (v. cap. 3.1.2) i volumi morti provocano invece variazioni dei tempi di ritenzione. Se il volume morto è notevole occorrerà quindi prolungare di conseguenza il tempo di misurazione.

##### 3.1.1 Parametri HPLC utilizzando due pompe HPLC isocratiche

Questi parametri HPLC sono stati testati in combinazione con spettrometri di massa AB SCIEX e Thermo Scientific. Occorrono 2 pompe isocratiche e una valvola di commutazione di flusso a 2 posizioni e 6 vie.

**Parametri strumentali**

Volume d'iniezione:	≤ 50 µl (a seconda dello spettrometro di massa usato)
Durata dell'analisi:	5,0 min
Fasi mobili utilizzate:	Mobile Phase A (codice 62001) e Mobile Phase B (codice 62002)
Colonne utilizzate:	colonna "trap" (codice 62110) e colonna analitica (codice 62100)
Temperatura colonna:	temperatura ambiente (+20...+25 °C)
Soluzione di lavaggio dell'iniettore:	Rinsing Solution (codice 62009)

Per definire il volume di iniezione ottimale, iniettare volumi crescenti (fino a un massimo di 50 µl) di uno standard di calibrazione 1 precedentemente preparato (codice 62028/1, 62039/1) fino a ottenere la necessaria grandezza del picco e un rapporto segnale-rumore sufficiente. Quindi, verificare tramite le rette di calibrazione se tutti gli analiti producono una risposta lineare sull'intero intervallo di misurazione.

Tabella 1: Gradiente di flusso

Tempo	Flusso Mobile Phase A*	Tempo	Flusso Mobile Phase B
0,00 min	1,00 ml/min	0,00 min	0,60 ml/min
1,00 min	1,00 ml/min	2,60 min	0,60 ml/min
1,01 min	0,02 ml/min	2,61 min	1,00 ml/min
3,00 min	0,02 ml/min	4,98 min	1,00 ml/min
3,01 min	1,00 ml/min	4,99	0,60 ml/min

\* Facoltativo: In alternativa la fase mobile A può essere pompata a una velocità di flusso costante di 1,0 ml/min, con un consumo relativamente maggiore.

### Commutazione della colonna

Con la valvola in posizione "A" la colonna "trap" viene caricata con l'estratto del campione, mentre la colonna analitica viene equilibrata.

Portando la valvola sulla posizione "B" gli analiti vengono eluiti dalla colonna "trap" nella colonna analitica e qui separati dalle sostanze di disturbo tramite cromatografia.

Infine, riportando la valvola in posizione "A", la colonna "trap" viene preparata per l'iniezione successiva, mentre la colonna analitica viene lavata e equilibrata.

Tabella 2: Posizione valvola

Tempo	Posizione valvola
0,00 min	A
1,00 min	B
2,20 min	A

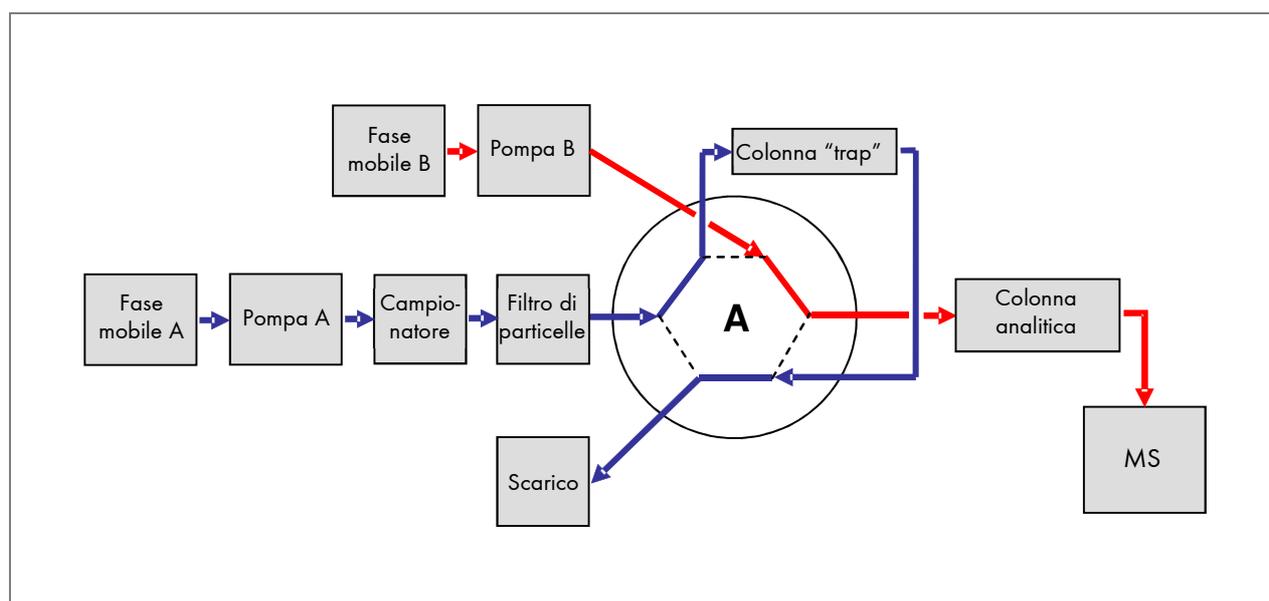


Figura 3: Posizione valvola "A": Caricamento della colonna "trap", equilibratura/lavaggio della colonna analitica

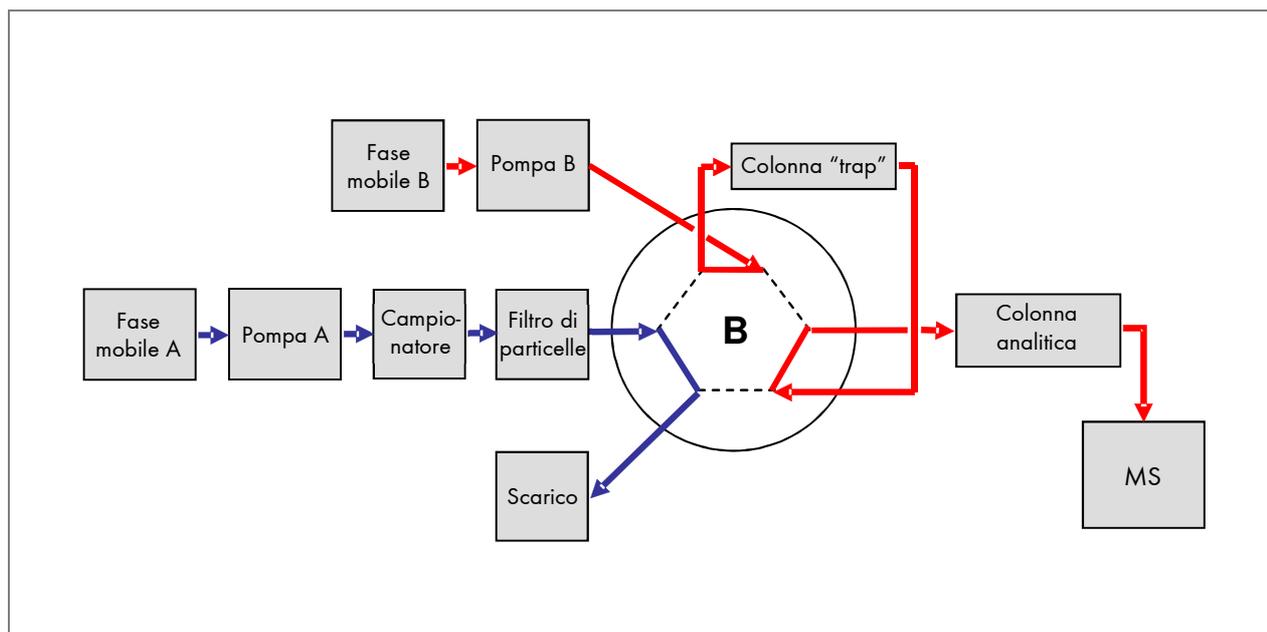


Figura 4: Posizione valvola "B":  
Eluizione degli analiti dalla colonna "trap" sulla colonna analitica, separazione cromatografica

### 3.1.2 Parametri HPLC utilizzando un sistema HPLC a gradiente binario

Questi parametri HPLC sono stati testati in combinazione con spettrometri di massa Waters Corporation. Occorrono 1 pompa a gradiente binario e una valvola di commutazione di flusso a 2 posizioni e 6 vie.

#### Parametri strumentali

Volume d'iniezione:	≤ 50 µl (a seconda dello spettrometro di massa usato)
Durata dell'analisi:	6,0 min
Fasi mobili utilizzate:	Mobile Phase A (codice 62001) e Mobile Phase B (codice 62002)
Colonne utilizzate:	colonna "trap" (codice 62110) e colonna analitica (codice 62100)
Temperatura colonna:	temperatura ambiente (+20...+25 °C)
Soluzione di lavaggio dell'iniettore:	Rinsing Solution (codice 62009)

Per definire il volume di iniezione ottimale, iniettare volumi crescenti (fino a un massimo di 50 µl) di uno standard di calibrazione 1 precedentemente preparato (codice 62028/1, 62039/1) fino a ottenere la necessaria grandezza del picco e un rapporto segnale-rumore sufficiente. Quindi, verificare tramite le rette di calibrazione se tutti gli analiti producono una risposta lineare sull'intero intervallo di misurazione.

#### Composizione del gradiente

Il gradiente indicato va utilizzato solo come base da cui procedere all'ottimizzazione. Poiché i volumi morti variano da sistema a sistema, può essere eventualmente necessario adeguare la composizione del gradiente.

Tabella 3: Gradiente

Tempo	Mobile Phase A	Mobile Phase B	Flusso
0,00 min	100 %	0 %	1,00 ml/min
1,00 min	100 %	0 %	1,00 ml/min
1,01 min	0 %	100 %	0,6 ml/min
3,00 min	0 %	100 %	0,6 ml/min
3,01 min	0 %	100 %	1,00 ml/min
5,50 min	0 %	100 %	1,00 ml/min
5,51 min	100 %	0 %	1,00 ml/min

**Commutazione della colonna**

In posizione "A" la colonna trappola viene caricata con l'estratto del campione.

Portando la valvola sulla posizione "B" gli analiti vengono eluiti dalla colonna trappola nella colonna analitica e qui separati dalle sostanze di disturbo tramite cromatografia. Al termine, con la valvola in posizione "A", la colonna trappola viene preparata per l'iniezione successiva.

I tempi di commutazione dovranno eventualmente essere adeguati in base ai volumi morti del sistema HPLC. I valori indicati nella seguente tabella vanno pertanto utilizzati solo come base da cui procedere all'ottimizzazione.

Tabella 4: Posizione valvola

Tempo	Posizione valvola
0,00 min	A
1,30 min	B
5,50 min	A

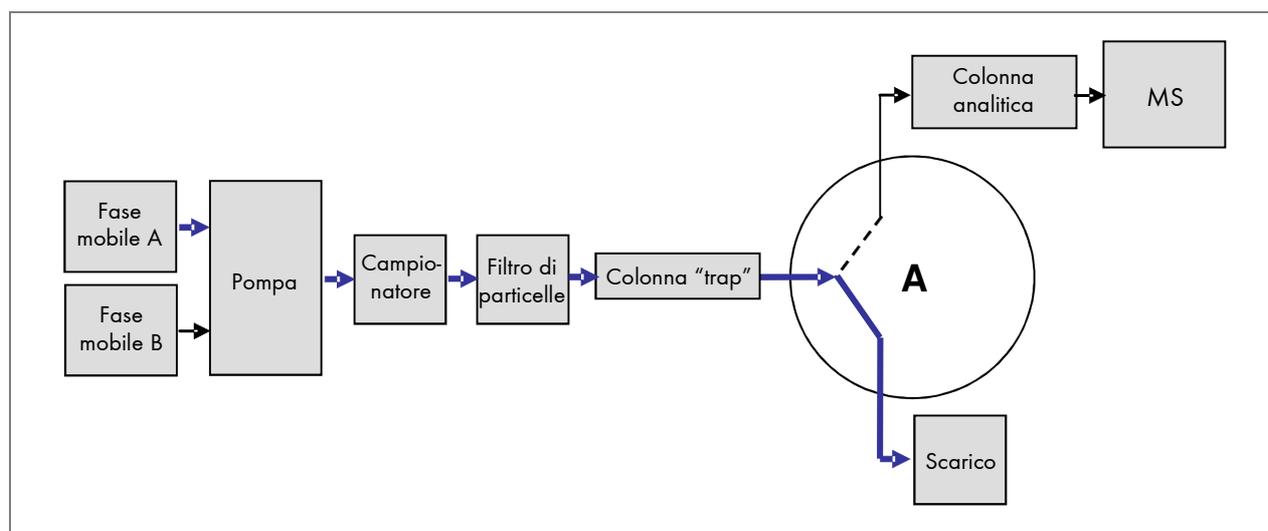


Figura 5: Posizione valvola "A": Caricamento della colonna "trap"

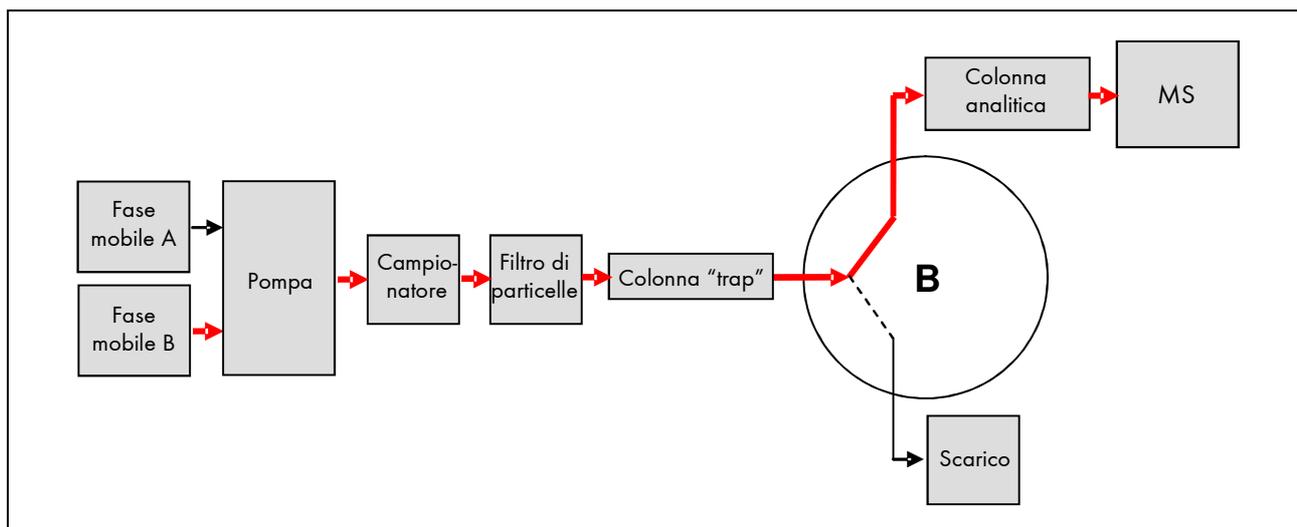


Figura 6: Posizione valvola "B":  
Eluizione degli analiti dalla colonna "trap" sulla colonna analitica, separazione cromatografica

### 3.2 Sistemi LC-MS/MS per l'Upgrade per 3-epi-25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub>

Di seguito sono descritte due possibili configurazioni HPLC che si differenziano dal punto di vista delle pompe e delle valvole di commutazione utilizzate.

La configurazione che utilizza una pompa binaria e una pompa HPLC isocratica aggiuntiva (v. cap. 3.2.1) non è soggetta ai problemi generati dai volumi morti tipici delle pompe per HPLC.

Per contro, nella configurazione che utilizza un sistema HPLC a gradiente binario (v. cap. 3.2.2) può verificarsi uno spostamento dei tempi di ritenzione dovuto ai volumi morti. Se il volume morto è relativamente elevato, può essere necessario aumentare il tempo di misurazione.

#### 3.2.1 Parametri HPLC utilizzando un sistema HPLC a gradiente binario con pompa isocratica aggiuntiva

Questi parametri HPLC sono stati testati in combinazione con uno spettrometro di massa AB SCIEX. Sono state utilizzate una pompa a gradiente binario, una pompa isocratica e una valvola di commutazione a 2 posizioni e 6 vie.

##### Parametri strumentali

Volume d'iniezione:	≤ 50 µl (a seconda dello spettrometro di massa utilizzato)
Durata dell'analisi:	8,5 min
Fasi mobili utilizzate:	Mobile Phase A (codice 62001) e Mobile Phase B (codice 62002)
Colonne utilizzate:	Colonna "trap" (codice 62110/Epi) e colonna analitica (codice 62120)
Temperatura colonna (analitica):	+40 °C
Soluzione di lavaggio ago iniettore:	Rinsing Solution (codice 62009)

Per definire il volume di iniezione ottimale, iniettare volumi crescenti (fino a un massimo di 50 µl) di uno standard di calibrazione 1 precedentemente preparato (codice 62029/1) fino a ottenere la necessaria grandezza del picco e un rapporto segnale-rumore sufficiente. Quindi, verificare tramite le rette di calibrazione se tutti gli analiti producono una risposta lineare sull'intero intervallo di misurazione.

Tabella 5: Gradiente di flusso, pompa isocratica

Tempo	Flusso, Mobile Phase A*
0,00 min	1,00 ml/min
0,50 min	1,00 ml/min
0,51 min	0,02 ml/min
8,00 min	0,02 ml/min
8,01 min	1,00 ml/min

\* Opzione: In alternativa, la Mobile Phase A può essere pompata a una velocità costante di 1,0 ml/min, con un aumento del consumo

Tabella 6: Gradiente di flusso, pompa gradiente

Tempo	Mobile Phase A	Mobile Phase B	Flusso
0,00 min	36 %	64 %	0,50 ml/min
6,00 min	36 %	64 %	0,50 ml/min
6,01 min	0 %	100 %	0,50 ml/min
8,00 min	0 %	100 %	0,50 ml/min
8,01 min	36 %	64 %	0,50 ml/min

### Commutazione della colonna

Con la valvola in posizione "A", la colonna "trap" viene caricata con l'estratto del campione, mentre la colonna analitica viene equilibrata.

Dopo la commutazione sulla posizione "B" gli analiti vengono eluiti dalla colonna "trap" alla colonna analitica e qui separati per via cromatografica dalle interferenze.

Infine, con la valvola in posizione "A", la colonna "trap" viene preparata per l'iniezione successiva, mentre la colonna analitica viene lavata ed equilibrata.

Tabella 7: Posizione valvola

Tempo	Posizione valvola
0,00 min	A
0,50 min	B
1,70 min	A

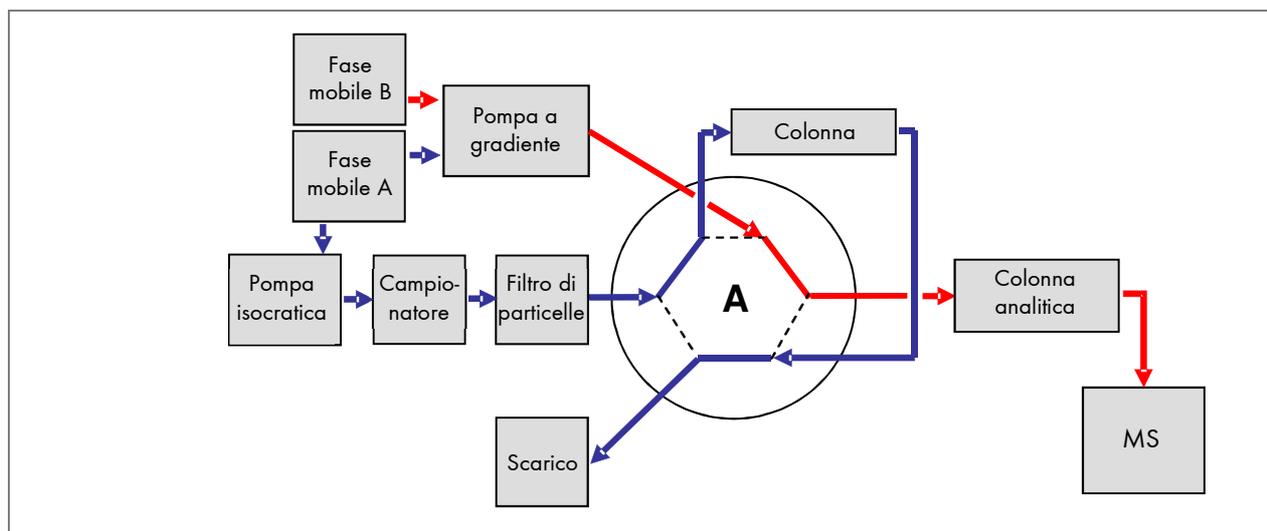


Figura 7: Posizione valvola "A":  
Caricamento della colonna "trap", equilibratura/lavaggio della colonna analitica

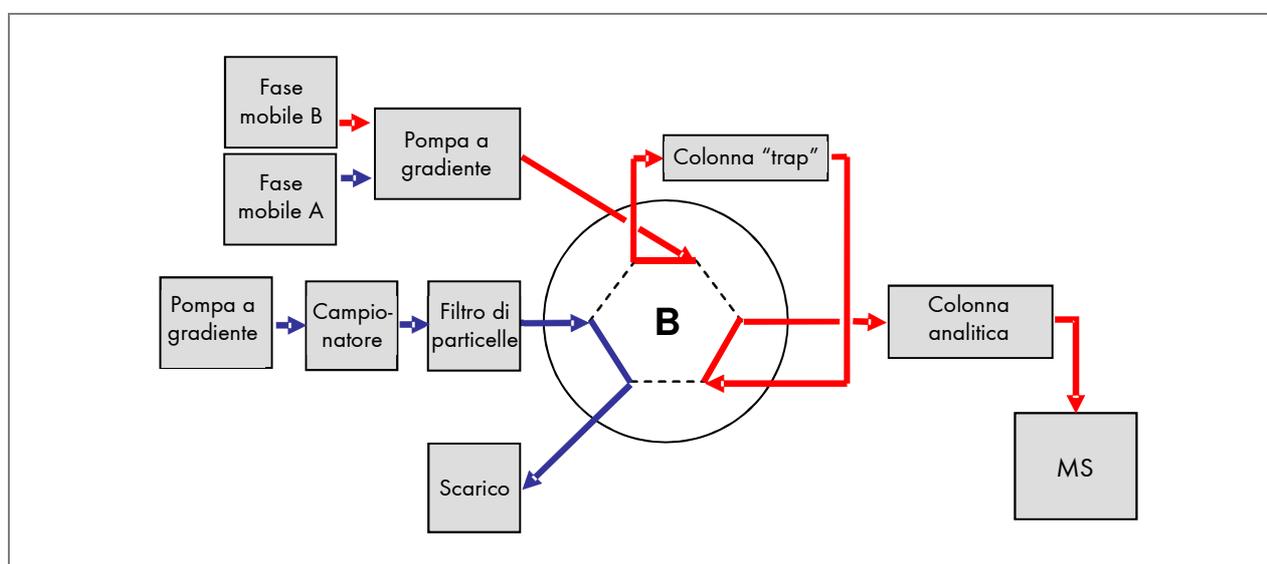


Figura 8: Posizione valvola "B":  
Eluizione degli analiti dalla colonna "trap" sulla colonna analitica, separazione cromatografica

### 3.2.2 Parametri HPLC utilizzando un sistema HPLC a gradiente binario

Questi parametri HPLC sono stati testati in combinazione con uno spettrometro di massa AB SCIEX. Occorrono una pompa a gradiente binario e una valvola di commutazione di flusso a 2 posizioni e 6 vie.

#### Parametri strumentali

Volume d'iniezione:	≤ 50 µl (a seconda dello spettrometro di massa usato)
Durata dell'analisi:	10,0 min
Fasi mobili utilizzate:	Mobile Phase A (codice 62001) e Mobile Phase B (codice 62002)
Colonne utilizzate:	colonna "trap" (codice 62110/Epi) e colonna analitica (codice 62120)
Temperatura colonna (analitica):	+40 °C
Soluzione di lavaggio dell'iniettore:	Rinsing Solution (codice 62009)

Per definire il volume di iniezione ottimale, iniettare volumi crescenti (fino a un massimo di 50 µl) di uno standard di calibrazione 1 precedentemente preparato (codice 62029/1) fino a ottenere la necessaria

grandezza del picco e un rapporto segnale-rumore sufficiente. Quindi, verificare tramite le rette di calibrazione se tutti gli analiti producono una risposta lineare sull'intero intervallo di misurazione.

### Composizione del gradiente

Il gradiente indicato va utilizzato solo come base da cui procedere all'ottimizzazione. Poiché i volumi morti variano da sistema a sistema, può essere eventualmente necessario adeguare la composizione del gradiente.

Tabella 8: Gradiente

Tempo	Mobile Phase A	Mobile Phase B	Flusso
0,00 min	100 %	0 %	1,00 ml/min
0,05 min	100 %	0 %	1,00 ml/min
0,06 min	36 %	64 %	0,50 ml/min
6,00 min	36 %	64 %	0,50 ml/min
6,01 min	0 %	100 %	0,50 ml/min
8,00 min	0 %	100 %	0,50 ml/min
8,01 min	36 %	64 %	0,50 ml/min
9,50 min	36 %	64 %	0,50 ml/min
9,51 min	100 %	0 %	1,00 ml/min

### Commutazione della colonna

In posizione "A" la colonna "trap" viene caricata con l'estratto del campione. Commutando la valvola sulla posizione "B" gli analiti vengono eluiti dalla colonna "trap" nella colonna analitica e qui separati dalle sostanze di disturbo tramite cromatografia. Al termine, con la valvola in posizione "A", la colonna trappola viene preparata per l'iniezione successiva.

I tempi di commutazione dovranno eventualmente essere adeguati in base ai volumi morti del sistema HPLC. I valori indicati nella seguente tabella vanno pertanto utilizzati solo come base da cui procedere all'ottimizzazione.

Tabella 9: Posizione valvola

Tempo	Posizione valvola
0,00 min	A
1,00 min	B
9,50 min	A

Per lo schema del sistema si veda il paragrafo 3.1.2.

### 3.3 Sistemi LC-MS/MS per il kit di reagenti *MassChrom*<sup>®</sup> 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> e 3-epi-25-OH-vitamina D<sub>3</sub> in siero e plasma (codice 62062)

Di seguito sono descritte due possibili configurazioni HPLC che si differenziano dal punto di vista delle pompe e delle valvole di commutazione utilizzate.

La configurazione che utilizza una pompa binaria e una pompa HPLC isocratica aggiuntiva (v. cap. 3.3.1) non è soggetta ai problemi generati dai volumi morti tipici delle pompe per HPLC.

Per contro, nella configurazione che utilizza un sistema HPLC a gradiente binario (v. cap. 3.3.2) può verificarsi uno spostamento dei tempi di ritenzione dovuto ai volumi morti. Se il volume morto è relativamente elevato, può essere necessario aumentare il tempo di misurazione.

#### 3.3.1 Parametri HPLC utilizzando un sistema HPLC a gradiente binario con pompa isocratica aggiuntiva

Questi parametri HPLC sono stati testati in combinazione con uno spettrometro di massa di Waters Corporation. Sono state utilizzate una pompa a gradiente binario, una pompa isocratica e una valvola di commutazione a 2 posizioni e 6 vie.

##### Parametri strumentali

Volume d'iniezione:	≤ 50 µl (a seconda dello spettrometro di massa utilizzato)
Durata dell'analisi:	3,25 min
Fasi mobili utilizzate:	Mobile Phase A (codice 62011) e Mobile Phase B (codice 62022)
Colonne utilizzate:	Colonna tipo "trap" (codice 62110/Epi) e colonna analitica (codice 62130)
Temperatura colonna (analitica):	+40 °C
Soluzione di lavaggio dell'iniettore:	Rinsing Solution (codice 62009)

Per definire il volume di iniezione ottimale, iniettare volumi crescenti (fino a un massimo di 50 µl) di uno standard di calibrazione 1 precedentemente preparato (codice 62029/1) fino a ottenere la necessaria grandezza del picco e un rapporto segnale-rumore sufficiente. Quindi, verificare tramite le rette di calibrazione se tutti gli analiti producono una risposta lineare sull'intero intervallo di misurazione.

Tabella 10: Gradiente di flusso, pompa isocratica

Tempo	Flusso, Mobile Phase A*
0,00 min	0,20 ml/min
0,01 min	2,00 ml/min
0,50 min	2,00 ml/min
0,51 min	0,02 ml/min
3,00 min	0,02 ml/min
3,01 min	2,00 ml/min
3,20 min	2,00 ml/min
3,21 min	0,20 ml/min

\* Opzione: In alternativa, la Mobile Phase A può essere pompata a una velocità costante di 2,0 ml/min, con un aumento del consumo di fase

Tabella 11: Gradiente di flusso, pompa gradiente

Tempo	Mobile Phase A	Mobile Phase B	Flusso
0,00 min	34 %	66 %	0,20 ml/min
0,01 min	34 %	66 %	0,75 ml/min
2,60 min	34 %	66 %	0,75 ml/min
2,61 min	0 %	100 %	0,75 ml/min
3,20 min	0 %	100 %	0,75 ml/min
3,21 min	34 %	66 %	0,20 ml/min

### Commutazione della colonna

Con la valvola in posizione "A", la colonna "trap" viene caricata con l'estratto del campione, mentre la colonna analitica viene equilibrata.

Dopo la commutazione sulla posizione "B" gli analiti vengono eluiti dalla colonna "trap" alla colonna analitica e qui separati per via cromatografica dalle interferenze.

Infine, con la valvola in posizione "A", la colonna "trap" viene preparata per l'iniezione successiva, mentre la colonna analitica viene lavata ed equilibrata.

Tabella 12: Posizione valvola

Tempo	Posizione valvola
0,00 min	A
0,50 min	B
3,00 min	A

La struttura schematica del sistema corrisponde al punto 3.2.1.

### 3.3.2 Parametri HPLC utilizzando un sistema HPLC a gradiente binario

Questi parametri HPLC sono stati testati in combinazione con uno spettrometro di massa SCIEX. Occorrono una pompa a gradiente binario e una valvola di commutazione di flusso a 2 posizioni e 6 vie.

#### Regolazioni dello strumento

Volume d'iniezione:	≤ 50 µl (a seconda dello spettrometro di massa utilizzato)
Durata dell'analisi:	3,9 min
Fasi mobili utilizzate:	Mobile Phase A (codice 62011) e Mobile Phase B (codice 62022)
Colonne utilizzate:	Colonna "trap" (codice 62110/Epi) e colonna analitica (codice 62130)
Temperatura colonna (analitica):	+40 °C
Soluzione di lavaggio dell'iniettore:	Rinsing Solution (codice 62009)

Per definire il volume di iniezione ottimale, iniettare volumi crescenti (fino a un massimo di 50 µl) di uno standard di calibrazione 1 precedentemente preparato (codice 62029/1) fino a ottenere la necessaria grandezza del picco e un rapporto segnale-rumore sufficiente. Quindi, verificare tramite le rette di calibrazione se tutti gli analiti producono una risposta lineare sull'intero intervallo di misurazione.

#### Composizione del gradiente

Il gradiente indicato va utilizzato solo come base da cui procedere all'ottimizzazione. Poiché i volumi morti variano da sistema a sistema, può essere eventualmente necessario adeguare la composizione del gradiente.

Tabella 13: Gradiente

Tempo	Mobile Phase A	Mobile Phase B	Flusso
0,00 min	100 %	0 %	0,20 ml/min
0,01 min	100 %	0 %	2,00 ml/min
0,50 min	100 %	0 %	2,00 ml/min
0,51 min	34 %	66 %	0,75 ml/min
2,90 min	34 %	66 %	0,75 ml/min
2,91 min	0 %	100 %	0,75 ml/min
3,50 min	0 %	100 %	0,75 ml/min
3,51 min	34 %	66 %	0,75 ml/min
3,70 min	34 %	66 %	0,75 ml/min
3,71 min	100 %	0 %	2,00 ml/min
3,88 min	100 %	0 %	2,00 ml/min
3,89 min	100 %	0 %	0,20 ml/min

#### Commutazione della colonna

In posizione "A" la colonna "trap" viene caricata con l'estratto del campione. Commutando la valvola sulla posizione "B" gli analiti vengono eluiti dalla colonna "trap" nella colonna analitica e qui separati dalle sostanze di disturbo tramite cromatografia. Al termine, con la valvola in posizione "A", la colonna trappola viene preparata per l'iniezione successiva.

I tempi di commutazione dovranno eventualmente essere adeguati in base ai volumi morti del sistema HPLC. I valori indicati nella seguente tabella vanno pertanto utilizzati solo come base da cui procedere all'ottimizzazione.

Tabella 14: Posizione valvola

Tempo	Posizione valvola
0,00 min	A
0,50 min	B
3,70 min	A

La struttura schematica del sistema corrisponde al punto 3.1.2.

### 3.4 Misurazione MS/MS

#### Fondamenti del metodo di misurazione

Lo spettrometro di massa analizza le molecole distinguendole in funzione del rapporto massa/carica ( $m/z$ ). A tal fine gli analiti devono essere dapprima ionizzati e trasferiti nella fase gassosa. Per le sostanze apolari, come i metaboliti della vitamina D, si è dimostrata particolarmente utile, per produrre gli ioni, la ionizzazione chimica (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation, APCI).

In spettrometria di massa MS/MS a triplo quadrupolo si utilizzano varie modalità di misurazione. Il presente metodo utilizza esclusivamente il Multiple Reaction Monitoring.

#### Multiple Reaction Monitoring (MRM):

In modalità MRM, il primo e il secondo quadrupolo vengono impostati staticamente su uno specifico rapporto massa/carica ( $m/z$ ). Nell'MS 1 viene discriminato lo ione molecolare dell'analita, mentre gli ioni con un altro rapporto massa/carica sono esclusi. Nella camera di collisione lo ione molecolare si frammenta e l'MS 2 rileva uno ione frammentato caratteristico. La modalità MRM offre una sensibilità e selettività di quantificazione particolarmente elevata.

### 3.5 Ottimizzazione delle transizioni MRM (tuning)

Si raccomanda di verificare la precisione e la risoluzione del sistema MS/MS su misure di massa esatta. Nel caso in cui la precisione del sistema rispetto a misure di massa esatte e risoluzione si situino al di fuori delle specifiche del produttore dello strumento, si raccomanda una ri-calibrazione dello spettrometro di massa. Al termine, ottimizzare le transizioni MRM come segue:

1. Infondere il Tuning Mix (codice 62015 oppure codice 62016 per la determinazione degli epimeri) con la pompa ad infusione tramite un raccordo a T con un flusso di 5-20  $\mu\text{l}/\text{min}$  (0,6 ml/min per la Mobile Phase B o 0,5 ml/min per la Mobile Phase A/B 36/64 V/V o 0,75 ml/min per la Mobile Phase A/B 34/66 V/V). Se necessario, il Tuning Mix può essere diluito con la fase mobile B.
2. determinare con Q1 Scan (MS Scan) le posizioni esatte dei segnali massimi delle masse MS1 (ioni genitore) almeno fino a una cifra decimale dopo la virgola.
3. determinare le posizioni esatte dei segnali massimi delle masse MS2 (ioni figli) mediante scansione degli ioni prodotti almeno fino a una cifra decimale dopo la virgola.
4. ottimizzare i parametri specifici per ogni singola transizione MRM (ad es. energia di collisione).
5. in base alle transizioni MRM rilevate, ottimizzare i parametri globali della sorgente ionica, in particolare i voltaggi del capillare, la temperatura e i flussi dei diversi gas.

Per una corretta messa a punto dell'apparecchio, leggere accuratamente le istruzioni per l'uso del sistema LC-MS/MS installato. Per qualsiasi chiarimento, rivolgersi alla casa produttrice dell'apparecchio; eventualmente può essere necessario frequentare un corso di formazione della casa produttrice dell'apparecchio.

### 3.6 Messa in esercizio

Prima di cominciare la serie di analisi, preparare il sistema LC-MS/MS come segue:

1. equilibrare il sistema per 10 min alle condizioni iniziali del metodo
2. iniettare più volte un controllo **MassCheck**<sup>®</sup> preparato (codice 0222, 0223, 0256, 0311, 0312) fino a ottenere tempi di ritenzione e intensità di segnale degli analiti pressoché identici
3. avviare la sequenza di analisi.

Per un corretto uso del sistema LC-MS/MS seguire le istruzioni fornite con il sistema. In caso di dubbio, rivolgersi alla casa produttrice dell'apparecchio; può essere necessaria una formazione impartita dal fornitore.

### 3.7 Messa a riposo temporanea

In caso d'interruzioni temporanee si consiglia di spegnere la pompa HPLC: non si prevede una cristallizzazione di sali sulle guarnizioni dei pistoni della pompa. Per risparmiare la sorgente e il fotomoltiplicatore, impostare il sistema MS/MS in modalità standby. Lasciando in funzione le pompe a vuoto del sistema LC-MS/MS.

## 4 Transizioni di massa

### 4.1 Transizioni di massa per la determinazione di 25-OH-D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub>

Tutte le sostanze vengono misurate in modalità di ionizzazione positiva mediante APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation).

La seguente tabella contiene le transizioni di massa validate per gli analiti e lo standard interno deuterato (MRM 1). La MRM 2 della 25-OH-vitamina D<sub>3</sub> (383 → 229) è validata e può essere utilizzata per la quantificazione in caso di disturbo della MRM 1 (v. capitolo 14). La seconda transizione di massa (MRM 2) della 25-OH-vitamina D<sub>2</sub> e dello standard interno può essere utilizzata come qualificatore, ma non è validata.

Tabella 15: Transizioni di massa raccomandate per spettrometri di AB SCIEX, Agilent et Thermo Scientific

Analita/standard interno	MRM 1	MRM 2
25-OH-vitamina D <sub>3</sub>	383 → 257	383 → 229
25-OH-vitamina D <sub>2</sub>	395 → 269	395 → 251
Standard interno	389 → 263	389 → 229

Durante la ionizzazione delle molecole dell'analita viene scissa una molecola d'acqua. Le masse di partenza non sono quindi gli ioni quasi molecolari  $[MH]^+$ , bensì  $[MH-18]^+$ .

La seguente tabella contiene le transizioni di massa validate per gli analiti e lo standard interno deuterato (MRM 1) quando si utilizza un sistema Waters ACQUITY® TQD. Per ciascuna di esse è indicata anche una seconda transazione di massa (MRM 2) che può essere utilizzata come *qualifier* ma non è validata.

Tabella 16: Transizioni di massa raccomandate per i sistemi Waters ACQUITY® TQD

Analita/standard interno	MRM 1	MRM 2
25-OH-vitamina D3	401 → 159	401 → 365
25-OH-vitamina D2	413 → 355	413 → 83
Standard interno	407 → 159	407 → 371

Le masse nominali indicate vanno considerate solo come punti di partenza da cui procedere all'ottimizzazione. La posizione precisa delle masse esatte varia leggermente da sistema a sistema e deve essere determinata nell'ambito della messa a punto del metodo. Per l'allestimento del metodo si raccomanda di definire la posizione delle masse almeno fino a un decimale dopo la virgola. A tal fine utilizzare il Tuning Mix (codice 62015, v. Capitolo 3.5: Ottimizzazione delle transizioni MRM).

Per qualsiasi domanda riguardante l'implementazione del metodo sul Vostro sistema LC-MS/MS, si prega di rivolgersi al nostro Servizio assistenza Chromsystems, chiamando la nostra hotline (+49 89 18930-111) o inviando una mail a [support@chromsystems.com](mailto:support@chromsystems.com).

## 4.2 Transizioni di massa per l'Upgrade

Tutte le sostanze vengono misurate in modalità di ionizzazione positiva mediante APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation).

La seguente tabella contiene le transizioni di massa suggerite per gli analiti e lo standard interno deuterato (MRM 1). Per ciascuna di esse è indicata anche una seconda transazione di massa (MRM 2) che può essere utilizzata come *qualifier* ma non è validata.

Tabella 17: Transizioni di massa raccomandate per spettrometri di AB SCIEX

Analita/standard interno	Standard interno utilizzato	MRM 1	MRM 2
25-OH-vitamina D3	ISTD 1	383 → 257	383 → 229
3-epi-25-OH-vitamina D3	ISTD 2	383 → 257	383 → 229
25-OH-vitamina D2	ISTD 2	395 → 269	395 → 251
3-epi-25-OH-vitamina D2	ISTD 2	395 → 269	395 → 251
Standard interno 1	—	386 → 257	386 → 232
Standard interno 2	—	386 → 257	386 → 232

Durante la ionizzazione della molecola dell'analita viene scissa una molecola d'acqua. Le masse di partenza non sono pertanto ioni molecolari  $[MH]^+$ , bensì  $[MH-18]^+$ .

Le masse nominali indicate vanno considerate solo come punti di partenza da cui procedere all'ottimizzazione. La posizione precisa delle masse esatte varia leggermente da sistema a sistema e deve essere determinata nell'ambito della messa a punto del metodo. Per l'allestimento del metodo si

raccomanda di definire la posizione delle masse almeno fino a un decimale dopo la virgola. A tal fine utilizzare il Tuning Mix (codice 62016, v. Capitolo 3.5: Ottimizzazione delle transizioni MRM).

Per qualsiasi domanda riguardante l'implementazione del metodo sul Vostro sistema LC-MS/MS, si prega di rivolgersi al nostro servizio assistenza Chromsystems, chiamando la nostra hotline (+49 89 18930-111) o inviando una mail a support@chromsystems.com.

### 4.3 Transizioni di massa per *MassChrom*<sup>®</sup> 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> e 3-*epi*-25-OH-vitamina D<sub>3</sub> in siero e plasma (codice 62062)

Tutte le sostanze vengono misurate in modalità di ionizzazione positiva mediante APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation).

La seguente tabella contiene le transizioni di massa suggerite per gli analiti e lo standard interno deuterato (MRM 1). Per ciascuna di esse è indicata anche una seconda transazione di massa (MRM 2) che può essere utilizzata come *qualifier* ma non è validata.

Tabella 18: Transizioni di massa raccomandate

Analita/ Standard interno	Standard interno utilizzato	MRM 1	MRM 2
25-OH-vitamina D <sub>3</sub>	ISTD 1	383 → 257	383 → 229
3- <i>epi</i> -25-OH-vitamina D <sub>3</sub>	ISTD 2	383 → 257	383 → 229
25-OH-vitamina D <sub>2</sub>	ISTD 2	395 → 269	395 → 251
Standard interno 1	—	386 → 257	386 → 232
Standard interno 2	—	386 → 257	386 → 232

Durante la ionizzazione della molecola dell'analita viene scissa una molecola d'acqua. Le masse di partenza non sono pertanto ioni molecolari [MH]<sup>+</sup>, bensì [MH-18]<sup>+</sup>.

Le masse nominali indicate sono da intendersi come punti di partenza per l'ottimizzazione. La posizione precisa delle masse esatte può variare leggermente da sistema MS a sistema MS e deve essere determinata con precisione nell'ambito della messa a punto del metodo. Per l'implementazione del metodo si raccomanda di identificare la posizione della massa di ciascun analita specificando almeno una cifra decimale dopo la virgola. A questo scopo utilizzare la Tuning Mix (codice 62016, v. capitolo 3.5: Ottimizzazione delle transizioni MRM).

Per qualsiasi domanda riguardante l'implementazione del metodo sul Vostro sistema LC-MS/MS, si prega di rivolgersi al nostro servizio assistenza Chromsystems, chiamando la nostra hotline (+49 89 18930-111) o inviando una mail a support@chromsystems.com.

## 5 Preparazione dei campioni

### Attenzione:

Quando si manipolano i reagenti, consultare le avvertenze sulle sostanze pericolose all'allegato II.

### 5.1 Raccolta e conservazione dei campioni dei pazienti

L'analisi viene condotta su siero o plasma. I campioni sono stabili per un massimo di 3 giorni a temperatura ambiente e per un massimo di 1 settimana a +2 ...+8 °C. Per conservarli più a lungo (max. 1 mese), congelarli a temperature inferiori a -18 °C. Evitare di congelare e scongelare ripetutamente [11,12].

### Avviso:

Rientra nelle responsabilità di ogni laboratorio ricorrere a tutto il materiale di riferimento disponibile e/o svolgere studi propri per definire i criteri di stabilità specifici per il proprio laboratorio.

### 5.2 Ricostituzione degli standard di calibrazione

Prima di procedere alla preparazione dei campioni, ricostituire gli standard di calibrazione di siero (codice 62028 e 62039 o 62029 per la determinazione degli epimeri) come segue:

1. pipettare 1,0 ml di acqua distillata nel flacone originale
2. ricostituire per 10-15 min a +20...+25 °C, agitando più volte

Verificare che il contenuto del flacone sia omogeneo. Se sono ancora visibili sostanze non disciolte, prolungare il tempo di ricostituzione. Evitare la luce solare diretta.

I valori di calibrazione sono riconducibili a pesate iniziali di sostanze pure. Le concentrazioni degli analiti nello standard di calibrazione variano da lotto a lotto. I valori specifici sono indicati nel foglietto illustrativo dello standard di calibrazione.

### Attenzione:

Questo prodotto è stato ottenuto da sangue umano sierico che, in seguito alle opportune verifiche da parte del produttore, è risultato negativo agli agenti infettivi del virus dell'immunodeficienza umana (HIV), del virus dell'epatite B (HBV), del virus dell'epatite C (HCV) e del batterio *Treponema pallidum*. Tuttavia non è possibile escludere completamente il rischio d'infezione di questo prodotto. Considerare tutti i prodotti che contengono materiali di origine umana come potenzialmente contagiosi e adottare, nell'uso di questi prodotti, le stesse precauzioni prescritte per i campioni di pazienti potenzialmente infetti.

### Stabilità degli standard di calibrazione dopo la ricostituzione

Gli standard di calibrazione disciolti in acqua hanno i seguenti periodi di stoccaggio:

Tabella 19: Stabilità degli standard di calibrazione dopo la ricostituzione

Temperatura di stoccaggio	Stabilità	Altre condizioni di stoccaggio
+2...+8 °C	1 settimana	al riparo dalla luce, ben chiuso
inferiore a -18 °C	3 mesi	al riparo dalla luce, ben chiuso

## 5.3 Ricostituzione dei controlli

Prima della preparazione dei campioni ricostituire i controlli di siero (codice 0222, 0223, 0256 oppure 0311, 0312 per la determinazione degli epimeri) come segue:

1. pipettare 1,0 ml di acqua distillata nel flacone originale
2. ricostituire per 10-15 min a +20...+25 °C, agitando più volte

Verificare che il contenuto del flacone sia omogeneo. Se sono ancora visibili sostanze non disciolte, prolungare il tempo di ricostituzione. Evitare la luce solare diretta.

Le concentrazioni degli analiti nei controlli variano da lotto a lotto. I valori specifici sono indicati nel foglietto illustrativo del relativo controllo.

### Attenzione:

Questo prodotto è stato ottenuto da sangue umano sierico che, in seguito alle opportune verifiche da parte del produttore, è risultato negativo agli agenti infettivi del virus dell'immunodeficienza umana (HIV), del virus dell'epatite B (HBV), del virus dell'epatite C (HCV) e del batterio *Treponema pallidum*. Tuttavia non è possibile escludere completamente il rischio d'infezione di questo prodotto. Considerare tutti i prodotti che contengono materiali di origine umana come potenzialmente contagiosi e adottare, nell'uso di questi prodotti, le stesse precauzioni prescritte per i campioni di pazienti potenzialmente infetti.

### Stabilità dei controlli dopo la ricostituzione:

I controlli disciolti in acqua hanno i seguenti periodi di stoccaggio:

Tabella 20: Stabilità dei controlli dopo la ricostituzione

Temperatura di stoccaggio	Stabilità	Altre condizioni di stoccaggio
+2...+8 °C	1 settimana	al riparo dalla luce, ben chiuso
inferiore a -18 °C	3 mesi	al riparo dalla luce, ben chiuso

## 5.4 Preparazione dei campioni

### 5.4.1 Preparazione dei campioni manuale

Per preparare campioni di pazienti, controlli e standard di calibrazione eseguire le seguenti operazioni nella modalità indicata:

1. Preparare 100 µl di campione/standard di calibrazione/controllo in un vial di reazione da 1,5 ml.
2. Aggiungere 25 µl di Precipitation Reagent
3. Aggiungere 200 µl di Internal Standard (codice 62004 o 62044 per la determinazione degli epimeri)
4. Miscelare per 20 s (tramite vortex).
5. Incubare per 10 min a +4 °C.
6. Centrifugare per 5 min a 15000 x g.
7. Trasferire 200 µl di surnatante in un vial dell'autocampionatore.
8. Iniettare 10-50 µl dell'estratto del campione nel sistema LC-MS/MS.

Per le avvertenze sulla determinazione del volume d'iniezione ottimale consultare i Capitoli 3.1 bis 3.3.

## 5.4.2 Preparazione automatica dei campioni

I campioni possono essere preparati anche in maniera completamente automatica con un sistema di pipettamento automatico oppure manualmente con piastre filtranti a 96 pozzetti e una pipetta multicanale (multipette e/o una pipetta con pettine). Seguire le istruzioni contenute nell'Allegato I.

## 5.5 Stabilità e stoccaggio dei campioni preparati

I campioni preparati per l'analisi come descritto al capitolo 5.4 sono stabili come segue:

Tabella 21: Stabilità dei campioni preparati

Temperatura di stoccaggio	Stabilità	Altre condizioni di stoccaggio
+20...+25 °C	4 giorni	al riparo dalla luce, ben chiuso, contenitori di vetro
+2...+8 °C	1 settimana	al riparo dalla luce, ben chiuso, contenitori di vetro
inferiore a -18 °C	2 settimane	al riparo dalla luce, ben chiuso, contenitori di vetro

## 6 Equipaggiamento aggiuntivo necessario

Il kit di reagenti per la determinazione LC-MS/MS della 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> richiede il seguente equipaggiamento, non contenuto nel kit:

- spettrometro di massa tandem con sorgente APCI
- valvola di commutazione flusso a 2 posizioni e 6 vie
- sistema HPLC a gradiente binario, pompe e campionatori comandati da computer (v. capp. da 3.1 a 3.3)
- Per accelerare la purificazione e la separazione cromatografica può essere utilizzata una pompa isocratica aggiuntiva (v. capitoli da 3.1 a 3.3)
- dispositivo di riscaldamento della colonna (solo per la determinazione degli epimeri)
- pipette e puntali
- centrifuga da tavolo
- agitatore orbitale (ad es. Vortex™)

## 7 Acquisizione e valutazione dei dati

A ogni serie di misurazione, eseguire una calibrazione completa del sistema di valutazione. A questo scopo utilizzare gli standard di calibrazione **3PLUS1**® o **6PLUS1**®-Multilevel (codice 62028 e 62039 oppure 62029 per la determinazione degli epimeri). Le concentrazioni dei singoli analiti negli standard di calibrazione possono variare da lotto a lotto. I valori esatti sono riportati nei relativi foglietti illustrativi. Per produrre una retta di calibrazione, i rapporti delle superfici dei picchi (analita/ISTD) si riportano sull'asse y e le concentrazioni degli standard di calibrazione sull'asse x. Per tutti gli analiti, produrre infine una retta di calibrazione mediante regressione lineare.

Per garantire che le condizioni di analisi LC-MS/MS non subiscano variazioni nel corso della sequenza analitica, iniettare i controlli **MassCheck**<sup>®</sup> preparati almeno una volta nel corso dell'analisi di una serie di campioni e al termine della stessa.

Verificare regolarmente l'esattezza delle masse e la risoluzione dello spettrometro e ricalibrarlo se vengono individuate deviazioni. A tal fine, leggere attentamente le avvertenze contenute nel libretto d'istruzioni dell'apparecchio in uso e in caso di dubbio rivolgersi alla casa costruttrice.

## 8 Controllo di qualità

La precisione e l'accuratezza delle determinazioni vengono determinate analizzando i controlli (controlli **MassCheck**<sup>®</sup>, codici 0222, 0223, 0256 oppure 0311, 0312 per la determinazione degli epimeri) in ogni sequenza analitica. Se i risultati dei controlli di qualità cadono al di fuori dell'intervallo indicato sui foglietti illustrativi, controllare il sistema analitico. Se lo scostamento permane, ri-calibrare il sistema analitico.

## 9 Intervalli di riferimento

Poiché la concentrazione della 25-OH-vitamina D<sub>3</sub> sierica dipende da svariati fattori quali età, sesso, pigmentazione della pelle, luogo di residenza (latitudine geografica), stagione dell'anno e condizioni meteorologiche (strato di ozono), è difficile fornire un range di riferimento. Gli intervalli di riferimento elencati sono valori indicativi ricavati dalla letteratura [8]. Possono discostarsi da altri dati pubblicati. Poiché i valori variano a seconda della popolazione dei pazienti e del metodo di misurazione, occorre definire gli intervalli di riferimento specifici per il proprio laboratorio. Nella definizione dei valori, occorre tenere conto anche delle normative vigenti a livello locale.

Tabella 22: Intervalli di riferimento per 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>

Dosaggio di vitamina D	Intervalli di riferimento in siero [8]
Valore ottimale	20-70 µg/l
Insufficiente	10-20 µg/l
Carente	< 10 µg/l

Nei pazienti che non assumono integratori, non si rilevano di norma livelli significativi di 25-OH-vitamina D<sub>2</sub>.

Nei bambini piccoli, le forme epimeriche possono arrivare a costituire il 60 % del tenore della 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> [7]. Negli adulti sani ammontano al 5 % [10] circa. Queste concentrazioni non hanno attualmente alcuna rilevanza diagnostica.

## 10 Fattori di conversione

La tabella sottostante elenca i fattori per la conversione della concentrazione molare nella concentrazione in peso e viceversa.

Tabella 23: Fattori di conversione

Sostanza	da µg/l a nmol/l	da nmol/l a µg/l
25-OH-vitamina D3 e 3- <i>epi</i> -25-OH-D3	x 2,496	x 0,4007
25-OH-vitamina D2 e 3- <i>epi</i> -25-OH-D2	x 2,423	x 0,4127

## 11 Stoccaggio e stabilità dei reagenti

Osservando le avvertenze per il trasporto e lo stoccaggio e in confezione integra, i reagenti sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. Trasportare e conservare i reagenti osservando le avvertenze fornite di seguito.

Tabella 24: Condizioni di trasporto del kit di reagenti

Prodotto	Temperatura di trasporto
Kit di reagenti (codice 62000, 62000/1000, 62000/1000/F, 62062, 62062/1000, 62062/1000/F)	+18... +30 °C

Estrarre i reagenti dalla confezione immediatamente dopo il trasporto e stoccare ogni singolo reagente come indicato nella seguente tabella.

Tabella 25: Condizioni di stoccaggio dei reagenti:

Prodotto	Temperatura di stoccaggio
Mobile Phase A (codice 62001, 62011)	+18... +30 °C
Mobile Phase B (codice 62002, 62022)	+18... +30 °C
Precipitation Reagent (codice 62003)	+18... +30 °C
Internal Standard (codice 62004, 62044)	< -18 °C
Rinsing Solution (codice 62009)	+18... +30 °C
Tuning Mix (codice 62015, 62016)	< -18 °C
Multilevel Serum Calibrator Sets (codice 62028, 62029, 62039)	< -18 °C
<b>MassCheck</b> ® Serum Controls (codice 0221, 0222, 0223, 0256, 0310, 0311, 0312)	< -18 °C

Chiudere i reagenti immediatamente dopo l'uso e conservarli alla temperatura indicata. I reagenti possono essere conservati per un anno dalla data di apertura, ma non oltre la data di scadenza indicata. Per la stabilità degli standard di calibrazione e dei controlli ricostituiti vedi paragrafi 5.2 e 5.3.

## 12 Smaltimento dei rifiuti

Mobile Phase A (codice 62001, 62011), Mobile Phase B (codice 62002, 62022), Rinsing Solution (codice 62009), Internal Standard (codice 62004, 62044) e Tuning Mix (codice 62015, 62016) contengono solventi organici. Collocare i residui in contenitori appositi, per solventi organici non alogenati.

Il Precipitation Reagent (codice 62003) contiene una sostanza pericolosa per l'ambiente. Collocare i residui del prodotto in un contenitore di raccolta per le soluzioni saline.

I residui dei campioni dei pazienti e i campioni preparati, così come i controlli e gli standard di calibrazione sono potenzialmente infettivi e devono pertanto essere raccolti e smaltiti come rifiuti potenzialmente infettivi.

Le soluzioni menzionate non possono essere smaltite né come rifiuto domestico, né attraverso la rete fognaria pubblica. Smaltire ai sensi della Direttiva 2008/98/CE sui rifiuti, nonché delle normative nazionali e regionali. Tenere i recipienti e i contenitori per la raccolta fuori dalla portata di persone non autorizzate.

## 13 Esempi di cromatogrammi

Le seguenti figure illustrano vari esempi di cromatogrammi determinati con il presente metodo.

### 13.1 Esempi di cromatogrammi per *MassChrom*<sup>®</sup> 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> in siero/plasma (codice 62000)

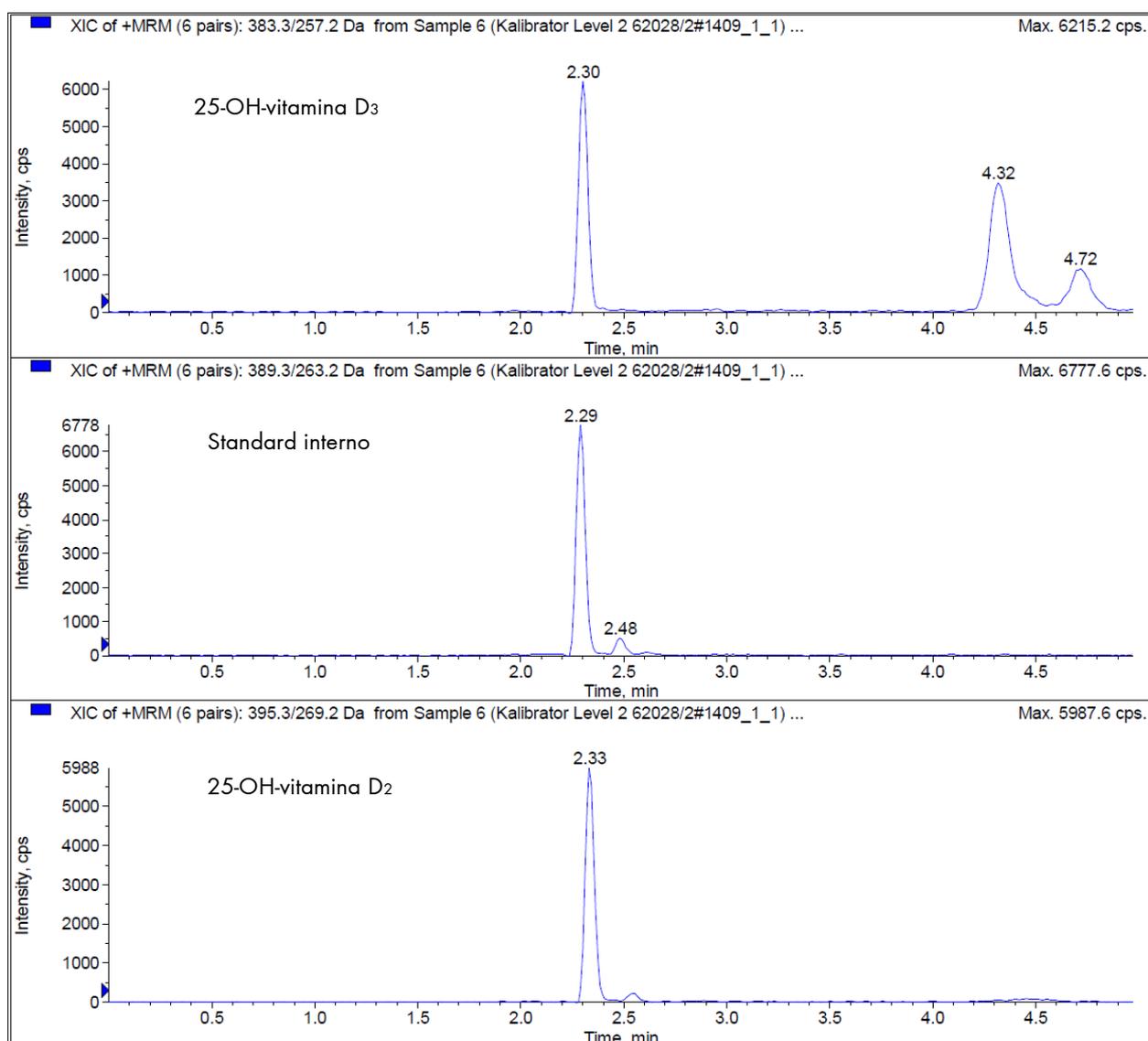


Figura 9: Cromatogramma di uno standard di calibrazione (62028/2) usando due pompe per HPLC isocratiche; Concentrazione dell'analita: 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>: 40 µg/l, 25-OH-vitamina D<sub>2</sub>: 40 µg/l

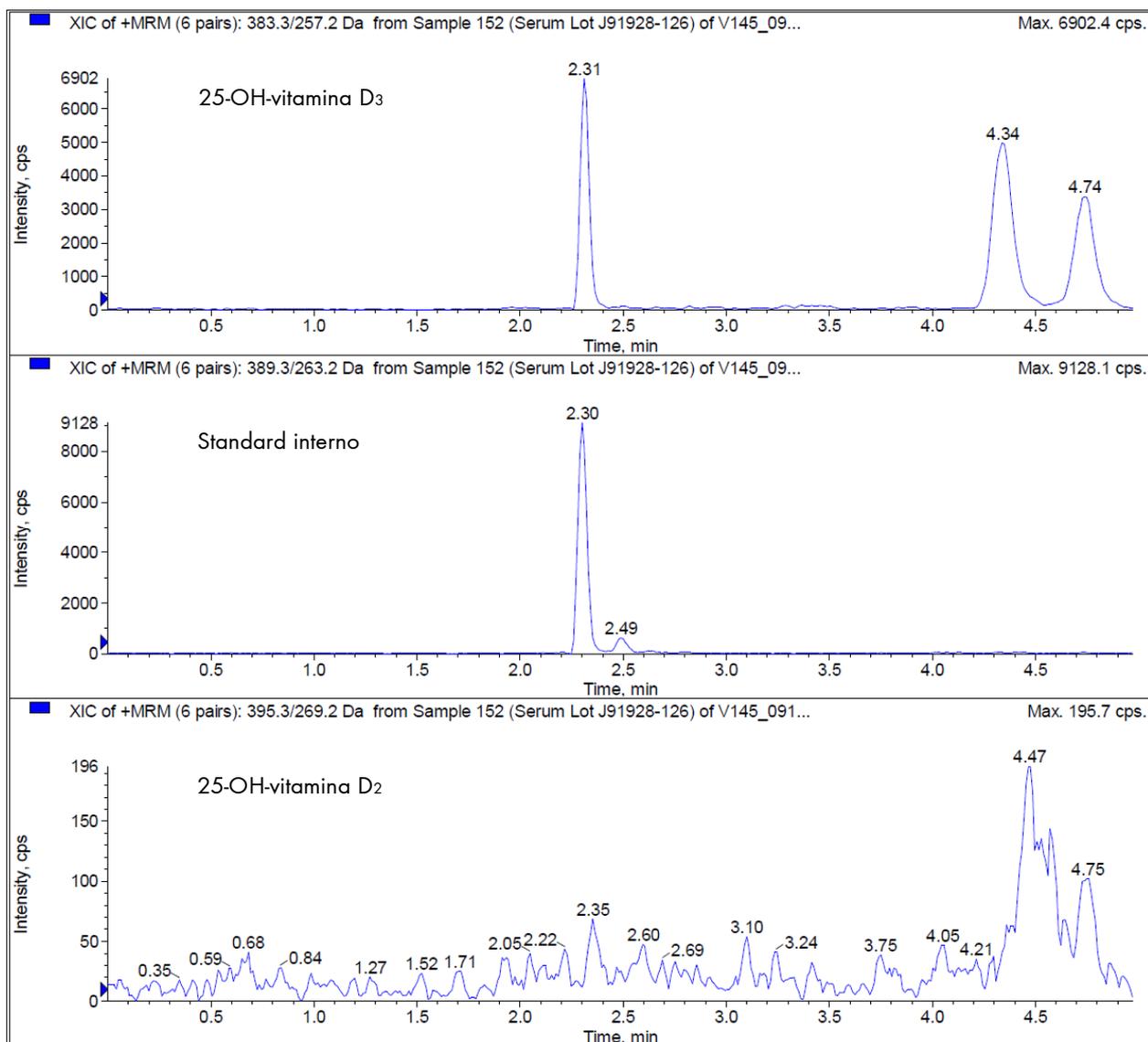


Figura 10: Cromatogramma di un campione di siero nativo con contenuto di 25-OH-vitamina D<sub>3</sub> nella norma usando due pompe per HPLC isocratiche;  
 Concentrazione dell'analita: 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>: 35 µg/l, 25-OH-vitamina D<sub>2</sub>: non rilevabile

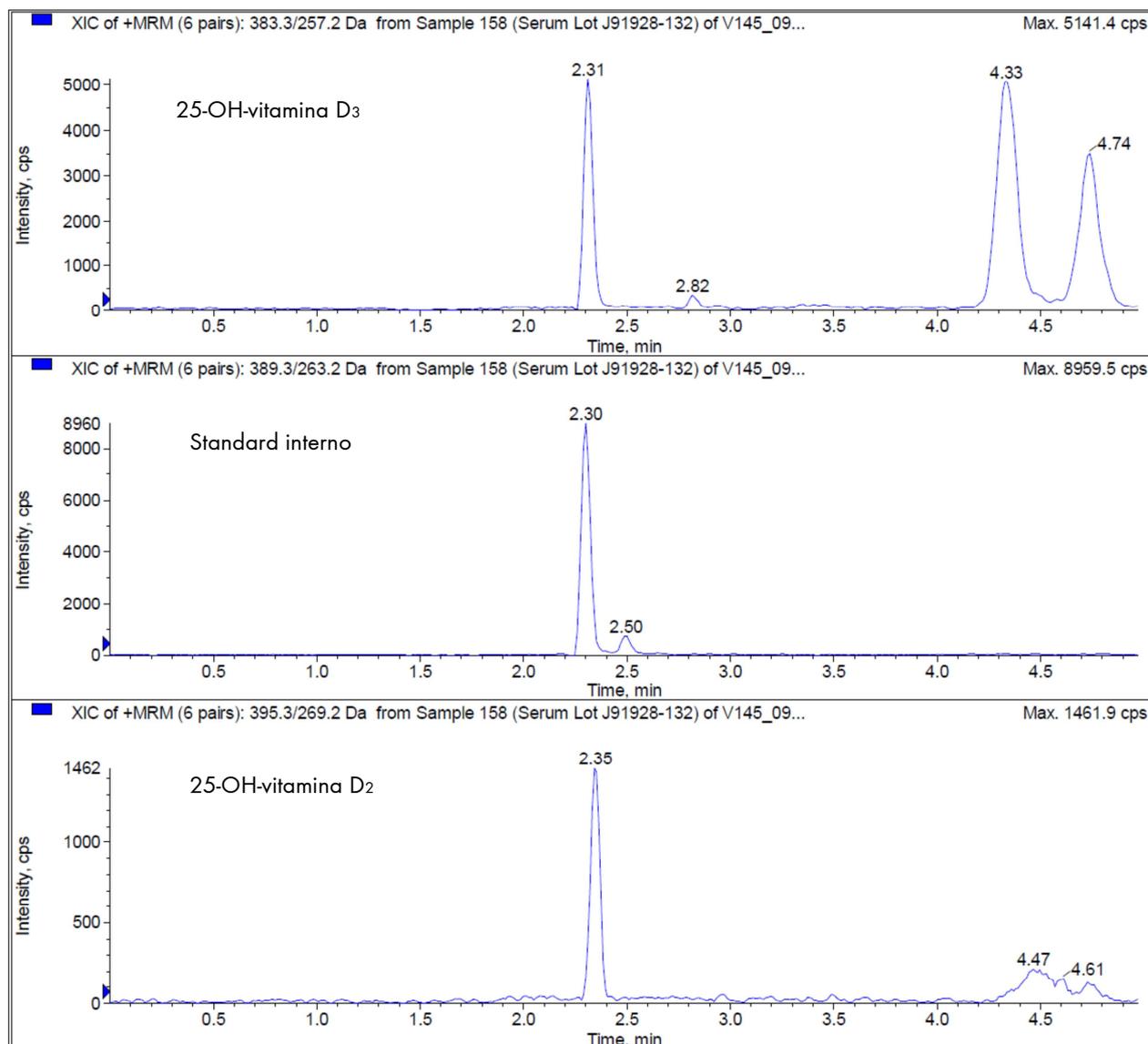


Figura 11: Cromatogramma di un campione di siero nativo con ridotto contenuto di 25-OH-vitamina D<sub>3</sub> con assunzione di integratori di vitamina D<sub>2</sub> usando due pompe per HPLC isocratiche; Concentrazione dell'analita: 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>: 25 µg/l, 25-OH-vitamina D<sub>2</sub>: 7 µg/l

## 13.2 Esempi di cromatogrammi per l'Upgrade 3-*epi*-25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub>

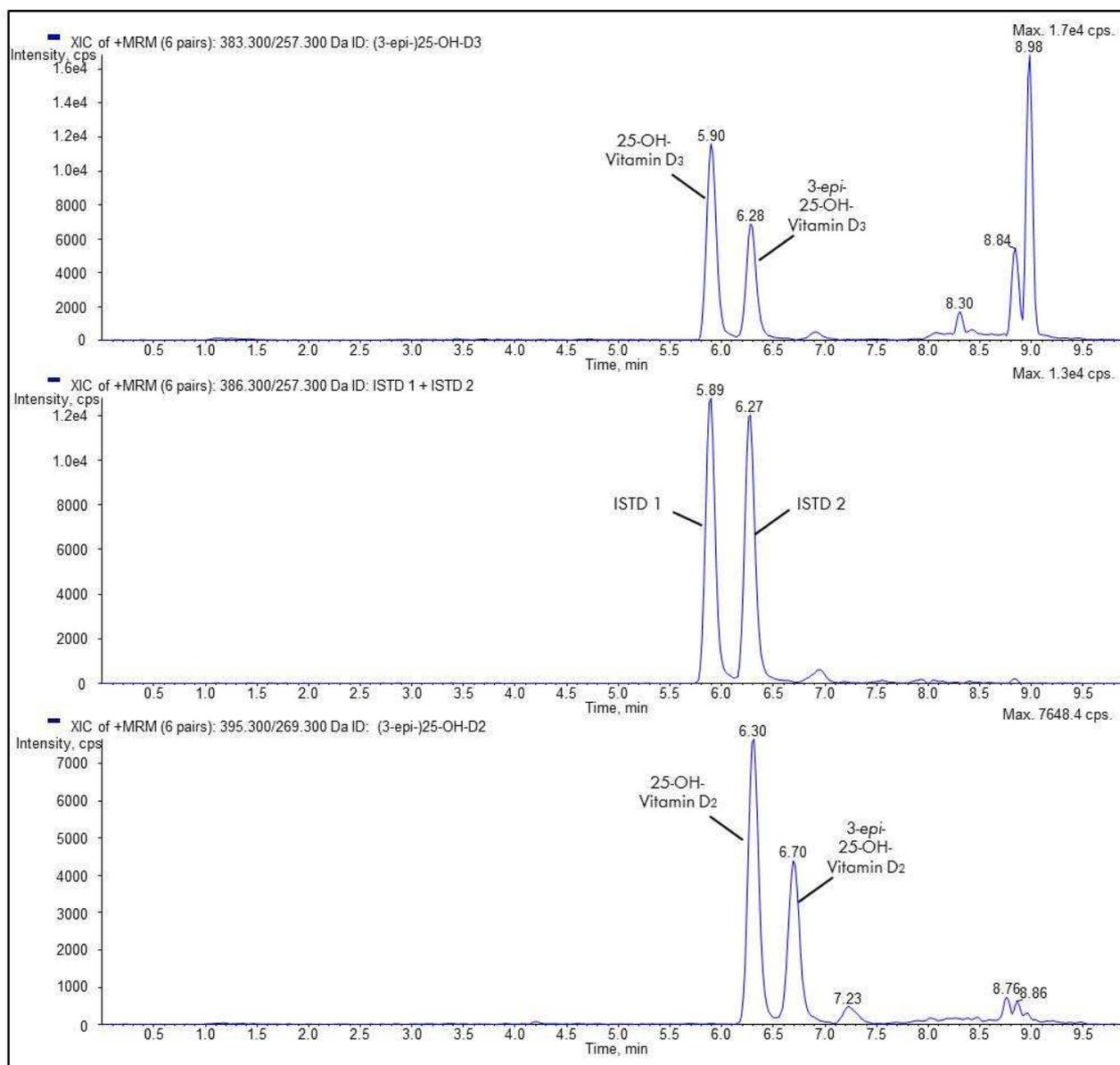


Figura 12: Cromatogramma di uno standard di calibrazione (62029/2) usando una pompa a gradiente binario; Concentrazione dell'analita: 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>: ca. 30 µg/l, 25-OH-vitamina D<sub>2</sub>: ca. 30 µg/l, 3-*epi*-25-OH-vitamina D<sub>3</sub>: ca. 20 µg/l, 3-*epi*-25-OH-vitamina D<sub>2</sub>: ca. 20 µg/l

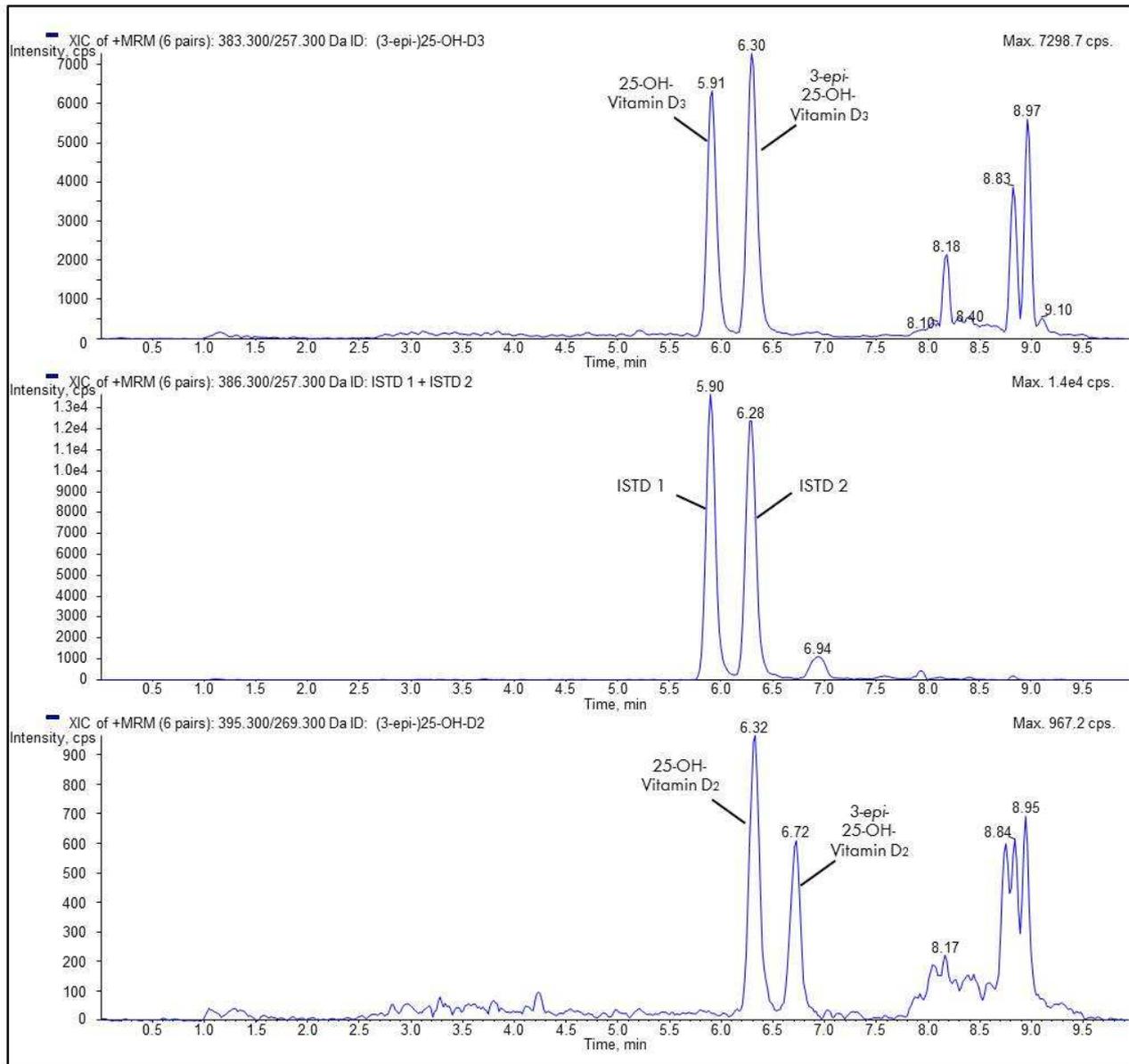


Figura 13: Cromatogramma di un campione di siero nativo con una percentuale elevata di forme epimeriche usando una pompa a gradiente binario;  
 Concentrazione dell'analita: 25-OH-vitamina D3: ca. 15 µg/l, 25-OH-vitamina D2: ca. 3,4 µg/l, 3-epi-25-OH-vitamina D3: ca. 18 µg/l, 3-epi-25-OH-vitamina D2: ca. 2,1 µg/l

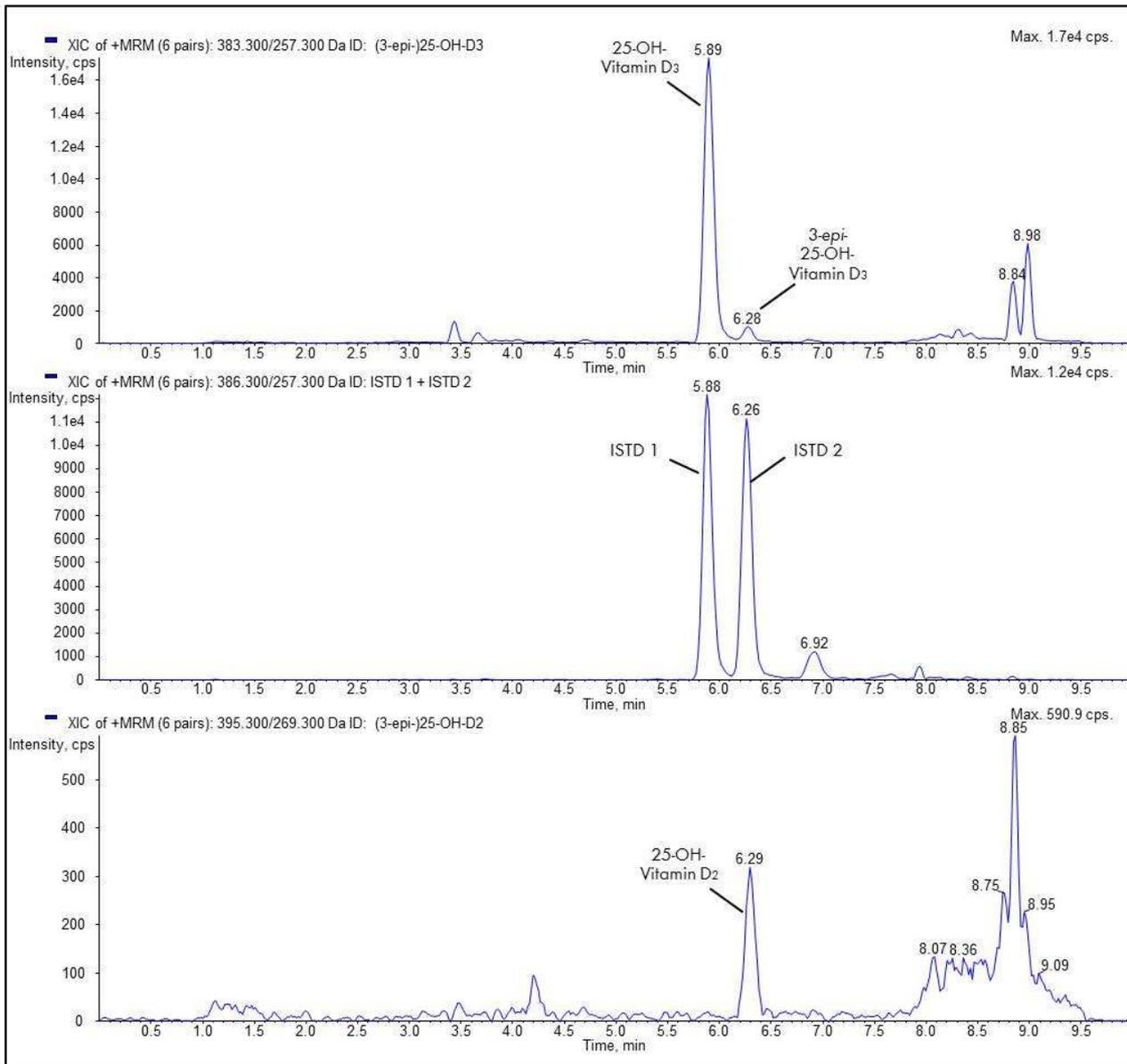


Figura 14: Cromatogramma di un campione di siero nativo di paziente adulto tipico a elevata concentrazione di 25-OH-vitamina D3 usando una pompa a gradiente binario;  
 Concentrazione dell'analita: 25-OH-vitamina D3: ca. 50 µg/l, 25-OH-vitamina D2: ca. 1,3 µg/l, 3-epi-25-OH-vitamina D3: ca. 3,1 µg/l, 3-epi-25-OH-vitamina D2: non rilevabile

### 13.3 Esempi di cromatogrammi per *MassChrom*® 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> e 3-*epi*-25-OH-vitamina D<sub>3</sub> in siero/plasma (codice 62062)

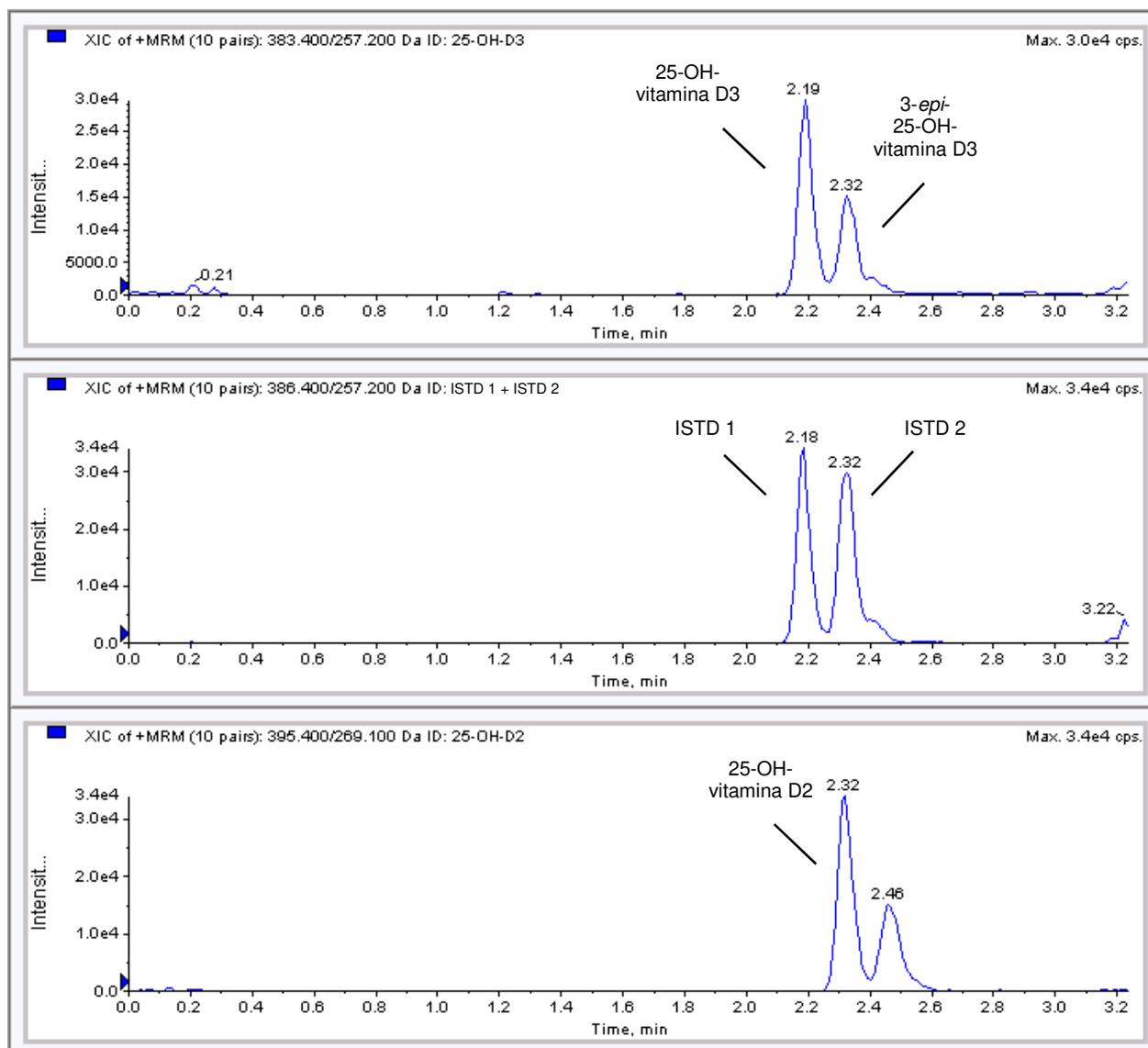


Figura 15: Cromatogramma di una soluzione di calibrazione (62029/2) usando una pompa a gradiente binario con pompa isocratica aggiuntiva; concentrazione degli analiti: 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>: ca. 30 µg/l, 25-OH-vitamina D<sub>2</sub>: ca. 30 µg/l, 3-*epi*-25-OH-vitamina D<sub>3</sub>: ca. 20 µg/l

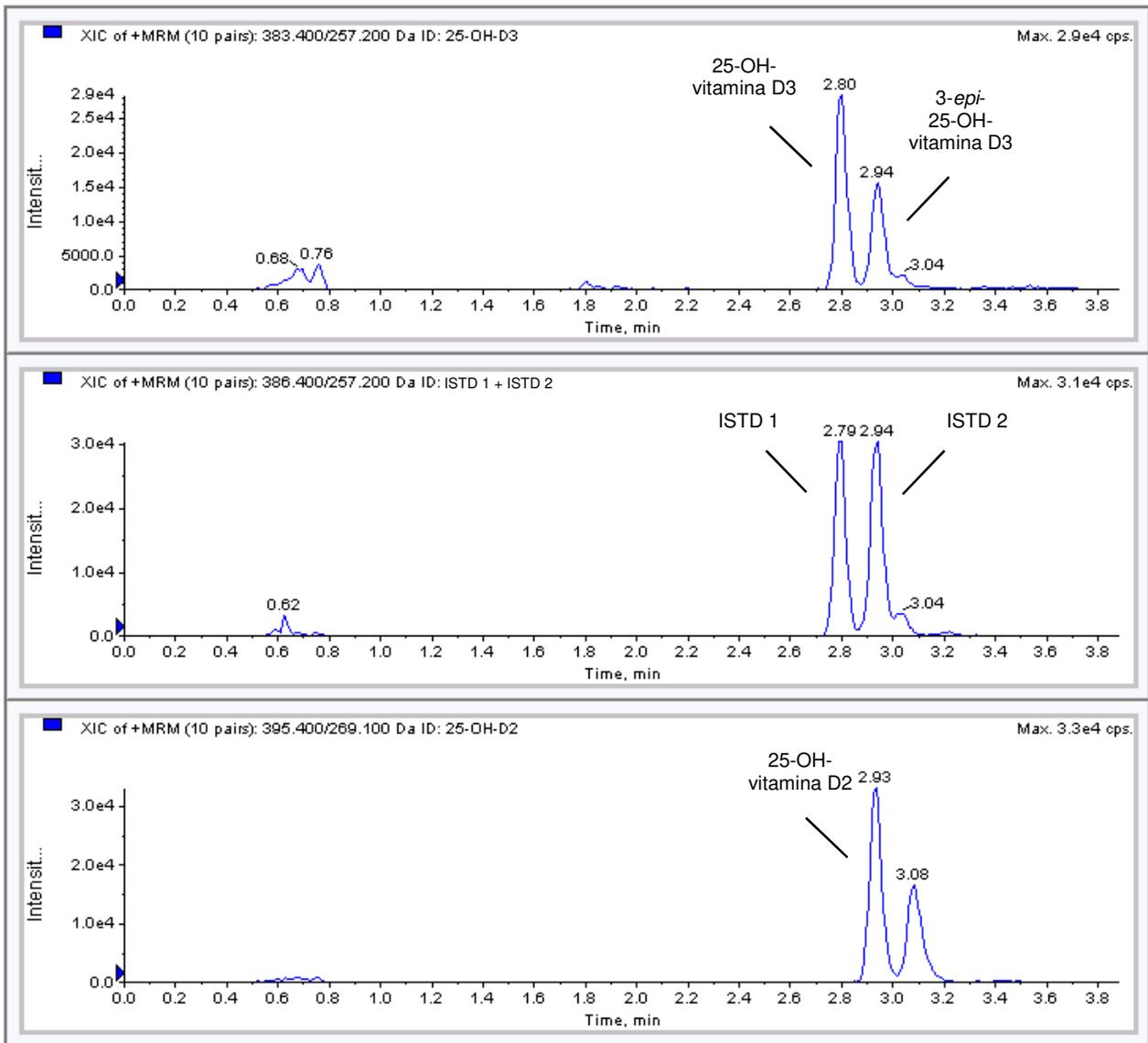


Figura 16: Cromatogramma di una soluzione di calibrazione (62029/2) usando una pompa a gradiente binario; concentrazione degli analiti: 25-OH-vitamina D3: ca. 30 µg/l, 25-OH-vitamina D2: ca. 30 µg/l, 3-epi-25-OH-vitamina D3: ca. 20 µg/l

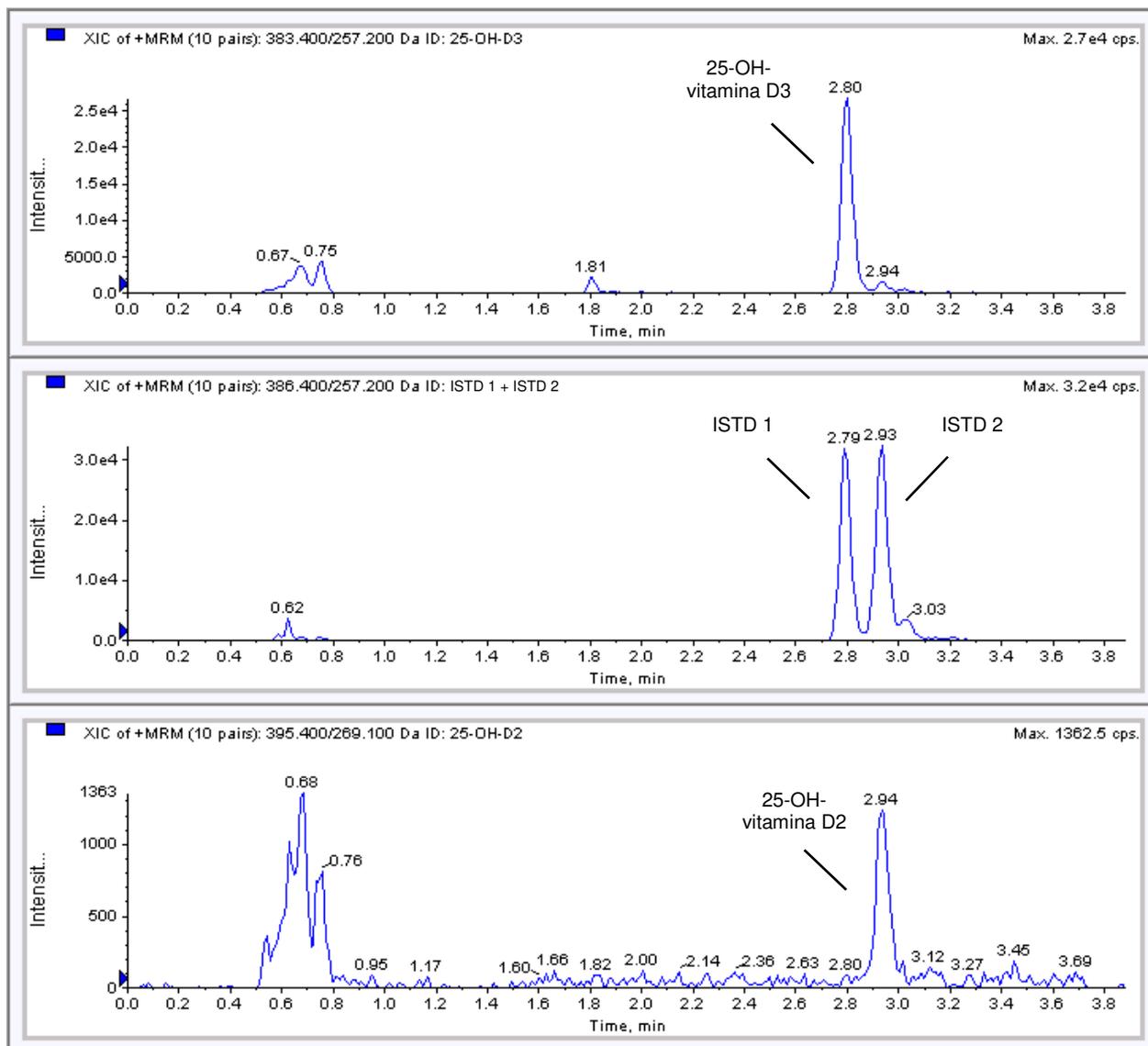


Figura 17: Cromatogramma di un campione di siero nativo adulto a elevata concentrazione di 25-OH-vitamina D3, usando una pompa a gradiente binario; Concentrazione degli analiti: 25-OH-vitamina D3: ca. 33 µg/l, 25-OH-vitamina D2 e di 3-epi-25-OH-vitamina D3 al di sotto del limite di quantificazione.

## 14 Valutazione delle interferenze

Con il metodo **MassChrom**<sup>®</sup> 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> in siero e plasma (codice 62000), possono verificarsi casi sporadici di disturbo della MRM 1 della 25-OH-vitamina D<sub>3</sub> (383 → 257) in caso di utilizzo di determinati sistemi di prelievo del sangue e provette secondarie in plastica. Nel campione è riconoscibile un'interferenza sotto forma di deviazione del rapporto delle superfici dei picchi dalla MRM 2 alla MRM 1 rispetto al rapporto ricavato dalla serie di calibrazione. Nel caso si osservasse tale interferenza, si raccomanda di usare per la quantificazione della 25-OH-vitamina D<sub>3</sub> la MRM 2 (383 → 229), che non è soggetta a disturbi. L'Upgrade 3-epi-25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub>, con la colonna analitica (codice 62120), così come il kit di reagenti **MassChrom**<sup>®</sup> 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> e 3-epi-25-OH-vitamina D<sub>3</sub> in siero/plasma (codice 62062) e la colonna analitica corrispondente (codice 62130) non sono interessati.

Con il metodo **MassChrom**<sup>®</sup> 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> in siero e plasma (codice 62000) non vengono separate le forme diastereomeriche, cioè la D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> (25-OH) e la D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> (3-epi-25-OH) vengono acquisite come somma. In alcuni casi l'acquisizione contemporanea degli epimeri C3 può pertanto produrre valori falsamente elevati di 25-OH-vitamina D.

Allo stato attuale delle conoscenze, concentrazioni più elevate delle forme epimeriche si riscontrano soprattutto nei lattanti e nei bambini di età inferiore a un anno. Per la separazione cromatografica e la determinazione delle forme diastereomeriche utilizzare l'Upgrade per 3-epi-25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> per il kit **MassChrom**<sup>®</sup> 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> in siero e plasma. Con il kit di reagenti **MassChrom**<sup>®</sup> 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> e 3-epi-25-OH-vitamina D<sub>3</sub> in siero e plasma, utilizzato con la corrispondente colonna analitica (codice 62130), le forme epimeriche vengono separate completamente. Possono essere quantificate la 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> e la 3-epi-25-OH-vitamina D<sub>3</sub>.

### 14.1 Kit di reagenti **MassChrom**<sup>®</sup> 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> in siero/plasma (codice 62000) incl. Upgrade

Le seguenti sostanze testate non hanno prodotto interferenze

#### Metaboliti della vitamina D e sostanze interferenti note in letteratura

1 $\alpha$ -OH-vitamina D<sub>3</sub>, 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamina D<sub>3</sub>, 24R,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamina D<sub>3</sub>, 5-colestan-3 $\beta$ -ol-7-on, 7 $\alpha$ -OH-4-colestan-3-on

#### Steroidi:

Progesterone, 17-OH-progesterone, aldosterone, testosterone, *trans*-androstendione, estrone, DHEAS, DHEA, pregnenolone, estriolo, androsterone, cortisone, cortisolo, 11-deossicorticosterone, DHT, corticosterone, 11-deossicorticosterone, etiocolanone, estradiolo, androstenedione

#### Farmaci

Acetaminofene, acido acetilsalicilico, alprazolam, amiodarone, amitriptilina, amoxicillina, amfotericina B, aripripazolo, amitriptilina, amprenavir, atenololo, atomoxetina, bromazepam, brotizolam, 10-OH-carbamazepina, carbamazepina-10,11-epossido, cloramfenicolo, clordiazepossido, clorpromazina, citalopram, clobazam, clomipramina, clonazepam, clozapina, codeina, cortisone, debutildronedarone, desalchilflurazepam, desetilamiodarone, desipramina, desmetilclozapina, desmetilfluoxetina, desmetilsertralina, N-desmetilolanzapina, desmetilvenlafaxina, diazepam, diclofenac, diltiazem, 1,1-dimetilbiguanidina, doxepina, dronedarone, duloxetina, efavirenz, etosuccimide, felbamato, fenofibrato, flecainide, fluconazolo, flunitrazepam, fluoxetina, flupentixolo, flufenazina, 5-fluoritosina, flurazepam, flurazepossido, fluvoxamina, gabapentina, ganciclovir, aloperidolo, 10-idrossicarbamazepina, 9-idrossisiperidone, ibuprofene, imipramina, indinavir, isoniacide, ketoconazolo, lamivudina, lamotrigina, levofloxacin, lopinavir, lorazepam, maprotilina, medazepam, metamazolo, metoclopramide, midazolam, mirtazapina, montelukast, acido micofenolico, nelfinavir, nevirapina, nitrazepam, norclobazam,

norclomipramina, norclozapina, nordiazepam, nordossepina, norfludiazepam, nortrimipramina, nortriptilina, olanzapina, omeprazolo, oxazepam, paracetamolo, paroxetina, perazina, fenobarbital, fenitoina, pimozide, prazepam, prednisolone, prednisone, pregabalina, primidone, promazina, protriptilina, pirimetamina, quetiapina, rifampicina, risperidone, acido salicilico, sertralina, sulfadiazina, sulfametossazolo, sultiame, succibuzone, temazepam, tetrazepam, teofillina, tilidina, topiramato, trazodone, trifluperazina, trileptal, trimetoprim, trimipramina, acido valproico, venlafaxina, verapamil, voriconazolo, warfarin, zaleplone, zolpidem, zonisamide, zopiclone

Per qualsiasi domanda riguardante le interferenze, si prega di rivolgersi al nostro Servizio Clienti, oppure direttamente alla nostra Assistenza Chromsystems, chiamando l'hotline (+49 89 18930-111) o inviando una mail a support@chromsystems.com.

## 14.2 Kit di reagenti *MassChrom*<sup>®</sup> 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> e 3-epi-25-OH-vitamina D<sub>3</sub> in siero/plasma (codice 62062)

Campioni di siero sono stati addizionati con metaboliti, sostanze di disturbo note dalla letteratura e sostanze medicinali alla massima concentrazione attesa, per poi essere analizzati con uno spettrometro di massa SCIEX 4500MD™ per verificare la presenza di interferenze.

**Le seguenti sostanze sono state testate senza che si verificassero interferenze degne di nota. I risultati quantitativi non sono influenzati (deviazione ≤15 %):**

### Metaboliti della vitamina D e sostanze di disturbo note in letteratura

1 $\alpha$ -OH-vitamina D<sub>3</sub>, 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamina D<sub>3</sub>, 24R,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamina D<sub>3</sub>, 5-colestene-3 $\beta$ -olo-7-one, 7 $\alpha$ -OH-4-colestene-3-one

### Farmaci

acetazolamide, acetilcisteina, acido acetilsalicilico, aciclovir, allopurinolo, amikacina, amlodipina, amoxicillina, ampicillina, azatioprina, azitromicina, bisoprololo, captopril, carbamazepina, carbamazepina-10,11-epossido, cefradina, cloramfenicolo, clordiazepossido, cimetidina, ciproflossacina, claritromicina, desametasone, diazepam, diclofenac, digitossina, digossina, diidrocodeina, disopiramide, enalaprilato, eritromicina, furosemide, ganciclovir, gentamicina, idroclorotiazide, ibuprofene, isosorbide dinitrato, itraconazolo, ketoconazolo, levofloxacina, levotirosina, lidocaina, lorazepam, metformina, meticillina, metilprednisolone, metoclopramide, metoprololo, acido micofenolico, acido micofenolico-glucuronide, N-acetil-procainamide, nadololo, fluoruro di sodio, N-desmetildiazepam, neomicina, nifedipina, norverapamil, omeprazol, oxazepam, ossipurinolo, paracetamolo, penicillina G, penicillina V, fenitoina, prazosina, prednisolone, prednisone, procainamide, propranololo, ranitidina, rifampicina, risperidone, salbutamolo, acido salicilico, streptomina, sulfametossazolo, tramadolo, triamteren, trimetoprim, acido valproico, vancomicina, verapamil

Per qualsiasi domanda riguardante le interferenze, si prega di rivolgersi al nostro Servizio Clienti, oppure direttamente alla nostra Assistenza Chromsystems, chiamando l'hotline +49 89 18930-111 o inviando una mail a support@chromsystems.com.

## 15 Limitazioni cliniche

Non esistono intervalli terapeutici generalmente validi per il kit di reagenti LC-MS/MS **MassChrom**<sup>®</sup> 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> in siero/plasma. I valori ricavati con metodi di test differenti non possono essere messi a confronto. Per poter interpretare correttamente i risultati, i laboratori devono indicare il metodo utilizzato per l'analisi.

Ciascun utilizzatore deve stabilire i propri intervalli di riferimento in base alle valutazioni cliniche. Non utilizzare i fattori di conversione tra i diversi metodi di analisi per ricavare i valori individuali dei pazienti.

## 16 Risoluzione dei problemi

Tabella 26: Risoluzione dei problemi

Malfunzionamento	Possibile causa	Rimedio
Picchi di disturbo	Sistema di iniezione sporco	Pulire con metanolo o iniettare 10 volte la Mobile Phase
	Contenitori dei campioni sporchi	Utilizzare contenitori nuovi
	Setto del contenitore del campione	Utilizzare un altro setto
	Fasi mobili o colonne contaminate	Cambiare le fasi mobili o le colonne e lavare il sistema
	Risoluzione della massa troppo bassa	Ottimizzare la risoluzione della massa
Segnale assente	Valvola di commutazione flusso montata in modo errato	Verificare il funzionamento della valvola
	Iniettore guasto	Controllare l'iniettore
	Pompa guasta	Ispezionare la pompa
	Capillari di trasferimento non collegati alla sorgente ionica	Collegare i capillari alla sorgente ionica
	Sistema MS/MS non pronto	Controllare il sistema MS/MS
	Ago di scarica installato in maniera scorretta	Installare o raddrizzare l'ago
Sensibilità ridotta	Sorgente ionica sporca	Pulire la sorgente ionica
	Ago di scarica sporco	Pulire l'ago
	Spettrometro di massa sporco	Pulire lo spettrometro di massa
	La valvola dell'iniettore perde	Controllare l'iniettore
	La valvola di commutazione flusso perde	Controllare la valvola
	Rilevatore vecchio	Sostituire il rilevatore o aumentare la tensione del moltiplicatore

<b>Malfunzionamento</b>	<b>Possibile causa</b>	<b>Rimedio</b>
<b>Forti oscillazioni del segnale</b>	Ionizzazione instabile	Verificare la sorgente ionica, eventualmente ottimizzare la tensione o i flussi dei gas
	Flusso non uniforme	Controllare la pompa HPLC
	Flusso di gas instabile	Controllare i flussi e l'alimentazione del gas.
<b>Non si produce il vuoto</b>	Pompe per vuoto guaste	Controllare la pompa di prevuoto e quella per l'alto vuoto
	Perdita nel sistema di vuoto	Controllare i tubi e i raccordi del sistema di vuoto
<b>Alimentazione del gas assente</b>	Generatore di azoto guasto	Controllare il generatore di azoto
	Compressore guasto	Controllare il compressore
	Bombola del gas vuota	Sostituire la bombola del gas
	Pressioni d'ingresso del gas fuori dai valori nominali	Regolare le pressioni d'ingresso del gas

## 17 Bibliografia

1. Biesalski HK, Schrezenmeir J, Weber P, Weiß H. Vitamin: Physiologie, Pathophysiologie, Therapie. Georg Thieme Verlag Stuttgart (1997).
2. Collins D, Jasani C, Fogelman I, Swaminathan R. (1998) Vitamin D and bone mineral density. *Osteoporos Int* **8**(2): 110-4.
3. Lips P. (2006) Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Bio* **92**(1): 4-8.
4. Hart GR, Furniss JL, Laurie D, Durham SK. (2006) Measurement of vitamin D status: background, clinical use, and methodologies. *Clin Lab* **52**(7-8): 335-43.
5. The American Society for Bone and Mineral Research. 28th Annual Meeting, Plenary symposium: Vitamin D: From Bench to Bedside (2006).
6. Die Qualität diagnostischer Proben. Empfehlungen der Arbeitsgruppe Präanalytik der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin. 5. Aufl., (2005).
7. Singh RJ, Taylor RL, Reddy GS, Grebe SKG. (2006) C-3 epimers can account for a significant proportion of total circulating 25-hydroxyvitamin D in infants, complicating accurate measurement and interpretation of vitamin D status. *J Clin Endocrinol Metab* **91**(8): 3055-61.
8. Thomas L. Labor und Diagnose. 7. Aufl., Verlag TH-Books Frankfurt/Main (2008).
9. Lensmeyer G, Poquette M, Wiebe D, Binkley N. (2012) The C-3 epimer of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> is present in adult serum. *J Clin Endocrinol Metab* **97**(1): 163-8.
10. Strathmann FG, Sadilkova K, Laha TJ, LeSourd SE, Bornhost JA, Hoofnagle AN, Jack R. (2012) 3-epi-25-hydroxyvitamin D concentrations are not correlated with age in a cohort of infants and adults. *Clin Chim Acta* **413**(1-2): 203-6.
11. World Health Organization. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations (2002) WHO/DIL/LAB/99.1 Rev.2.
12. Wielders JPM, Wijnberg FA. (2009) Preanalytic stability of 25(OH)-Vitamin D<sub>3</sub> in human blood or serum at room temperature: Solid as a rock. *Clin Chem* **55**(8): 1584-95.

## Allegato I: Preparazione automatica dei campioni

### Nota:

Per il preparatore automatico MassSTAR è disponibile, su richiesta, una procedura dedicata. MassSTAR è un prodotto sviluppato in collaborazione tra Chromsystems e Hamilton.

L'automatizzazione è validata solo per il kit di reagenti **MassChrom®** 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> in siero/plasma (codice 62000/1000/F) e **MassChrom®** 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> e 3-*epi*-25-OH-vitamina D<sub>3</sub> in siero/plasma (codice 62062/1000/F).

### 1a Equipaggiamento aggiuntivo necessario, non compreso nel kit:

Usando un sistema di pipettamento:

- sistema di pipettamento
- agitatore
- centrifuga (o dispositivo per vuoto)

Usando una pipetta multicanale:

- pipetta multicanale (a 8 o 12 canali)
- agitatore
- centrifuga

### 1b Preparazione automatizzata del campione con sistema di pipettamento

#### Attenzione

I campioni umani possono presentare coaguli (clots) o altri componenti solidi, che possono eventualmente modificare il volume di pipettamento.

In particolare quando si utilizza un robot di laboratorio, se il sistema non dispone delle funzioni di controllo adatte („Clot Detection“), la presenza di coaguli può falsare le misurazioni. Nella pratica, i sistemi configurabili, con controllo a pressione si sono dimostrati più adatti rispetto a quelli basati sulla misurazione della conduttività. Si consiglia pertanto di richiedere informazioni a questo proposito alla casa produttrice dell'apparecchio. Chromsystems non si assume alcuna responsabilità in caso di inadeguatezza dell'apparecchio in uso. Il kit di reagenti Chromsystems può fornire risultati affidabili solo se viene garantito l'utilizzo della corretta quantità di campione.

### Preparazione del sistema di pipettamento

Prima di procedere alla preparazione automatica dei campioni, seguire la procedura raccomandata dal costruttore. A seconda del sistema in uso possono essere necessarie ad esempio lavaggi del sistema di trasferimento o procedure di manutenzione giornaliere.

### Preparazione automatica del campione con sistema di pipettamento

Per preparare campioni di pazienti, controlli e standard di calibrazione eseguire le seguenti operazioni nella successione indicata:

1. Mettere 200 µl di Internal Standard in una piastra filtrante a 96 pozzetti
2. Aggiungere 25 µl di Precipitation Reagent
3. Aggiungere 100 µl di siero/plasma (standard di calibrazione, controlli, campioni)
4. Agitare per 10 min (600 giri/min)
5. Separare il precipitato mediante
  - a. Filtraggio a vuoto: 200 mbar, 4 min
  - b. Centrifugazione: 3200 x g, 4 min
6. Sigillare la piastra di raccolta e trasferirla nell'autocampionatore
7. Iniettare ≤ 50 µl di eluato nel sistema LC-MS/MS.

**Osservare scrupolosamente la sequenza di pipettamento.**

Per le avvertenze sulla determinazione del volume d'iniezione ottimale consultare i Capitoli 3.1 e 3.3.

Gli standard interni e il reagente di precipitazione possono essere prelevati in modalità multipipetting. Data l'elevata pressione di vapore dello standard interno devono essere prelevati 100 µl in più rispetto al volume totale occorrente. Per il lavaggio degli aghi utilizzare (acqua ultrapura, 0,055 µS/cm, 18,2 MΩ).

#### Manutenzione del sistema di pipettamento e interruzioni dell'attività

Per conservare le funzionalità del sistema di pipettamento automatico possono essere necessarie procedure particolari a intervalli regolari e/o prima e dopo le pause d'esercizio di lunga durata. Nell'effettuare tali procedure attenersi alle istruzioni del produttore del sistema di pipettamento.

#### Ic Preparazione del campione con pipetta multicanale

Per preparare campioni di pazienti, controlli e standard di calibrazione eseguire le seguenti operazioni nella successione indicata:

1. Mettere 200 µl di Internal Standard in una piastra filtrante a 96 pozzetti
2. Aggiungere 25 µl di Precipitation Reagent
3. Aggiungere 100 µl di siero/plasma (standard di calibrazione, controlli, campioni)
4. Agitare per 10 min (600 giri/min)
5. Separare il precipitato mediante centrifugazione: 3200 x g, 4 min
6. Sigillare la piastra di raccolta e trasferirla nell'autocampionatore
7. Iniettare ≤ 50 µl di eluato nel sistema LC-MS/MS.

Osservare scrupolosamente la sequenza di pipettamento.

Per le avvertenze sulla determinazione del volume d'iniezione ottimale consultare i Capitoli 3.1 e 3.3.

#### Id Risoluzione dei problemi

Tabella 27: Risoluzione dei problemi

Errore	Possibile causa	Rimedio
Piastra filtrante microtiter intasata	Sequenza di pipettamento errata	Sequenza di pipettamento: 1. Standard interno 2. Reagente di precipitazione 3. Campione
Elevata variazione delle superfici dei picchi dello standard interno	Perdita di standard interno a causa dell'elevata pressione di vapore dello stesso	Prelevare 100 µl oltre al volume occorrente
	Dispositivo di rilevamento del livello nel recipiente dello standard interno guasto	Effettuare il rilevamento con un ago e portare gli altri aghi sullo stesso livello
	Contaminazione del campione con pellicola sigillante non adatta per la piastra di raccolta	Utilizzare una pellicola senza collante nei punti di foratura
Non viene rilevato alcun analita	Il campione non è stato iniettato o non lo è stato completamente	Verificare la profondità di immersione dell'ago dell'autocampionatore
	Evaporazione del campione nell'autocampionatore	Raffreddare l'autocampionatore Utilizzare un film sigillante per piastre microtiter

Errore	Possibile causa	Rimedio
	Contaminazione del campione con pellicola sigillante non adatta per la piastra di raccolta	Utilizzare un film senza collante nei punti di foratura
Diffusione dei residui di campione	Robot sporco	Pulire gli aghi e i tubi

## Allegato II: Avvertenze sulle sostanze pericolose

Quando si manipolano i reagenti, osservare le seguenti avvertenze relative alle sostanze pericolose e adottare le opportune misure di sicurezza. Altre informazioni sono contenute nelle schede di sicurezza. Queste possono essere scaricate dal nostro sito web [www.chromsystems.com](http://www.chromsystems.com) oppure richiesti ai nostri uffici.

Tabella 28: Indicazioni di pericolo e consigli di prudenza

Pittogrammi	Indicazioni di pericolo e consigli di prudenza
<b>Mobile Phase A (codice 62001, 62011)</b>	
	<b>Pericolo</b> H226 Liquido e vapori infiammabili. H301+H311+H331 Tossico se ingerito, a contatto con la pelle o se inalato. H370 Provoca danni agli organi.
	P210 Tenere lontano da fonti di calore, superfici calde, scintille, fiamme libere o altre fonti di accensione. Non fumare.
	P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. P301+P310 IN CASO DI INGESTIONE: contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico. P302+P352 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: Lavare abbondantemente con acqua e sapone. P403+P233 Tenere il recipiente ben chiuso e in luogo ben ventilato.
<b>Mobile Phase B (codice 62002, 62022)</b>	
	<b>Pericolo</b> H225 Liquido e vapori facilmente infiammabili. H301+H311+H331 Tossico se ingerito, a contatto con la pelle o se inalato. H370 Provoca danni agli organi.
	P210 Tenere lontano da fonti di calore, superfici calde, scintille, fiamme libere o altre fonti di accensione. Non fumare.
	P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. P301+P310 IN CASO DI INGESTIONE: contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico. P302+P352 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: Lavare abbondantemente con acqua e sapone. P403+P233 Tenere il recipiente ben chiuso e in luogo ben ventilato.

**Pittogrammi      Indicazioni di pericolo e consigli di prudenza**

**Precipitation Reagent (codice 62003)**



**Pericolo**

H318 Provoca gravi lesioni oculari.

H411 Tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.



P273 Non disperdere nell'ambiente.

P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.

P305+P351+P338 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.

**Internal Standard (codice 62004)**



**Pericolo**

H225 Liquido e vapori facilmente infiammabili.

H301+H311+H331 Tossico se ingerito, a contatto con la pelle o se inalato.

H319 Provoca grave irritazione oculare.

H370 Provoca danni agli organi.

H336 Può provocare sonnolenza o vertigini.



P210 Tenere lontano da fonti di calore, superfici calde, scintille, fiamme libere o altre fonti di accensione. Non fumare.

P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.

P301+P310 IN CASO DI INGESTIONE: contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico.

P302+P352 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: Lavare abbondantemente con acqua e sapone.

P305+P351+P338 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.

P403+P233 Tenere il recipiente ben chiuso e in luogo ben ventilato.

**Internal Standard Mix (codice 62044)**



**Pericolo**

H225 Liquido e vapori facilmente infiammabili.

H301+H311+H331 Tossico se ingerito, a contatto con la pelle o se inalato.

H370 Provoca danni agli organi.

P210 Tenere lontano da fonti di calore, superfici calde, scintille, fiamme libere o altre fonti di accensione. Non fumare.

P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.

P301+P310 IN CASO DI INGESTIONE: contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico.

P302+P352 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: Lavare abbondantemente con acqua e sapone.

P403+P233 Tenere il recipiente ben chiuso e in luogo ben ventilato.



**Pittogrammi**      **Indicazioni di pericolo e consigli di prudenza**

**Rinsing Solution (codice 62009)**



**Pericolo**

H225 Liquido e vapori facilmente infiammabili.  
H301+H311+H331 Tossico se ingerito, a contatto con la pelle o se inalato.  
H370 Provoca danni agli organi.



P210 Tenere lontano da fonti di calore, superfici calde, scintille, fiamme libere o altre fonti di accensione. Non fumare.



P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.  
P301+P310 IN CASO DI INGESTIONE: contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico.  
P302+P352 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: Lavare abbondantemente con acqua e sapone.  
P403+P233 Tenere il recipiente ben chiuso e in luogo ben ventilato.

**Tuning Mix (codice 62015)**



**Pericolo**

H225 Liquido e vapori facilmente infiammabili.  
H301+H311+H331 Tossico se ingerito, a contatto con la pelle o se inalato.  
H370 Provoca danni agli organi.



P210 Tenere lontano da fonti di calore, superfici calde, scintille, fiamme libere o altre fonti di accensione. Non fumare.



P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.  
P301+P310 IN CASO DI INGESTIONE: contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico.  
P302+P352 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: Lavare abbondantemente con acqua e sapone.  
P403+P233 Tenere il recipiente ben chiuso e in luogo ben ventilato.

**Tuning Mix (codice 62016)**



**Pericolo**

H226 Liquido e vapori infiammabili.  
H301+H311+H331 Tossico se ingerito, a contatto con la pelle o se inalato.  
H370 Provoca danni agli organi.



P210 Tenere lontano da fonti di calore, superfici calde, scintille, fiamme libere o altre fonti di accensione. Non fumare.



P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.  
P301+P310 IN CASO DI INGESTIONE: contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico.  
P302+P352 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: Lavare abbondantemente con acqua e sapone.  
P403+P233 Tenere il recipiente ben chiuso e in luogo ben ventilato.

**I componenti non sono classificati come pericolosi ai sensi della normativa europea:**

6PLUS1® / 3PLUS1® Multilevel Serum Calibrator Sets (codice 62028, 62029, 62039)

MassCheck® Serum Controls (codice 0221, 0222, 0223, 0256, 0310, 0311, 0312)

## Allegato III: Calcolo manuale

Confrontare i quozienti delle superfici dei picchi degli analiti e delle superfici dei picchi dello standard interno con le concentrazioni degli analiti. Per regressione lineare si ottiene la pendenza della retta di calibrazione, dalla quale si calcola la concentrazione dei campioni.

Per il calcolo manuale occorrono i seguenti dati:

- Superficie dei picchi dell'analita A nel cromatogramma MRM =  $A_{\text{Campione}}$
- Superficie dei picchi dello standard interno nel cromatogramma MRM =  $IS_{\text{Campione}}$
- Gradiente della retta di calibrazione =  $a$
- Intercetta della retta di calibrazione =  $b$

Calcolare quindi la concentrazione dell'analita A nel campione ( $C_{\text{Campione}}$ ) con la seguente formula:

$$C_{\text{Campione}} = \frac{(A_{\text{Campione}} / IS_{\text{Campione}}) - b}{a}$$

## Allegato IV: Dati relativi alle prestazioni

IVa: **MassChrom® 25-OH-vitamina D3/D2 in siero/plasma (codice 62000)**

Le prestazioni sono state rilevate e verificate sui seguenti apparecchi:

- AB SCIEX IVD-MS™ Analyzer (Triple Quad™ 4500)
- Spettrometro di massa AB SCIEX API 3200™ con Shimadzu-HPLC come componente per la LC
- Agilent 6460 Triple Quadrupole LC-MS con Agilent 1260/1290 HPLC
- Sistema Waters ACQUITY® TQD System

Se questo kit **MassChrom®** (codice 62000) viene utilizzato su uno spettrometro di massa diverso da quelli qui citati, l'utente deve validare il metodo sull'apparecchio in uso.

### Recupero relativo

Il recupero analitico relativo è stato ricavato con siero e plasma. Gli analiti sono stati introdotti più volte a tre diverse concentrazioni all'interno dei rispettivi intervalli di calibrazione. Il tasso di recupero si calcola con la seguente equazione:

$$\text{Recupero [\%]} = \frac{\text{Concentrazione misurata nel campione fortificato} - \text{Concentrazione nel campione nativo}}{\text{Concentrazione spiked}} \times 100$$

Tabella 29: Tassi di recupero, determinazione con spettrometro di massa Agilent 6460

Sostanza	Tasso di recupero nel siero (concentrazione della sostanza)			Tasso di recupero nel plasma (concentrazione della sostanza)		
	19,2 µg/l	38,5 µg/l	57,7 µg/l	19,2 µg/l	38,5 µg/l	57,7 µg/l
25-OH-vitamina D3	97,1 %	97,0 %	95,8 %	100,6 %	97,8 %	98,0 %
25-OH-vitamina D2	101,9 %	101,8 %	103,4 %	101,7 %	101,5 %	100,1 %

### Recupero

Il recupero analitico è stato ricavato dai gradienti delle rette di calibrazione dopo ripetute addizioni di campioni di siero e plasma e diluizioni delle soluzioni acquose standard. La seguente tabella riporta i tassi di recupero:

Tabella 30: Tassi di recupero, determinazione con AB SCIEX IVD-MS™ Analyzer (Triple Quad™ 4500)

Sostanza	Tasso di recupero nel siero	Tasso di recupero nel plasma
25-OH-vitamina D3	107 %	111 %
25-OH-vitamina D2	109 %	106 %

Tabella 31: Tassi di recupero, determinazione con AB SCIEX API 3200™

Sostanza	Tasso di recupero nel siero	Tasso di recupero nel plasma
25-OH-vitamina D3	93 %	96 %
25-OH-vitamina D2	95 %	91 %

Tabella 32: Tassi di recupero, determinazione con Waters ACQUITY® TQD

Sostanza	Tasso di recupero nel siero	Tasso di recupero nel plasma
25-OH-vitamina D3	101 %	104 %
25-OH-vitamina D2	101 %	101 %

**Limite di quantificazione inferiore (LLOQ) e linearità (limite di quantificazione superiore):**

La linearità è stata determinata aggiungendo campioni di siero e plasma con quantità definite di sostanze standard. Il limite di quantificazione è stato stimato diluendo un campione di plasma con una soluzione di albumina di siero di bovino priva di analiti (7 %, in soluzione salina tamponata con fosfato) oppure con diluizione con siero umano privo degli analiti.

La risposta prodotta dal metodo è lineare dal limite di quantificazione (LLOQ) fino almeno al limite superiore dichiarato (intervallo lineare).

Tabella 33: Linearità e limite di quantificazione, determinazione con AB SCIEX IVD-MS™ Analyzer (Triple Quad™ 4500)

Sostanza	LLOQ	Intervallo di linearità fino ad almeno
25-OH-vitamina D3	1,0 µg/l	250 µg/l
25-OH-vitamina D3 (MRM 2)	1,0 µg/l	250 µg/l
25-OH-vitamina D2	1,0 µg/l	250 µg/l

Tabella 34: Linearità e limite di quantificazione, determinazione con AB SCIEX API 3200™

Sostanza	LLOQ	Intervallo di linearità fino ad almeno
25-OH-vitamina D3	3,0 µg/l	250 µg/l
25-OH-vitamina D2	2,2 µg/l	250 µg/l

Tabella 35: Linearità e limite di quantificazione, determinazione con Agilent 6460

Sostanza	LLOQ	Intervallo di linearità fino ad almeno
25-OH-vitamina D3	2,5 µg/l	250 µg/l
25-OH-vitamina D2	3,5 µg/l	250 µg/l

Tabella 36: Linearità e limite di quantificazione, determinazione con Waters ACQUITY® TQD

Sostanza	LLOQ	Intervallo di linearità fino ad almeno
25-OH-vitamina D3	2,0 µg/l	250 µg/l
25-OH-vitamina D2	1,0 µg/l	250 µg/l

### Riproducibilità intra-assay

I coefficienti di variazione sono stati determinati attraverso la ripetuta elaborazione (n = 10) dello stesso campione a due diverse concentrazioni.

Tabella 37: Riproducibilità intra-assay, determinazione con AB SCIEX IVD-MS™ Analyzer (Triple Quad™ 4500)

Sostanza	Coefficiente di variazione (concentrazione della sostanza)	
	concentrazione bassa	concentrazione alta
25-OH-vitamina D3	2,6 % (16,3 µg/l)	3,0 % (38,0 µg/l)
25-OH-vitamina D3 (MRM 2)	3,8 % (16,3 µg/l)	4,4 % (38,0 µg/l)
25-OH-vitamina D2	2,4 % (17,6 µg/l)	4,9 % (41,4 µg/l)

Tabella 38: Riproducibilità intra-assay, determinazione con AB SCIEX API 3200™

Sostanza	Coefficiente di variazione (concentrazione della sostanza)	
	concentrazione bassa	concentrazione alta
25-OH-vitamina D3	2,7 % (26,6 µg/l)	4,2 % (58,2 µg/l)
25-OH-vitamina D2	3,9 % (26,3 µg/l)	4,3 % (53,1 µg/l)

Tabella 39: Riproducibilità intra-assay, determinazione con Agilent 6460

Sostanza	Coefficiente di variazione (concentrazione della sostanza)	
	concentrazione bassa	concentrazione alta
25-OH-vitamina D3	6,7 % (16,5 µg/l)	5,9 % (39,4 µg/l)
25-OH-vitamina D2	5,0 % (15,9 µg/l)	5,6 % (35,9 µg/l)

Tabella 40: Riproducibilità intra-assay, determinazione con Waters ACQUITY® TQD

Sostanza	Coefficiente di variazione (concentrazione della sostanza)	
	concentrazione bassa	concentrazione alta
25-OH-vitamina D3	3,7 % (30,6 µg/l)	3,7 % (61,6 µg/l)
25-OH-vitamina D2	4,5 % (31,3 µg/l)	2,6 % (63,3 µg/l)

### Riproducibilità inter-assay

La riproducibilità inter-assay è stata ricavata attraverso la ripetuta elaborazione (n = 10 risp. n = 5 con Agilent) dello stesso campione a due concentrazioni diverse in 10 giorni diversi.

Tabella 41: Riproducibilità inter-assay, determinazione con AB SCIEX IVD-MS™ Analyzer (Triple Quad™ 4500)

Sostanza	Coefficiente di variazione (concentrazione della sostanza)	
	concentrazione bassa	concentrazione alta
25-OH-vitamina D3	5,1 % (16,3 µg/l)	5,4 % (38,0 µg/l)
25-OH-vitamina D3 (MRM 2)	8,2 % (16,3 µg/l)	8,0 % (38,0 µg/l)
25-OH-vitamina D2	4,3 % (17,6 µg/l)	5,5 % (41,4 µg/l)

Tabella 42: Riproducibilità inter-assay, determinazione con AB SCIEX API 3200™

Sostanza	Coefficiente di variazione (concentrazione della sostanza)	
	concentrazione bassa	concentrazione alta
25-OH-vitamina D3	3,9 % (26,6 µg/l)	4,0 % (58,2 µg/l)
25-OH-vitamina D2	5,7 % (26,3 µg/l)	4,7 % (53,1 µg/l)

Tabella 43: Riproducibilità inter-assay, determinazione con Agilent 6460

Sostanza	Coefficiente di variazione (concentrazione della sostanza)	
	concentrazione bassa	concentrazione alta
25-OH-vitamina D3	9,9 % (16,5 µg/l)	7,3 % (39,4 µg/l)
25-OH-vitamina D2	6,4 % (15,9 µg/l)	6,7 % (35,9 µg/l)

Tabella 44: Riproducibilità inter-assay, determinazione con Waters ACQUITY® TQD

Sostanza	Coefficiente di variazione (concentrazione della sostanza)	
	concentrazione bassa	concentrazione alta
25-OH-vitamina D3	6,0 % (30,6 µg/l)	5,3 % (61,6 µg/l)
25-OH-vitamina D2	6,1 % (31,3 µg/l)	4,6 % (63,3 µg/l)

Questi dati sono stati ricavati nei nostri laboratori, esclusivamente per la verifica delle prestazioni del kit di reagenti e al fine di garantire l'osservanza delle norme di validazione. Si avvisa esplicitamente che tali dati non sono adatti a confrontare i sistemi di validazione utilizzati e a trarre conclusioni sulle loro capacità di prestazione in generale.

#### IVb: Upgrade per 3-*epi*-25-OH-vitamina D3/D2

Per la verifica della linearità e la validazione sono stati più volte elaborati campioni di siero e plasma addizionati con quantità definite di vitamina D3/D2 3-*epi*-25-OH e di vitamina D3/D2 (25-OH). Per la validazione è stato utilizzato uno spettrometro di massa AB SCIEX API 4000™ con Shimadzu-HPLC come componente per la LC.

#### Tasso di recupero

Il recupero analitico è stato ricavato dai gradienti delle rette di calibrazione dopo ripetute addizioni di campioni di siero e plasma e diluizioni delle soluzioni acquose standard. La seguente tabella riporta i tassi di recupero:

Tabella 45: Tassi di recupero, determinazione con AB SCIEX API 4000™

Sostanza	Tasso di recupero nel siero	Tasso di recupero nel plasma
25-OH-vitamina D3	110 %	107 %
3- <i>epi</i> -25-OH-vitamina D3	106 %	102 %
25-OH-vitamina D2	102 %	104 %
3- <i>epi</i> -25-OH-vitamina D2	104 %	105 %

**Limite di quantificazione inferiore (LLOQ) e linearità (limite di quantificazione superiore):**

La linearità è stata determinata aggiungendo campioni di siero e plasma con quantità definite di sostanze standard. Il limite di quantificazione è stato stimato attraverso la diluizione di un campione di siero/plasma con una soluzione di albumina di siero di bovino priva di analiti (7 %, in soluzione salina tamponata con fosfato).

La risposta prodotta dal metodo è lineare dal limite di quantificazione (LLOQ) fino almeno al limite superiore dichiarato (intervallo lineare).

Tabella 46: Linearità e limite di quantificazione, determinazione con AB SCIEX API 4000™

Sostanza	LLOQ	Intervallo di linearità fino ad almeno
25-OH-vitamina D3	2,0 µg/l	250 µg/l
3-epi-25-OH-vitamina D3	2,0 µg/l	250 µg/l
25-OH-vitamina D2	1,0 µg/l	250 µg/l
3-epi-25-OH-vitamina D2	1,0 µg/l	250 µg/l

**Riproducibilità intra-assay**

I coefficienti di variazione sono stati determinati attraverso la ripetuta elaborazione (n = 10) dello stesso campione a 2 diverse concentrazioni.

Tabella 47: Riproducibilità intra-assay, determinazione con AB SCIEX API 4000™

Sostanza	Coefficiente di variazione (concentrazione della sostanza)	
	concentrazione bassa	concentrazione alta
25-OH-vitamina D3	3,2 % (17,7 µg/l)	1,7 % (66,7 µg/l)
3-epi-25-OH-vitamina D3	4,7 % (9,4 µg/l)	2,8 % (28,3 µg/l)
25-OH-vitamina D2	2,5 % (14,2 µg/l)	3,0 % (55,9 µg/l)
3-epi-25-OH-vitamina D2	3,8 % (8,7 µg/l)	2,3 % (26,3 µg/l)

**Riproducibilità inter-assay**

La riproducibilità inter-assay è stata determinata attraverso la ripetuta elaborazione in 10 giorni diversi dello stesso campione a due diverse concentrazioni.

Tabella 48: Riproducibilità inter-assay, determinazione con AB SCIEX API 4000™

Sostanza	Coefficiente di variazione (concentrazione della sostanza)	
	concentrazione bassa	concentrazione alta
25-OH-vitamina D3	4,0 % (17,7 µg/l)	2,5 % (66,7 µg/l)
3-epi-25-OH-vitamina D3	2,4 % (9,4 µg/l)	4,7 % (28,3 µg/l)
25-OH-vitamina D2	3,4 % (14,2 µg/l)	3,5 % (55,9 µg/l)
3-epi-25-OH-vitamina D2	2,8 % (8,7 µg/l)	2,4 % (26,3 µg/l)

Questi dati sono stati ricavati nei nostri laboratori, esclusivamente per la verifica delle prestazioni del kit di reagenti e al fine di garantire l'osservanza delle norme di validazione. Si avvisa esplicitamente che tali dati non sono adatti a confrontare i sistemi di validazione utilizzati e a trarre conclusioni sulle loro capacità di prestazione in generale.

**IVc: MassChrom® 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> e 3-epi-25-OH-vitamina D<sub>3</sub> in siero/plasma (codice 62062)**

Le prestazioni sono state rilevate e verificate sui seguenti apparecchi:

- spettrometro di massa SCIEX 4500MD™ con sistema UPLC Shimadzu Nexera XR
- spettrometro di massa Waters® Xevo™ TQ-S micro con sistema UPLC ACQUITY™ UPLC® I-Class

Se questo kit **MassChrom®** (codice 62062) viene utilizzato su uno spettrometro di massa diverso da quelli qui citati, l'utente deve validare il metodo sull'apparecchio in uso.

**Recupero**

Il recupero analitico relativo è stato ricavato con le matrici siero e plasma. A questo scopo la matrice è stata addizionata più volte con gli analiti. Sono state analizzate tre diverse concentrazioni negli intervalli di lavoro degli analiti. Il tasso di recupero si calcola con la seguente equazione:

$$\text{Recupero [\%]} = \frac{\text{Concentrazione misurata nel campione fortificato} - \text{Concentrazione nel campione nativo}}{\text{Concentrazione spiked}} \times 100$$

Tabella 49: Tassi di recupero, determinazione con spettrometro di massa SCIEX 4500MD™

Sostanza	Tasso di recupero nel siero (concentrazione della sostanza)			Tasso di recupero nel siero (concentrazione della sostanza)		
	10 µg/l	30 µg/l	50 µg/l	10 µg/l	30 µg/l	50 µg/l
25-OH-vitamina D <sub>3</sub>	85 %	102 %	104 %	91 %	105 %	106 %
25-OH-vitamina D <sub>2</sub>	107 %	105 %	109 %	113 %	104 %	108 %
3-epi-25-OH-vitamina D <sub>3</sub>	102 %	104 %	107 %	96 %	101 %	102 %

Tabella 50: Tassi di recupero, determinazione con spettrometro di massa Waters® Xevo™ TQ-S micro

Sostanza	Tasso di recupero nel siero (concentrazione della sostanza)			Tasso di recupero nel siero (concentrazione della sostanza)		
	10 µg/l	30 µg/l	50 µg/l	10 µg/l	30 µg/l	50 µg/l
25-OH-vitamina D <sub>3</sub>	81 %	91 %	92 %	94 %	90 %	92 %
25-OH-vitamina D <sub>2</sub>	100 %	100 %	107 %	103 %	104 %	102 %
3-epi-25-OH-vitamina D <sub>3</sub>	104 %	105 %	111 %	118 %	110 %	112 %

**Limite di quantificazione inferiore (LLOQ) e linearità (limite di quantificazione superiore)**

La linearità è stata determinata addizionando siero/plasma con quantità definite di sostanze standard. Il limite di determinazione è stato valutato attraverso la diluizione di un campione di siero o plasma con una soluzione di sieralbumina bovina priva di analita (7%, in soluzione salina tamponata al fosfato).

La risposta prodotta dal metodo è lineare dal limite di quantificazione (LLOQ) fino almeno al limite superiore dichiarato (intervallo lineare).

Tabella 51: Linearità e limite di quantificazione, determinazione con spettrometro di massa SCIEX 4500MD™

Sostanza	Limite di quantificazione	Intervallo di linearità fino ad almeno
25-OH-vitamina D3	1,5 µg/l	250 µg/l
25-OH-vitamina D2	1,5 µg/l	250 µg/l
3-epi-25-OH-vitamina D3	1,5 µg/l	250 µg/l

Tabella 52: Linearità e limite di quantificazione, determinazione con spettrometro di massa Waters® Xevo™ TQ-S micro

Sostanza	Limite di quantificazione	Intervallo di linearità fino ad almeno
25-OH-vitamina D3	2,5 µg/l	250 µg/l
25-OH-vitamina D2	2,5 µg/l	250 µg/l
3-epi-25-OH-vitamina D3	2,5 µg/l	250 µg/l

### Riproducibilità intra-assay

I coefficienti di variazione sono stati determinati attraverso preparazioni ripetute (n = 10) dello stesso campione di siero a tre diverse concentrazioni nella stessa sequenza.

Tabella 53: Riproducibilità intra-assay, determinazione con spettrometro di massa SCIEX 4500MD™

Sostanza	Coefficiente di variazione (concentrazione della sostanza)		
25-OH-vitamina D3	2,4 % (17,2 µg/l)	2,8 % (30,9 µg/l)	2,2 % (44,6 µg/l)
25-OH-vitamina D2	1,0 % (18,7 µg/l)	2,7 % (30,9 µg/l)	1,8 % (43,0 µg/l)
3-epi-25-OH-vitamina D3	2,9 % (14,7 µg/l)	3,8 % (20,0 µg/l)	3,3 % (25,3 µg/l)

Tabella 54: Riproducibilità intra-assay, determinazione con spettrometro di massa Waters® Xevo™ TQ-S micro

Sostanza	Coefficiente di variazione (concentrazione della sostanza)		
25-OH-vitamina D3	8,1 % (17,2 µg/l)	5,0 % (30,9 µg/l)	9,5 % (44,6 µg/l)
25-OH-vitamina D2	7,6 % (18,7 µg/l)	7,8 % (30,9 µg/l)	6,8 % (43,0 µg/l)
3-epi-25-OH-vitamina D3	6,8 % (14,7 µg/l)	5,8 % (20,0 µg/l)	6,6 % (25,3 µg/l)

### Riproducibilità inter-assay

La riproducibilità inter-assay è stata ricavata attraverso la preparazione ripetuta (n = 5) dello stesso campione di siero a tre concentrazioni diverse in 20 giorni diversi.

Tabella 55: Riproducibilità inter-assay, determinazione con spettrometro di massa SCIEX 4500MD™

Sostanza	Coefficiente di variazione (concentrazione della sostanza)		
25-OH-vitamina D3	5,3 % (17,2 µg/l)	5,8 % (30,9 µg/l)	5,6 % (44,6 µg/l)
25-OH-vitamina D2	6,5 % (18,7 µg/l)	6,8 % (30,9 µg/l)	7,4 % (43,0 µg/l)
3-epi-25-OH-vitamina D3	9,0 % (14,7 µg/l)	8,6 % (20,0 µg/l)	9,4 % (25,3 µg/l)

Tabelle 56: Riproducibilità inter-assay, determinazione con spettrometro di massa Waters® Xevo™ TQ-S micro

Sostanza	Coefficiente di variazione (concentrazione della sostanza)		
25-OH-vitamina D3	8,0 % (17,2 µg/l)	8,9 % (30,9 µg/l)	10,3 % (44,6 µg/l)
25-OH-vitamina D2	7,2 % (18,7 µg/l)	8,1 % (30,9 µg/l)	8,7 % (43,0 µg/l)
3-epi-25-OH-vitamina D3	9,7 % (14,7 µg/l)	10,9 % (20,0 µg/l)	10,3 % (25,3 µg/l)

Questi dati sono stati ricavati nei nostri laboratori, esclusivamente per la verifica delle prestazioni del kit di reagenti e al fine di garantire l'osservanza delle norme di validazione. Si avvisa esplicitamente che tali dati non sono adatti a confrontare i sistemi di validazione utilizzati e a trarre conclusioni sulle loro capacità di prestazione in generale.

#### Drift

Per la definizione del drift della concentrazione degli analiti nel tempo è stata messa a confronto per un periodo di 20 giorni la concentrazione di tutti gli analiti nei tre controlli utilizzati. Non è stato osservato alcun drift per nessun analita.

#### Carry-Over (contaminazione)

Immediatamente dopo alla misurazione dello standard di calibrazione con la più elevata concentrazione di analita è stato iniettato il bianco, confrontando le aree dei picchi di entrambi. Dalla verifica dei dati ricavati, per tutti e quattro gli analiti non risultano effetti di carry-over. Per tutte le misurazioni, la concentrazione del bianco si situava al di sotto del limite di rivelazione.

COPY

**EC-Declaration of Conformity**

according to directive 98/79 EC on in vitro diagnostic medical devices

We, as manufacturer

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH  
 Am Haag 12  
 D-82166 Gräfelfing, Germany

declare on our own responsibility, that herein after called in vitro diagnostic medical devices for the LC-MS/MS determination of:

Nomenclature term: 25-Hydroxyvitamin D

Nomenclature code: 12-06-03-10-00

Classification: other product

Product name: **MassChrom® 25-OH-Vitamin D3/D2 in Serum/Plasma incl.  
 Upgrade 3-epi-25-OH-Vitamin D3/D2**

Controls: **MassCheck® 25-OH-Vitamin D3/D2 Serum Control**  
**MassCheck® 3-epi-25-OH- D3/D2 and 25-OH- D3/D2 Serum Control**

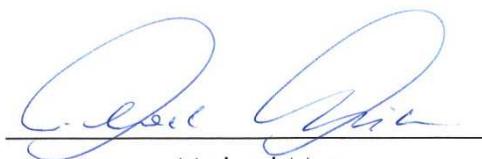
meets all applicable requirements of the directive 98/79/EC

Conformity assessment procedure:  
 Annex III of the directive 98/79/EC

Applied harmonized standards:  
 EN ISO 9001, EN ISO 13485, EN ISO 14971, EN ISO 18113-2, EN 980,  
 EN ISO 23640, EN 13641

Notified body: -

Gräfelfing, December 12, 2012



Michael Meier  
 Managing Director

Vers. 1.0

[Traduzione]

## Dichiarazione di conformità

ai sensi della direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro

Noi, come produttore,

*Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH*  
*AmHaag 12*  
*D-82166 Gräfelfing, Germania*

dichiariamo sotto la propria responsabilità che i sottocitati prodotti per la diagnostica in-vitro per la determinazione LC-MS/MS

Denominazione nomenclatura: 25-Hydroxyvitamin D  
Codice nomenclatura: 12-06-03-10-00  
Classificazione: *altro dispositivo*

Denominazione prodotto: **MassChrom®** 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> in siero/plasma  
Incl. Upgrade 3-epi-25-OH-vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub>

Controlli: **MassCheck®** 25-OH-Vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> Serum Control  
**MassCheck®** 3-epi-25-OH-D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> and 25-OH-D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> Serum Control

sono conformi ai requisiti della direttiva 98/79 CE.

Procedura di valutazione della conformità:

Allegato III della direttiva 98/79 CE.

Norme armonizzate applicate:

*EN ISO 9001, EN ISO 13485, EN ISO 14971, EN 18113-2, EN 980, EN 23640,*  
*EN 13641*

Organismo notificato:-

Gräfelfing, 12 dicembre 2012

---

M. Meier  
Amministratore delegato

## Allegato VI: Simboli

Le etichette, procedure e confezioni dei prodotti Chromsystems utilizzano simboli ai sensi della norma EN ISO 15223-1, il cui significato è descritto nella seguente tabella:

Tabella 57: Simboli

Simboli	Significato
	Produttore
	Utilizzabile fino
	Codice articolo
	Lotto
	Osservare le istruzioni per l'uso!
	Limite di temperatura superiore: Conservare a temperature inferiori al valore indicato
	Intervallo di temperatura: Conservare a temperature all'interno di un intervallo definito
	Diagnostica <i>in-vitro</i>