

Vitamin B₆ HPLC Kit

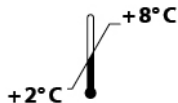
Zur Bestimmung von Vitamin B₆ in Plasma, Serum und
EDTA-Vollblut

For the determination of Vitamin B₆ in plasma, serum and
EDTA-whole blood

Gültig ab / Valid from 08.05.2013

REF

KC2150



CAL
CTRL 1
CTRL 2



Immundiagnostik AG
Stubenwald-Allee 8a
D-64625 Bensheim

IVD



Inhalt

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

1. VERWENDUNGSZWECK

Die HPLC-Applikation ist für die Bestimmung von Vitamin B₆ aus Plasma, Serum und EDTA-Vollblut geeignet. Nur zur in vitro Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Vitamin B₆ ist der Sammelbegriff für Pyridoxin, Pyridoxal, Pyridoxamin und deren Phosphatverbindungen. Alle können im Stoffwechsel in die eigentliche Wirkform Pyridoxal-5-Phosphat umgewandelt werden.

Pyridoxal-5-Phosphat (hier als Vitamin B₆ bezeichnet) ist als Coenzym im Proteinstoffwechsel für über 50 Reaktionen unentbehrlich. Durch dieses Coenzym werden Aminosäuren auf-, um- und abgebaut. Vitamin B₆ fördert die Aminosäureresorption und deren Transport in die Zelle. Bei der Blutbildung ist es als Bestandteil des hämbildenden Enzyms beteiligt. Weiterhin werden durch Vitamin B₆ Neurotransmitter und biogene Amine (z.B. Histamin) gebildet.

Die Speicherfähigkeit von Vitamin B₆ beträgt 2-6 Wochen. Die Symptome eines Vitamin B₆- Mangels sind u.a. Störungen der Proteinbiosynthese, Muskelschwund, Hautveränderungen (Schuppung, Hyperpigmentierung) und Störungen des Nervensystems (Reizbarkeit, Depressionen, Lähmungen).

Indikationen

- Ermittlung des Vitamin B₆-Status
- Homocysteinämie
- Hautveränderungen
- Bewegungsstörungen
- Anämie, Depressionen

3. TESTPRINZIP

Zur Bestimmung des Vitamin B₆ wird im ersten Schritt eine Probenvorbereitung mit angeschlossener Derivatisierung durchgeführt. Zunächst erfolgt ein Fällungsschritt, bei dem höhermolekulare Substanzen abgetrennt werden. Nachdem die Probe zentrifugiert wurde, wird der Überstand abgenommen und ein Derivatisierungsreagenz zugegeben und für 20 min bei 60°C inkubiert, wobei das Vitamin B₆ in ein fluoreszierendes Produkt umgesetzt wird. Die Probe wird abgekühlt (2-8 °C), zentrifugiert und in die HPLC injiziert.

Die Trennung mittels HPLC erfolgt in einem isokratischen Verfahren bei 30 °C auf einer „reversed phase“ Säule. Die Aufnahme der Chromatogramme erfolgt mit einem Fluoreszenzdetektor. Die Trennung benötigt ca. 10 Minuten für einen Lauf. Die Quantifizierung erfolgt über den mitgelieferten Plasma-Kalibrator und die Berechnung der Ergebnisse wird über die „externe Standard-Methode“ anhand der Integration der Peakhöhen durchgeführt.

Zusammenfassung

Der hier vorliegende Komplettkit zur Bestimmung des Vitamin B₆ ermöglicht eine einfache, schnelle und präzise quantitative Bestimmung. Dieser Komplettkit enthält gebrauchsfertig alle Reagenzien und Verbrauchsmaterialien für die Aufbereitung der Proben und die analytische HPLC-Trennung.

Wie auch bei vielen anderen Parametern liegt der Vorteil der HPLC-Analytik in der gleichzeitigen Abarbeitung vieler Analyten in einem Test. Die HPLC-System-Komplettlösung ermöglicht auch Laboratorien, die bislang noch keine Erfahrung mit Hochdruckflüssigkeitschromatographie haben, diese Technik schnell und problemlos für klinisch-chemische Routinezwecke einzusetzen. Für die Kalibrierung des Testsystems ist meist eine Einpunkt-Kalibrierung ausreichend, im Gegensatz zu Immunoassays mit bis zu 6 Kalibratoren pro Testansatz. Eine Automatisierung der Probenaufgabe und der Auswertung ist möglich, sodaß auch größere Probenzahlen fast unbeaufsichtigt abgearbeitet werden können. (Bei kurzen Serienlängen ist die Einpunktkalibrierung sehr viel wirtschaftlicher gegenüber der 6-Punkt-Kalibrierung bei Immuno-Assays).

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
KC2100LM	MOPHA	Laufmittel (enthält Na-Azid)	1000 ml
KC2100KA	CAL	Kalibrator (lyoph. 500 µl; Konzentration siehe Etikett)	5 x 1 Fläschchen
KC2150FR	PREC	Fällungsreagenz	30 ml
KC2100RE	RECSOL	Rekonstitutionslösung	10 ml
KC2100DL	DER	Derivatisierungslösung (enthält KCN)	3 x 8,5 ml
KC2100KO	CTRL 1 CTRL 2	Kontrolle 1 und 2 (lyoph. 250 µl; Konzentration siehe Produktspezifikation)	2 x 3 Fläschchen

Die HPLC Trennsäule (KC 2100 RP) kann separat bei Immundiagnostik bestellt werden. Neben den kompletten Kits können auch alle Komponenten einzeln bestellt werden. Bitte fordern Sie unsere Einzelkomponentenpreisliste an.

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

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

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Der **CAL** (Kalibrator; Plasma mit definierter Menge Vitamin B₆) wird in **500 µl RECSOL** (Rekonstitutionslösung) gelöst. Der Gehalt an Vitamin B₆ ändert sich geringfügig von Charge zu Charge, der genaue Gehalt ist auf dem Etikett angegeben.
- Die **CTRL 1** und **CTRL 2** (Kontrolle 1 und 2) werden in **250 µl RECSOL** (Rekonstitutionslösung) gelöst.
- Die restlichen Testreagenzien werden gebrauchsfertig in gelöster Form geliefert.
- Die **Testreagenzien sind bei 2-8 °C**, der **CAL** (Kalibrator) und die **CTRL 1** und **CTRL 2** (Kontrolle 1 und 2) **bei -20 °C**, bis zum Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Kalibrator und Kontrollen sind auf Humanplasma aufgebaut. Sie sind auf Hepatitis-B Oberflächenantigen (HBsAg), HCV, HIV-1 und HIV-2 Antikörper getestet und für negativ befundet worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Das **PREC** (Fällungsreagenz) besteht aus Säure und muss mit Vorsicht behandelt werden. Sie verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Die **DER** (Derivatisierungslösung) enthält KCN und sollte unter dem Abzug pipettiert werden.

8. PROBENVORBEREITUNG

Als Probe eignet sich Serum und EDTA-Plasma, das aus venösem Nüchternblut gewonnen wird oder EDTA-Vollblut.

Da Vitamin B₆ sehr licht- und temperaturempfindlich ist sollte die Probe vor Licht geschützt, gekühlt und sofort abzentrifugiert werden.

Die Haltbarkeit der Probe beträgt bei 2-8 °C im Dunkeln 1 Woche. Zur längeren Lagerung sollte die Probe bei -20 °C aufbewahrt werden.

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

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

Arbeitsschema

In 1,5 ml Reaktionsgefäße (z.B. Eppendorf) werden pipettiert:	
1.	200 µl CAL (Kalibrator), Patientenprobe bzw. CTRL 1 und CTRL 2 (Kontrolle 1 und 2) +
2.	300 µl PREC (Fällungsreagenz) Mindestens 30 Sekunden vortexen.
3.	Gut mischen, 10 Minuten bei 2-8 °C stehen lassen und anschließend für 2 min bei 10.000 g zentrifugieren.
4.	250 µl des Überstandes +
5.	250 µl DER (Derivatisierungslösung)
6.	Mischen, für 20 min bei 60 °C auf Schüttler inkubieren, danach bei 2-8 °C abkühlen und für 5 min bei 10.000 g zentrifugieren. Den Überstand abnehmen, dieser ist als Probe jetzt 5 Tage bei 2-8 °C im Dunkeln stabil.
7.	50 µl Überstand in HPLC-System injizieren.

Chromatographische Bedingungen

Säulenmaterial: Prontosil Eurobond; 5 µm
Merck Lichrospher; 5 µm
MZ- Inertsil ODS-2; 5 µm

Säulendimension: 125 mm x 4 mm

Fluss : 1 - 1,5 ml/min

(der genaue Fluss ist auf der Produktspezifikation der jeweiligen Säule angegeben)

Fluoreszenzdetektor : Exzitation: 320 nm
Emission: 415 nm

Laufzeit pro Chromatogramm : 7 min
(bei Dialysepatienten 15 min)

Temperatur: 30 °C

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

10. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE

Nach der Analyse sollte die Trennsäule mit ca. 30 ml Aqua bidest bei einem Fluss von 1 ml/min gespült werden. Anschließend wird die Säule in 50% Methanol in Wasser gelagert (ca. 30 ml, Fluss 0,5 ml/min).

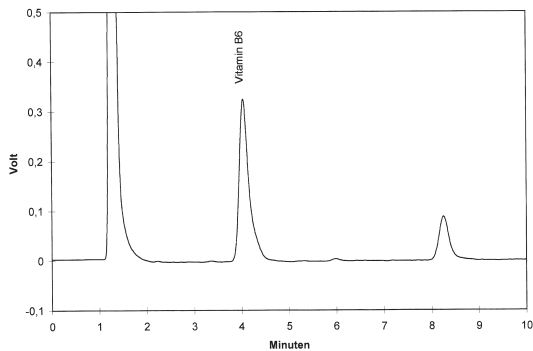
Zur Wiederinbetriebnahme wird das ganze System mit ca. 30 ml MOPHA (Laufmittel) äquilibriert.

11. AUSWERTUNG

Berechnung

$$\text{Konzentration Probe} = \frac{\text{Peakhöhe Probe} \times \text{Konzentration des Kalibrators}}{\text{Peakhöhe Kalibrator}}$$

Musterchromatogramm



12. QUALITÄTSKONTROLLE

Normbereich:

Serum und Plasma

4,3 - 17,5 ng/ml (n = 90)

Vollblut

8,7 - 27,2 ng/ml*

*Quelle: den Ottolander, Diagnostisch Kompas, 1997 Ziekenfondsraad, Amstelveen, Holland

Wir empfehlen, dass jedes Labor seinen eigenen Normalwerte-Bereich erstellt, weil Referenzbereiche stark von der Auswahl des Probandenkollektivs abhängig sind. Die Angabe des Normbereichs für Vitamin B₆ zwischen 4,3 - 17,5 ng/ml dient lediglich der Orientierung und kann von anderen publizierten Daten abweichen.

(Lehrbuch für klinische Chemie und Pathobiochemie, Schattauer Stuttgart / New York, 1987: 3,6 - 18 ng/ml (14,6 - 72,8 pmol/ml))

Kontrollen

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

13. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay VK: 2,3 % (28,4 ng/ml) [n = 12]

Inter-Assay VK: 5,4 % (12,9 ng/ml) [n = 12]

Linearität:

bis 250 ng/ml

Nachweisgrenze:

1,04 ng/ml

Wiederfindung:

84,1 % (Vollblut)

97,0 % (Plasma)

14. ENTSORGUNG

Die DER (Derivatisierungslösung) kann mit Wasserstoffperoxid oxidiert werden und nachdem der pH Wert mit Natronlauge auf 6-8 eingestellt wurde als wässrige Salzlösung entsorgt werden.

Das MOPHA (Laufmittel) und das PREC (Fällungsreagenz) kann mit Natronlauge neutralisiert und bei neutralem pH als Salzlösung entsorgt werden.

Achtung: Wärmeentstehung!

15. MASSNAHMEN BEI STÖRUNGEN

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

Problemstellung	Mögliche Ursache	Behebung
Basislinie driftet	Detektorlampe noch kalt	Warten
	Detektorlampe zu alt	Ggf. Lampe erneuern
	System noch nicht im Gleichgewicht	System mit mobiler Phase 15 min spülen
	Pumpe fördert ungenau	Pumpe überprüfen, entlüften
Unruhige Basislinie	Pumpe fördert ungenau	Pumpe überprüfen, entlüften
	Detektorzelle verschmutzt	Detektorzelle reinigen

16. LITERATUR

Ambrosch A. et al. (2000). Relation between homocysteinaemia and diabetic neuropathy in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabetic Med* 18; 185-192.

Dierkes J. et al. (2001). Vitamin supplementation can markedly reduce the homocysteine elevation induced by fenofibrate. *Atherosclerosis* 158; 161-164.

Dierkes et al. (2001). Homocysteine lowering effect of different multivitamin preparations in patients with end-stage renal disease. *J Renal Nut* 11; 67-72.

17. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Reagenzien dieser Testpackung enthalten organische Lösungsmittel. Berührungen mit der Haut oder den Schleimhäuten sind zu vermeiden.
- Sämtliche in der Testpackung enthaltene Reagenzien dürfen ausschließlich zur in-vitro-Diagnostik eingesetzt werden.
- Die Reagenzien sollten nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden (Verfallsdatum siehe Testpackung).
- Einzelkomponenten mit unterschiedlichen Lot-Nummern aus verschiedenen Testpackungen sollten nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die dafür erstellten Richtlinien für medizinische Laboratorien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten und der Aufbereitung der Proben wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für direkt daraus resultierende Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung



Kontrollen



Kalibrator

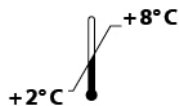
Vitamin B₆ HPLC Kit

For the determination of Vitamin B₆ in plasma, serum and
EDTA-whole blood

Valid from 08.05.2013



KC2150



CAL
CTRL 1
CTRL 2



Immundiagnostik AG
Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany



Content

- 1. INTENDED USE.....15**
- 2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST15**
- 3. PRINCIPLE OF THE TEST15**
- 4. MATERIAL SUPPLIED16**
- 5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED17**
- 6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS.....17**
- 7. PRECAUTIONS17**
- 8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION18**
- 9. ASSAY PROCEDURE18**
 - Procedural notes18
 - Sample and standard preparation.....19
 - Chromatographic conditions19
- 10. TREATMENT OF THE COLUMN20**
- 11. RESULTS20**
 - Calculation20
 - Typical chromatogram20
- 12. QUALITY CONTROL21**
 - Expected values21
 - Controls21
- 13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS21**
 - Precision and reproducibility21
 - Linearity:.....21
 - Detection limit:22
 - Recovery:22
- 14. DISPOSAL.....22**
- 15. TROUBLESHOOTING22**
- 16. REFERENCES23**
- 17. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE24**

1. INTENDED USE

The Immundiagnostik Assay is intended for the quantitative determination of vitamin B₆ in plasma, serum and EDTA-whole blood. This Assay is designed for in vitro diagnostic use only.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Vitamin B₆ is the term for pyridoxin, pyridoxal and pyridoxamin and the appropriate phosphate products. All forms can be transformed into the active form pyridoxal-5-phosphate (here described as „vitamin B₆“).

Vitamin B₆ functions as a coenzyme and is essential for more than 50 reactions in the protein metabolism thereby synthesizing, transforming or degrading amino acids. Vitamin B₆ supports the resorption of amino acids and their transport into the cells. Furtheron vitamin B₆ contributes to the synthesis of neuro transmitters and amine products (histamin).

Due to the fact that vitamin B₆ contributes to a variety of different reactions lack of vitamin B₆ results in various clinical pictures.

Applications:

- determination of vitamin B₆ status
- homocysteinaemia
- skin diseases
- movement disorders
- Anaemia, depression

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The first step in the determination of Vitamin B₆ includes the sample preparation with additional derivatisation. During the precipitation higher molecular substances are removed. After centrifugation the supernatant is used for derivatisation (20 min at 60°C) thereby transforming the vitamin B₆ into a fluorescent product. The sample is cooled, centrifuged and injected into the HPLC system.

The separation via HPLC follows an isocratic method at 30°C using a „reversed phase“ column; one run lasts 10 minutes. The quantification is performed with the delivered plasma calibrator; the concentration is calculated via integration of the peak heights.

Summary

The application of vitamin B₆ for HPLC makes it possible to determine the vitamin in an easy, fast and precise method. The kits includes all reagents in ready to use form for preparation and separation of the samples with exception of the columns.

As many other parameters the advantage of HPLC analytics is the simultaneous handling of many analytes in a single test. The HPLC complete system enables even laboratories without experience in „high performance liquid chromatography“ to use this technique for clinical chemical routines quickly and precisely. Mostly a one-point calibration is sufficient for calibrating the test system - unlike immuno assays with up to 6 calibrators per test. It is possible to automate the sample application and calculation of the results so that even higher number of samples can be handled nearly without control. (With short test series the one-point calibration is much more economic than 6-point calibration for immuno assays).

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat.No	Label	Kit Components	Quantity
KC2100LM	MOPHA	Mobile phase	1000 ml
KC2100KA	CAL	Calibrator, 500 µl lyophilized	5 x 1 vial
KC2150FR	PREC	Precipitating reagent	30 ml
KC2100RE	RECSOL	Reconstitution solution	10 ml
KC2100DL	DER	Derivatization solution)	3 x 8,5 ml
KC2100KO	CTRL 1 CTRL 2	Control 1 and 2; 250 µl lyophilized	2 x 3 vials

HPLC column (KC 2100 RP) as well as individual components can be ordered separately from Immundiagnostik. Please ask for the price list of the individual components.

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

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

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- Reconstitute the **CAL** (calibrator) in **500 µl RECSOL** (reconstitution solution). The concentration of vitamin B₆ might have minor changes from lot to lot.
- Reconstitute **CTRL 1, CTRL 2** (control 1 and 2) in **250 µl RECSOL** (reconstitution solution).
- **All other test reagents are stable at 2-8 °C**, the **CAL** (calibrator) and **CTRL 1, CTRL 2** (control 1 and 2) **at -20 °C**, up to the date of expiry stated on the label.

7. PRECAUTIONS

- Human materials used in kit components were tested for hepatitis-B (HBsAg), HCV, HIV-1 and HIV-2 antibodies and found to be negative. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- The **PREC** (precipitating reagent) contains acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- The **DER** (derivatization solution) contains KCN and should be pipetted in a fume hood.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

EDTA-plasma and serum or EDTA-whole blood are suitable for use in the assay.

Vitamin B₆ is light- and temperature sensitive; therefore samples have to be protected from light and cooled and centrifuged immediately.

The samples are stable in the dark at 2-8°C for 1 week. For longer storage samples should be frozen at -20°C.

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Quality control guidelines should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

Sample and standard preparation

Pipette into 1.5 ml reaction tubes:	
1.	200 µl CAL (calibrator), serum sample or CTRL 1 and CTRL 2 (control 1 and 2) +
2.	300 µl PREC (precipitating reagent) Vortex for at least 30 seconds.
3.	Mix well. Leave the tubes for 10 minutes at 2-8°C and centrifuge afterwards at 10.000g for 2 minutes .
4.	250 µl supernatant +
5.	250 µl DER (derivatization solution)
6.	Mix well. Incubate for 20 minutes at 60°C on a shaker or in a waterbath; cool to 2-8°C and centrifuge at 10.000g for 5 minutes . Take supernatant. It is stable in the dark for 5 days at 2-8°C .
7.	Inject 50 µl of the supernatant into the HPLC-system.

Chromatographic conditions

Column material:	Bischoff Prontosil Eurobond, 5 µm Merck Lichrospher 5 µm MZ- Inertsil ODS-2; 5 µm		
Column dimension:	125 mm x 4 mm		
Flow rate:	1-1.5 ml/min		
Detection :	Fluorescence:	Excitation	320 nm
		Emission	415 nm
Injection volume:	20 µl		
Running time:	7 min (Dialysis patients 15 minutes)		
Temperature:	30 °C		

10. TREATMENT OF THE COLUMN

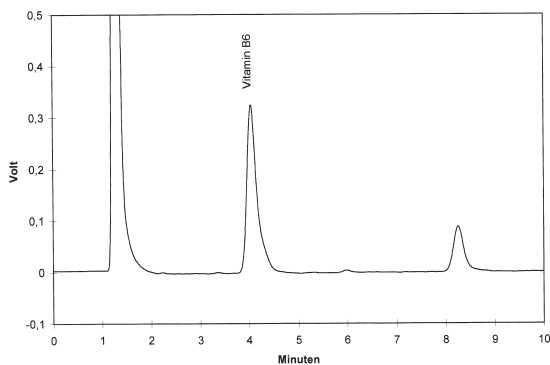
After the analysis the column should be flushed with 30 ml aqua bidest (1 ml/min) and stored in 50% methanol in aqua bidest (ca. 30 ml, flow 0.5 ml/min). Before use, the system should be equilibrated with ca. 30 ml Eluent.

11. RESULTS

Calculation

$$\text{Concentration sample} = \frac{\text{Peak height sample} \times \text{Concentration of the calibrator}}{\text{Peak height calibrator}}$$

Typical chromatogram



12. QUALITY CONTROL

Expected values

Serum and Plasma

4,3 - 17,5 ng/ml (n = 90)

Whole blood

8,7 - 27,2 ng/ml*

*Reference: den Ottolander, Diagnostisch Kompas, 1997 Ziekenfondsraad, Amstelveen, Holland

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

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

Controls

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

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay CV: 2.3 % (28.4 ng/ml) [n = 12]

Inter-Assay CV: 5.4 % (12.9 ng/ml) [n = 12]

Linearity:

up to 250 ng/ml

Detection limit:

1.04 ng/ml

Recovery:

84.1 % (Whole blood)

97.0 % (Plasma)

14. DISPOSAL

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

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

15. TROUBLESHOOTING

Problem	Possible reasons	Solution
No signal	No or defect connection to evaluation system.	Check signal cord and connection.
	Detector lamp is altered	Change lamp
No peaks	Injector is congested	Check Injector
Double peaks	Dead volume in fittings and / or column	Renew fittings and / or column
Contaminating	Injector dirty	Clean injector
peaks	Contamination at the head of the column	Change direction of the column and rinse for 30 min at low flow rate (0.2 ml/min) with mobile phase
	Air in the system	Degas pump
	Autosampler vials contaminated	Use new vials or clean them with methanol

Problem	Possible reasons	Solution
Broad peaks, tailing	Precolumn / column exhausted	Use new precolumn / column
Variable retention times	Drift in temperature	Use a column oven
	Pump delivers imprecise	Check pump, degas the system
	System is not in steady state yet	Rinse system mobile phase for 15 min
Baseline is drifting	Detector lamp did not reach working temperature yet	Wait
	Detector lamp is too old	Renew lamp
	System is not in steady state yet	Rinse system mobile phase for 15 min
	Pump delivers imprecise	Check pump, degas the system
Baseline is not calm	Pump delivers imprecise	Check pump, degas the system
	Detector flow cell is dirty	Clean flow cell

16. REFERENCES

Ambrosch A. et al. (2000). Relation between homocysteinaemia and diabetic neuropathy in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabetic Med* 18; 185-192.

Dierkes J. et al. (2001). Vitamin supplementation can markedly reduce the homocysteine elevation induced by fenofibrate. *Atherosclerosis* 158; 161-164.

Dierkes et al. (2001). Homocysteine lowering effect of different multivitamin preparations in patients with end-stage renal disease. *J Renal Nut* 11; 67-72.

17. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The test components contain organic solvents. Contact with skin or mucous membranes has to be avoided.
- All reagents in the kit package are for in vitro diagnostic use only.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Guidelines for medical laboratories should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.

Used Symbols:



Store at



Catalog Number



In Vitro Diagnostic Device



No. of tests



Manufacturer



Use by



Chargennummer



Controls



Calibrator

