Arbeitsanleitung / Manual

Vitamin B_6 HPLC Kit

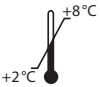
Zur Bestimmung von Vitamin B_6 in Plasma, Serum und Vollblut

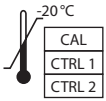
For the determination of vitamin B_6 in plasma, serum and whole blood

Gültig ab / Valid from 2015-12-15

REF KC2150







IVD CE

Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany
Tel.: +49 6251 70190-0 Fax: + 49 6251 849430
e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK 2

2. EINLEITUNG 2

3. TESTPRINZIP 2

4. INHALT DER TESTPACKUNG 3

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL 4

6. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN 4

7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN 4

8. PROBENVORBEREITUNG 5

9. TESTDURCHFÜHRUNG 5

Hinweise 5
Arbeitsschema 6
Chromatographische Bedingungen 6

10. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE 7

11. AUSWERTUNG 7

Berechnung 7
Musterchromatogramm 7

12. QUALITÄTSKONTROLLE 8

Referenzbereiche 8
Kontrollen 8

13. TESTCHARAKTERISTIKA 8

Präzision und Reproduzierbarkeit 8
Linearität 8
Nachweisgrenze 8
Wiederfindung 9

14. ENTSORGUNG 9

15. MASSNAHMEN BEI STÖRUNGEN 9

16. LITERATUR 10

17. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST 10

1. VERWENDUNGSZWECK

Diese HPLC-Applikation ist für die Bestimmung von Vitamin B_6 aus Serum, Plasma und EDTA-Vollblut geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Vitamin B_6 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 B_6 bezeichnet) ist als Coenzym im Proteinstoffwechsel für über 50 Reaktionen unentbehrlich. Durch dieses Coenzym werden Aminosäuren auf-, um- und abgebaut. Vitamin B_6 fördert die Aminosäureresorption und deren Transport in die Zelle. Bei der Blutbildung ist es als Bestandteil des hämbildenden Enzyms beteiligt. Weiterhin werden durch Vitamin B_6 Neurotransmitter und biogene Amine (z. B. Histamin) gebildet.

Die Speicherfähigkeit von Vitamin B_6 beträgt 2–6 Wochen. Die Symptome eines Vitamin-B_6-Mangels sind u. a. Störungen der Proteinbiosynthese, Muskelschwund, Hautveränderungen (Schuppung, Hyperpigmentierung) und Störungen des Nervensystems (Reizbarkeit, Depressionen, Lähmungen).

Indikationen

- Ermittlung des Vitamin-B_6-Status
- Homocysteinämie
- Hautveränderungen
- Bewegungsstörungen
- Anämie, Depressionen

3. TESTPRINZIP

Zur Bestimmung des Vitamin B_6 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 B_6 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 Peakflächen/-höhen durchgeführt.

Zusammenfassung

Der hier vorliegende Komplettkit zur Bestimmung des Vitamin B_6 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 Immunassays.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KC2100LM	MOPHA	Laufmittel (enthält Natrium-Azid)	1000 ml
KC2100KA	CAL	Kalibrator (lyoph. 500 µl; Konzentration siehe Etikett)	5 Fläschchen
KC2150FR	PREC	Fällungsreagenz	30 ml
KC2100RE	RECSOL	Rekonstitutionslösung	15 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 Spezifikationsdatenblatt)	2 x 3 Fläschchen

Die HPLC-Trennsäule (KC2100RP) 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

- Reinstwasser*
- 1,5-ml-Reaktionsgefäße (z. B. Eppendorf)
- Zentrifuge
- Vortex-Mischer
- diverse Pipetten
- HPLC-Gerät mit Fluoreszens-Detektor
- beheizbarer Schüttler
- reversed phase C_{18}-Säule

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

6. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- **Der lyophilisierte CAL** (Kalibrator) ist bei **-20 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor Gebrauch wird er in **500 µl Rekonstitutionslösung** (RECSOL) resuspendiert. Der Gehalt an Vitamin B_6 ändert sich geringfügig von Charge zu Charge, der genaue Gehalt ist auf dem Etikett angegeben.
- **Die lyophilisierten CTRL 1 und CTRL 2** (Kontrolle 1 und 2) sind bei **-20 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor Gebrauch werden sie in je **250 µl Rekonstitutionslösung** (RECSOL) resuspendiert. Der Gehalt an Vitamin B_6 ändert sich geringfügig von Charge zu Charge, der genaue Gehalt ist dem Spezifikationsdatenblatt zu entnehmen.
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig, bei **2–8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf auf Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg), HCV, HIV-1 und HIV-2 Antikörper getestet und für negativ befunden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Das Fällungsreagenz (PREC) besteht aus Säure und muss mit Vorsicht benutzt werden. Es verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet wer-

den. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

- Die Derivatisierungslösung (DER) sollte unter dem Abzug pipettiert werden, da sie KCN enthält.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

8. PROBENVORBEREITUNG

Als Probe eignen sich Serum und EDTA-Plasma, die aus venösem Nüchternblut gewonnen werden, sowie EDTA-Vollblut.

Da Vitamin B_6 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 eine Woche. Zur längeren Lagerung sollte die Probe bei -20 °C aufbewahrt werden.

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

Arbeitsschema

Pipettieren Sie in 1,5-ml-Reaktionsgefäße (z. B. Eppendorf) **200 µl Kalibrator**, **Patientenprobe** oder **Kontrolle 1 oder 2.**
300 µl Fällungsreagenz (PREC) zugeben, für mindestens **30 s vortexen**
10 Minuten bei **2–8 °C** inkubieren
Für **2 min** bei **10 000 *g*** zentrifugieren
250 µl Überstand mit **250 µl Derivatisierungslösung** (DER) versetzen, mischen
Für **20 min** bei **60 °C** auf einem **Schüttler** inkubieren
Bei **2–8 °C** abkühlen
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
50 µl Überstand ins HPLC-System **injizieren**

Chromatographische Bedingungen

Säulenmaterial:	Prontosil Eurobond; 5 µm Merck Lichrospher; 5 µm MZ-Inertsil ODS-2; 5 µm
Säulendimension:	125 × 4 mm
Fluss:	1–1,5 ml/min (der genaue Fluss ist auf der Produktspezifikation der jeweiligen Säule angegeben)
Fluoreszensdetektion:	Exzitation: 320 nm Emission: 415 nm
Temperatur:	30 °C
Laufzeit:	7 Minuten (bei Dialysepatienten 15 min)

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 Reinstwasser bei einem Fluss von 1 ml/min gespült werden. Anschließend wird die Säule in 50 % Methanol in Wasser gelagert (ca. 30 ml, Fluss 0,5 ml/min).

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

11. AUSWERTUNG

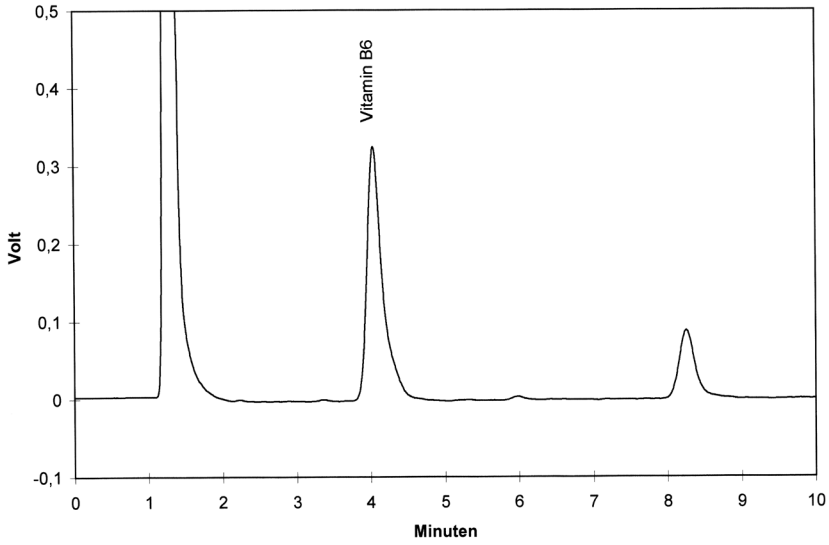
Berechnung

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

* siehe Etikett

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

Musterchromatogramm



12. QUALITÄTSKONTROLLE

Referenzbereiche

Serum und Plasma

- Anhand einer laborinternen Studie mit Proben von augenscheinlich Gesunden (n = 90) wurde ein Referenzbereich von 4,3–17,5 ng/ml ermittelt.
- Lehrbuch für klinische Chemie und Pathobiochemie, Schattauer Stuttgart / New York, 1987: 3,6–18 ng/ml (14,6–72,8 pmol/ml).

Vollblut

8,7–27,2 ng/ml*

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

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren. Die Angabe des Referenzbereichs für Vitamin B_6 dient lediglich der Orientierung und kann von anderen publizierten Daten abweichen.

Kontrollen

Wir empfehlen, bei jedem Testansatz Kontrollen mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

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

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

Achtung: Wärmeentstehung!

15. MASSNAHMEN BEI STÖRUNGEN

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

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

16. LITERATUR

1. Ambrosch, A. et al., 2001. Relation between homocysteinaemia and diabetic neuropathy in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, **18**(3), pp.185–92.
2. Dierkes, J., Domröse, U., et al., 2001. Homocysteine lowering effect of different multivitamin preparations in patients with end-stage renal disease. *Journal of renal nutrition : the official journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation*, **11**(2), pp.67–72.
3. Dierkes, J., Westphal, S., et al., 2001. Vitamin supplementation can markedly reduce the homocysteine elevation induced by fenofibrate. *Atherosclerosis*, **158**(1), pp.161–4.

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.

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

Verwendete Symbole:


Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Zu verwenden mit


Hersteller



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Chargenbezeichnung


Verwendbar bis


Achtung

Manual

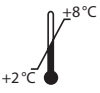
Vitamin B_6 HPLC Kit

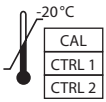
For the determination of vitamin B_6 in serum, plasma and whole blood

Valid from 2015-12-15

REF **KC2150**







IVD CE

Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany
Tel.: +49 6251 70190-0 Fax: + 49 6251 849430
e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE 15

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST 15

3. PRINCIPLE OF THE TEST 15

4. MATERIAL SUPPLIED 16

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED 16

6. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS 17

7. PRECAUTIONS 17

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION 17

9. ASSAY PROCEDURE 18

Procedural notes 18
Test procedure 18
Chromatographic conditions 19

10. TREATMENT OF THE COLUMN 19

11. RESULTS 19

Calculation 19
Typical chromatogram 20

12. QUALITY CONTROL 20

Reference ranges 20
Controls 21

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS 21

Precision and reproducibility 21
Linearity 21
Detection limit 21
Recovery 21

14. DISPOSAL 21

15. TROUBLESHOOTING 22

16. REFERENCES 23

17. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE 23

1. INTENDED USE

This HPLC application is intended for the quantitative determination of vitamin B_6 in plasma and serum. For *in vitro* diagnostic use only.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Vitamin B_6 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 referred to as vitamin B_6).

Vitamin B_6 functions as a coenzyme and is essential for more than 50 reactions in the protein metabolism thereby synthesizing, transforming or degrading amino acids. Vitamin B_6 supports the resorption of amino acids and their transport into the cells. Furtheron vitamin B_6 contributes to the synthesis of neuro transmitters and amine products (histamin).

Due to the fact that vitamin B_6 contributes to a variety of different reactions lack of vitamin B_6 results in various clinical pictures.

Applications:

- determination of vitamin B_6 status
- homocysteinaemia
- skin diseases
- movement disorders
- Anaemia, depression

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The first step in the determination of vitamin B_6 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 B_6 into a fluorescent product. The sample is cooled, centrifuged and injected into the HPLC system.

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

Summary

This HPLC application for the determination of vitamin B_6 allows to determine the vitamin in an easy, fast and precise method. The kit includes all reagents in ready to use form for preparation and separation of the samples with exception of the columns.

As for 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 immunoassays with up to 6 calibrators per test. It is possible to automate the sample application and calculation of the results so that even higher number of samples can be handled nearly without control. With short test series, the one-point calibration is much more economic than 6-point calibration for immunoassays.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
KC2100LM	MOPHA	Mobile phase	1000 ml
KC2100KA	CAL	Calibrator (500 µl lyophilized; see label for concentration)	5 vials
KC2150FR	PREC	Precipitation reagent	30 ml
KC2100RE	RECSOL	Reconstitution solution	15 ml
KC2100DL	DER	Derivatisation solution	3 x 8,5 ml
KC2100KO	CTRL 1 CTRL 2	Control 1 and 2 (250 µl lyophilized; see specification data sheet for concentration)	2 x 3 vials

The HPLC column (KC2100RP) 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

- Ultra pure water*
- 1.5 ml reaction tubes (e. g. Eppendorf)
- Centrifuge
- Various pipettes
- Vortex
- HPLC with fluorescence detector
- Reversed phase C_{18} column
- Thermoshaker

* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

6. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- **The lyophilised CAL** (calibrator) is stable at **-20 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, the CAL has to be reconstituted with **500 µl reconstitution solution** (RECSOL). The concentration of vitamin B_6 slightly changes from lot to lot, the exact concentration is stated on the label.
- **The lyophilised CTRL 1 and CTRL 2** (controls 1 and 2) are stable at **-20 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, they have to be reconstituted with each **250 µl reconstitution solution** (RECSOL). The concentration of vitamin B_6 slightly changes from lot to lot, the exact concentration is stated on the specification data sheet.
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2–8 °C**.

7. PRECAUTIONS

- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, hepatitis B and hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- The precipitation reagent (PREC) 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.
- As the derivatisation solution (DER) contains KCN, it should be pipetted under an fume hood.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

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

Vitamin B_6 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 one 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 incorrect use.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

Test procedure

Pipet into 1.5 ml reaction tubes (e. g. Eppendorf) **200 µl calibrator**, **patient sample** or **control 1 or 2**.
Add **300 µl precipitation reagent** (PREC) and **vortex** for at least **30 s**
Incubate for **10 min** at **2–8 °C**
Centrifuge for **2 min** at **10 000 *g***
Add to each **250 µl supernatant 250 µl derivatisation solution** (DER) and mix
Incubate for **20 min** at **60 °C** on a thermoshaker
Cool the tubes down at **2–8 °C**
Centrifuge for **5 min** at **10 000** g
Take the **supernatant**. It is stable for 5 days at 2–8 °C in the dark.
Inject 50 µl of the supernatant into the HPLC

Chromatographic conditions

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

It is recommended to use a guard column to extend column life.

10. TREATMENT OF THE COLUMN

After analysis, the column should be flushed with 30 ml ultra pure water (1 ml/min) and stored in 50% methanol in water (~ 30 ml, flow 0.5 ml/min). Before use, the system should be equilibrated with ~ 30 ml mobile phase (MOPHA).

11. RESULTS

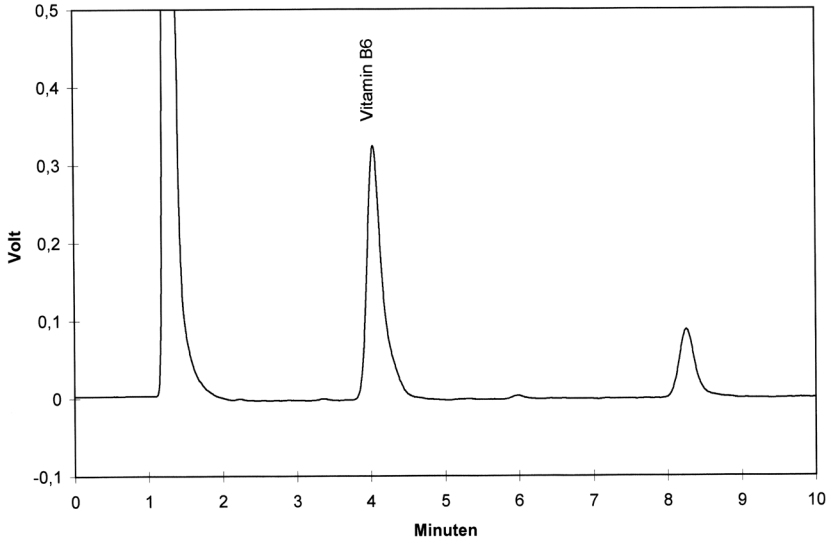
Calculation

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

* see label

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

Typical chromatogram



12. QUALITY CONTROL

Reference ranges

Serum and plasma

- Based on Immundiagnostik studies of samples of apparently healthy persons (n = 90), a mean value of 4.3–17.9 ng/ml was estimated.
- Published reference range: 3.6–18 ng/ml (14.6–72.8 pmol/ml); source: Lehrbuch für klinische Chemie und Pathobiochemie, Schattauer Stuttgart / New York, 1987

Whole blood

8.7–27.2 ng/ml*

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

We recommend each laboratory to establish its own reference range. The above mentioned values are only for orientation and may deviate from other published data.

Controls

Control samples should be analysed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay CV:	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 derivatisation solution (DER) must be oxidized with hydrogen peroxide, the pH value adjusted to 6–8, and disposed as aqueous salt solution. The mobile phase (MOPHA) and the precipitation reagent (PREC) must be 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 reason	Solution
No signal	No or defect connection to evaluation system	Check signal cord and connection
	Detector lamp is altered	Change lamp
No peaks	Injector is congested	Check injector
Double peaks	Dead volume in fittings and / or column	Renew fittings and / or column
Contaminating peaks	Injector dirty	Clean injector
	Contamination at the head of the column	Change direction of the column and rinse for 30 min at low flow rate (0.2 ml/min) with mobile phase
	Air in the system	Degas pump
	Auto sampler vials contaminated	Use new vials or clean them with methanol
Broad peaks, tailing	Precolumn / column exhausted	Use new precolumn / column
Variable retention times	Drift in temperature	Use a column oven
	Pump delivers imprecise	Check pump, degas the system
	System is not in steady state yet	Rinse system mobile phase for 15 min
Baseline is drifting	Detector lamp did not reach working temperature yet	Wait
	Detector lamp is too old	Renew lamp
	System is not in steady state yet	Rinse system mobile phase for 15 min
	Pump delivers imprecise	Check pump, degas the system

Problem	Possible reason	Solution
Baseline is not smooth	Pump delivers imprecise	Check pump, degas the system
	Detector flow cell is dirty	Clean flow cell

16. REFERENCES

1. Ambrosch, A. et al., 2001. Relation between homocysteinaemia and diabetic neuropathy in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, **18**(3), pp.185–92.
2. Dierkes, J., Domröse, U., et al., 2001. Homocysteine lowering effect of different multivitamin preparations in patients with end-stage renal disease. *Journal of renal nutrition : the official journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation*, **11**(2), pp.67–72.
3. Dierkes, J., Westphal, S., et al., 2001. Vitamin supplementation can markedly reduce the homocysteine elevation induced by fenofibrate. *Atherosclerosis*, **158**(1), pp.161–4.

17. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The test components contain organic solvents. Contact with skin or mucous membranes must be avoided.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on the kit label.
- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the

test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.

- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

Used symbols:


Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



To be used with


Manufacturer



Contains sufficient for <n> tests



Lot number


Use by


Attention