

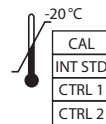
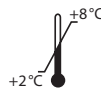
# Homocysteine HPLC Kit

*Zur Bestimmung von Homocystein in Plasma und Serum*

*For the determination of homocysteine in plasma and serum*

Gültig ab / Valid from 2015-12-23

**REF** **KC2801**



**IVD** **CE**



**Immundiagnostik AG**, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)



# Inhalt

<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>2</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
<b>3. TESTPRINZIP</b>	<b>2</b>
<b>4. INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>3</b>
<b>5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>3</b>
<b>6. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>4</b>
<b>7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN</b>	<b>5</b>
<b>8. PROBENVORBEREITUNG</b>	<b>5</b>
<b>9. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>5</b>
<i>Hinweise</i>	5
<i>Arbeitsschema</i>	6
<i>Chromatographische Bedingungen</i>	6
<b>10. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE</b>	<b>7</b>
<b>11. AUSWERTUNG</b>	<b>7</b>
<i>Berechnung</i>	7
<i>Musterchromatogramm</i>	7
<b>12. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>8</b>
<b>13. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>8</b>
<i>Referenzbereich</i>	8
<i>Kontrollen</i>	8
<b>14. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>9</b>
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	9
<i>Linearität</i>	9
<i>Nachweisgrenze</i>	9
<i>Wiederfindung</i>	9
<b>15. ENTSORGUNG</b>	<b>9</b>
<b>16. MASSNAHMEN BEI STÖRUNGEN</b>	<b>9</b>
<b>17. LITERATUR</b>	<b>10</b>
<b>18. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>11</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Diese HPLC-Applikation ist für die Bestimmung von Homocystein aus Plasma und Serum geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

## 2. EINLEITUNG

Homocystein kommt im Plasma in freier Form und zu ca. 70% an Albumin gebunden vor. Methionin wird nach einigen Stoffwechselschritten zunächst in Homocystein umgewandelt, dies wird mit Hilfe der Cystathion-Beta-Synthase (Cofaktor Vitamin B<sub>6</sub>) weiter umgewandelt zu Cystin und danach abgebaut. Bei einem Mangel des Enzyms steigen die Konzentrationen an Methionin und Homocystein an, die von Cystin nimmt ab. Daraus resultiert die Homocysteinurie, die unbehandelt zu psychomotorischen Behinderungen führt.

Neuere Ergebnisse zeigen, dass Homocystein ein wichtiger Risikofaktor für koronare Arterienerkrankungen ist. Hohe Werte findet man gehäuft bei Menschen mit einem genetischen Defekt im Eiweißstoffwechsel, das Homocystein wird nicht abgebaut. Untersuchungen zu Folge ist dies die Ursache für 40% aller Herzinfarktfälle in den USA. Außerdem steigt das Risiko eines Schlaganfalls proportional mit der Konzentration von Homocystein im Blut.

Mit den Vitaminen B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> und Folsäure kann der erhöhte Plasma-Homocysteinspiegel wirksam und ohne Nebenwirkungen gesenkt werden.

## 3. TESTPRINZIP

Zur Bestimmung des Homocysteins wird im ersten Schritt eine Probenvorbereitung mit angeschlossener Derivatisierung durchgeführt. Den Plasma- bzw. Serumproben wird der interne Standard zugegeben und die Proben werden in einem Schritt einer Reduktion und einer Derivatisierung unterzogen. Hierbei wird das noch an Albumin gebundene Homocystein freigesetzt, sowie Homocystin in zwei Homocysteine gespalten. In der Derivatisierungsreaktion erfolgt die Umsetzung des Homocysteins in ein fluoreszierendes Produkt. Danach erfolgt in einem Fällungsschritt die Abtrennung höhermolekularer Substanzen.

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. 7 Minuten für einen Lauf. Die Quantifizierung erfolgt über den mitgelieferten Plasma-Kalibrator und die Berechnung der Ergebnisse wird über die interne-Standard-Methode anhand der Integration der Peakfläche/-höhe durchgeführt.

## Zusammenfassung

Der hier vorliegende Komplettkit zur Bestimmung des Homocysteins 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 Analyte 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 Immunassays 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
KC2801LM	MOPHA	Laufmittel	1000 ml
KC2801KA	CAL	Kalibrator (lyoph. 1 ml; Konzentration siehe Etikett)	1 Fläschchen
KC2801IS	INT STD	interner Standard (lyoph. 12 ml)	1 Fläschchen
KC2801RE	RECSOL	Rekonstitutionslösung	2x 15 ml
KC2801RL	REDSOL	Reduktionslösung (lyoph. 2,4 ml)	1 Fläschchen
KC2801DL	DER	Derivatisierungslösung	12 ml
KC2801FR	PREC	Fällungsreagenz	12 ml
KC2801KO	CTRL 1 CTRL 2	Kontrolle 1 und 2 (lyoph. 250 µl; Konzentration siehe Spezifikation)	2x 3 Fläschchen

Die HPLC-Trennsäule (KC2801RP) 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
- Wasserbad / heizbarer Schüttler
- diverse Pipetten
- HPLC-Gerät mit Fluoreszenz-Detektor
- reversed phase C<sub>18</sub>-Säule
- Vortex-Wirbelmischer

\* 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 > 0,2µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩcm).

## 6. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- **Der lyophilisierte Kalibrator (CAL)** ist bei **-20 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor Gebrauch wird er in **1 ml Rekonstitutionslösung (RECSOL)** resuspendiert. Der Gehalt an Homocystein ändert sich geringfügig von Charge zu Charge, der genaue Gehalt ist auf dem Etikett angegeben. **Kalibrator** (rekonstituierter CAL) **wird aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.**
- **Der lyophilisierte interner Standard (INT STD)** ist bei **-20 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor Gebrauch wird er in **12 ml Rekonstitutionslösung (RECSOL)** resuspendiert. **Interner Standard** (rekonstituierter INT STD) **wird aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.**
- **Die lyophilisierten Kontrollen 1 und 2 (CTRL 1 und CTRL 2)** sind bei **-20 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor Gebrauch werden sie in je **250 µl Rekonstitutionslösung (RECSOL)** resuspendiert. Der Gehalt an Homocystein ändert sich geringfügig von Charge zu Charge, der genaue Gehalt ist dem Spezifikationsdatenblatt zu entnehmen.
- **Die lyophilisierte Reduktionslösung (REDSOL)** ist bei **-20 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor Gebrauch wird sie in **2,4 ml Rekonstitutionslösung (RECSOL)** resuspendiert. **Reduktionslösung** (rekonstituierte REDSOL) kann **3 Monate bei 2–8 °C** gelagert werden.
- Alle anderen Testreagenzien sind 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 HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Das Fällungsreagenz (PREC) besteht aus Säure und muss mit Vorsicht benutzt werden. Es verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

## 8. PROBENVORBEREITUNG

Als Patientenprobe ist EDTA-Plasma zu bevorzugen, da es bei Serumproben zu einem zeitabhängigen Anstieg des Homocysteingehaltes kommen kann. Die Probe sollte in jedem Fall sofort nach der Abnahme bei 2–8°C gelagert werden, und innerhalb der nächsten 30 Minuten zentrifugiert werden (2000 g, 10 min, 2–8°C). Danach kann die Probe bei 4°C gelagert werden. Für längere Lagerung (> 1 Woche) sollten die Proben bei -20°C bis -80°C aufbewahrt werden.

## 9. TESTDURCHFÜHRUNG

### *Hinweise*

- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettierolumina 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

Je <b>50 µl Probe, Kalibrator</b> oder <b>Kontrolle 1 oder 2</b> in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß pipettieren.
Je <b>50 µl internen Standard</b> hinzugeben.
Je <b>20 µl Reduktionslösung</b> hinzugeben.
Je <b>100 µl Derivatisierungslösung (DER)</b> hinzugeben und mischen.
<b>10 min</b> bei <b>60 °C</b> inkubieren, danach abkühlen lassen.
Je <b>100 µl Fällungsreagenz (PREC)</b> zugeben, gut mischen.
<b>5 min</b> bei <b>2–8 °C</b> inkubieren.
Für <b>5 min</b> bei <b>10 000 g</b> zentrifugieren.
Die so aufgearbeitete Probe ist bei <b>2–8 °C</b> mindestens <b>6 Tage</b> stabil.
<b>20 µl Überstand</b> in das HPLC-System injizieren.

## Chromatographische Bedingungen

Säulenmaterial:	MZ Inertsil ODS-2; 5 µm MZ PerfectBond ODS-2; 5 µm Bischoff Prontosil Eurobond; 5 µm
Säulendimension:	125 mm × 4 mm
Fluss:	0,7–1,0 ml/min der genaue Fluss ist auf der Produktspezifikation der jeweiligen Säule angegeben
Fluoreszenzdetektion:	Exzitation: 385 nm Emission: 515 nm
Temperatur:	30 °C
Auftragsvolumen:	20 µl
Laufzeit:	7 Minuten

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 0,6 ml/min).

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

## 11. AUSWERTUNG

### Berechnung

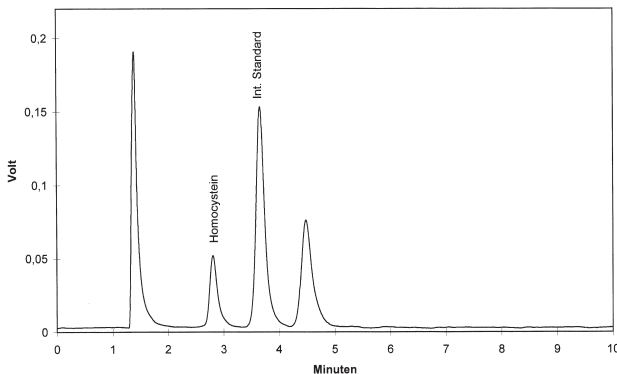
$$\frac{\text{Peakhöhe Probe} \times \text{Kalibratorkonzentration}^*}{\text{Peakhöhe interner Standard der Probe}} \times F = \text{Probenkonzentration}$$

$$F = \frac{\text{Peakhöhe interner Standard des Kalibrators}}{\text{Peakhöhe Kalibrator}}$$

\* siehe Etikett

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

### Musterchromatogramm



## 12. EINSCHRÄNKUNGEN

Als Patientenprobe ist EDTA-Plasma zu bevorzugen, da es bei Serumproben zu einem zeitabhängigen Anstieg des Homocysteingehalts kommen kann. Vollblut kann nicht im Test eingesetzt werden.

## 13. QUALITÄTSKONTROLLE

### *Referenzbereich*

Aus „Homocystein“ Resch, Till, Riezler, Pütter ISBN: 3-920328-17-5:

< 15	Normalwert
15–30	Durch Vitaminmangel bedingte Erhöhung
31–100	Weist auf heterozygote Homocysteinämie hin
> 100	Weist auf homozygote Homocysteinämie hin

Nach einem Methioninbelastungstest kann die Homocysteinkonzentration ansteigen. Steigt sie jedoch über 30 µmol/l an, liegt eine heterozygote Homocysteinämie vor.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren. Die Angabe des Referenzbereichs für Homocystein 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.

## 14. TESTCHARAKTERISTIKA

### *Präzision und Reproduzierbarkeit*

#### **Intra-Assay-VK**

2,5 % (8,9  $\mu\text{mol/l}$ ) [n = 12]

1,6 % (16,5  $\mu\text{mol/l}$ ) [n = 12]

#### **Inter-Assay-VK**

5,2 % (8,7  $\mu\text{mol/l}$ ) [n = 12]

2,9 % (17,4  $\mu\text{mol/l}$ ) [n = 12]

### *Linearität*

bis 500  $\mu\text{mol/l}$

### *Nachweisgrenze*

0,6  $\mu\text{mol/l}$

### *Wiederfindung*

98 %

## 15. ENTSORGUNG

Das Laufmittel (MOPHA), Reduktionslösung (REDSOL), interner Standard (INT STD) und Derivatisierungslösung (DER) müssen als halogenfreier Lösungsmittelabfall entsorgt werden. Das Fällungsreagenz (PREC) kann mit Natronlauge neutralisiert und bei neutralem pH als Salzlösung entsorgt werden.

**Achtung: Wärmeentstehung!**

## 16. MASSNAHMEN BEI STÖRUNGEN

Problemstellung	Mögliche Ursache	Behebung
Kein Signal	Keine oder defekte Verbindung zur Auswerteeinheit.	Signalkabel und Anschluss prüfen.
	Detektorlampe zu alt	Ggf. Lampe erneuern
Keine Peaks	Injektor verstopft	Injektor überprüfen

<b>Problemstellung</b>	<b>Mögliche Ursache</b>	<b>Behebung</b>
Doppelpeaks	Totvolumen an Fittings und/oder Säule	Fittings und / oder Säule erneuern
Störpeaks	Injektor verunreinigt	Injektor reinigen
	Kontamination am Säulen- kopf	Säule umdrehen und 30 min mit niedrigem Fluß (0,2 ml/ min) Laufmittel spülen
	Luft im System	Pumpe entgasen
	Autosamplergefäße verunreinigt	Neue oder mit Methanol gespülte Autosamplergefäße verwenden
Breite Peaks, Tailing	Vorsäule / Säule zu alt	Neue Vorsäule / Säule verwenden
Veränderte Retentionszeit	Temperaturdrift	Säulenofen verwenden
	Pumpe fördert ungenau	Pumpe überprüfen, entlüften
	System noch nicht im Gleichgewicht	System mit mobiler Phase 15 min spülen
Basislinie driftet	Detektorlampe noch kalt	Warten
	Detektorlampe zu alt	Ggf. Lampe erneuern
	System noch nicht im Gleichgewicht	System mit mobiler Phase 15 min spülen
	Pumpe fördert ungenau	Pumpe überprüfen, entlüften
Unruhige Basislinie	Pumpe fördert ungenau	Pumpe überprüfen, entlüften
	Detektorzelle verschmutzt	Detektorzelle reinigen

## 17. LITERATUR










1. Role of Plasma Homocyst(e)ine in Arterial Occlusive Diseases. (1994) *Clinical Chemistry*, Vol. **40** No. 6, pp. 857-858.

2. Association between Plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. Selhub, J. et al. (1995). *The New England Journal of Medicine*, Feb. 95, Vol. **332** No. 5, pp. 286-291.
3. Plasma Homocyst(e)ine as a Risk Factor for Early Familial Coronary Artery disease. Wu, L. et al. (1994). *Clinical Chemistry*, Vol. **40** No. 4, pp. 552-561.
4. Homocyst(e)ine and arterial occlusive diseases. Malinow, M. (1994). *Journal of Intern Medicine*, Vol. **236**, pp. 603-617.
5. Hormone replacement therapy may reduce high serum homocysteine in postmenopausal women. van der Mooren, M. (1994). *European Journal of Clinical Investigation*, Vol. **24**, pp. 733-736.
6. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. Mills, J. et al. (1995). *The Lancet*, Jan. 1995, Vol. **345**, pp. 149-151.

## 18. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Reagenzien dieser Testpackung enthalten organische Lösungsmittel. Berührungen mit der Haut oder den Schleimhäuten sind zu vermeiden.
- 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 Pipettierolumina 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:**

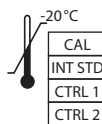
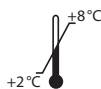
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		

# Homocysteine HPLC Kit

*For the determination of homocysteine in plasma and serum*

Valid from 2015-12-23

**REF** **KC2801**



**IVD** **CE**



**Immundiagnostik AG**, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

# Table of Contents

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



## 1. INTENDED USE

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

## 2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Homocysteine exists in plasma as protein-bound and, so-called, free forms. About 70 percent of the total plasma homocysteine is bound to albumin. The free forms include homocystine (homocysteine disulphide) and mixed disulphide. Just minute amounts of reduced homocysteine are found in plasma. Total homocysteine in plasma, including protein-bound and free forms, has been referred to as homocyst(e)ine [H(e)]. Studies for peripheral vascular, cerebrovascular and coronary artery disease (CAD), evaluating H(e) as a cardiovascular risk factor, have been consistently demonstrated that there are more persons with high H(e) among patients than among healthy persons. Increased concentrations of free forms of homocysteine have also generally been reported among patients with occlusive artery disease, with one notable exception of a negative finding in relation to CAD.

## 3. PRINCIPLE OF THE TEST

The first step in determining homocysteine includes sample preparation with additional derivatisation. Therefore, the internal standard is added to the calibrator, controls and samples. Reduction and derivatisation is carried out in one step (10 min at 60°C). During the reduction, homocysteine is cleaved from albumin and homocystine is reduced into two homocysteines. The derivatisation reagent transforms homocysteine into a fluorescent product. Higher molecular substances are removed by precipitation and centrifugation. 20 ml of the supernatant are injected into the HPLC system.

The separation via HPLC follows an isocratic method at 30°C using a reversed phase column. One run lasts 7 minutes. The chromatograms are recorded by a fluorescence detector. The quantification is performed with the delivered plasma calibrator; the concentration is calculated via integration of the peak areas/heights by the internal standard method.

### Summary

The application of homocysteine for HPLC makes a fast and precise determination of the amino acid possible in an easy way. The kit includes all reagents for preparation and separation of the samples, except the column.

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
KC2801LM	MOPHA	Mobile phase	1000 ml
KC2801KA	CAL	Calibrator (lyoph. 1 ml; see label for concentration)	1 vial
KC2801IS	INT STD	Internal standard (lyoph. 12 ml)	1 vial
KC2801RE	RECSOL	Reconstitution solution	2x 15 ml
KC2801RL	REDSOL	Reduction solution (lyoph. 2.4 ml)	1 vial
KC2801DL	DER	Derivatisation solution	12 ml
KC2801FR	PREC	Precipitation reagent	12 ml
KC2801KO	CTRL 1 CTRL 2	Control 1 and 2 (lyoph. 250 µl.; see specification data sheet for concentration)	2x 3 vials

The HPLC column (KC2801RP) 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
- HPLC with fluorescence detector
- Reversed phase C<sub>18</sub> column
- Water bath / thermo shaker
- Vortex

\* 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 calibrator (CAL)** is stable at **-20 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, the CAL has to be reconstituted with **1 ml reconstitution solution (RECSOL)**. The concentration of homocysteine slightly changes from lot to lot, the exact concentration is stated on the label. **Calibrator (reconstituted CAL) has to be aliquotted and stored at -20 °C until use.**
- **The lyophilised internal standard (INT STD)** is stable at **-20 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, the INT STD has to be reconstituted with **12 ml reconstitution solution (RECSOL)**. **Internal standard (reconstituted INT STD) has to be aliquotted and stored at -20 °C until use.**
- **The lyophilised controls 1 and 2 (CTRL 1 and CTRL 2)** are stable at **-20 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, they have to be reconstituted with each **250 µl reconstitution solution (RECSOL)**. The concentration of homocysteine slightly changes from lot to lot, the exact concentration is stated on the specification data sheet.
- **The lyophilised reduction solution (REDSOL)** is stable at **-20 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, the REDSOL has to be reconstituted with **2.4 ml reconstitution solution (RECSOL)**. **Reduction solution (reconstituted REDSOL) can be stored for 3 months at 2–8 °C.**
- 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 consists of an acid. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.

## 8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Since the concentration in serum samples is depending on clotting time, EDTA-plasma should be preferred as sample. Please store the sample directly after blood collection at 2–8 °C. After blood collection, the sample should be centrifuged within the next 30 minutes (conditions: 2000 g, 10 min, 2–8 °C). Afterwards the sample should be stored at 2–8 °C.

For long time storage (> 1 week), keep the samples at -20 °C to -80 °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 each <b>50 µl sample, calibrator or control 1 or 2</b> into an 1.5 ml reaction tube.
Add each <b>50 µl internal standard</b> .
Add each <b>20 µl reduction solution</b> .
Add each <b>100 µl derivatisation solution (DER)</b> and mix.
Incubate for <b>10 min at 60 °C</b> , then let the tubes cool down.
Add each <b>100 µl precipitation reagent (PREC)</b> and mix well.
<b>Incubate for 5 min at 2–8 °C</b> .
Centrifuge for <b>5 min at 10 000 g</b> .
The samples prepared like this are stable for at least <b>6 days at 2–8 °C</b> .
Inject <b>20 µl</b> supernatant into the HPLC system.

### Chromatographic conditions

Column material:	MZ Inertsil ODS-2; 5 µm
	MZ PerfectBond ODS-2; 5 µm
	Bischoff Prontosil Eurobond; 5 µm
Column dimension:	125 mm × 4 mm
Flow rate:	0.7–1.0 ml/min
	Please refer to the quality certificate of the column
Fluorescence detection:	Excitation: 385 nm
	Emission: 515 nm
Temperature:	30 °C
Injection volume:	20 µl
Running time:	7 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 0.6 ml/min). Before use, the system should be equilibrated with ~ 30 ml mobile phase (MOPHA).

## 11. RESULTS

### Calculation

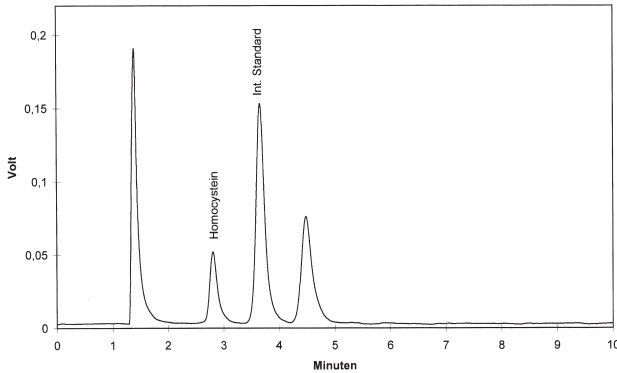
$$F = \frac{\text{Peak height sample} \times \text{calibrator concentration}^*}{\text{Peak height internal standard of the sample}} \times F = \text{sample concentration}$$

$$F = \frac{\text{Peak height internal standard of the calibrator}}{\text{Peak height calibrator}}$$

\* see label

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

## Typical chromatogram



## 12. LIMITATIONS

Since the concentration in serum samples is depending on clotting time, EDTA-plasma should be preferred as sample.

Do not use whole blood.

## 13. QUALITY CONTROL

### Reference range

Homocysteine values: (Resch, "Homocystein", ISBN 3-920328-17-5)

< 15 $\mu\text{mol/l}$	Normal value
15-30 $\mu\text{mol/l}$	Lack of vitamins
31-100 $\mu\text{mol/l}$	Indication of heterocygote homocysteinemia
> 100 $\mu\text{mol/l}$	Indication of homocygote homocysteinemia

After a methionine loading test an increase in homocysteine concentration is normal. Concentrations more than 30  $\mu\text{mol/l}$  are indicating a heterocygote homocysteinemia.

We recommend each laboratory to establish its own reference range. The above mentioned values are only for orientation and may vary 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.

## **14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

### *Precision and reproducibility*

#### **Intra-Assay CV**

2.5 % (8.9  $\mu\text{mol/l}$ ) [n = 12]

1.6 % (16.5  $\mu\text{mol/l}$ ) [n = 12]

#### **Inter-Assay CV**

5.2 % (8.7  $\mu\text{mol/l}$ ) [n = 12]

2.9 % (17.4  $\mu\text{mol/l}$ ) [n = 12]

### *Linearity*

up to 500  $\mu\text{mol/l}$

### *Detection limit*

0.6  $\mu\text{mol/l}$

### *Recovery*

98 %

## **15. DISPOSAL**

The mobile phase (MOPHA), reduction solution (REDSOL), internal standard (INT STD), and derivatisation solution (DER) must be disposed as non-halogenated solvents. The precipitation reagent (PREC) can be neutralized with NaOH to pH 7.0 and disposed as salt solution.

**Important:** Reaction will produce heat, be careful!

Please refer to the appropriate national guidelines.

## 16. TROUBLESHOOTING

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

## 17. REFERENCES










1. Role of Plasma Homocyst(e)ine in Arterial Occlusive Diseases. (1994) *Clinical Chemistry*, Vol. **40** No. 6, pp. 857-858.
2. Association between Plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. Selhub, J. et al. (1995). *The New England Journal of Medicine*, Feb. 95, Vol. **332** No. 5, pp. 286-291.
3. Plasma Homocyst(e)ine as a Risk Factor for Early Familial Coronary Artery disease. Wu, L. et al. (1994). *Clinical Chemistry*, Vol. **40** No. 4, pp. 552-561.
4. Homocyst(e)ine and arterial occlusive diseases. Malinow, M. (1994). *Journal of Intern Medicine*, Vol. **236**, pp. 603-617.
5. Hormone replacement therapy may reduce high serum homocysteine in postmenopausal women. van der Mooren, M. (1994). *European Journal of Clinical Investigation*, Vol. **24**, pp. 733-736.
6. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. Mills, J. et al. (1995). *The Lancet*, Jan. 1995, Vol. **345**, pp. 149-151.

## 18. 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 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 sent 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		