

Kurzanleitung / Short manual

Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal /

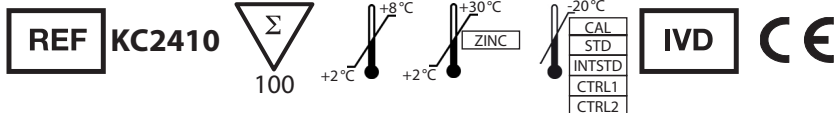
For professional use only

Vitamin K₁ (SPE) HPLC Kit

**Zur in-vitro-Bestimmung von Vitamin K₁
in Plasma und Serum**

**For the in vitro determination of vitamin K₁
in plasma and serum**

Gültig ab / Valid from 2024-04-02



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Sicherheitshinweise

Dieses Zubehör ist ausschließlich nach der beigefügten Arbeitsanleitung zu nutzen. Wichtige Sicherheitshinweise zu diesem Produkt sind dem Kapitel 7 zu entnehmen.

Inhalt

1. ZWECKBESTIMMUNG	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	3
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	4
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	6
7. VORSICHTSMASSNAHMEN	6
8. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	6
9. LITERATUR	7
10. SYMBOLE	8

1. ZWECKBESTIMMUNG

Die HPLC-Applikation ist für die quantitative Bestimmung von Vitamin K₁ aus Serum und Plasma geeignet. Nur zur *in vitro* Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Vitamin K wird rasch metabolisiert und wird nur in geringer Menge im Organismus gespeichert, so dass Mangelercheinungen sich bereits nach wenigen Tagen offenbaren. Die klinischen Symptome sind vor allem Gerinnungsstörungen und zeigen sich durch Blutungen in der Haut, in den Schleimhäuten, im Muskelgewebe und in den inneren Organen. Daneben sind auch Knochenstoffwechselstörungen aufgrund mangelhafter Modifizierung von Osteocalcin beschrieben.

Die Mangelercheinungen sind Folgen einer verminderten Wirkung des Vitamins als Cofaktor einer mikrosomalen, O₂-abhängigen Carboxylase bei der Carboxylierung von spezifischen Glutaminsäureresten der Gerinnungsfaktoren, sowie des Osteocalcins. Die dadurch verminderte Bildung von γ -Carboxyglutaminsäure-Resten, die den Gerinnungsfaktoren die Fähigkeit verleihen mit Ca²⁺ und Membranphospholipiden Komplexe zu bilden, aus denen dann nach proteolytischer Spaltung die aktiven Gerinnungsfaktoren freigesetzt werden, führt letztlich zu den beobachteten Symptomen. Osteocalcin verliert durch mangelhafte γ -Carboxylierung die Fähigkeit an das Calciumhydroxylapatit der Knochenmatrix zu binden. Außerdem kann sich bei gravierendem Vitamin-K-Mangel eine schwere Anämie infolge hypoplastischer Knochenmarkveränderungen entwickeln.

Indikationen

- Störungen der Blutgerinnung
- Störungen im Knochenstoffwechsel / Osteoporose
- Vitamin K-Mangel hervorgerufen durch:
 - obstruktive Lebererkrankungen
 - Störungen der Gallensekretion: Verschlussikterus
 - Malabsorptions syndrome: Zöliakie, Sprue, Pankreatitiden, Diarrhö
 - Längerandauernde Antibiotikatherapie: Zerstörung der Darmflora
- Klassische hämorrhagische Erkrankung bei Neugeborenen

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KC2400	MOPHA	Laufmittel, gebrauchsfertig (Wichtig: nicht rezirkulieren)	2 x 1 000 ml
	INTSTD	Interner Standard, gebrauchsfertig	1 ml
	STD	Standard isopropanolisch, gebrauchsfertig	2 ml
	ZINC	Zink	12 g
	ZUB	Zubehör für Nachsäulenreduktionsreaktor	1 x
KC2410	CAL	Kalibrator, lyophilisiert	4 x
	CTRL1	Kontrolle 1, lyophilisiert	4 x
	CTRL2	Kontrolle 2, lyophilisiert	4 x
	ELUSOL	Elutionslösung, gebrauchsfertig	110 ml
	PREC	Fällungsreagenz, gebrauchsfertig	525 ml
	WASHSOL	Waschlösung, gebrauchsfertig	315 ml
KC0002.50	SPE	Festphasenextraktionskartuschen	2 x 50
K 0005.15	RECSOL	Rekonstitutionslösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

Die HPLC Trennsäule (KC2400RP) und der Nachsäulenreduktionsreaktor (KC2400NR) können separat bei Immundiagnostik AG bestellt werden. Um die Lebensdauer Ihrer HPLC-Trennsäule zu verlängern, sollte idealerweise eine Vorsäule (KC2400VS) verwendet werden. Diese sowie die entsprechenden Vorsäulenhalter (KC2400VH) sind von Immundiagnostik AG zu beziehen. Neben dem kompletten Kit können alle Komponenten, sowie erforderliches Zubehör (z.B. Borsilikatglasröhrchen (KC0001V), Evaporator (KC0001SV)) auch einzeln bestellt werden. Bitte fordern Sie hierfür unsere Einzelkomponenten-Preisliste an.

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Zentrifuge
- Vortex-Mixer
- 10 ml Borsilikatglasröhrchen, mit Spitzboden
- 15 ml Zentrifugenröhrchen (z.B. Falcons)
- HPLC-System mit Fluoreszenzdetektor
- Nachsäulenreduktionsreaktor
- Reversed phase C18-Säule,
- Verschiedene Präzisionspipetten
- Vorrichtung zum Einengen der Probe (z.B. Vakuumzentrifuge oder Evaporator)

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Vorbereitung des Kalibrators und der Kontrollen

Alle Testreagenzien werden gebrauchsfertig in gelöster Form geliefert, mit Ausnahme des Kalibrators (**CAL**) und der Kontrollen (**CTRL1** und **CTRL2**).

Der Kalibrator (**CAL**) wird mit x µl Rekonstitutionslösung (**RECSOL**) resuspendiert (x = siehe Produktspezifikation). Nicht verbrauchte rekonstituierte Reste sind zu entsorgen, da erneutes Einfrieren den Kalibrator teilweise zerstört. Der Gehalt an Vitamin K₁ ändert sich geringfügig von Charge zu Charge; der genaue Gehalt ist der beiliegenden Produktspezifikation zu entnehmen.

Die Kontrollen (**CTRL1** und **CTRL2**) werden in x µl Rekonstitutionslösung (**RECSOL**) resuspendiert (x = siehe Produktspezifikation).

Der Kalibrator (**CAL**), der interne Standard (**INTSTD**), die Kontrollen (**CTRL1** und **CTRL2**) und der isopropanolische Standard (**STD**) sind bei Lagerung bei -20°C bis zum Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar. Die anderen Komponenten, mit Ausnahme von Zink und den Filtern/Dichtungen für den Reaktor, werden bei 2–8°C gelagert.

Vorbereitung des Laufmittels

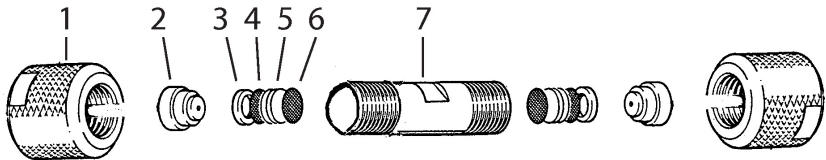
Bei fehlendem In-Line Entgaser des eingesetzten HPLC-Systems wird das Laufmittel für 10–15 min im Ultraschallbad entgast. Da es sich bei dem eingesetzten Laufmittel um ein organisches Lösungsmittel handelt, ist darauf zu achten, die Autosampler-Vials zur Injektion in das HPLC-System mit einem Septum zu verschließen, um ein Abdampfen zu vermeiden und die gleichbleibende Qualität der Messung zu gewährleisten.

Vorbereitung des Nachsäulenreduktionsreaktors

Im Nachsäulenreduktionsreaktor wird das Vitamin K₁ reduziert und damit erst der Detektion im Fluoreszenzdetektor zugänglich gemacht. Um eine gleichbleibende Qualität des Detektorsignals zu erhalten, ist es nötig, vor jeder Probensequenz den Nachsäulenreduktionsreaktor frisch zu füllen, da die Oberfläche der Zinkpartikel nach 48 h Laufzeit oxidiert ist. Der Füllvorgang ist sehr einfach und benötigt nur etwa 5 min.

Der Zusammenbau des Reaktors ist aus der folgenden Zeichnung ersichtlich:

1. Andruckschraube
2. Edelstahlinsatz
3. PTFE-Dichtring
4. Edelstahlsieb (grau)
5. Glasfasersieb (3 Stück, weiß)
6. Edelstahlsieb (grau)
7. Säulenrohr



1. Eine Seite der Säule wird wie in obiger Zeichnung beschrieben verschlossen.
2. Die Zinkpartikel werden mit einem Trichter oder Spatel eingefüllt, dabei wird die Säule ständig leicht auf eine Unterlage geklopft. Hiermit wird eine gleichmäßige feste Füllung erreicht.
3. Die andere Seite der Säule wird verschlossen.

Der Nachsäulenreduktionsreaktor wird, wie im folgenden Bild gezeigt, in das HPLC-System eingebaut:



Achtung: Die Leistungsfähigkeit des Reaktors muss überprüft werden (siehe Kapitel 7. „Testdurchführung“ - Arbeitsschema).

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Als Patientenprobe ist Plasma und Serum geeignet. Die Proben sind bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss 7 Tage stabil und können auch erst 72 Stunden später unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur zentrifugiert werden. Für längere Lagerung sollten sie bei -20 °C eingefroren werden.

7. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Das für Standards und Kontrollen 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.
- Reagenzien dieser Testpackung enthalten organische Lösungsmittel. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.
- Als Vorsichtsmaßnahme wird empfohlen das verwendete Humanmaterial stets als potenziell infektiös zu betrachten.

8. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST
















- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Sämtliche in der Testpackung enthaltene Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik eingesetzt werden.
- Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden (Verfallsdatum siehe Testpackung).
- Einzelkomponenten mit unterschiedlichen Lot-Nummern aus verschiedenen Testpackungen nicht mischen oder austauschen.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die dafür erstellten Richtlinien für medizinische Laboratorien 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.
- Qualitätskontrollen immer mitmessen.
- Die Bestimmung ist immer nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Schwerwiegende Vorfälle im Zusammenhang mit dem Testkit sind der Immundiagnostik AG sowie der nationalen Aufsichtsbehörde zu melden

9. LITERATUR

1. Saupe J. (1992). Vitamin K und Indikationen zur Bestimmung im Plasma. *Klin. Lab.* 38: 51-54
2. Szulc P., Arlot M., Chapuy M.C., Duboef F., Meunier P.J., Delmas P.D. (1994). Serum undercarboxylated osteocalcin correlates with hip bone mineral density in elderly women. *J Bone Miner Res* 9:1591-95
3. Hodges S.J., Akesson K., Vergnaud P., Obrant K., Delmas P.D. (1993). Circulating levels of vitamin K1 and K2 decreased in elderly women with hip fracture. *J Bone Miner Res* 8:1241-45
4. Haroon Y, Bacon DS, Sadowski JA. (1986) Liquid-chromatographic determination of vitamin K1 in plasma, with fluorometric detection. *Clin Chem.* Oct;32(10):1925-9

10. SYMBOLE

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Enthält Plasmaderivate oder menschliches Blut		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Nicht wiederverwenden
	eindeutige Produktidentifizierung		Enthält Material tierischen Ursprungs
	medizinische Substanz		Enthält Material humanen Ursprungs

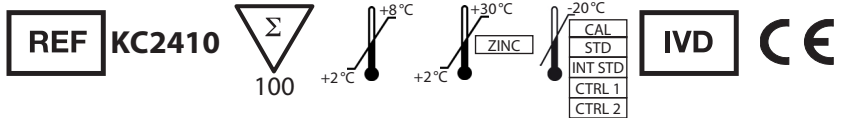
Short manual

For professional use only

Vitamin K₁ (SPE) HPLC Kit

*For the in vitro determination of vitamin K₁
in plasma and serum*

Valid from 2024-04-02



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Safety information

These accessories are to be used exclusively in accordance with the enclosed instructions for use. Important safety information for this product can be found in chapter 7.

Table of Contents

1. INTENDED PURPOSE _____	12
2. INTRODUCTION _____	12
3. MATERIAL SUPPLIED _____	13
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED _____	14
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS _____	14
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES _____	16
7. PRECAUTIONS _____	16
8. GENERAL NOTES ON THE TEST _____	16
9. REFERENCES _____	17
10. SYMBOL EXPLANATION _____	18

1. INTENDED PURPOSE

The Immundiagnostik AG assay is intended for the quantitative determination of vitamin K₁ in plasma and serum. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Vitamin K is metabolized rapidly and is stored in the organism only in small quantities so that deficiency symptoms become apparent after only a few days. The clinical symptoms are mainly coagulation disorders and are manifested by bleeding in the skin, mucous membranes, muscle tissue and internal organs. In addition, bone metabolism disorders due to deficient modification of osteocalcin have also been described.

The deficiency symptoms are consequences of a reduced effect of the vitamin as a cofactor of a microsomal, O₂-dependent carboxylase in the carboxylation of specific glutamic acid residues of the coagulation factors, as well as of osteocalcin. The resulting reduced formation of γ -carboxyglutamic acid residues, which give the coagulation factors the ability to form complexes with Ca²⁺ and membrane phospholipids, from which the active coagulation factors are then released after proteolytic cleavage, ultimately leads to the observed symptoms. Osteocalcin loses the ability to bind to the calcium hydroxyapatite of the bone matrix due to deficient γ -carboxylation. In addition, severe anemia may develop as a result of hypoplastic bone marrow changes in cases of severe vitamin K deficiency.

Indications

- Blood clotting disorders
- Bone metabolism disorders
- Vitamin K deficiency induced by:
 - obstructive liver disease
 - obstructive icterus
 - malabsorption due to celiac disease, pancreatitis, diarrhea
 - long-term antibiotic therapy: destruction of the intestinal flora
- Haemorrhagic disorders of newborns

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
KC2400	MOPHA	Mobile phase, ready-to-use (important: do not recirculate)	2 x 1 000 ml
	INTSTD	Internal Standard, ready-to-use	1 ml
	STD	Isopropanolic standard, ready-to-use	2 ml
	ZINC	Zinc	12 g
	ZUB	Accessories for post-column reduction reactor	1 x
KC2410	CAL	Calibrator, lyophilised	4 x
	CTRL1	Control 1, lyophilised	4 x
	CTRL2	Control 2, lyophilised	4 x
	ELUSOL	Elution solution, ready-to-use	110 ml
	PREC	Precipitating reagent, ready-to-use	525 ml
	WASHSOL	Wash solution, ready-to-use	315 ml
KC0002.50	SPE	Solid phase extraction cartridges	2 x 50
K 0005.15	RECSOL	Reconstitution solution, ready-to-use	1 x 15 ml

The HPLC column (KC2400RP) and the post-column reduction reactor (KC2400NR) can be ordered separately from Immundiagnostik AG. To extend the lifetime of your HPLC column, pre-columns (KC2400VS) should ideally be used. These and also the corresponding pre-column holders (KC2400VH) can also be ordered from Immundiagnostik AG. In addition to the complete kit, all components as well as required materials (e.g. borosilicate glass tubes (KC0001V), evaporator (KC0001SV)) can be ordered separately. Please ask for our single component price list.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Centrifuge
- Vortex
- 10 ml borosilicate glass tube, V-bottom
- 15 ml centrifuge tubes (e.g. Falcon tubes)
- HPLC-system with fluorescence detector
- Post-column reduction reactor
- Reversed phase C18-column
- Various precision pipettes
- Device for concentrating the sample (e.g. vacuum centrifuge or evaporator)

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

Preparation of the calibrator and controls

All reagents are ready-to-use in dissolved form, except for the calibrator (**CAL**) and controls (**CTRL1** and **CTRL2**). Reconstitute calibrator (**CAL**) in $x\ \mu\text{l}$ (x = see the enclosed product specification sheet) reconstitution solution (**RECSOL**). Unused reconstituted material must be disposed of, as refreezing partially destroys the calibrator. The content of vitamin K₁ varies slightly from batch to batch, please refer to the enclosed product specification sheet for the exact amount.

Reconstitute controls (**CTRL1** and **CTRL2**) in $x\ \mu\text{l}$ (x = see the enclosed product specification sheet) reconstitution solution (**RECSOL**).

The calibrator (**CAL**), internal standard (**INTSTD**), controls (**CTRL1** and **CTRL2**) and standard (**STD**) can be used up to the date of expiry stated on the label when stored at -20°C. The other components, with the exception of zinc and the filters/seals for the reactor, must be stored at 2-8°C

Preparation of the mobile phase

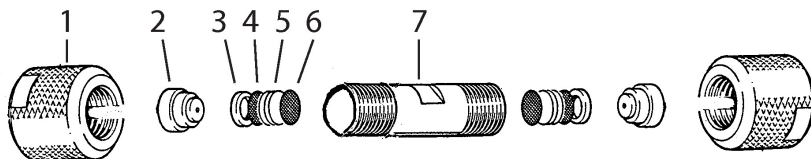
If the used HPLC-system does not have an in-line degasser, the mobile phase is degassed in an ultrasonic bath for 10–15 min. Since the mobile phase is an organic solvent, care must be taken to seal the autosampler vials for injection into the HPLC-system with a septum in order to avoid evaporation and to ensure the consistent quality of the measurement.

Preparation of the post-column reduction reactor

Vitamin K₁ is reduced in the post-column reduction reactor and thus made accessible for detection in the fluorescence detector. In order to obtain a constant detector signal quality, it is necessary to freshly fill the post-column reduction reactor before each series of samples, as the surface of the zinc particles is oxidised after 48 h of running time. The filling process is very simple and takes only about 5 min.

For assembling the column see the following figure.

1. Cap nut
2. Stainless steel inlet
3. PTFE seal
4. Stainless steel sieve (grey)
5. Glass fiber sieve (3 pieces, white)
6. Stainless steel sieve (grey)
7. column tube



1. Close one side of the column according to the figure above.
2. Fill in the zinc-particles with a funnel while knocking the column slightly on the table, so that the packing will not show any cavities.
3. Close the upper side of the column.

The post-column reduction reactor should be mounted in the HPLC-system as described by the following picture:



Note: The performance of the reactor must be checked (see chapter 7. "Assay procedure" - Test procedure).

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Plasma and serum can both be used for analysis. The samples are stable for 7 days at room temperature in the absence of light and can also be centrifuged 72 hours later in the absence of light at room temperature. For longer storage, samples should be frozen at -20°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 supplied reagents contain organic solvents. Although diluted, they still should be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection and appropriate protective clothing. Do not breathe vapour and avoid inhalation.
- As a precaution, it is recommended that the human material used is always considered potentially infectious.

8. GENERAL NOTES ON THE TEST

















- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Do not use reagents beyond the expiration date stated on the kit label.
- Do not mix different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- Follow the guidelines for medical laboratories.

- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which has not been consulted 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 made within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.
- Analyse controls with each run.
- Always perform the assay according to the enclosed manual.
- Serious incidents are to be reported to Immundiagnostik AG and the national regulatory authorities.

9. REFERENCES

1. Saupe J. (1992). Vitamin K und Indikationen zur Bestimmung im Plasma. *Klin. Lab.* 38: 51-54
2. Szulc P, Arlot M., Chapuy M.C., Duboef F, Meunier P.J., Delmas P.D. (1994). Serum undercarboxylated osteocalcin correlates with hip bone mineral density in elderly women. *J Bone Miner Res* 9:1591-95
3. Hodges S.J., Akesson K., Vergnaud P., Obrant K., Delmas P.D. (1993). Circulating levels of vitamin K1 and K2 decreased in elderly women with hip fracture. *J Bone Miner Res* 8:1241-45
4. Haroon Y, Bacon DS, Sadowski JA. (1986) Liquid-chromatographic determination of vitamin K1 in plasma, with fluorometric detection. *Clin Chem.* Oct;32(10):1925-9

10. SYMBOL EXPLANATION

	Temperature limitation		Catalogue number
	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Content sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Contains plasma derivatives or human blood		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		Do not re-use
	Unique Device Identification		Contains material of animal origin
	Medicinal substance		Contains material of human origin

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

