

Vitamin B₆ HPLC Kit

*Zur Bestimmung von Vitamin B₆ in Plasma, Serum
und Vollblut*

*For the determination of vitamin B₆ in plasma, serum
and whole blood*

Gültig ab / Valid from 2022-09-06

REF KC2150

Σ
100

+2°C ±8°C

-20°C
CAL
CTRL 1
CTRL 2

IVD **CE**



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

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 REAGENZEN	4
7. PROBENVORBEREITUNG	4
8. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Arbeitsschema</i>	5
<i>Chromatographische Bedingungen</i>	5
9. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE	6
10. AUSWERTUNG	6
<i>Berechnung</i>	6
<i>Musterchromatogramm</i>	6
11. QUALITÄTSKONTROLLE	7
<i>Referenzbereiche</i>	7
<i>Kontrollen</i>	7
12. TESTCHARAKTERISTIKA	7
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	7
13. ENTSORGUNG	8
14. MASSNAHMEN BEI STÖRUNGEN	8
15. VORSICHTSMASSNAHMEN	9
16. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	10
17. LITERATUR	11

1. VERWENDUNGSZWECK

Diese HPLC-Applikation ist für die Bestimmung von Vitamin B₆ aus Serum, Plasma 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 Peakflächen/-höhen 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 Immunassays.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 0005.15	RECSOL	Rekonstitutionslösung	1 x 15 ml
KC2150	PREC	Fällungsreagenz (Serum, Plasma, EDTA-Vollblut)	1 x 30 ml
KC2100	MOPHA	Laufmittel, gebrauchsfertig (Wichtig: nicht rezirkulieren)	1 x 1 000 ml
	CAL	Kalibrator; lyophilisiert (Konzentration siehe Spezifikationsdatenblatt)	4 x
	DER	Derivatisierungslösung (enthält KCN)	1 x 25,5 ml
	CTRL1	Kontrolle1; lyophilisiert	4 x
	CTRL2	Kontrolle2; lyophilisiert	4 x

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

Die HPLC-Trennsäule (KC2100RP), kann separat bei Immundiagnostik bestellt werden. Um die Lebensdauer Ihrer HPLC-Trennsäule zu verlängern, sollten idealerweise Vorsäulen (KC2100VS) verwendet werden. Diese und auch die Vorsäulenhalter (KC2100VH) können ebenfalls 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
- Vortex-Mischer
- diverse Pipetten
- HPLC-Gerät mit Fluoreszenz-Detektor
- beheizbarer Schüttler
- reversed phase C₁₈-Säule

6. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- **Der lyophilisierte Kalibrator (CAL)** ist bei **-20 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor Gebrauch wird er in **500 µl Rekonstitutionslösung** (RECSOL) resuspendiert. Der Gehalt an Vitamin B₆ ändert sich geringfügig von Charge zu Charge, der genaue Gehalt ist auf dem Etikett angegeben.
- **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 Vitamin B₆ ändert sich geringfügig von Charge zu Charge, der genaue Gehalt ist dem Spezifikationsdatenblatt zu entnehmen.
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2-8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. PROBENVORBEREITUNG

Als Probe eignen sich Serum und EDTA-Plasma, die aus venösem Nüchternblut gewonnen werden, sowie 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 eine Woche. Zur längeren Lagerung sollte die Probe bei -20 °C aufbewahrt werden.

8. TESTDURCHFÜHRUNG

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)
Fluoreszenzdetektion:	Exzitation: 320 nm Emission: 415 nm
Temperatur:	30 °C
Laufzeit:	7 Minuten (bei Dialysepatienten 15 min)

9. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE

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

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.

10. AUSWERTUNG

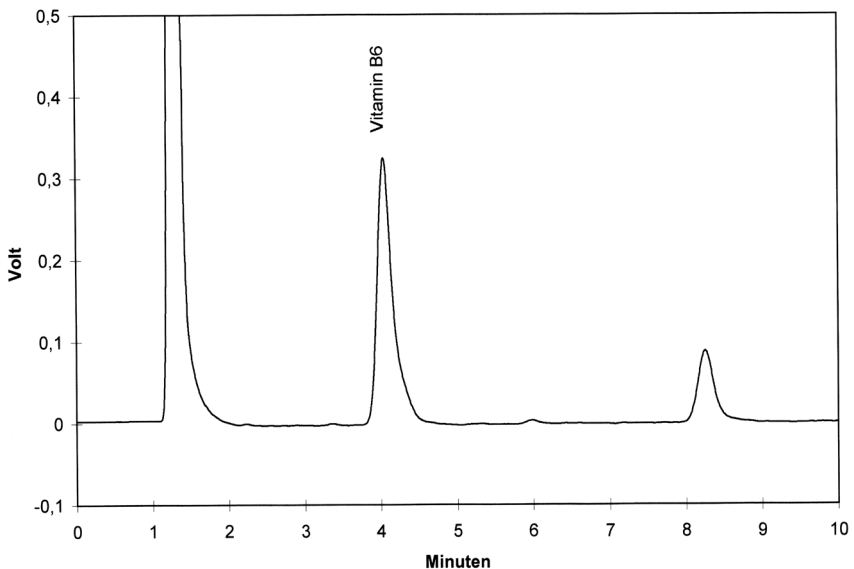
Berechnung

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

* siehe Etikett

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

Musterchromatogramm



11. 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 B₆ 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 AG die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

12. 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)

13. 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. Bitte beachten Sie die entsprechenden nationalen Richtlinien. Laufmittel (MOPHA) und Fällungsreagenz (PREC) können mit Natronlauge neutralisiert und bei neutralem pH als Salzlösung entsorgt werden.

Achtung: Wärmeentstehung!

14. 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

15. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde 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.
- Die Derivatisierungslösung (DER) sollte unter dem Abzug pipettiert werden, da sie KCN enthält.
- 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 Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Als Vorsichtsmaßnahme wird empfohlen, das verwendete Humanmaterial immer als potentiell infektiös zu betrachten.
- Reagenzien dieser Testpackung enthalten organische Lösungsmittel. Berührungen mit der Haut oder den Schleimhäuten sind zu vermeiden.

16. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen 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.
- Schwerwiegende Vorfälle sind der Immundiagnostik AG und den nationalen Aufsichtsbehörden zu melden.

17. 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.

Verwendete Symbole:

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

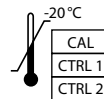
Vitamin B₆ HPLC Kit

*For the determination of vitamin B₆ in serum, plasma
and whole blood*

Valid from 2022-09-06



KC2150



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

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	17
6. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	17
7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	17
8. ASSAY PROCEDURE	18
<i>Test procedure</i>	18
<i>Chromatographic conditions</i>	18
9. TREATMENT OF THE COLUMN	19
10. RESULTS	19
<i>Calculation</i>	19
<i>Typical chromatogram</i>	19
11. QUALITY CONTROL	20
<i>Reference ranges</i>	20
<i>Controls</i>	20
12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	20
<i>Precision and reproducibility</i>	20
13. DISPOSAL	21
14. TROUBLESHOOTING	21
15. PRECAUTIONS	22
16. GENERAL NOTES ON THE TEST	23
17. REFERENCES	23

1. INTENDED USE

This HPLC application is intended for the quantitative determination of vitamin B₆ in plasma, serum and EDTA whole blood. 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 referred to 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 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 B₆ 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
K 0005.15	RECSOL	Reconstitution solution	1 x 15 ml
KC2150	PREC	Precipitation reagent (serum, plasma, EDTA-whole blood)	1 x 30 ml
KC2100	MOPHA	Mobile phase (important: do not recirculate)	1 x 1 000 ml
	CAL	Calibrator; lyophilised (see specification data sheet for concentration)	4 x
	DER	Derivatisation solution (contain KCN)	1 x 25,5 ml
	CTRL1	Control1; lyophilised	4 x
	CTRL2	Control2; lyophilised	4 x

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

The HPLC column (KC2100RP), can be ordered separately from Immundiagnostik. To extend the lifetime of your HPLC column, pre-columns (KC2100VS) are highly recommended. These and also the pre-column holders (KC2100VH) can also be ordered from Immundiagnostik. In addition to the complete kits, all components can also be ordered separately. Please ask for our single component price list.

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- 1.5 ml reaction tubes (e.g. Eppendorf)
- Centrifuge
- Various pipettes
- Vortex
- HPLC with fluorescence detector
- Reversed phase C₁₈ column
- Thermoshaker

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 **500 µl reconstitution solution (RECSOL)**. The concentration of vitamin B₆ slightly changes from lot to lot, the exact concentration is stated on the label.
- **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 vitamin B₆ 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) when stored at **2–8 °C**.

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Plasma, serum and 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 one week. For longer storage, samples should be frozen at -20 °C.

8. ASSAY PROCEDURE

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

Please refer to the quality certificate of the column

Fluorescence detection: Excitation: 320 nm
Emission: 415 nm

Temperature: 30 °C

Injection volume: 20 µl

Running time: 7 min (dialysis patients: 15 min)

9. TREATMENT OF THE COLUMN

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

After analysis, the column should be flushed with 30 ml ultrapure 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).

10. RESULTS

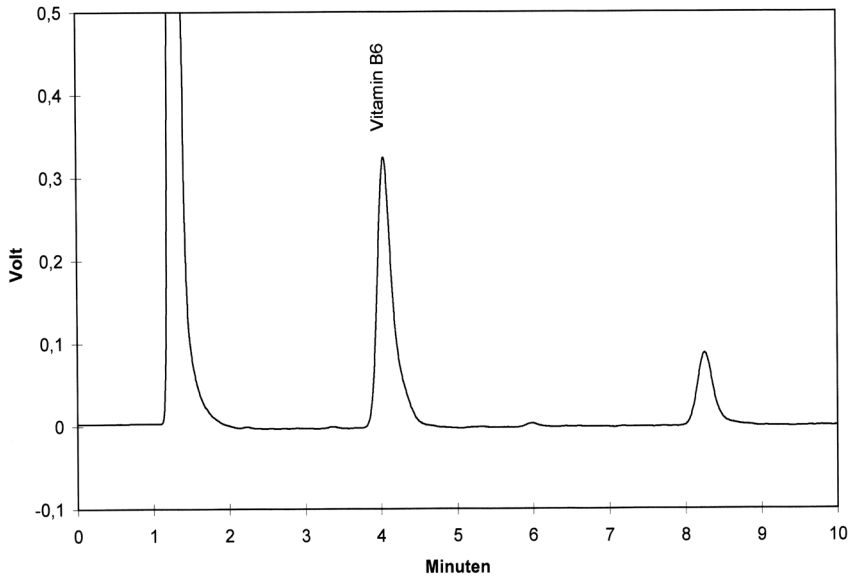
Calculation

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

* see label

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

Typical chromatogram



11. QUALITY CONTROL

Reference ranges

Serum and plasma

- Based on Immundiagnostik AG 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.

12. 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)

13. DISPOSAL

The derivatisation solution (DER) must be oxidised 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 neutralised with NaOH to neutral pH and disposed as salt solution.

Important: Reaction will produce heat, be careful!

Please refer to the appropriate national guidelines.

14. 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

Problem	Possible reason	Solution
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 smooth	Pump delivers imprecise	Check pump, degas the system
	Detector flow cell is dirty	Clean flow cell

15. 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.
- The test components contain organic solvents. Contact with skin or mucous membranes must be avoided.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- As a precaution, it is recommended that the human material used is always considered potentially infectious.
- As the derivatisation solution (DER) contains KCN, it should be pipetted under an fume hood.

















16. 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 interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- 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.
- 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.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

17. 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.

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
	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