

Vitamin B₆ HPLC Kit

Zur Bestimmung von Vitamin B₆ in Plasma und Serum

For the determination of Vitamin B₆ in plasma and serum

Gültig ab/valid from 23.08.2005

Artikelnummer/Catalogue no.: KC 2100

Packungsgröße/Package size: 100 Tests/100 determinations

Lagerung/Storage: 4 °C, Kalibrator und Kontrollen bei -20 °C
4 °C, Calibrator and controls at -20 °C



| Inhaltsverzeichnis/Table of contents | Seite/Page |
|---|------------|
| 1. VERWENDUNGSZWECK | 3 |
| 2. EINLEITUNG | 3 |
| 3. TESTPRINZIP | 3 |
| 4. INHALT DER TESTPACKUNG | 5 |
| 5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL | 5 |
| 6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN | 5 |
| 7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN | 6 |
| 8. PROBENVORBEREITUNG | 6 |
| 9. TESTDURCHFÜHRUNG | 6 |
| HINWEISE | 6 |
| ARBEITSSCHEMA | 7 |
| CHROMATOGRAPHISCHE BEDINGUNGEN | 7 |
| 10. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE | 8 |
| 11. AUSWERTUNG | 8 |
| BERECHNUNG | 8 |
| MUSTERCHROMATOGRAMM | 8 |
| 12. EINSCHRÄNKUNGEN | 9 |
| 13. QUALITÄTSKONTROLLE | 9 |
| NORMBEREICH | 9 |
| KONTROLLEN | 9 |
| 14. TESTCHARAKTERISTIKA | 9 |
| PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT | 9 |
| LINEARITÄT | 10 |
| NACHWEISGRENZE | 10 |
| WIEDERFINDUNG | 10 |
| 15. ENTSORGUNG | 10 |
| 16. MAßNAHMEN BEI STÖRUNGEN | 10 |
| 17. LITERATUR | 12 |
| 18. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST | 12 |

| | |
|---|-----------|
| 1. INTENDED USE | 14 |
| 2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST | 14 |
| 3. PRINCIPLE OF THE TEST | 14 |
| 4. MATERIAL SUPPLIED | 15 |
| 5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED | 16 |
| 6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS | 16 |
| 7. PRECAUTIONS | 16 |
| 8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION | 17 |
| 9. ASSAY PROCEDURE | 17 |
| PROCEDURAL NOTES | 17 |
| SAMPLE AND STANDARD PREPARATION | 18 |
| CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS | 18 |
| 10. TREATMENT OF THE COLUMN | 19 |
| 11. RESULTS | 19 |
| CALCULATION | 19 |
| TYPICAL CHROMATOGRAM | 19 |
| 12. LIMITATIONS | 20 |
| 13. QUALITY CONTROL | 20 |
| EXPECTED VALUES | 20 |
| CONTROLS | 20 |
| 14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS | 21 |
| PRECISION AND REPRODUCIBILITY | 21 |
| LINEARITY | 21 |
| DETECTION LIMIT | 21 |
| RECOVERY | 21 |
| 15. DISPOSAL | 21 |
| 16. TROUBLESHOOTING | 22 |
| 17. REFERENCES | 23 |
| 18. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE | 23 |

1. VERWENDUNGSZWECK

Die HPLC-Applikation ist für die Bestimmung von Vitamin B₆ aus Plasma und Serum 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 durchgeführt.

Zusammenfassung

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

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

4. INHALT DER TESTPACKUNG

| Artikel Nr. | Kit Komponenten | Menge |
|-------------|---|------------------|
| KC2100LM | Laufmittel (enthält Na-Azid) | 1000 ml |
| KC2100KA | Kalibrator (lyoph. 4 ml; Konzentration siehe Etikett) | 1 Fläschchen |
| KC2100FR | Fällungsreagenz | 5 ml |
| KC2100RL | Rekonstitutionslösung | 10 ml |
| KC2100DL | Derivatisierungslösung (enthält KCN) | 3 x 8,5 ml |
| KC2100KO | Kontrolle 1 und 2 (lyoph. 250 µl; Konzentration siehe Produktspezifikation) | 2 x 3 Fläschchen |

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

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

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Der **Kalibrator** (EDTA-Plasma mit definierter Menge Vitamin B₆) wird in 4 ml Rekonstitutionslösung gelöst, aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert. Der Gehalt an Vitamin B₆ ändert sich geringfügig von Charge zu Charge, der genaue Gehalt ist auf dem Etikett angegeben.
- Die **Kontrollen** werden in 250 µl Rekonstitutionslösung gelöst.

- Die restlichen Testreagenzien werden gebrauchsfertig in gelöster Form geliefert.
- Die Testreagenzien sind bei 2-8 °C, der Kalibrator bei -20 °C bis zum Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Standards und Kontrollen sind auf Humanplasma aufgebaut. Sie sind auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befundet worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Das Fällungsreagenz besteht aus Säure und muß mit Vorsicht behandelt werden. Sie verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muß die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

8. PROBENVORBEREITUNG

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

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

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

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

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

Arbeitsschema

In 1,5 ml Reaktionsgefäße (z.B. Eppendorf) werden pipettiert:

200 µl Patientenprobe, Kalibrator oder Kontrolle

+

50 µl Fällungsreagenz

gut mischen, 10 Minuten bei 2-8 °C stehen lassen und anschließend für 2 min bei 10.000 g zentrifugieren.

100 µl des Überstandes

+

250 µl Derivatisierungslösung

mischen, für 20 min bei 60 °C auf Schüttler inkubieren, danach bei 2-8 °C abkühlen und für 5 min bei 10.000 g zentrifugieren. Den Überstand abnehmen, dieser ist als Probe jetzt 5 Tage bei 2-8 °C im Dunkeln stabil.

20 µl in das HPLC-System injizieren.

Chromatographische Bedingungen

Säulenmaterial: Prontosil Eurobond; 5 µm

Merck Lichrospher; 5 µm

Säulendimension: 125 mm x 4 mm

Fluß : 1 - 1,5 ml/min

Fluoreszenzdetektor : Exzitation: 320 nm

Emission: 415 nm

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

Temperatur: 30 °C

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

10. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE

Nach der Analyse sollte die Trennsäule mit ca. 50 ml Aqua bidest bei einem Fluß von 1 ml/min gespült werden. Anschließend wird die Säule in 20% Methanol in Wasser gelagert (ca. 30 ml, Fluß 0,7 ml/min)

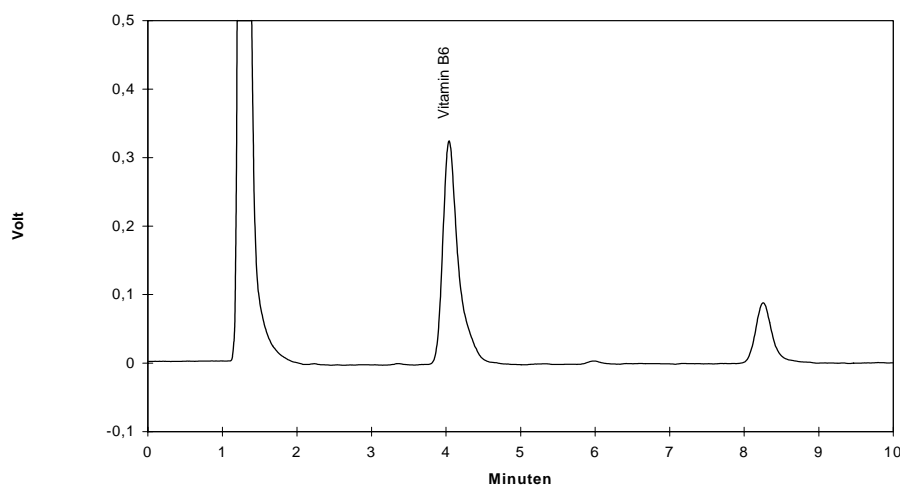
Zur Wiederinbetriebnahme wird das ganze System mit ca. 50 ml Laufmittel äquilibriert

11. AUSWERTUNG

Berechnung

$$\text{Konz. Probe (ng/ml)} = \frac{\text{Peakfläche Patient} * \text{Konz. Kalibrator (ng/ml)}}{\text{Peakfläche Kalibrator}}$$

Musterchromatogramm



12. EINSCHRÄNKUNGEN

Bei der Messung von Vollblut sollten die Proben 1:1 mit Aqua bidest. verdünnt werden. Die gefundenen Konzentrationen sind dann zu verdoppeln.

13. QUALITÄTSKONTROLLE

Normbereich

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

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

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

Kontrollen

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

14. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay VK: 2,8 % (24,7 ng/ml) [n = 12]

Inter-Assay VK: 4,1 % (24,6 ng/ml) [n = 12]

Linearität

bis 250 ng/ml

Nachweisgrenze

0,2 ng/ml

Wiederfindung

95,6 %

15. ENTSORGUNG

Die Derivatisierungslösung kann mit Wasserstoffperoxid oxidiert werden und nachdem der pH Wert mit Natronlauge auf 6-8 eingestellt wurde als wässrige Salzlösung entsorgt werden. Das Laufmittel und das Fällungsreagenz 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 |
| Doppelpeaks | Totvolumen an Fittings und / oder Säule | Fittings und / oder Säule erneuern |

| Problemstellung | Mögliche Ursache | Behebung |
|---------------------------|------------------------------------|---|
| 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 |
| 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

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

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

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

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.
- Sämtliche in der Testpackung enthaltene Reagenzien dürfen ausschließlich zur in-vitro-Diagnostik eingesetzt werden.
- Die Reagenzien sollten nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden (Verfallsdatum siehe Testpackung).
- Einzelkomponenten mit unterschiedlichen Lot-Nummern aus verschiedenen Testpackungen sollten nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die dafür erstellten Richtlinien für medizinische Laboratorien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten und der Aufbereitung der Proben wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für direkt daraus resultierende Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

Vitamin B₆ HPLC Kit

For the determination of Vitamin B₆ in plasma and serum

Gültig ab/valid from 23.08.2005

Artikelnummer/Catalogue no.: KC 2100

Packungsgröße/Package size: 100 Tests/100 determinations

Lagerung/Storage: 4 °C, Kalibrator und Kontrollen bei -20 °C
4 °C, Calibrator and controls at -20 °C



1. INTENDED USE

The *Immundiagnostik* Assay is intended for the quantitative determination of vitamin B6 in plasma and serum. This Assay is designed for *in vitro* diagnostic use only.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

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

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

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

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

3. PRINCIPLE OF THE TEST

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

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

Summary:

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

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

4. MATERIAL SUPPLIED

| Catalogue No | Kit Components | Quantity |
|--------------|-------------------------------------|-------------|
| KC 2100LM | Mobile phase | 1 x 1000 ml |
| KC 2100KA | Calibrator, 4 ml lyophilized | 1 vial |
| KC 2100DL | Derivatisation solution | 3 x 8.5 ml |
| KC 2100FR | Precipitating reagent | 1 x 5 ml |
| KC 2100RE | Reconstitution solution | 1 x 10 ml |
| KC 2100KO | Control 1 and 2, 250 µl lyophilized | 2 x 3 vials |

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- 1.5 ml reaction tubes (Eppendorf)
- Centrifuge
- Various pipettes
- HPLC with Fluorescence-detector
- Reversed phase C₁₈-column - Bischoff ProntoSil Eurobond C18 5 µm, 125 x 4 mm
- Heatable shaker or water bath
- Vortex mixer

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- Reconstitute the **calibrator** in **4 ml** reconstitution solution. Take aliquots and store them at -20°C. Avoid repeated freeze-thaw circles. The concentration of vitamin B6 might have minor changes from lot to lot.
- Reconstitute the **controls** in **250 µl** reconstitution solution.
- All other test reagents are stable at 2-8 °C, up to the date of expiry stated on the label.

7. PRECAUTIONS

- For in vitro diagnostic use only.
- This product contains human source material which was tested and found to be non-reactive to HBsAg, anti-HIV-1/2, and anti-HCV. Since no method can offer complete assurance that hepatitis B virus, HIV-1/2, HVC or other infectious agents are absent, these reagents should be handled as if potentially infectious.
- The precipitating reagent contains acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped out immediately with copious quantities of water. Do not breath vapor and avoid inhalation.

- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on kit label.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

EDTA-plasma and serum is suited for this test system.

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

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

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- The quality control guidelines should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure, that are not coordinated with the producer, may influence the test results. Immundiagnostik can therefore not be held reliable for any damage resulting from this.
- The assay should always be performed due to the manual which is given in the kit.

10. TREATMENT OF THE COLUMN

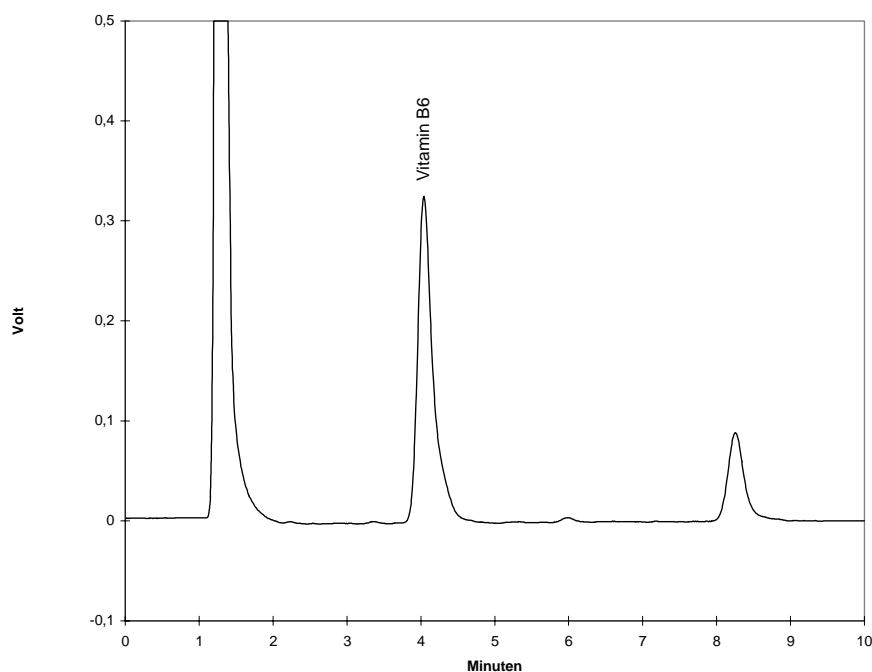
After the analysis the column should be flushed with 50 ml aqua bidest (1 ml/min) and stored in 20% methanol in aqua bidest (ca. 30 ml, flow 0.7 ml/min). Before use, the system should be equilibrated with ca. 50 ml Eluent.

11. RESULTS

Calculation

$$c_{B_6 \text{ patient}} = \frac{\text{Peak height patient} \times \text{conc. calibrator (ng / mL)}}{\text{Peak height calibrator}}$$

Typical chromatogram



12. LIMITATIONS

To minor interferences whole blood should be diluted 1:1 with aqua bidest. The calculated concentration must then be multiplied with 2.

13. QUALITY CONTROL

Expected values

Vitamin B6 normal values: 4.3 – 17.9 ng/ml (n=90)

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

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

Controls

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

14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay CV: 2.8 % (24.7 ng/ml) [n = 12]

Inter-Assay CV: 4.1 % (24.6 ng/ml) [n = 12]

Linearity

up to 250 ng/ml

Detection limit

0.2 ng/ml

Recovery

95,6 %

15. DISPOSAL

The derivatisation solution can be oxidized with hydrogen peroxide and after the pH value is adjusted inbetween 6-8, it can be disposed as aqueous salt solution. The mobile phase and the precipitation solution could be neutralized with NaOH and if the pH value is neutral it can be disposed as salt solution. (**Important:** Reaction will produce heat, be careful)

Please refer to the appropriate national guidelines.

16. TROUBLESHOOTING

| Problem | Possible reason | Solution |
|--------------------------|---|---|
| No signal | No or defect connection to evaluation system | Check signalcord and connection |
| | Detectorlamp is altered | Change lamp |
| No peaks | Injector is congested | Check Injector |
| Doublepeaks | 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 |
| | Autosampler 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 |
| Baseline is not smooth | Pump delivers imprecise | Check pump, degas the system |
| | Detector flowcell is dirty | Clean flow cell |

17. REFERENCES

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

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

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

18. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The test components contain organic solvents. Contact with skin or mucous membranes has to be avoided.
- All reagents in the test package are to be used for research only.
- The reagents should not be used after the date of expiry stated on the label.
- Single components with different lot numbers should not be mixed or exchanged.
- The guidelines for medical laboratories should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure, that are not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held reliable for any damage resulting from this.