

Arbeitsanleitung/Manual

# Homocystein HPLC Kit

*Zur Bestimmung von Homocystein in Plasma und Serum*

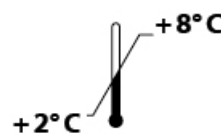
# Homocysteine HPLC Kit

*For the determination of Homocysteine in plasma and serum*

Gültig ab / Valid from 11.06.2008



KC 2801



CAL
INT STD
CTRL 1
CTRL 2



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim  
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)

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

---

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

Die 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 umgewandelt in Homocystein, 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 Schlaganfalles 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 höher molekularer 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. 5 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 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 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 eine Einpunkt-Kalibrierung ausreichend, im Gegensatz von Immunoassays 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.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
KC2801LM	MOPHA	Laufmittel	1 x 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	1 x 25 ml
KC2801RL	REDSOL	Reduktionslösung (lyoph., 2,4 ml)	1 Fläschchen
KC2801DL	DER	Derivatisierungslösung	1 x 12 ml
KC2801FR	PREC	Fällungsreagenz	1 x 12 ml
KC 2801KO	CTRL 1 CTRL 2	Kontrolle 1 und 2 (lyoph., 250 µl; Konzentration siehe Spezifikation)	2 x 3 Fläschchen

Die HPLC Trennsäule (KC 2801RP) 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

- 1,5 ml Reaktionsgefäße (z.B. Eppendorf)
- Zentrifuge
- Wasserbad / heizbarer Schüttler
- div. Pipetten
- HPLC Gerät mit Fluoreszenz-Detektor
- reversed phase C18-Säule
- Vortex Wirbelmischer

## 6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Die Testreagenzien sind bei 2-8 °C, der **Kalibrator** (CAL), der **interne Standard** (INT STD) und die **Kontrollen** (CTRL) bei -20 °C bis zum Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.
- Der **Kalibrator** (CAL) wird in 1 ml und der **interne Standard** (INT STD) in 12 ml der mitgelieferten Rekonstitutionslösung (RECSOL) resuspendiert. Kalibrator und interner Standard werden anschließend aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Der Gehalt an Homocystein ändert sich geringfügig von Charge zu Charge, der genaue Gehalt ist auf dem Etikett angegeben.
- Die **Kontrollen** (CTRL1,2) werden in 250 µl Rekonstitutionslösung (RECSOL) gelöst.
- Die lyophilisierte **Reduktionslösung** (REDSOL) wird mit 2,4 ml Rekonstitutionslösung (RECSOL) versetzt und ist dann bei 2-8 °C 3 Monate haltbar.

## 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 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 kühl gelagert werden, und innerhalb der nächsten 30 Minuten bei 2000 g in einer kühlbaren Zentrifuge für 10 min zentrifugiert werden. Danach kann die Probe bei 4°C gelagert werden. **Für längere Lagerung (> 1 Woche)** sollten die Proben bei -20 bis -80°C aufbewahrt werden.

## 9. TESTDURCHFÜHRUNG

### Hinweise

- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumina 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:

**50 µl Patientenprobe, CAL** (Kalibrator) oder **CTRL 1, 2** (Kontrolle 1 und 2)

+

**50 µl INT STD** (Interner Standard)

+

**20 µl REDSOL** (Reduktionslösung)

+

**100 µl DER** (Derivatisierungslösung)

mischen und **10 Minuten** bei 60 °C reagieren lassen.

Die Probe abkühlen und **100 µl PREC** (Fällungsreagenz) zugeben,

mischen, **5 Minuten** bei 2-8 °C stehen lassen und anschließend für **5 Minuten** bei 10.000 g zentrifugieren. Die aufgearbeitete Probe ist bei 2-8 °C mindestens 6 Tage stabil.

**20 µl** in das HPLC-System injizieren.

## Chromatographische Bedingungen

<b>Säulenmaterial:</b>	MZ Inertsil ODS-2; 5 µm
	MZ PerfectBond ODS-2; 5 µm
	Bischoff Prontosil Eurobond; 5 µm
<b>Säulendimension:</b>	125 mm x 4 mm
<b>Fluß:</b>	0,7 – 1,0 ml/min (der genaue Fluß ist auf der Produktspezifikation der jeweiligen Säule angegeben)
<b>Temperatur:</b>	30 °C
<b>Detektion:</b>	Fluoreszenzdetektion    Exzitation: 385 nm Emission: 515 nm
<b>Auftragsvolumen:</b>	20 µl
<b>Laufzeit:</b>	5 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** Aqua bidest. bei einem Fluss von 1,0 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 MOPHA** (Laufmittel) äquilibriert.

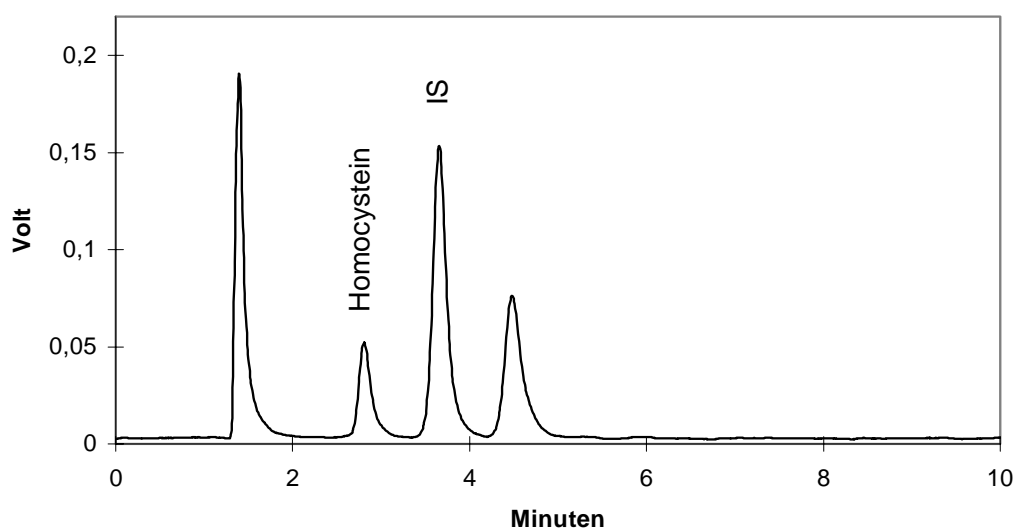
## 11. AUSWERTUNG

### Berechnung

$$\frac{\text{Peakhöhe Probe} \times \text{Konzentration des Kalibrators}}{\text{Peakhöhe Interner Standard der Probe}} \times F = \text{Konzentration Probe}$$

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

### Musterchromatogramm



## 12. EINSCHRÄNKUNGEN

Als Patientenprobe ist EDTA-Plasma zu bevorzugen, da es bei Serumproben zu einem zeitabhängigen Anstieg des Homocysteingehaltes kommen kann.

## 13. QUALITÄTSKONTROLLE

### Normbereich

(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  $\mu\text{mol/l}$  an, liegt eine heterozygote Homocysteinämie vor.

Wir empfehlen, dass jedes Labor seinen eigenen Normalwerte-Bereich erstellt, weil Referenzbereiche stark von der Auswahl des Probandenkollektivs abhängig sind. Die Angabe des Normalbereichs dient lediglich der Orientierung und kann von anderen publizierten Daten abweichen.

### 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:	2,5 % (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 MOPHA (Laufmittel), REDSOL (Reduktionslösung), INT STD (interner Standard) und DER (Derivatisierungslösung) müssen als halogenfreier Lösungsmittelabfall entsorgt werden. Das PREC (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
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**

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.
- 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.

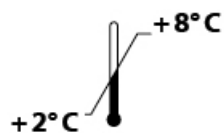
# Homocysteine HPLC Kit

*For the determination of Homocysteine in plasma and serum*

Valid from 11.06.2008



KC 2801



CAL
INT STD
CTRL 1
CTRL 2



## 1. INTENDED USE

The *Immundiagnostik Assay* is intended for the quantitative determination of homocysteine in plasma and serum. This Assay is designed 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 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 5 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 by the internal standard method.

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.

## Summary

Besides many other parameters the advantage of HPLC method lies in the simultaneous handling of many analytes in a single test. The HPLC system enables even laboratories without experience in high performance liquid chromatography to use this technique for clinical routine determination in a quick and precise manner. Unlike immuno assays with up to six calibrators per test, a one-point calibration is sufficient to calibrate the test system. It is possible to automate the sample application and calculation of the results so that even higher numbers of samples can be handled nearly without control.

## 4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Content	Kit Components	Quantity
KC 2801LM	MOPHA	Mobile phase	1 x 1000 ml
KC 2801KA	CAL	Calibrator (lyophilized, 1 ml)	1 vial
KC 2801IS	INT STD	Internal standard (lyophilized, 12 ml)	1 vial
KC 2801RE	RECSOL	Reconstitution solution	1 x 25 ml
KC 2801RL	REDSOL	Reduction solution (lyophilized, 2.4 ml)	1 vial
KC 2801DL	DER	Derivatisation solution	1 x 12 ml
KC 2801FR	PREC	Precipitation reagent	1 x 12 ml
KC 2801KO	CTRL 1 CTRL 2	Control 1 and 2; 250 µl lyophilized	2 x 3 vials

HPLC column (KC 2801RP) 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

- 1.5 ml reaction tubes (Eppendorf)
- Centrifuge
- Ice water bath
- Various pipettes
- HPLC with Fluorescence-detector
- Reversed phase C<sub>18</sub>-column
- Water bath /Thermo shaker
- Vortex Mixer

## 6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- Reconstitute the **calibrator** (CAL) in **1 ml** reconstitution solution (RECSOL). Take aliquots and store them at -20°C. Avoid repeated freeze-thaw cycles. The concentration of homocysteine might have minor changes from lot to lot.
- Reconstitute the **controls** (CTRL1,2) in **250 µl** reconstitution solution (RECSOL).
- Reconstitute the **internal standard** (INT STD) in **12 ml** reconstitution solution (RECSOL). **Take aliquots** and store them at -20°C. Avoid repeated freeze-thaw cycles. The concentration of homocysteine might have minor changes from lot to lot.
- Reconstitute the **reduction solution** (REDSOL) in **2.4 ml** reconstitution solution (RECSOL) and store at **2-8 °C**. The reconstituted reduction solution is stable for 3 months.
- 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 breathe vapor and avoid inhalation.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown 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 (shipment is possible for 24 h at room temperature).

For long time storage (> 1 week), keep the samples at -20 to -80°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 analysis, the column should be flushed with 30 ml aqua bidest. (1 ml/min) and stored in 50% methanol in aqua bidest (approx. 30 ml, flow 0.6 ml/min). Before use, the system should be equilibrated with ca. 30 ml eluent.

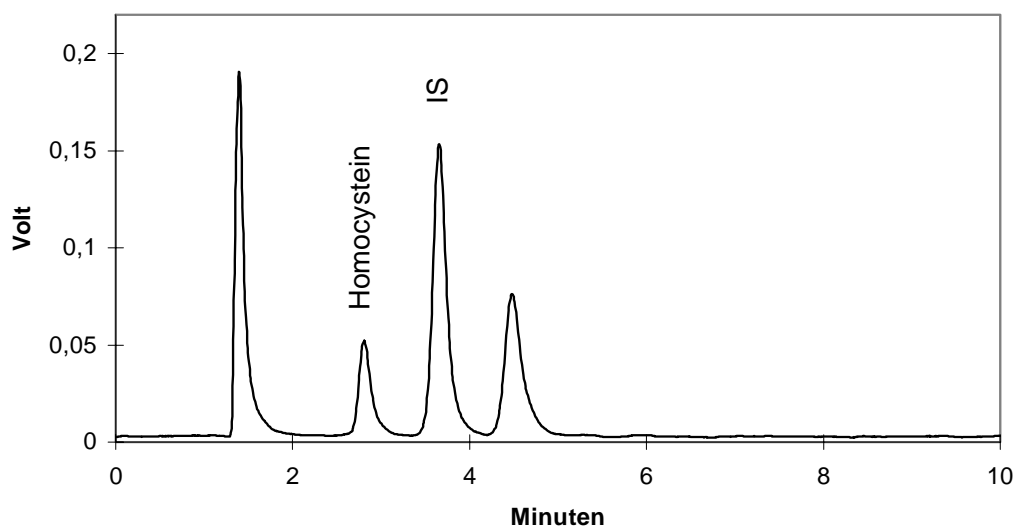
## 11. RESULTS

### Calculation

$$\frac{\text{Peak height sample} \times \text{Concentration of the calibrator}}{\text{Peak height internal standard in the sample}} \times F = \text{Concentration sample}$$

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

### Typical chromatogram



## 12. LIMITATIONS

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

Don't use whole blood.

## 13. QUALITY CONTROL

### Expected values

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

< 15	µmol/l	Normal value
15-30	µmol/l	Lack of vitamins
31-100	µmol/l	Indication of heterocygote homocysteinemia
> 100	µmol/l	Indication of homocygote homocysteinemia

After a methionine loading test an increase in homocysteine concentration is normal. Concentrations more than 30 µmol/l are indicating a heterocygote homocysteinemia.

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

### Controls

Control samples should be analyzed 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 MOPHA (mobile phase), REDSOL (reduction solution), INT STD (internal standard), and DER (derivatisation solution) must be disposed as non-halogenated solvents. The PREC (precipitation solution) 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 reason	Solution
No signal	No or defect connection to evaluation system	Check signal cord and connection
	Detector lamp is altered	Change lamp
No peaks	Injector is congested	Check Injector
Double peaks	Dead volume in fittings and / or column	Renew fittings and / or column
Contaminating peaks	Injector dirty	Clean injector
	Contamination at the head of the column	Change direction of the column and rinse for 30 min at low flow rate (0.2 ml/min) with mobile phase
	Air in the system	Degas pump
	Auto sampler vials contaminated	Use new vials or clean them with methanol
Broad peaks, tailing	Precolumn / column exhausted	Use new precolumn / column
Variable retention times	Drift in temperature	Use a column oven
	Pump delivers imprecise	Check pump, degas the system
	System is not in steady state yet	Rinse system mobile phase for 15 min
Baseline is drifting	Detector lamp did not reach working temperature yet	Wait
	Detector lamp is too old	Renew lamp
	System is not in steady state yet	Rinse system mobile phase for 15 min
	Pump delivers imprecise	Check pump, degas the system
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 put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The test components contain organic solvents. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- For *in vitro* diagnostic use only.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- The guidelines for medical laboratories should be 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 wrong use.