

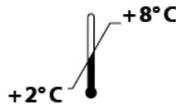
# Vitamin K<sub>1</sub> HPLC Kit

Zur Bestimmung von Vitamin K<sub>1</sub> in Plasma und Serum

For the determination of Vitamin K<sub>1</sub> in plasma and serum

Gültig ab / Valid from 18.03.2008

**REF** KC 2400



CAL
INT STD
CTRL 1
CTRL 2
STD



Immundiagnostik AG





# Inhalt

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

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Die HPLC-Applikation ist für die Bestimmung von Vitamin K<sub>1</sub> aus Serum und Plasma geeignet. Nur zur in vitro Diagnostik.

## 2. EINLEITUNG

Vitamin K wird rasch metabolisiert und ist nur in geringer Menge im Organismus gespeichert, so dass Mangelerscheinungen 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 Mangelerscheinungen sind Folgen einer verminderten Wirkung des Vitamins als Cofaktor einer mikrosomalen, O<sub>2</sub>-abhängigen Carboxylase bei der Carboxylierung von spezifischen Glutaminsäureresten der Gerinnungsfaktoren, sowie des Osteocalcins. Die dadurch verminderte Bildung von  $\gamma$ -Carboxyglutaminsäure-Resten, die den Gerinnungsfaktoren die Fähigkeit verleihen, mit Ca<sup>2+</sup> 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  $\gamma$ -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.

## 3. TESTPRINZIP

Zur Bestimmung des Vitamin K<sub>1</sub> wird im ersten Schritt eine Probenvorbereitung durchgeführt. Die Plasma- bzw. Serumproben werden über eine SPE-Kartusche vorgereinigt. Hierbei bindet Vitamin K<sub>1</sub> nicht an das C18-Material der Kartusche und erscheint im Durchbruch. Danach erfolgt in einem Fällungsschritt die Abtrennung höher molekularer Substanzen. Anschließend wird Vitamin K<sub>1</sub> aus dem Überstand extrahiert. Nach der Extraktion wird die organische obere Phase abgezogen und verdampft. Die Probe wird in Laufmittel aufgenommen und in das HPLC-System injiziert. In einem hinter der analytischen Trennsäule angeschlossenen Reduktionsreaktor wird die Probe reduziert und kann dann im Fluoreszenzdetektor nachgewiesen werden.

Die Trennung benötigt ca. 15-20 Minuten für einen Lauf. Die Quantifizierung erfolgt über den mitgelieferten Plasma-Kalibrator nach der internen Standard-Methode.

## Zusammenfassung

Der hier vorliegende Komplettkit zur Bestimmung des Vitamin K<sub>1</sub> 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 von 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).

## Indikationen

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

#### 4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
KC2400LM	MOPHA	Laufmittel ( <b>wichtig</b> : nicht rezirkulieren)	3 x 1000 ml
KC2400KA	CAL	Kalibrator (lyoph. 2,2 ml; Konzentration siehe Etikett)	8 Fläschchen
KC2400IL	STD	Standard isopropanolisch	10 ml
KC2400IS	INT STD	Interner Standard	1 ml
KC2400FR	PREC	Fällungsreagenz	200 ml
KC2400EX	EXTSOL	Extraktionslösung	400 ml
KC2400ZI	ZINC	Zink ( <b>Wichtig</b> : Lagerung unter Argon)	20 g
KC2400ZN	ZUB	Zubehör für Nachsäulenreduktionsre- aktor	5 Stück
KC2400KO	CTRL 1 CTRL 2	Kontrolle 1 und 2 (lyoph. 1.1 ml; Konzentration siehe Produktspezi- fikation)	2 x 3 Fläschchen

Der Starter-Kit beinhaltet daneben einen **Nachsäulenreduktionsreaktor** (nicht gefüllt). Die HPLC Trennsäule (KC2400RP) sowie die Kartuschen (KC2400CK) können 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

- Zentrifuge
- Vortex-Wirbelmischer
- Glasröhrchen, mit Spitzboden
- HPLC-Anlage mit Fluoreszenzdetektor
- Reversed phase C18-Säule, Superspher RP18, 4 µm, 125 x 4,6 mm

- SPE-Kartuschen, C18 (KC 2400ck)
- MERCK-Catridge Holder Manu-Kart (KC2400RK)
- Absaugeinheit für Festphasenextraktionskartuschen
- Vorrichtung zum Einengen der Probe (z.B. Vakuumzentrifuge)

## 6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

### Vorbereitung des Kalibrators und der Kontrolle

Der **CAL** (Kalibrator) wird mit dem auf dem Etikett angegebenen Volumen Aqua bidest. resuspendiert. Nicht verbrauchte Reste sind zu entsorgen, da erneutes Einfrieren den Kalibrator teilweise zerstört. Der Gehalt an Vitamin K<sub>1</sub> ändert sich geringfügig von Charge zu Charge, der genaue Gehalt ist auf dem Etikett angegeben.

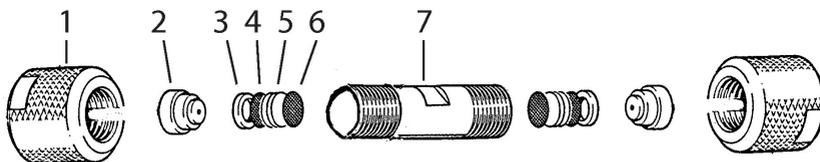
Die **CTRL 1** und **CTRL 2** (Kontrollen 1 und 2) werden in 1.1 ml Aqua bidest. resuspendiert.

### Vorbereitung des Nachsäulenreduktionsreaktors

Im Nachsäulenreduktionsreaktor wird das Vitamin K reduziert und damit erst der Detektion im Fluoreszenzdetektor zugänglich gemacht. Um eine gleichbleibende Qualität des Detektorsignals zu erhalten, ist es nötig vor jeder Probenreihe den Nachsäulenreduktionsreaktor frisch zu füllen, da die Oberfläche der Zinkpartikel nach 12 h Laufzeit oxidiert ist. Der Füllvorgang ist sehr einfach und benötigt nur etwa 10 min.

Der Zusammenbau des Reaktors ist aus der folgenden Zeichnung ersichtlich:

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



1. Eine Seite der Säule wird wie in obiger Zeichnung beschrieben verschlossen.
2. Die Zinkpartikel werden mit einem Trichter 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:



Alle Testreagenzien werden gebrauchsfertig in gelöster Form geliefert mit Ausnahme des **CAL** (Kalibrator).

Die Testreagenzien sind bei Raumtemperatur, der **CAL** (Kalibrator) und der **STD** (Standard) 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.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

## 8. PROBENVORBEREITUNG

Als Patientenprobe ist Plasma und Serum geeignet. Die Probe sollte in jedem Fall sofort nach der Abnahme kühl gelagert werden.

Die Proben sind bei 2-8 °C eine Woche stabil, für längere Lagerung sollten sie bei -20 °C eingefroren 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

1. Konditionierung: <b>Kartusche</b> mit 3 ml Methanol und anschließend mit 3 ml Aqua bidest. spülen.
2. Zu <b>1 ml Plasma</b> , <b>CAL</b> (Kalibrator) oder <b>CTRL 1</b> und <b>CTRL 2</b> (Kontrolle 1 und 2) <b>10 µl INT STD</b> (interner Standard) geben, mischen und durch die Kartusche saugen
3. Den <b>Durchbruch</b> in einem Borosilikatglasröhrchen <b>auffangen</b> .
4. <b>2 ml PREC</b> (Fällungsreagenz) zugeben, 1 min vortexen und anschließend bei 3.500 g 10 min zentrifugieren.
5. <b>Überstand</b> in ein neues Borosilikatglasröhrchen überführen und <b>4 ml EXTSOL</b> (Extraktionslösung) zugeben.
6. 2 min <b>schütteln</b> und 5 min bei 3500 g <b>zentrifugieren</b> .
7. <b>Die obere Phase</b> in ein neues Borosilikatglasröhrchen überführen und das Lösungsmittel verdampfen (z.B. in Vakuumzentrifuge).
8. <b>Die trockene Probe ist bei 4°C 8 Tage stabil</b> .
9. Der <b>Nachsäulenreduktionsreaktor</b> wird in das HPLC-System eingebaut und 30-45 min äquilibriert.
10. Die Leistungsfähigkeit des Reaktors wird überprüft, indem <b>100 µl STD</b> (isopropanolischer Standard) injiziert werden; hierbei sollte das <b>Verhältnis von Signal zu Untergrundrauschen größer 25 sein</b> .
11. Die eingedampfte <b>Probe</b> in <b>150 µl MOPHA</b> (Laufmittel) aufnehmen und <b>100 µl</b> in das HPLC-System <b>injizieren</b> .

## Chromatographische Bedingungen

Zur Bestimmung der Retentionszeit werden **100 µl STD** (isopropanolischer Standard) in das HPLC-System injiziert.

Säulenmaterial:	Superspher 100 RP18; 4 µm
Säulendimension:	125 mm x 4 mm
Temperatur:	30 °C
Fluoreszenzdetektor:	Exzitation: 248 nm Emission: 418 nm
Fließgeschwindigkeit:	0,9 - 1,2 ml / min
Injektionsvolumen:	100 µl
Laufzeit/Chromatogramm:	ca. 20 min.

**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 0,5 ml/min).

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

**Wichtig: Das MOPHA (Laufmittel) darf nicht rezirkuliert werden.**

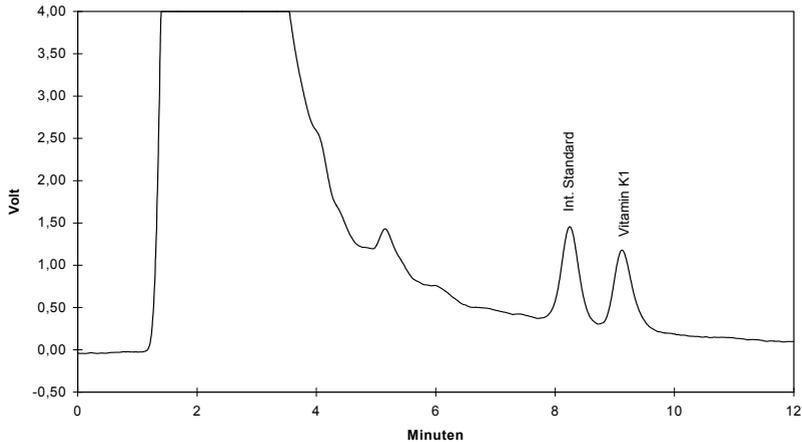
## 11. AUSWERTUNG

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

Wir raten von der Messung stark hämolytischer, sowie lipämischer Proben ab.

## 13. QUALITÄTSKONTROLLE

Referenzbereich

**0,22 - 2,28 ng/ml (Mittelwert = 1,29 ng/ml) (n = 19)**

Wir empfehlen, dass jedes Labor seinen eigenen Referenzbereich erstellt, weil Referenzbereiche stark von der Auswahl des Probandenkollektivs abhängig sind. Die Angabe des Referenzbereichs für Vitamin K<sub>1</sub> 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:** 4,5 % (1,7 ng/ml) [n = 6]

**Inter-Assay VK:** 5,6 % (1,7 ng/ml) [n = 6]

### Linearität

bis 25 ng/ml

### Nachweisgrenze

0,15 ng/ml

## 15. ENTSORGUNG

Das **MOPHA** (Laufmittel), **STD** (isopropanolischer Standard), **INT STD** (interner Standard), **EXTSOL** (Extraktionslösung) und **PREC** (Fällungsreagenz) müssen als halogenfreier Lösungsmittelabfall entsorgt werden.

## 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

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

## 17. LITERATUR

- Saupe J. (1992). Vitamin K und Indikationen zur Bestimmung im Plasma. Klin Lab 38:51-54
- 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 woman. J Bone Miner Res 9:1591-95
- 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
- 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.

## 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 Pipettierolumina 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.

### Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung



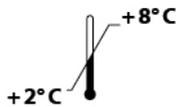
# Vitamin K<sub>1</sub> HPLC Kit

For the determination of Vitamin K<sub>1</sub> in plasma and serum

Valid from 18.03.2008

**REF**

KC 2400



CAL
INT STD
CTRL 1
CTRL 2
STD



Immundiagnostik AG

**IVD**



**CE**

# Content

<b>1. INTENDED USE</b>	<b>17</b>
<b>2. INTRODUCTION</b>	<b>17</b>
<b>3. PRINCIPLE OF THE TEST</b>	<b>17</b>
<b>4. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>18</b>
<b>5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>19</b>
<b>6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS</b>	<b>19</b>
<b>7. PRECAUTIONS</b>	<b>20</b>
<b>8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION</b>	<b>20</b>
<b>9. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>20</b>
Procedural notes	20
Sample and standard preparation	21
Chromatographic conditions	22
<b>10. TREATMENT OF THE COLUMN</b>	<b>22</b>
<b>11. RESULTS</b>	<b>22</b>
Calculation	22
Typical chromatogram	23
<b>12. LIMITATIONS</b>	<b>23</b>
<b>13. QUALITY CONTROL</b>	<b>23</b>
Expected values	23
Controls	23
<b>14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>24</b>
Precision and reproducibility	24
Linearity	24
Detection limit	24
<b>15. DISPOSAL</b>	<b>24</b>
<b>16. TROUBLESHOOTING</b>	<b>24</b>
<b>17. REFERENCES</b>	<b>25</b>
<b>18. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>26</b>

## 1. INTENDED USE

The Immundiagnostik Assay is intended for the quantitative determination of Vitamin K<sub>1</sub> in plasma and serum. This Assay is designed for in vitro diagnostic use only.

## 2. INTRODUCTION

Vitamin K<sub>1</sub> is a derivative of 2-methyl-1,4-naphthochinone and is found in green plants. Vitamin K<sub>1</sub> is insoluble in water and readily soluble in ether, n-hexane and chloroform.

It's an essential co-factor in the posttranslational carboxylation reaction of glutamic acid residues (GLU) to  $\gamma$ -carboxyglutamic acid residues (GLA) in a number of blood clotting factors and also in some other proteins e.g. osteocalcin. The adjacent carboxyl groups of the GLA-residues provide the Vitamin K dependent proteins with characteristic calcium- and phospholipid-binding properties that are essential for their activation and function. A decrease in Vitamin K<sub>1</sub> is reported in osteoporotic patients. Other clinical symptoms of Vitamin K<sub>1</sub> deficiency are clotting disorders, which manifest themselves as bleeding in the skin, in the mucous membranes, in muscles and in internal organs. Symptoms of deficiencies normally appear within few days. Vitamin K<sub>1</sub> is rapidly metabolized and only minor amounts are stored in the organism.

### Applications:

- Determination of Vitamin K<sub>1</sub> status
- Vitamin K deficiency induced by:
  - obstructive liver disease
  - obstructive icterus
  - malabsorption due to celiac disease,
  - pancreatitis, diarrhea, antibiotic abuse
- Blood clotting disorder
- Bone metabolism disorders
- Haemorrhagic disorders of newborns

## 3. PRINCIPLE OF THE TEST

The newly developed Vitamin K HPLC-application is the first commercially available kit. After a solid phase extraction on SPE-cartridges, serum or plasma samples are precipitated. The supernatant is then extracted with an organic solvent and evaporated. After resuspension the sample is measured in an isocratic HPLC-system. A post-column reduction reactor reduces Vitamin K and enables the measurement of Vitamin K with a fluorescence detector. An internal standard is added before the solid phase extraction step to ensure the high quality of the measurement.

**Summary:**

The application of Vitamin K<sub>1</sub> for HPLC makes it possible to determine the Vitamin in an easy, fast and precise way. The kits includes all reagents in ready to use form for preparation and separation of the samples with exception of the columns. As with many other parameters the advantage of HPLC measurements are the simultaneous handling of many analytes in a single test. The „complete HPLC-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 runs the one-point calibration is much more economic than 6-point calibration for immuno assays).

**4. MATERIAL SUPPLIED**

Catalogue No	Content	Kit Components	Quantity
KC2400LM	MOPHA	Mobile phase	3 x 1000 ml
KC2400KA	CAL	Calibrator, lyophilized	8 vials
KC2400IL	STD	Isopropanolic standard	10 ml
KC2400IS	INT STD	Internal Standard	1 ml
KC2400FR	PREC	Precipitating reagent	200 ml
KC2400EX	EXTSOL	Extraction solution	400 ml
KC2400ZI	ZINC	<b>Zinc (Important: store under argon)</b>	20 g
KC2400ZN	ZUB	Accessories for post-column reduction-reactor	5 pieces
KC2400KO	CTRL 1 CTRL 2	Control 1 and 2; 1.1 ml lyophilized	2 x 3 vials

The starter-kit contains also a post-column reduction-reactor (empty). HPLC column (KC2400RP), SPE cartridges (KC2400CK) 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

- Glass tubes for centrifugation, V-bottom (10 ml)
- SPE cartridges, C18 (KC 2400ck)
- MERCK-Catridge Holder Manu-Kart (ordering no. KC2400RK)
- Evaporator
- Centrifuge
- Various pipettes
- HPLC with Fluorescence-detector
- Reversed phase C18-column – Superspher RP 18,4 µm, 125 x 4,6 mm
- Vortex mixer

## 6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

### Preparation of the calibrator and controls

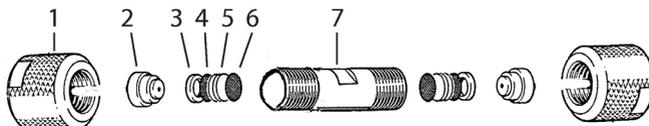
- Reconstitute **CAL** (calibrator) in aqua bidest. The volume is given on the label. One vial is for a single use only; discard the material, which have not been used. The content of Vitamin K<sub>1</sub> might have minor changes from lot to lot.
- Reconstitute **CTRL 1** and **CTRL 2** (control 1 and 2) in 1.1 ml aqua bidest.
- All other test reagents are stable at 2-8 °C, up to the date of expiry stated on the label.

### Preparation of the post-column reduction reactor

For getting well detectable peaks it is necessary to exchange the zinc particles in the post-column reduction reactor each day. The zinc particles are used up after 12 h by oxidation. Filling the column is very easy and takes just 10 min of time.

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:



## 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 supplied reagents contain different dangerous chemical reagents like methanol (mobile phase), ethanol (precipitating reagent), n-hexan (extraction solution), isopropanol and acid (mobile phase). Although diluted, it still must be handled with care and should only be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. 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

Plasma and serum can both be used for analysis. The samples must be cooled immediately.

The samples are stable 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.

## Sample and standard preparation

1. The <b>cartridge</b> is rinsed with 3 ml methanol and 3 ml aqua bidist.
2. Add <b>10 µl INT STD</b> (internal standard) to <b>1 ml patient sample</b> , <b>CAL</b> (calibrator) or <b>CTRL 1</b> and <b>CTRL 2</b> (control 1 and 2) and pipette the mixture on the SPE cartridge. Let it soak through by vacuum.
3. <b>Collect the break-through</b> in a glass vial.
4. Add <b>2 ml PREC</b> (precipitation reagent), <b>vortex</b> for 1 min and <b>centrifuge</b> for 10 min at 3.500 x g.
5. Pipette the <b>supernatant</b> in a fresh glass vial and add <b>4 ml of EXTSOL</b> (extraction solution).
6. <b>Vortex</b> for 2 min and <b>centrifuge</b> for 5 min at 3.500 x g.
7. Pipette the <b>upper phase</b> in a new glass vial and evaporate to dryness.
8. <b>The dried sample is stable for 8 days at 4-8°C</b>
9. Connect the <b>post-column reduction reactor</b> in the HPLC-system, as described above and wait for equilibration (30-45 min).
10. Check the performance of the reactor by the injection of <b>100 µl of STD</b> (isopropanolic standard) and determine the <b>signal to noise ratio</b> , which should be <b>greater than 25</b> .
11. Resuspend the dried sample in <b>150 µl MOPHA</b> (mobile phase) and <b>inject 100 µl</b> in the HPLC-system.

## Chromatographic conditions

For determination of the retention time, inject **100 µl** of the **STD** (isopropanolic standard) in the HPLC-system.

Column material :	Superspher 100 RP 18; 4 µm
Column dimension:	125 mm x 4.6 mm
Flow rate:	0.9 - 1.2 ml/min
Fluorescence detector:	ex.: 248 nm em.: 418 nm
Temperature:	30°C
Running time:	approx. 20 min

Immundiagnostik recommends to use a guard-column to enlarge lifetime of the column.

## 10. TREATMENT OF THE COLUMN

After analysis the column should be flushed with 30 ml aqua bidest (1,0 ml/min) and stored in 50% methanol in aqua bidest (approx. 30 ml, flow 0.5 ml/min). Before use, the system should be equilibrated with ca. 50 ml MOPHA (mobile phase).

**Important: Do not re-circulate the MOPHA (mobile phase) in this test system.**

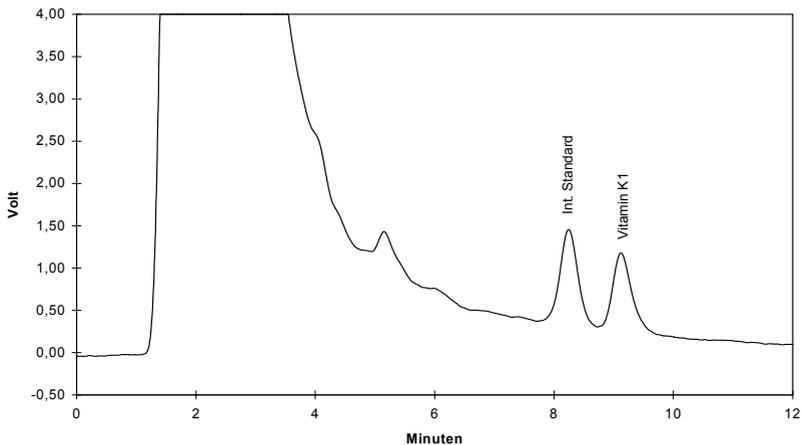
## 11. RESULTS

### 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

We recommend not to measure hemolytic and lipaemic patient samples.

## 13. QUALITY CONTROL

Reference value

**0.22 - 2.28 ng/ml (Mean value = 1.29 ng/ml) (n = 19)**

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

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:** 4.5 % (1.7 ng/ml) [n = 6]

**Inter-Assay CV:** 5.6 % (1.7 ng/ml) [n = 6]

Linearity

up to 25 ng/ml

Detection limit

0.15 ng/ml

## 15. DISPOSAL

**MOPHA** (mobile phase), **STD** (isopropanolic standard), **INTSTD** (internal standard), **EXTSOL** (extraction solution) and **PREC** (precipitating reagent) must be disposed as non-halogenated solvent. Please refer to the appropriate national guidelines.

## 16. TROUBLESHOOTING

Problem	Possible reasons	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

Problem	Possible reasons	Solution
	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 flow cell is dirty	Clean flow cell

## 17. REFERENCES

- Saupé J. (1992). Vitamin K und Indikationen zur Bestimmung im Plasma. Klin. Lab. 38: 51-54
- 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 woman. J Bone Miner Res 9:1591-95
- 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
- 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.

## 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.

### Used Symbols:

	Store at		Catalog Number
	In Vitro Diagnostic Device		No. of tests
	Manufacturer		Use by
	Lot number		





**Immundiagnostik AG**

Stubenwald-Allee 8a  
D-64625 Bensheim

Tel.: +49(0) 62 51/70 19 00

Fax: +49(0) 62 51/84 94 30

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

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