

Adenosin

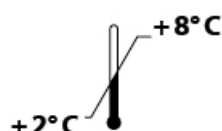
Zur Bestimmung von Adenosin in Urin

For the determination of adenosine in urine

Gültig ab / Valid from 06.05.2008



KC 8000



CAL
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
www.immundiagnostik.com

Inhaltsverzeichnis/Table of contents

	Seite/Page
1. VERWENDUNGSZWECK	3
2. EINLEITUNG	3
3. TESTPRINZIP	4
4. INHALT DER TESTPACKUNG	5
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL:	5
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	6
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	9
BERECHNUNG	9
MUSTERCHROMATOGRAMM	9
12. EINSCHRÄNKUNGEN	9
13. QUALITÄTSKONTROLLE	10
NORMBEREICH	10
KONTROLLEN	10
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. INTENDED USE	14
2. INTRODUCTION	14
3. PRINCIPLE OF THE TEST	15
4. MATERIAL SUPPLIED	16
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	16
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	17
7. PRECAUTIONS	17
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	17
9. ASSAY PROCEDURE	17
PROCEDURAL NOTES	17
ASSAY PROCEDURE	18
CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS	19
10. TREATMENT OF THE COLUMN	19
11. RESULTS	20
CALCULATION	20
TYPICAL CHROMATOGRAM	20
12. LIMITATIONS	20
13. QUALITY CONTROL	21
EXPECTED VALUES	21
CONTROLS	21
14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	21
PRECISION AND REPRODUCIBILITY	21
LINEARITY	21
DETECTION LIMIT	21
15. DISPOSAL	21
16. TROUBLESHOOTING	22
17. REFERENCES	23
18. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	24

1. VERWENDUNGSZWECK

Der HPLC-Kit ist für die Bestimmung von Adenosin aus Urin geeignet. Nur zur *in vitro* Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Adenosin ist ein ubiquitäres, biologisch wichtiges Nucleosid und Vorläufer anderer ähnlicher biologisch aktiver Moleküle. Adenosin ist Bestandteil verschiedener Kofaktoren, kann jedoch auch selbst biologisch aktiv sein: Es spielt eine wichtige Rolle im zentralen Nervensystem, im kardiovaskulären System, in der Skelettmuskulatur und im Immunsystem.

Zu den wichtigen eigenständigen intrazellulären Wirkungen von Adenosin gehört die Hemmung des Enzyms Phosphodiesterase. Extrazelluläres Adenosin zeigt eine spezifische neuromodulatorische Wirkung auf Dopamin und Glutamat.

Adenosin wirkt entweder als Hormon indem es an spezifische Rezeptoren auf der Zellmembran bindet oder als intrazellulärer Modulator nach dem Transport in die Zelle mit Hilfe von Membrantransportproteinen. Vier Adenosin-Rezeptor-Subtypen sind beschrieben. Besonders häufig treten Adenosin-Rezeptoren im Gehirn und im kardiovaskulären System auf. Sie kommen aber auch in den meisten anderen Geweben vor, z. B. in Respirationsapparat, Darm, Niere, Muskulatur, Hypophyse, Uterus und Gonaden. Durch Aktivierung der spezifischen Zelloberflächenrezeptoren induziert Adenosin eine Reihe physiologischer Effekte. Des Weiteren fungiert Adenosin als endogener Regulator von Immun- und Entzündungsvorgängen.

Adenosin zeigt vielfältige Wirkungen auf das Herz und die Blutgefäße und ist an der Regulation der Nierenfunktion beteiligt. Es spielt eine wichtige Rolle für den Schutz der Körpergewebe, besonders im Zustand einer Hypoxie oder Ischämie, Exzitotoxizität, einer durch andere Substanzen induzierten Toxizität und Trauma. Aufgrund seiner wichtigen elektrophysiologischen Eigenschaft, die Reizleitung zwischen Vorhof und atrioventrikulären Knoten zu verlangsamen, wird Adenosin auch als ein effektives und sicheres Medikament für die Behandlung paroxysmaler Tachykardien bei Erwachsenen und Kindern verwendet.

Die Messung von Adenosin im Urin kann zur Evaluierung von Nierenschäden, metabolischen Erkrankungen und schwerer Lungeninsuffizienz eingesetzt werden, da es nachgewiesen ist, dass erhebliche pathophysiologische Zustände mit einem erhöhten Adenosin-Spiegel einhergehen.

Indikationen

- Evaluierung von Nierenschäden
- Metabolische Erkrankungen

3. TESTPRINZIP

Die HPLC-Trennung von Adenosin erfolgt durch Anlegen eines Gradienten aus Laufmittel A und B bei 30°C auf einer reversed-phase-Säule. Für einen Lauf werden ca. 35 Minuten benötigt. Die Aufnahme der Chromatogramme erfolgt mit einem UV-Detektor. Die Quantifizierung wird über den mitgelieferten Kalibrator und die Berechnung der Ergebnisse über die externe Standard-Methode anhand der Integration der Peakhöhen durchgeführt. Es sollte parallel eine Kreatinin-Bestimmung des Urins durchgeführt werden, um die Ergebnisse der HPLC-Messung zu normieren.

Zusammenfassung

Der hier vorliegende HPLC-Kit ermöglicht eine einfache, schnelle und präzise quantitative Bestimmung des Adenosins. Der Kit enthält gebrauchsfertige Reagenzien und Verbrauchsmaterialien für die analytische HPLC-Trennung. Die Trennsäule (KC8000RP), Vorsäulen (KC8000VS) sowie der für die Probenaufarbeitung erforderliche Adenosin-Extraktionskit (KC8100) zur Extraktion von Adenosin aus Urin können separat über die Firma Immunodiagnostik erworben werden. Das Extraktionskit enthält gebrauchsfertige Reagenzien und Verbrauchsmaterialien zur Aufarbeitung von 48 Urinproben (Extraktionsplatte, Extraktionspuffer, Elutionslösung). **Bitte beachten Sie:** um die Kapazität des Adenosin-HPLC-Kits von 96 Proben voll auszuschöpfen benötigen Sie **2 Extraktionskits**.

Dieser HPLC-Kit 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. Eine Automatisierung der Probenaufgabe und der Auswertung ist möglich, so dass auch größere Probenzahlen fast unbeaufsichtigt abgearbeitet werden können.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
KC8000LA	MOPHAA	Laufmittel A	4 x 1000 ml
KC8000LB	MOPHAB	Laufmittel B	1 x 1000 ml
KC8000ST	STAB	Stabilisierungsreagenz	1,5 ml
KC8000RE	RECSOL	Rekonstitutionslösung	20 ml
KC8000KA	CAL	Kalibrator (lyoph., 6 ml)	2 Flaschen
KC8000KO	CTRL 1 CTRL 2	Kontrolle 1 und 2 (lyoph., 600 µl, Konzentration, siehe Spezifikation)	2 x 3 Fläschchen

Die HPLC Trennsäule (KC8000RP), die Vorsäulen (KC8000VS) sowie der für die Probenaufarbeitung erforderliche Adenosin-Extraktionskit (KC8100) zur Extraktion von Adenosin aus Urin können separat bei Immundiagnostik bestellt werden. Ein Extraktionskit ist ausreichend für 48 Proben und beinhaltet eine Extraktionsplatte mit 48 Vertiefungen, Extraktionspuffer und Elutionslösung für 48 Proben. **Bitte beachten Sie:** Um die Kapazität des Adenosin-HPLC-Kits von 96 Proben voll auszuschöpfen benötigen Sie **2 Extraktionskits**. Neben den kompletten Kits können auch alle Komponenten einzeln bestellt werden. Bitte fordern Sie unsere Einzelkomponentenpreisliste an.

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL:

- Vortex Wirbelmischer
- 1,5 ml Reaktionsgefäße (z.B. Eppendorf)
- Diverse Pipetten
- Aqua bidest.
- Horizontalschüttler
- HPLC Gradientenanlage mit UV-Detektor
- Zentrifuge
- Reversed phase-Säule Nucleosil 100 C₁₈ 125 x 4 mm, 10 µm (KC8000RP)
- Vorsäulenkartuschen Nucleosil 100 C₁₈ 10 x 4 mm, 10 µm (KC8000VS)
- Adenosin-Extraktionskit (KC8100) zur Extraktion von Adenosin aus Urin

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Die Testreagenzien sind bei 2-8°C, der **Kalibrator** (CAL) und die **Kontrollen** (CTRL) bei -20°C bis zum Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.
- Der **Kalibrator** (CAL) wird mit **6 ml** der im Kit enthaltenen Rekonstitutionslösung (RECSOL) oder aqua bidest. resuspendiert. Der rekonstituierte Kalibrator ist bei -20°C bis zum Verfallsdatum (siehe Etikett) haltbar.
- Die **Kontrollen** (CTRL1, 2) werden mit je **600 µl** der im Kit enthaltenen Rekonstitutionslösung (RECSOL) oder aqua bidest. resuspendiert.
- **Kalibrator** (CAL) und **Kontrollen** (CTRL1, 2) enthalten bereits Stabilisierungsreagenz und bedürfen keiner weiteren Stabilisierung.
- Die übrigen Testreagenzien werden gebrauchsfertig in gelöster Form geliefert.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur zur *in vitro* Diagnostik
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

8. PROBENVORBEREITUNG

Als Probe eignet sich Morgenurin, der sofort nach Abgabe mit **Stabilisierungsreagenz** (STAB) versetzt wird. Hierfür werden zu **500 µl** Urin **10 µl STAB** (Stabilisierungsreagenz) pipettiert. Durch die Zugabe des Stabilisierungsreagenz kann es zu Präzipitationen kommen. Die Proben sollten vor dem Testansatz zentrifugiert werden (siehe Arbeitsschema) und der resultierende Überstand im Test eingesetzt werden. Die stabilisierte Probe ist bei -20°C mindestens 6 Monate stabil.

Nach dem Auftauen der Proben sollte schnellstmöglich die Analyse erfolgen.

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 AG übernimmt keine Haftung.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung abzuarbeiten.

Arbeitsschema

Die stabilisierten Proben, der **CAL** (Kalibrator) und die **CTRL 1, CTRL 2** (Kontrolle 1, Kontrolle 2) müssen vor Testeinsatz 10 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert werden und der resultierende Überstand im Test eingesetzt werden.

In jeweils ein well der Extraktionsplatte werden pipettiert:

450 µl Probe, CAL (Kalibrator) oder CTRL1, 2 (Kontrolle 1, 2)

+

50 µl EXBUF (Extraktionspuffer)

Extraktionsplatte mit einer Folie abkleben und **30 Minuten** auf einem Horizontalschüttler bei Raumtemperatur inkubieren.

Folie entfernen, Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste durch kräftiges Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage (Papierhandtuch) entfernen.

1 ml aqua bidest. in jedes well pipettieren, Extraktionsplatte mit Folie abkleben und **5 Minuten** auf dem Horizontalschüttler bei Raumtemperatur inkubieren.

Folie entfernen, Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste durch kräftiges Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage (Papierhandtuch) entfernen.

200 µl ELUSOL (Elutionslösung) in jedes well pipettieren, Extraktionsplatte mit Folie abkleben und **10 Minuten** auf dem Horizontalschüttler bei Raumtemperatur inkubieren.

Den **kompletten** Inhalt jedes wells in je ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettieren und **10 Minuten** bei **10000 rpm** zentrifugieren.

Der Überstand ist als Probe jetzt mindestens 24 **Stunden** bei 4 °C stabil.

100 µl in das HPLC-System injizieren.

Chromatographische Bedingungen

Säulenmaterial:	Nucleosil 100 C18, 10 µm	
Säulendimension:	125 mm x 4 mm	
Fluss :	1,0 ml/min	
UV-Detektion:	254 nm	
Temperatur:	30 °C	
Injektionsvolumen:	100 µl	
Laufzeit pro Chromatogramm:	35 Minuten	
Gradient:	0 min	(100 % A / 0 % B)
	12 min	(100 % A / 0 % B)
	24 min	(60 % A / 40 % B)
	26 min	(0 % A / 100 % B)
	28 min	(0 % A / 100 % B)
	29 min	(100 % A / 0 % B)
	35 min	(100 % A / 0 % B)

Wir empfehlen dringend 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 85% Acetonitril / 15% Wasser gelagert (ca. 30 ml, Fluss 1,0 ml/min).

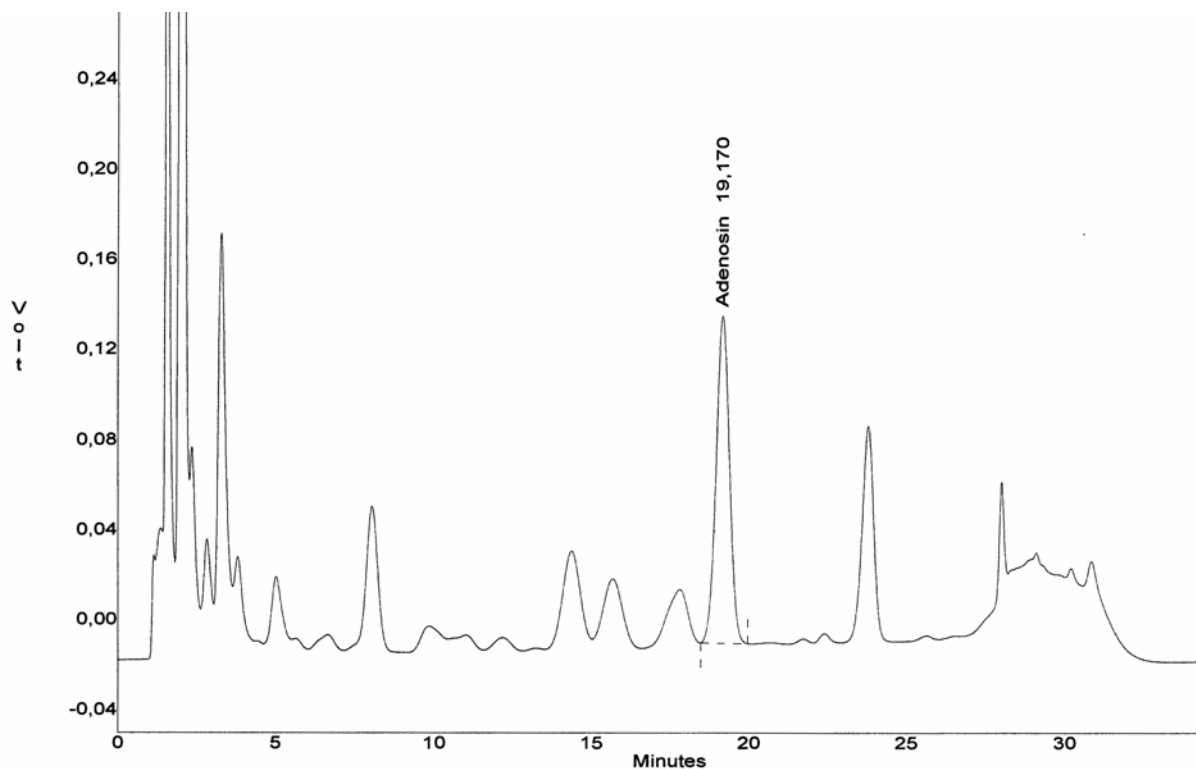
Zur Wiederinbetriebnahme wird das ganze System mit ca. **30 ml** Laufmittel A (MOPHAA) äquilibriert.

11. AUSWERTUNG

Berechnung

$$\text{Konzentration Probe} = \frac{\text{Peakhöhe Probe} \times \text{Konzentration des Kalibrators}}{\text{Peakhöhe Kalibrator}}$$

Musterchromatogramm



Die Ergebnisse der HPLC-Auswertung sollten anhand der Kreatinin-Konzentration des Urins normiert werden.

$$\text{Konzentration}_{\text{Probe}} [\mu\text{M}/\text{mM Kreatinin}] = \frac{\text{Adenosin-Konzentration}_{\text{Probe}} [\mu\text{M}]}{\text{Kreatinin-Konzentration}_{\text{Probe}} [\text{mM}]}$$

12. EINSCHRÄNKUNGEN

Blutproben können nicht bestimmt werden.

13. QUALITÄTSKONTROLLE

Normbereich

Bereich in Urin	0,78 – 6,84 μM (Mittelwert: 2,51 μM)
Bereich bezogen auf Kreatinin	0,07 – 0,63 $\mu\text{M}/\text{mM}$ Kreatinin (Mittelwert: 0,26 $\mu\text{M}/\text{mM}$ Kreatinin)

Wir empfehlen jedem Labor seinen eigenen Normalwerte-Bereich zu erstellen, 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: 4,7 % [n = 6]

Inter-Assay VK: 12,8 % [n = 6]

Linearität

bis 1000 μM

Nachweisgrenze

0,42 μM

15. ENTSORGUNG

Die Laufmittel (MOPHAA und MOPHAB) 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
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

Problemstellung	Mögliche Ursache	Behebung
Unruhige Basislinie	Pumpe fördert ungenau	Pumpe überprüfen, entlüften
	Detektorzelle verschmutzt	Detektorzelle reinigen

17. LITERATUR

1. Baggott JE, Morgan SL, Sams WM, Linden J. (1999) Urinary adenosine and aminoimidazolecarboxamide excretion in methotrexate-treated patients with psoriasis. *Arch Dermatol.* Jul;**135(7)**:813-7
2. Berne RM. (1980) The role of adenosine in the regulation of coronary blood flow. *Circ Res.* **68**:807-13
3. Deussen A, Flesche CW, Lauer T, Sonntag M, Schrader J. (1996) Spatial heterogeneity of blood flow in dog heart. II. Temporal stability in response to adrenergic stimulation. *Pfluegers Arch.* **432**:451-61
4. Engler RL (1991) Adenosine. The signal of life? *Circulation* **84**:951-954
5. Heyne N, Benöhr P, Mühlbauer B, Delabar U, Risler T, Osswald H. (2004) Regulation of renal adenosine excretion in humans--role of sodium and fluid homeostasis. *Nephrol Dial Transplant.* Nov;**19(11)**:2737-41
6. Katholi RE, Taylor GJ, McCann WP, Woods WT Jr, Womack KA, McCoy CD, Katholi CR, Moses HW, Mishkel GJ, Lucore CL, et al. (1995) Nephrotoxicity from contrast media: attenuation with theophylline. *Radiology*, Apr;**195(1)**:17-22
7. Müller CE, Scior T. (1993) Adenosine receptors and their modulators. Review. *Pharma Acta Helv.* **68**:77-111
8. Osswald H. (1984) The role of adenosine in the regulation of glomerular filtration rate and renin secretion. *Trends Pharmacol Sci.* **5**:94-7
9. Taniai H, Sumi S, Ito T, Ueta A, Ohkubo Y, Togari H. (2006) A simple quantitative assay for urinary adenosine using column-switching high-performance liquid chromatography. *Tohoku J Exp Med.* Jan;**208(1)**:57-63

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.

Verwendete Symbole:

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Hersteller		Verwendbar bis
	Chargenbezeichnung		Nur für Forschungszwecke

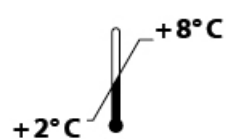
Adenosin

For the determination of adenosine in urine

Valid from 06.05.2008



KC 8000



CAL
CTRL 1
CTRL 2



1. INTENDED USE

The present HPLC kit is designed for quantitative determination of adenosine in urine. It is for *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Adenosine is a ubiquitous, biologically important nucleoside which is a precursor of other biologically active molecules as well as a component of some co-factors. Moreover, it also has its own distinct physiological functions in the central nervous system, the cardiovascular system, the skeletal muscle and the immune system.

One of the principal intracellular actions of adenosine is inhibition of the enzyme phosphodiesterase. Extracellular adenosine has specific neuro-modulatory actions on dopamine and glutamate.

Adenosine can act either as a hormone by binding to adenosine receptors or as an intracellular modulator after its translocation into the cell by membrane transport proteins. Four adenosine receptor subtypes have been identified. Notably, adenosine receptors are most widely expressed in the brain and the cardiovascular system, but they also are found in the most of the other tissues: respiratory tract, intestine, kidney, skeletal muscle, pituitary gland, uterus and gonads. Adenosine modulates several physiological effects by stimulating specific cell surface receptors. In addition, adenosine acts as an endogenous regulator of immune and inflammatory processes.

Adenosine exerts multifaceted effects on the heart and blood vessels and is involved in the regulation of the renal function. It works as a universal protective agent against hypoxia, ischemia, excitotoxicity, toxicities induced by other substances and trauma. It is also an effective and safe therapeutic medicine for paroxysmal tachycardias in adult and pediatric patients, with basic electrophysiologic properties of slowing conduction in atrioventricular nodes.

The measurement of urinary adenosine can contribute to evaluation of renal injury, metabolic disease or severe respiratory failure, as it was found that unfavorable pathophysiologic conditions are associated with appreciable elevation of adenosine.

Indications

- Evaluation of renal injury
- Metabolic diseases

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The HPLC separation of adenosine is performed on a reversed phase column by the application of a gradient formed from solvent A and solvent B at 30°C. The duration of one run is about 35 minutes. The chromatograms are recorded by a UV-detector. The quantification is based on integration of the peak heights of the sample and the provided calibrator as an external standard. Parallel measurements of the urinary creatinine concentration are required to normalize the HPLC-adenosine results.

Summary

The application of HPLC for adenosine analysis allows its quantification in an easy, fast, and precise way. Beside the column, the kit contains all reagents necessary for sample preparation and HPLC separation in ready-to-use form.

The analytical column (KC8000RP), pre-column (KC8000VS) as well as the adenosine extraction kit (KC8100) necessary for adenosine extraction from urine can be ordered separately from Immundiagnostik. The extraction kit contains ready-to-use reagents and consumables for sample preparation of 48 urine samples (extraction plate, extraction buffer, elution solution). **Note:** to use the complete capacity of the adenosine HPLC kit, which is designed for 96 samples, **2 extraction kits are needed.**

The present HPLC kit enables even laboratories without experience in high performance liquid chromatography to use this technique for clinical routine determination in a quick and precise manner. In addition, mostly one-point is sufficient to calibrate the test system. 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.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Content	Kit Components	Quantity
KC8000LA	MOPHAA	Mobile phase A	4 x 1000 ml
KC8000LB	MOPHAB	Mobile phase B	1 x 1000 ml
KC8000ST	STAB	Stabilizing reagent	1.5 ml
KC8000RE	RECSOL	Reconstitution solution	20 ml
KC8000KA	CAL	Calibrator (6 ml; lyophilized)	2 vials
KC8000KO	CTRL 1 CTRL 2	Control 1 and 2 (lyophilized, 600 µl; concentration, see product data sheet)	2 x 3 vials

The analytical column (KC8000RP), pre-column (KC8000VS) as well as the adenosine extraction kit (KC8100) necessary for adenosine extraction from urine can be ordered separately from Immundiagnostik. The extraction kit contains ready-to-use reagents and consumables for sample preparation of 48 urine samples (extraction plate, extraction buffer, elution solution). **Note:** to use the complete capacity of the adenosine HPLC kit, which is designed for 96 samples, **2 extraction kits are needed**.

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Vortex- mixer
- 1.5 ml centrifugation tubes (e.g. Eppendorf)
- Various pipettes
- Aqua bidist.
- Horizontal Shaker
- HPLC gradient pump system with UV-detector
- Centrifuge
- Reversed phase column Nucleosil 100 C₁₈ 125 x 4 mm, 10 µm (KC8000RP)
- Pre-column cartridges Nucleosil 100 C₁₈ 10 x 4 mm ,10 µm (KC8000VS)
- Adenosine extraction kit (KC8100) for adenosine extraction from urine

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- All reagents are stable at 2-8 °C, **calibrator** (CAL) and **controls** (CTRL1, CTRL2) at -20 °C up to the date of expiry (see label of the test package).
- Reconstitute the **calibrator** (CAL) with **6 ml** of the reconstitution solution (RECOSOL) from the kit or with aqua bidist. The reconstituted standard solution is stable at -20 °C up to the date of expiry (see label of the test package).
- Reconstitute the **controls** (CTRL1, CTRL2) with **600 µl** of the reconstitution solution (RECOSOL) from the kit or with aqua bidist.
- The **calibrator** (CAL) and the **controls** (CTRL1, CTRL2) contain already stabilizing reagent and do not need any further stabilization.
- All other reagents are provided in ready-to-use form.

7. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on kit label.

8. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Morning urine is suited for this test. Immediately after urine collection, **10 µl STAB** (stabilizing reagent) should be added to **500 µl** of urine sample. The addition of the stabilizing reagent can cause precipitation. The samples should be centrifuged before analysis (see Assay procedure). The resulting supernatant is used in the test. The stabilized samples are stable for at least 6 months at -20°C.

The analysis should be performed immediately after the samples have been defrosted.

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- 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 wrong use.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

Assay procedure

The stabilized samples, the **CAL** (calibrator) and the **CTRL 1, 2** (controls 1, 2) should be centrifuged for 10 minutes at 10000 rpm before analysis. The resulting supernatants are used in the test.

Add in each well of the extraction plate:

450 µl of sample, **CAL** (calibrator) or **CTRL 1, 2** (controls 1, 2)

+

50 µl EXBUF (extraction buffer)

Cover the extraction plate with a foil and incubate for **30 minutes** on a horizontal shaker at room temperature.

Remove the foil, aspirate the contents of the wells and tap the microtiter plate on absorbent paper towels to remove any residual solvent.

Add **1 ml** of aqua bidist. in each well of the extraction plate. Cover the extraction plate with a foil and incubate for **5 minutes** on a horizontal shaker at room temperature.

Remove the foil, aspirate the contents of the wells and tap the microtiter plate on absorbent paper towels to remove any residual solvent.

Add **200 µl** of ELUSOL (elution solution) in each well of the extraction plate. Cover the extraction plate with a foil and incubate for **10 minutes** on a horizontal shaker at room temperature.

Remove the foil, transfer the **complete content** of each well in a separate 1,5 ml centrifugation tube and centrifuge for **10 minutes** at **10000 rpm**.

The resulting supernatant is stable for at least **24 hours at 4 °C**.

Inject **100µl** of the supernatant into the HPLC.

Chromatographic conditions

Column material:	Nucleosil 100 C18, 10 µm	
Column dimension:	125 x 4 mm	
Flow rate:	1.0 ml/min	
UV-Detection:	254 nm	
Temperature:	30 °C	
Injection volume:	100 µl	
Running time/sample:	35 min	
Gradient:	0 min	(100 % A / 0 % B)
	12 min	(100 % A / 0 % B)
	24 min	(60 % A / 40 % B)
	26 min	(0 % A / 100 % B)
	28 min	(0 % A / 100 % B)
	29 min	(100 % A / 0 % B)
	35 min	(100 % A / 0 % B)

We recommend strongly the use of a pre-column to prolong the life of the analytical column.

10. TREATMENT OF THE COLUMN

After each run, the column should be washed with ca. **50 ml** of aqua bidist. at a flow rate of 1 ml/min. Afterwards, the column is stored in 85% Acetonitril / 15% aqua bidist. (ca. 30 ml, flow rate 1.0 ml/min).

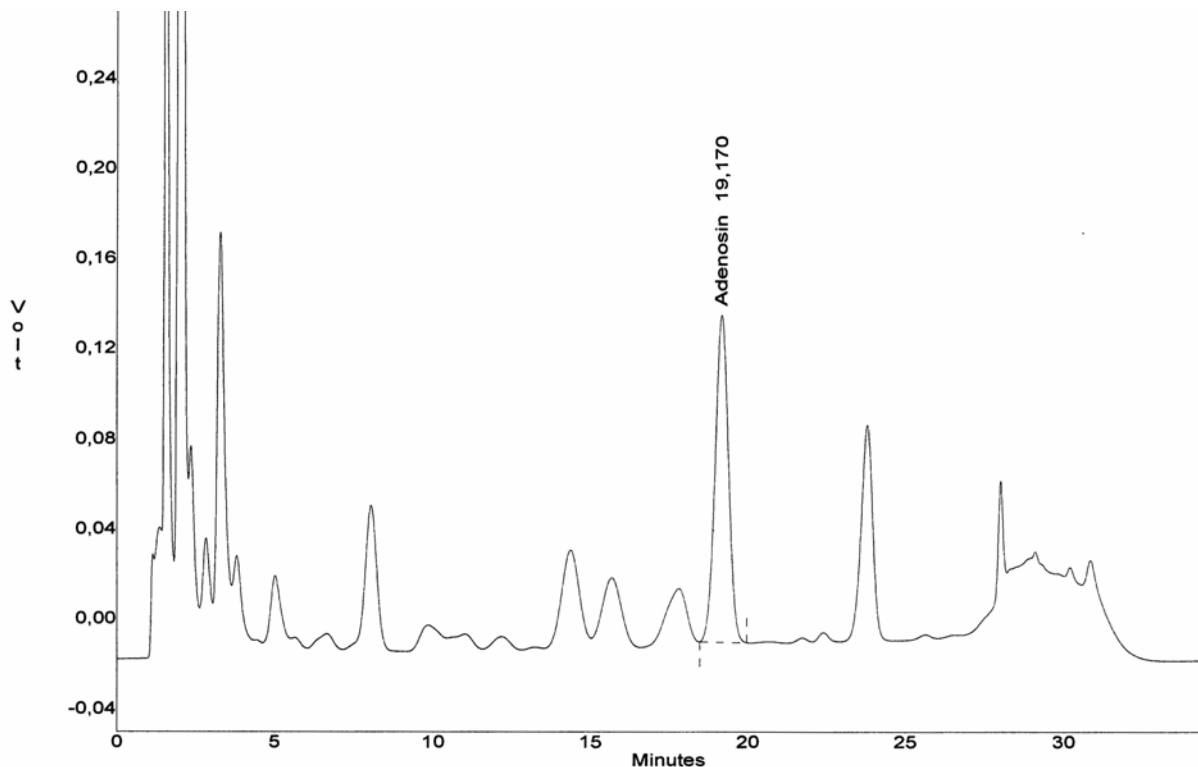
Before use, the system should be equilibrated with ca. **30 ml** mobile phase A (MOPHA).

11. RESULTS

Calculation

$$\text{Concentration sample} = \frac{\text{Peak height sample} \times \text{Concentration of the calibrator}}{\text{Peak height calibrator}}$$

Typical chromatogram



The HPLC-adenosine results are normalized to the creatinine concentration in the urine.

$$\text{Concentration}_{\text{Sample}} [\mu\text{M}/\text{mM Creatinine}] = \frac{\text{Adenosine Concentration}_{\text{Sample}} [\mu\text{M}]}{\text{Creatinine Concentration}_{\text{Sample}} [\text{mM}]}$$

12. LIMITATIONS

Blood is not suited for this test system and should not be used.

13. QUALITY CONTROL

Expected values

Normal range in urine	0.78 – 6.84 μM (average value: 2.51 μM)
Adenosine-to-creatinine ratio	0.07 – 0.63 $\mu\text{M}/\text{mM}$ creatinine (average value: 0.26 $\mu\text{M}/\text{mM}$ creatinine)

It is recommended that each laboratory should establish its own normal range. Above mentioned values are only for orientation and may vary from other published data.

Controls

Controls should be analyzed with each run of calibrators and patient samples. 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 samples are outside the acceptable limits.

14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay CV: 4.7 % [n = 6]

Inter-Assay CV: 12.8 % [n = 6]

Linearity

Up to 1000 μM

Detection limit

0.42 μM

15. DISPOSAL

The mobile phases (MOPHA and MOPHB) can be disposed as halogen free spent solvents.

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. Baggott JE, Morgan SL, Sams WM, Linden J. (1999) Urinary adenosine and aminoimidazolecarboxamide excretion in methotrexate-treated patients with psoriasis. *Arch Dermatol.* Jul;**135(7)**:813-7
2. Berne RM. (1980) The role of adenosine in the regulation of coronary blood flow. *Circ Res.* **68**:807-13
3. Deussen A, Flesche CW, Lauer T, Sonntag M, Schrader J. (1996) Spatial heterogeneity of blood flow in dog heart. II. Temporal stability in response to adrenergic stimulation. *Pfluegers Arch.* **432**:451-61
4. Engler RL (1991) Adenosine. The signal of life? *Circulation* **84**:951-954
5. Heyne N, Benöhr P, Mühlbauer B, Delabar U, Risler T, Osswald H. (2004) Regulation of renal adenosine excretion in humans--role of sodium and fluid homeostasis. *Nephrol Dial Transplant.* Nov;**19(11)**:2737-41
6. Katholi RE, Taylor GJ, McCann WP, Woods WT Jr, Womack KA, McCoy CD, Katholi CR, Moses HW, Mishkel GJ, Lucore CL, et al. (1995) Nephrotoxicity from contrast media: attenuation with theophylline. *Radiology*, Apr;**195(1)**:17-22
7. Müller CE, Scior T. (1993) Adenosine receptors and their modulators. Review. *Pharma Acta Helv.* **68**:77-111
8. Osswald H. (1984) The role of adenosine in the regulation of glomerular filtration rate and renin secretion. *Trends Pharmacol Sci.* **5**:94-7
9. Taniai H, Sumi S, Ito T, Ueta A, Ohkubo Y, Togari H. (2006) A simple quantitative assay for urinary adenosine using column-switching high-performance liquid chromatography. *Tohoku J Exp Med.* Jan;**208(1)**:57-63

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 must be avoided.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C and Australia antigen. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Reagents of the test package contain sodium azide as a bactericide. Contact with skin or mucous membranes must be avoided.
- All reagents in the test package are for *in-vitro* diagnostics 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.
- 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 wrong use.

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number



For research use only