

Coenzym Q₁₀

HPLC

*Zur Bestimmung von Coenzym Q₁₀ (Ubichinon) aus
EDTA-Vollblut, Serum und EDTA-Plasma*

*For the determination of Coenzyme Q₁₀ (Ubiquinone) in
EDTA-blood, serum and EDTA-plasma*

Gültig ab/valid from 02.01.2004

Artikelnummer/Catalogue no.: KC 1700

Packungsgröße/Package size: 100 Tests/100 determinations

Lagerung/Storage: 2-8 °C, Kalibrator u. interner Standard bei -20 °C
2-8 °C, calibrator and internal standard at -20 °C



Immundiagnostik AG , Wiesenstr. 4, D 64625 Bensheim

Tel.: ++49 6251 701900

Fax: ++ 49 6251 849430

e.mail: Immundiagnostik@t-online.de

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	7
HINWEISE	7
CHROMATOGRAPHISCHE BEDINGUNGEN	8
10. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE	8
11. AUSWERTUNG	8
BERECHNUNG	8
MUSTERCHROMATOGRAMM	9
12. EINSCHRÄNKUNGEN	9
13. QUALITÄTSKONTROLLE	9
NORMBEREICH	9
KONTROLLEN	10
14. TESTCHARAKTERISTIKA	10
PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT	10
LINEARITÄT	10
NACHWEISGRENZE	10
15. ENTSORGUNG	10
16. MAßNAHMEN BEI STÖRUNGEN	11
17. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	13

1. INTENDED USE	15
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	15
3. PRINCIPLE OF THE TEST	16
4. MATERIAL SUPPLIED	17
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	17
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	18
7. PRECAUTIONS	18
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	18
9. ASSAY PROCEDURE	19
PROCEDURAL NOTES	19
SAMPLE AND STANDARD PREPARATION	19
CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS	20
10. TREATMENT OF THE COLUMN	20
11. RESULTS	20
CALCULATION	20
TYPICAL CHROMATOGRAM	21
12. LIMITATIONS	21
13. QUALITY CONTROL	21
EXPECTED VALUES	21
CONTROLS	22
14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	22
PRECISION AND REPRODUCIBILITY	22
LINEARITY	22
DETECTION LIMIT	22
15. DISPOSAL	22
16. TROUBLESHOOTING	23
17. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	24

1. VERWENDUNGSZWECK

Die HPLC-Applikation ist für die Bestimmung von Coenzym Q10 (Ubichinon) aus EDTA-Vollblut, Serum und EDTA-Plasma geeignet. Nur zur in vitro Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Coenzym Q10 (Ubichinon) wurde erstmalig in den 50er Jahren von der Arbeitsgruppe um Prof. Green (Wisconsin) isoliert. Die Funktion untersuchte Prof. Mitchel, der für seine Arbeiten zur Aufklärung der oxidativen Phosphorylierung 1978 den Nobelpreis erhielt.

Ubichinon ist, wie der Name schon sagt ein ubiquitär (im gesamten Stoffwechsel) vorkommendes Coenzym. Ubichinone haben einen Chinonring und eine Isoprenseitenkette. Bei Coenzym Q10 besteht diese Seitenkette aus 10 Isopreneinheiten. Der Mensch kann Ubichinon mit der Nahrung aufnehmen, aber auch selbst synthetisieren.

Coenzym Q10 hat zunächst zwei generelle physiologische Wirkungskreise, die einerseits aus der bioenergetischen Funktion im Stoffwechsel und andererseits aus der hohen Anzahl der konjugierten Doppelbindungen resultierten:

- 1) Energiestoffwechsel-Komponente
- 2) Radikalfänger

Im Energiestoffwechsel werden während der Atmungskettenphosphorylierung bei der Reduktion von Sauerstoff 3 Mol ATP gebildet. Dieser Reduktionsvorgang verbunden mit Elektronentransfer von NADPH zum Sauerstoff läuft über 6 verschiedene Redox-Systeme ab. Q10 ist in den Mitochondrienmembranen das gering konzentrierteste und damit geschwindigkeitsbestimmende Redox-System. Es übt daher eine Kontrollfunktion im Energiestoffwechsel aus und hat im Falle einer Unterversorgung Einfluss auf das gesamte Geschehen. Mit der üblichen Nahrung ist der Bedarf an diesem Coenzym gedeckt und der menschliche Organismus ist in der Lage, Coenzym Q 10 selber bereitzustellen. Jedoch im ansteigenden Alter, sowie unter Sonnenbestrahlung nimmt der Gehalt an Coenzym Q10 um bis zu 50% ab.

Ubichinone haben eine hohe Anzahl von Doppelbindungen und damit ein deutlich höheres Reduktionspotential als Vitamin C oder Vitamin E. Sie werden demnach bei einem radikalischen Angriff zuerst verbraucht und stellen somit einen Schutz für besonders empfindliche Systeme dar. Q10 reagiert sehr schnell und sensibel auf freie Radikale, auch wenn andere Schutzsysteme wie z. B. Vitamin E sich noch inert verhalten. Q10 wird

dadurch zu einem optimalen Membranstabilisator, der die Ionenkanäle stabilisiert und den optimalen Stoffwechsel aufrecht erhält.

Indikationen

- Überwachung des Coenzym Q10 Status
- Kardiovaskuläre Erkrankungen
- Karzinogenese
- Alterungsprozesse
- Ermüdungssyndrome

3. TESTPRINZIP

Zur Bestimmung des Coenzym Q10 wird im ersten Schritt eine Probenvorbereitung durchgeführt. Zunächst wird dem Kalibrator, den Kontrollen und den Proben der interne Standard zugegeben. Gleichzeitig werden in diesem Fällungsschritt höhermolekulare Substanzen abgetrennt. Das Coenzym Q10 im Überstand wird abgenommen und mit Extraktionslösung in die organische Phase überführt. Das Lösungsmittel wird verdampft, die Probe in Ethanol p.A. resuspendiert und in die HPLC injiziert.

Die Trennung mittels HPLC erfolgt in einem isokratischen Verfahren bei 30 °C auf einer "reversed phase" Säule. Die Aufnahme der Chromatogramme erfolgt mit einem UV-Detektor. Die Trennung benötigt ca. 15 Minuten für einen Lauf. Die Quantifizierung erfolgt über den mitgelieferten EDTA-Vollblut-Kalibrator und die Berechnung der Ergebnisse wird über die "interne Standard-Methode" anhand der Integration der Peakflächen durchgeführt.

Zusammenfassung

Der hier vorliegende Komplettkit zur Bestimmung des Coenzym Q10 ermöglicht eine einfache, schnelle und präzise quantitative Bestimmung. Dieser Komplettkit enthält gebrauchsfertig alle Reagenzien und Verbrauchsmaterialien für die Aufbereitung der Proben und die analytische HPLC-Trennung.

Wie auch bei vielen anderen Parametern liegt der Vorteil der HPLC-Analytik in der gleichzeitigen Abarbeitung vieler Analyten in einem Test. Die HPLC-System-Komplettlösung ermöglicht auch Laboratorien, die bislang noch keine Erfahrung mit Hochdruckflüssigkeitschromatographie haben, diese

Technik schnell und problemlos für klinisch-chemische Routinezwecke einzusetzen. Für die Kalibrierung des Testsystems ist meist eine Einpunkt-Kalibrierung ausreichend, im Gegensatz zu Immunoassays mit bis zu 6 Kalibratoren pro Testansatz. Eine Automatisierung der Probenaufgabe und der Auswertung ist möglich, sodass auch größere Probenzahlen fast unbeaufsichtigt abgearbeitet werden können. (Bei kurzen Serienlängen ist die Einpunktkalibrierung sehr viel wirtschaftlicher gegenüber der 6-Punkt-Kalibrierung bei Immuno-Assays).

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Kit Komponenten	Menge
KC1700ka	Kalibrator (lyoph. 500 µl; Konzentration siehe Etikett)	5 Fläschchen
KC1700rk	Rekonstitutionslösung	5 ml
KC1700vl	Verdünnungslösung	85 ml
KC1700is	Interner Standard	110 ml
KC1700ex	Extraktionslösung	220 ml
KC1700et	Ethanol p.A.	20 ml
KC1700lm	Laufmittel	1000 ml

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Vortex Wirbelmischer
- 10 ml verschraubbare Glasröhrchen (z.B. Pyrex)
- diverse Pipetten
- HPLC Gerät mit UV-Detektor
- reversed phase C₁₈-Säule
- Anlage zum Eindampfen von Proben
- Zentrifuge

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

Der Kalibrator (mit definierter Menge Coenzym Q10) wird in 500 µl Rekonstitutionslösung gelöst. Der Gehalt an Coenzym Q10 (Ubichinon) ändert sich geringfügig von Charge zu Charge, der genaue Gehalt ist auf dem Etikett angegeben. Der aufgelöste Kalibrator kann bei -20 °C 14 Tage gelagert werden.

Die restlichen Testreagenzien werden gebrauchsfertig in gelöster Form geliefert.

Die Testreagenzien sind bei 2-8 °C, der Kalibrator bei -20 °C bis zum Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Standards und Kontrollen sind auf Humanblut 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 Probe eignet sich EDTA-Vollblut, Serum und EDTA-Plasma das aus venösem Nüchternblut gewonnen wird.

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

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

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

Arbeitsschema

In 10 ml verschraubbare Glasröhrchen (z.B. Pyrex) werden pipettiert:

200 µl Patientenprobe, Kalibrator oder Kontrolle

+

800 µl Verdünnungslösung

gut mischen (10 s Wirbelmischer)

1 ml interner Standard zugeben

gut mischen (10 s Wirbelmischer)

2 ml Extraktionslösung zugeben

2 min auf Wirbelmischer mischen und anschließend **10 min** bei 3.000 g zentrifugieren.

Die obere Phase wird abgenommen und eingedampft. Der Rückstand wird in **150 µl** Ethanol p.A. aufgenommen.

100 µl in das HPLC-System injizieren.

Chromatographische Bedingungen

Säulen:	Bischof Prontosil AQ 5 µm; 125 x 4 mm
Fluss:	0,8 - 1,2 ml/min
UV-Detektor:	275 nm
Laufzeit pro Chromatogramm:	15 Min.

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

10. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE

Die Säule kann nach der Analyse im Laufmittel belassen werden. Vor der Analyse sollte das System mit 50 ml Laufmittel äquilibriert werden.

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

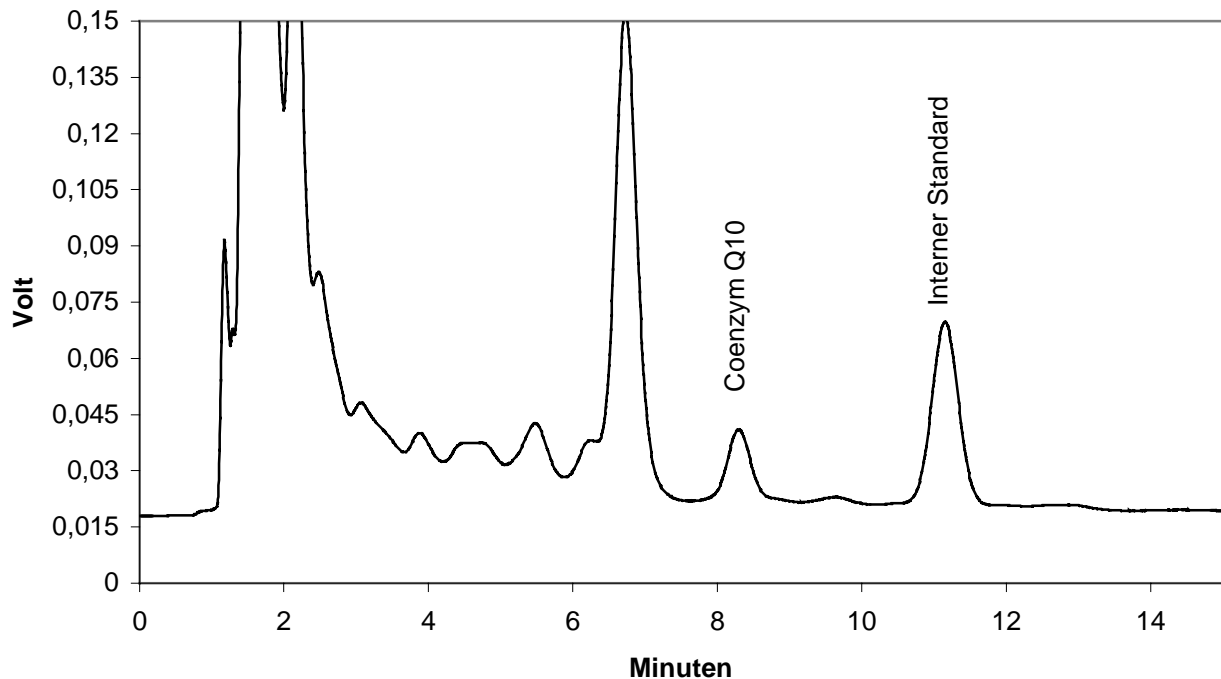
11. AUSWERTUNG

Berechnung

$$\frac{\text{Peakhöhe Patient} \cdot \text{Konzentration des Kalibrators}}{\text{Peakhöhe interner Standard Patient}} \cdot F = \text{Konzentration Patientenprobe}$$

$$F = \frac{\text{Peakhöhe interner Standard des Kalibrators}}{\text{Peakhöhe Reinsubstanz des Kalibrators}}$$

Musterchromatogramm



12. EINSCHRÄNKUNGEN

13. QUALITÄTSKONTROLLE

Normbereich

EDTA-Vollblut: 0,67 – 0,99 µg/ml (Mittelwert ± 2 SD).

EDTA-Plasma: 0,83 – 1,43 µg/ml (Mittelwert ± 2 SD)

Wir empfehlen, daß jedes Labor seinen eigenen Normalwerte-Bereich erstellt, weil Referenzbereiche stark von der Auswahl des Probandenkollektivs abhängig sind. Die Angabe des Normalbereichs für Ubichinon 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:	4,4 % (0,66 µg/ml)	[n = 12]
Inter-Assay VK:	6,6 % (0,31 µg/ml)	[n = 10]
	4,5 % (0,89 µg/ml)	[n = 10]

Linearität

bis 10 µg/ml

Nachweisgrenze

0,02 µg/ml

15. ENTSORGUNG

Das Laufmittel, Extraktionslösung, interner Standard und Ethanol p.A. 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. 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.

Manual

Coenzyme Q₁₀

HPLC

*For the determination of Coenzyme Q₁₀ (Ubiquinone) in
EDTA-blood, Serum und EDTA-Plasma*

Artikelnummer/Catalogue no.: KC 1700
Packungsgröße/Package size: 100 determinations
Lagerung/Storage: 2-8 °C, calibrator and internal standard at -20 °C



1. INTENDED USE

The *Immundiagnostik* Assay is intended for the quantitative determination of Coenzyme Q10 (Ubiquinone) in EDTA-blood, serum and EDTA-plasma. This Assay is designed for in vitro diagnostic use only.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Ubiquinone was first isolated in the 50th from the group of Prof. Green (Wisconsin). The function was investigated by Prof. Mitchel, who received the Nobel price for his research on the oxydative phosphorylation pathway.

Ubiquinone is a coenzyme which is represented in every cell and the whole metabolism. It is built up by a chinonic ring and an isoprenic sidechain. In humans ubiquinone can be synthesized and taken up by nutrition.

Ubiquinone has two different pysiological functions.

- 1.) Component of the energy metabolism
- 2.) Radical scavanger

During the reduction of oxygen in the oxydative phosphorylation 3 Mol ATP are generated. In this reduction electrons are transferred from NADPH to oxygen via 6 different redox systems. Ubiquinone is the less abundant redox system in the membrane of the mitochondria. Because of the low amount it is the speed controlling redox-system in the energy metabolism. Normally the amount of ubiquinone is sufficient, but with growing age and exposure to sunlight it is reduced to 50 %.

Ubiquinone has a high amount of carbon doublebonds and therefore a higher potential of reduction than vitamin C or vitamin E. Thereby it is the first line of defense against free radicals. Therefore ubiquinone is an optimal stabilizer of the ion channels of the membranes.

Indications

- Determination of Ubiquinone status
- Cardiovascular disease
- Carcinogenesis
- Aging
- Burnout syndrome

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The first step in determining Coenzyme Q10 includes sample preparation. Therefore the internal standard is added to the calibrator, controls and samples. Higher molecular substances are removed by precipitation and centrifugation. The Coenzyme Q10 in the supernatant is then extracted by an organic solvent, which is evaporated afterwards. The residue is resuspended in ethanol p.A.. 100 µl of the resuspension 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 15 minutes. The chromatograms are recorded by a UV detector. The quantification is performed with the delivered blood calibrator; the concentration is calculated via integration of the peak areas by the internal standard method.

The kits 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

Catalogue No	Kit Components	Quantity
KC 1700lm	Mobile phase	1 x 1000 ml
KC 1700ka	Calibrator (lyophilized 0.5 ml)	5 vial
KC 1700is	Internal standard	1 x 110 ml
KC 1700rk	Reconstitution solution	1 x 5 ml
KC 1700vl	Dilution solution	1 x 85 ml
KC 1700ex	Extraction solution	1 x 220 ml
KC 1700et	Ethanol p.A.	1 x 20 ml

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- 10 ml screw capped glas vials (Pyrex)
- Centrifuge
- Mixer (Vortex)
- Various pipettes
- HPLC with UV-detector
- Reversed phase C₁₈-column
- Evaporation unit

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

Reconstitute the **calibrator** in **0.5 ml** reconstitution solution. Take aliquots and store them at -20°C for at least 14 days. Avoid repeated freeze-thaw cycles. The concentration of coenzyme Q10 might have minor changes from lot to lot.

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

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

EDTA-whole-blood, serum or EDTA-plasma could be used in this assay.

The samples are stable in the dark at 2-8°C for 1 day. 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

Pipett into 10 ml screw capped glas vials

200 µl sample, standard or control

+

800 µl dilution solution

Mix well (10 s vortex mixer)

Add **1 ml** internal standard

mix well (10 s vortex mixer)

Add **2 ml** extraction solution

Mix for **2 min** on a vortex mixer and centrifuge for **10 min** at 3.000 g. The upper layer is removed and evaporated.

Resuspend the residue in **150 µl** ethanol p.A.

Inject **100 µl** of the resuspension into the HPLC system.

Chromatographic conditions

Column material:	Bischof Prontosil AQ 5 µm
Column dimension:	125 mm x 4 mm
Flow rate:	0.8 - 1.2 ml/min
Detection :	275 nm
Injection volume:	100 µl
Running time:	15 min

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

10. TREATMENT OF THE COLUMN

After analysis the column could be left in the mobile phase. Before use, the system should be equilibrated with ca. 50 ml eluent.

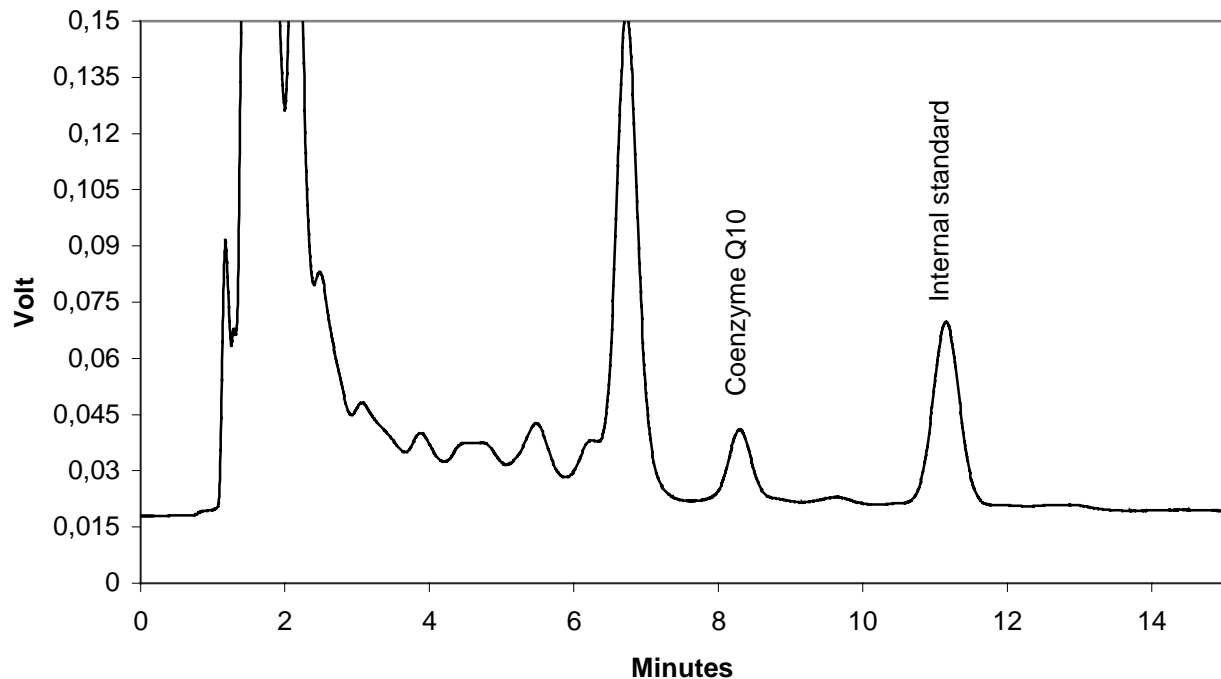
11. RESULTS

Calculation

$$\frac{\text{Peak height patient} \cdot \text{concentration of the calibrator}}{\text{Peak height internal standard patient}} \cdot F = \text{Concentration patient sample}$$

$$F = \frac{\text{Peak height internal standard of the calibrator}}{\text{Peak height of coenzyme Q10 of the calibrator}}$$

Typical chromatogram



12. LIMITATIONS

13. QUALITY CONTROL

Expected values

EDTA-blood: 0.67 – 0.99 $\mu\text{g/ml}$ (mean \pm 2 SD)

EDTA-plasma: 0.83 – 1.43 $\mu\text{g/ml}$ (mean \pm 2 SD)

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

Controls

Control samples or blood 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:	4.4 % (0.66 µg/ml)	[n = 12]
Inter-Assay VK:	6,6 % (0,31 µg/ml)	[n = 10]
	4,5 % (0,89 µg/ml)	[n = 10]

Linearity

up to 10 µg/ml

Detection limit

0.02 µg/ml

15. DISPOSAL

The mobile phase, extraction solution, internal standard, and ethanol p.A. must be disposed as non-halogenated solvent.

Please refer to the appropriate national guidelines.

16. TROUBLESHOOTING

Problem	Possible reason	Solution
No signal	No or defect connection to evaluation system	Check signalcord and connection
	Detectorlamp is altered	Change lamp
No peaks	Injector is congested	Check Injector
Doublepeaks	Dead volume in fittings and / or column	Renew fittings and / or column
Contaminating peaks	Injector dirty	Clean injector
	Contamination at the head of the column	Change direction of the column and rinse for 30 min at low flow rate (0.2 ml/min) with mobile phase
	Air in the system	Degas pump
	Autosampler vials contaminated	Use new vials or clean them with methanol
Broad peaks, tailing	Precolumn / column exhausted	Use new precolumn / column
Variable retention times	Drift in temperature	Use a column oven
	Pump delivers imprecise	Check pump, degas the system
	System is not in steady state yet	Rinse system mobile phase for 15 min
Baseline is drifting	Detector lamp did not reach working temperature yet	Wait
	Detector lamp is too old	Renew lamp
	System is not in steady state yet	Rinse system mobile phase for 15 min
	Pump delivers imprecise	Check pump, degas the system
Baseline is not smooth	Pump delivers imprecise	Check pump, degas the system
	Detector flowcell is dirty	Clean flow cell

17. 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.