

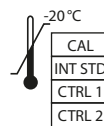
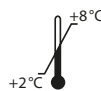
Coenzym Q₁₀ HPLC Kit

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

*For the determination of coenzyme Q₁₀ (ubiquinone) in
EDTA-whole blood, serum and EDTA-plasma*

Gültig ab / Valid from 2015-12-30

REF KC1700



IVD **CE**



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

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

1. VERWENDUNGSZWECK

Diese 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 resultieren:

- 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 am geringsten konzentrierte 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 Q₁₀ selbst 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 aufrechterhält.

Indikationen

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

3. TESTPRINZIP

Zur Coenzym-Q₁₀-Bestimmung 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 Fluoreszenzdetektor. Die Trennung benötigt ca. 15 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 Peakhöhe/-fläche durchgeführt.

Zusammenfassung

Der hier vorliegende Komplettkit 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 Analyte 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 Immunassays 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 Immunassays.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KC1700KA	CAL	Kalibrator (lyoph. 500 µl; Konzentration siehe Etikett)	5 Fläschchen
KC1700RE	RECSOL	Rekonstitutionslösung	15 ml
KC1700VL	DIL	Verdünnungslösung	85 ml
KC1700IS	INT STD	Interner Standard	110 ml
KC1700EX	EXTSOL	Extraktionslösung	220 ml
KC1700ET	ETHANOL	Ethanol p. a.	20 ml
KC1700LM	MOPHA	Laufmittel	1000 ml
KC1700KO	CTRL1 CTRL2	Kontrolle 1 und 2 (lyoph. 250 µl; Konzentration siehe Spezifikationsdatenblatt)	2 x 3 Fläschchen

Die HPLC-Trennsäule (KC1700RP) 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

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

6. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- **Der lyophilisierte Kalibrator (CAL)** ist bei **-20 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor Gebrauch wird er in je **500 µl Rekonstitutionslösung (RECSOL)** resuspendiert. Der Gehalt an Coenzym Q₁₀ ändert sich geringfügig von Charge zu Charge, der genaue Gehalt ist auf dem Etikett angegeben. Aliquots des **Kalibrators** (rekonstituierter CAL) können bei **-20 °C** für **14 Tage** gelagert werden. **Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.**

- **Die lyophilisierten Kontrollen 1 und 2 (CTRL 1 und CTRL 2)** sind bei **-20 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor Gebrauch werden sie in je **250 µl Rekonstitutionslösung (RECSOL)** resuspendiert. Der Gehalt an Coenzym Q₁₀ ändert sich geringfügig von Charge zu Charge, der genaue Gehalt ist dem Spezifikationsdatenblatt zu entnehmen.
- Der **interne Standard (INT STD)** ist bei **-20 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2–8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- 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 1 Tag bei 2–8 °C im Dunkeln. Zur längeren Lagerung sollte die Probe bei -20 °C aufbewahrt werden.

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Verdünnungslösung (DIL) vor dem Testansatz auf Raumtemperatur bringen, da Ausflockungen gelöst werden müssen.

Arbeitsschema

Je 200 µl Probe, Kalibrator oder Kontrolle 1 oder 2 in ein 10-ml-Glasröhrchen pipettieren.
Je 800 µl Verdünnungslösung (DIL) hinzugeben, gut mischen (10 s Vortex-Wirbelmischer)
Je 1 ml internen Standard (INT STD) zugeben, gut mischen (10 s Vortex-Wirbelmischer)
Je 2 ml Extraktionslösung (EXTSOL) zugeben.
2 min auf Vortex-Wirbelmischer mischen..
Für 10 min bei 3 000 g zentrifugieren.
Die obere Phase abnehmen und eindampfen . Der Rückstand wird in 150 µl Ethanol p. a. (ETHANOL) aufgenommen.
100 µl in das HPLC-System injizieren.

Chromatographische Bedingungen

Säulenmaterial:	Bischof Prontosil AQ; 5 µm
Säulendimension:	125 mm × 4 mm
Fluss:	0,8–1,2 ml/min der genaue Fluss ist auf der Produktspezifikation der jeweiligen Säule angegeben
UV-Detektion:	275 nm
Temperatur:	30 °C
Auftragsvolumen:	100 µl
Laufzeit:	15 Minuten

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

Als Spülflüssigkeit im Autosampler bzw. Injektionsventil ist das Laufmittel (MOPHA) zu verwenden.

10. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE

Die Säule kann nach der Analyse im Laufmittel (MOPHA) belassen werden.

Vor der Analyse sollte das System mit 50 ml Laufmittel (MOPHA) äquilibriert werden. Zur Wiederinbetriebnahme wird erst das System mit ca. 20 ml Laufmittel (MOPHA) eingefahren. Erst dann wird die Säule eingebaut und mit ca. 30 ml Laufmittel (MOPHA) äquilibriert.

11. AUSWERTUNG

Berechnung

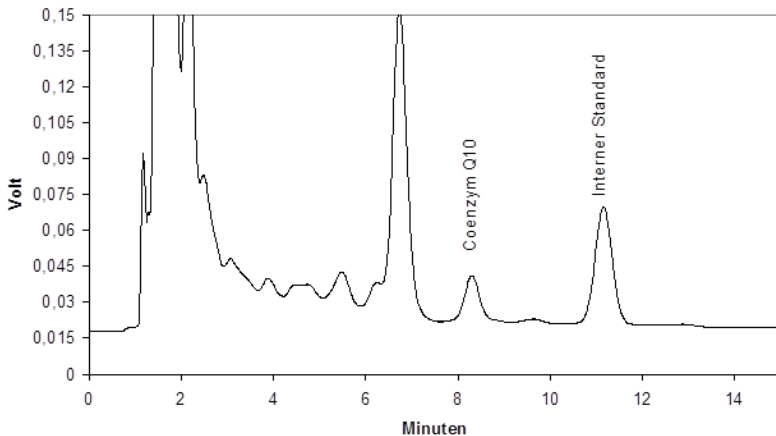
$$\frac{\text{Peakhöhe Probe} \times \text{Kalibratorkonzentration}^*}{\text{Peakhöhe interner Standard der Probe}} \times F = \text{Probenkonzentration}$$

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

* siehe Etikett

Hinweis: Alternativ zur Peakhöhe kann auch die Peakfläche zur Auswertung herangezogen werden.

Musterchromatogramm



12. QUALITÄTSKONTROLLE

Referenzbereich

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

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

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren. Die Angabe des Referenzbereichs dient lediglich der Orientierung und kann von anderen publizierten Daten abweichen.

Kontrollen

Wir empfehlen, bei jedem Testansatz Kontrollen mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

13. 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

14. ENTSORGUNG

Das Laufmittel (MOPHA), die Extraktionslösung (EXTSOL), der interne Standard (INT STD) und Ethanol p. a. (ETHANOL) müssen als halogenfreier Lösungsmittelabfall entsorgt werden.












15. 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

16. 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.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettierolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

Verwendete Symbole:

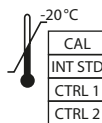
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		

Coenzyme Q₁₀ HPLC Kit

*For the determination of coenzyme Q₁₀ (ubiquinone) in
EDTA-whole blood, serum and EDTA-plasma*

Valid from 2015-12-30

REF KC1700



IVD **CE**



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	15
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	15
3. PRINCIPLE OF THE TEST	15
4. MATERIAL SUPPLIED	16
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	17
6. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	17
7. PRECAUTIONS	17
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	18
9. ASSAY PROCEDURE	18
<i>Procedural notes</i>	18
<i>Test procedure</i>	18
<i>Chromatographic conditions</i>	19
10. TREATMENT OF THE COLUMN	19
11. RESULTS	19
<i>Calculation</i>	19
<i>Typical chromatogram</i>	20
12. QUALITY CONTROL	20
<i>Reference range</i>	20
<i>Controls</i>	20
13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	21
<i>Precision and reproducibility</i>	21
<i>Linearity</i>	21
<i>Detection limit</i>	21
14. DISPOSAL	21
15. TROUBLESHOOTING	21
16. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	22

1. INTENDED USE

This HPLC application is intended for the quantitative determination of coenzyme Q₁₀ (ubiquinone) in EDTA-whole blood, serum and EDTA-plasma. For *in vitro* diagnostic use only.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Ubiquinone was first isolated in the 50s 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 who is controlling the 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. Afterwards, 100 µl of the resuspended solution 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 calibrator; the concentration is calculated via integration of the peak areas/heights by the internal standard method.

Summary

The kit includes all reagents for preparation and separation of the samples, except the column.

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

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
KC1700LM	MOPHA	Mobile phase	1000 ml
KC1700KA	CAL	Calibrator (500 µl lyoph.; see label for concentration)	5 vials
KC1700IS	INT STD	Internal standard	110 ml
KC1700RE	RECSOL	Reconstitution solution	15 ml
KC1700VL	DIL	Dilution solution	85 ml
KC1700EX	EXTSOL	Extraction solution	220 ml
KC1700ET	ETHANOL	Ethanol p.A.	20 ml
KC1700KO	CTRL1 CTRL2	Control 1 and 2 (250 µl lyoph.; see specification data sheet for concentration)	2 x 3 vials

The HPLC column (KC1700RP) 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

- 10 ml screw capped glass vials (e.g. Pyrex)
- Centrifuge
- Vortex
- Various pipettes
- HPLC with UV detector
- Reversed phase C₁₈ column
- Evaporation unit

6. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- **The lyophilised calibrator (CAL)** is stable at **-20 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, the CAL has to be reconstituted with **500 µl reconstitution solution (RECSOL)**. The concentration of coenzyme Q₁₀ slightly changes from lot to lot, the exact concentration is stated on the label. Aliquots of the **calibrator** (reconstituted CAL) can be stored at **-20 °C** for **14 days**. **Avoid repeated thawing and freezing.**
- **The lyophilised controls 1 and 2 (CTRL 1 and CTRL 2)** are stable at **-20 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, they have to be reconstituted with each **250 µl reconstitution solution (RECSOL)**. The concentration of coenzyme Q₁₀ slightly changes from lot to lot, the exact concentration is stated on the specification data sheet.
- **The internal standard (INT STD)** is stable at **-20 °C** until the expiry date stated on the label.
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2–8 °C**.

7. PRECAUTIONS

- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

EDTA-whole blood, serum or EDTA-plasma are suited for this test system.

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

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 incorrect use.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.
- Bring dilution solution (DIL) to room temperature before use to dissolve precipitations.

Test procedure

Pipet each 200 µl sample, calibrator or control 1 or 2 into a 10 ml screw capped glass reaction tube.
Add each 800 µl dilution solution (DIL), mix well (vortex for 10 s).
Add each 1 ml internal standard (INT STD), mix well (vortex for 10 s).
Add each 2 ml extraction solution (EXTSOL) .
Vortex for 2 min .
Centrifuge for 10 min at 3 000 g .
Take the upper layer and evaporate it. Resuspend the residue in 150 µl ethanol p. a. (ETHANOL).
Inject 100 µl into the HPLC system.

Chromatographic conditions

Column material:	Bischoff Prontosil AQ; 5 µm
Column dimension:	125 mm × 4 mm
Flow rate:	0.8–1.2 ml/min
	Please refer to the quality certificate of the column
UV detection::	275 nm
Temperature:	30 °C
Injection volume:	100 µl
Running time:	15 min

It is recommended to use a guard column to extend column life.

Use mobile phase (MOPHA) for autosampler and injection valve wash.

10. TREATMENT OF THE COLUMN

The column can be stored in the mobile phase (MOPHA) after the analysis.

Before use, the system should be equilibrated with 50 ml mobile phase (MOPHA): Run first 20 ml without column, and then the remaining 30 ml with integrated column.

11. RESULTS

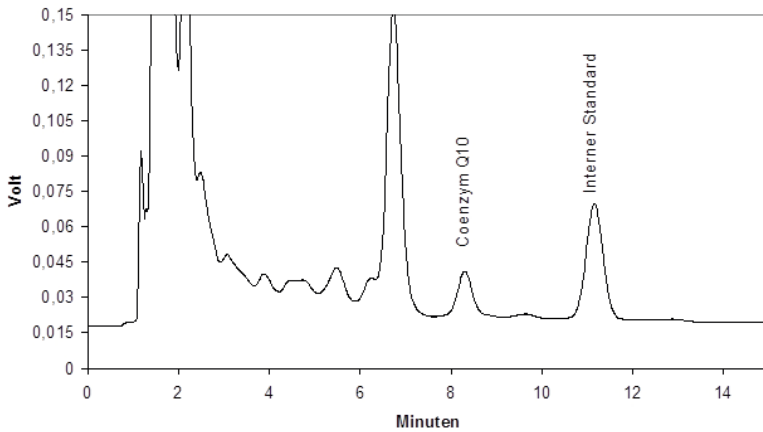
Calculation

$$\frac{\text{Peak height sample} \times \text{concentration of the calibrator}^*}{\text{Peak height internal standard of the sample}} \times F = \text{sample concentration}$$
$$F = \frac{\text{Peak height internal standard of the calibrator}}{\text{Peak height calibrator}}$$

* see label

Tip: Alternatively, the peak area instead of the peak height can be used for quantification.

Typical chromatogram



12. QUALITY CONTROL

Reference range

EDTA-whole blood: 0.67–0.99 µg/ml (mean ± 2 SD)

EDTA-plasma: 0.83–1.43 µg/ml (mean ± 2 SD)

We recommend each laboratory to establish its own reference range. The above mentioned values are only for orientation and may vary from other published data.

Controls

Control samples should be analysed 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.

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay CV

4.4% (0.66 µg/ml) [n = 12]

Inter-Assay CV

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

14. DISPOSAL

The mobile phase (MOPHA), extraction solution (EXTSOL), internal standard (INT STD), and ethanol p.a. (ETHANOL) must be disposed as non-halogenated solvent.

Please refer to the appropriate national guidelines.

15. TROUBLESHOOTING

Problem	Possible cause	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












Problem	Possible cause	Solution
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

16. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.

- The test components contain organic solvents. Contact with skin or mucous membranes must be avoided.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- 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. Immunodiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immunodiagnostik AG along with a written complaint.

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue Number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		