

# Coenzym Q<sub>10</sub> HPLC Kit

*Zur Bestimmung von Coenzym Q<sub>10</sub> (Ubichinon) aus  
EDTA-Vollblut, Serum und EDTA-Plasma*

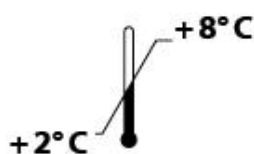
# Coenzyme Q<sub>10</sub> HPLC Kit

*For the determination of Coenzyme Q<sub>10</sub> (Ubiquinone) in  
EDTA-whole blood, serum and EDTA-plasma*

Gültig ab/valid from 19.02.2013



KC 1700



|         |
|---------|
| CAL     |
| INT STD |
| CTRL 1  |
| CTRL 2  |



Immundiagnostik AG  
Stubenwald-Allee 8a  
D-64625 Bensheim



## Inhaltsverzeichnis/Table of contents

Seite/Pag

e

|                                                     |           |
|-----------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>                          | <b>3</b>  |
| <b>2. EINLEITUNG</b>                                | <b>3</b>  |
| <b>3. TESTPRINZIP</b>                               | <b>4</b>  |
| <b>4. INHALT DER TESTPACKUNG</b>                    | <b>5</b>  |
| <b>5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b> | <b>5</b>  |
| <b>6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN</b>  | <b>7</b>  |
| <b>7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN</b>          | <b>7</b>  |
| <b>8. PROBENVORBEREITUNG</b>                        | <b>7</b>  |
| <b>9. TESTDURCHFÜHRUNG</b>                          | <b>8</b>  |
| HINWEISE                                            | 8         |
| CHROMATOGRAPHISCHE BEDINGUNGEN                      | 10        |
| <b>10. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE</b>                | <b>10</b> |
| <b>11. AUSWERTUNG</b>                               | <b>10</b> |
| BERECHNUNG                                          | 10        |
| MUSTERCHROMATOGRAMM                                 | 11        |
| <b>12. EINSCHRÄNKUNGEN</b>                          | <b>11</b> |
| <b>13. QUALITÄTSKONTROLLE</b>                       | <b>11</b> |
| NORMBEREICH                                         | 11        |
| KONTROLLEN                                          | 12        |
| <b>14. TESTCHARAKTERISTIKA</b>                      | <b>12</b> |
| PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT                    | 12        |
| LINEARITÄT                                          | 12        |
| NACHWEISGRENZE                                      | 12        |
| <b>15. ENTSORGUNG</b>                               | <b>12</b> |
| <b>16. MASSNAHMEN BEI STÖRUNGEN</b>                 | <b>13</b> |
| <b>17. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>             | <b>14</b> |

|                                                         |           |
|---------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTENDED USE</b>                                  | <b>14</b> |
| <b>2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST</b>           | <b>14</b> |
| <b>3. PRINCIPLE OF THE TEST</b>                         | <b>16</b> |
| <b>4. MATERIAL SUPPLIED</b>                             | <b>17</b> |
| <b>5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>            | <b>17</b> |
| <b>6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS</b>           | <b>18</b> |
| <b>7. PRECAUTIONS</b>                                   | <b>18</b> |
| <b>8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION</b>           | <b>18</b> |
| <b>9. ASSAY PROCEDURE</b>                               | <b>18</b> |
| PROCEDURAL NOTES                                        | 18        |
| SAMPLE AND STANDARD PREPARATION                         | 19        |
| CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS                              | 20        |
| <b>10. TREATMENT OF THE COLUMN</b>                      | <b>20</b> |
| <b>11. RESULTS</b>                                      | <b>20</b> |
| CALCULATION                                             | 20        |
| TYPICAL CHROMATOGRAM                                    | 22        |
| <b>12. LIMITATIONS</b>                                  | <b>22</b> |
| <b>13. QUALITY CONTROL</b>                              | <b>22</b> |
| EXPECTED VALUES                                         | 22        |
| CONTROLS                                                | 23        |
| <b>14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>                  | <b>23</b> |
| PRECISION AND REPRODUCIBILITY                           | 23        |
| LINEARITY                                               | 23        |
| DETECTION LIMIT                                         | 23        |
| <b>15. DISPOSAL</b>                                     | <b>23</b> |
| <b>16. TROUBLESHOOTING</b>                              | <b>24</b> |
| <b>17. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b> | <b>25</b> |

## 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 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 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 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 UV-Detektor. Die Trennung benötigt ca. 15 Minuten für einen Lauf. Die Quantifizierung erfolgt über den mitgelieferten Kalibrator und die Berechnung der Ergebnisse wird über die "interne Standard-Methode" anhand der Integration der Peakflächen durchgeführt.

### **Zusammenfassung**

Der 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. | Inhalt         | Kit Komponenten                                                             | Menge            |
|-------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------|------------------|
| KC1700KA    | CAL            | Kalibrator (lyoph. 500 µl; Konzentration siehe Etikett)                     | 5 Fläschchen     |
| KC1700RE    | RECSOL         | Rekonstitutionslösung                                                       | 5 ml             |
| KC1700VL    | DIL            | Verdünnungslösung                                                           | 85 ml            |
| KC1700IS    | INTSTD         | Interner Standard                                                           | 110 ml           |
| KC1700EX    | EXTSOL         | Extraktionslösung                                                           | 220 ml           |
| KC1700ET    | ETHANOL        | Ethanol p.A.                                                                | 20 ml            |
| KC1700LM    | MOPHA          | Laufmittel                                                                  | 1000 ml          |
| KC 1700KO   | CTRL1<br>CTRL2 | Kontrolle 1 und 2 (lyoph. 250 µl; Konzentration siehe Produktspezifikation) | 2 x 3 Fläschchen |

Die HPLC Trennsäule (KC 1700RP) 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

- Vortex Wirbelmischer
- 10 ml verschraubbare Glasröhrchen (z.B. Pyrex)
- diverse Pipetten
- HPLC Gerät mit UV-Detektor
- reversed phase C<sub>18</sub>-Säule
- Anlage zum Eindampfen von Proben
- Zentrifuge

## 6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Der **Kalibrator** (CAL; mit definierter Menge Coenzym Q10) wird in **500 µl** Rekonstitutionslösung (RECSOL) 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 (CAL) kann bei -20 °C 14 Tage gelagert werden.
- Die **Kontrollen** (CTRL1, CTRL2) werden in **250 µl** Rekonstitutionslösung (RECSOL) gelöst.
- Die restlichen Testreagenzien werden gebrauchsfertig in gelöster Form geliefert.
- Die Testreagenzien sind bei 2-8 °C, der Kalibrator (CAL), der Interne Standard (INTSTD) und die Kontrollen (CTRL1, CTRL2) bei -20 °C bis zum Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

## 7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Kalibrator (CAL) und Kontrollen (CTRL1, CTRL2) 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 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.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik übernimmt keine Haftung.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung abzuarbeiten.
- Verdünnungslösung (DIL) vor Testansatz auf Raumtemperatur bringen, da Ausflockungen gelöst werden müssen.

### Arbeitsschema

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

**200 µl** Patientenprobe, Kalibrator (CAL) oder Kontrolle (CTRL1, CTRL2)

+

**800 µl** Verdünnungslösung (DIL)

gut mischen (10 s Wirbelmischer)

**1 ml** Interner Standard (INTSTD) zugeben

gut mischen (10 s Wirbelmischer)

**2 ml** Extraktionslösung (EXTSOL) 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. (ETHANOL) aufgenommen.

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

## Chromatographische Bedingungen

|                         |                            |
|-------------------------|----------------------------|
| <b>Säulenmaterial:</b>  | Bischof Prontosil AQ; 5 µm |
| <b>Säulendimension:</b> | 125 mm x 4 mm              |
| <b>Fluss:</b>           | 0,8 - 1,2 ml/min           |
| <b>UV-Detektion:</b>    | 275 nm                     |
| <b>Temperatur:</b>      | 30 °C                      |
| <b>Auftragsvolumen:</b> | 100 µl                     |
| <b>Laufzeit:</b>        | 15 min                     |

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.

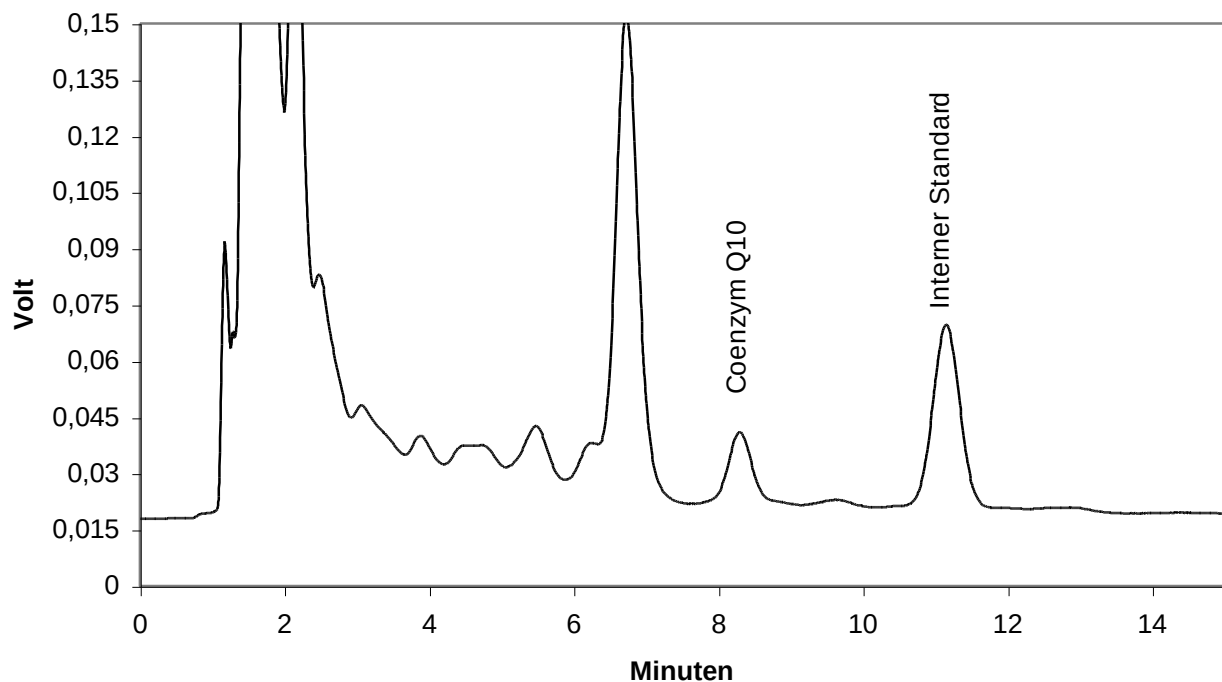
## 11. AUSWERTUNG

### Berechnung

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

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

## Musterchromatogramm



## 12. EINSCHRÄNKUNGEN

## 13. QUALITÄTSKONTROLLE

### Normbereich

**EDTA-Vollblut:** 0,67 – 0,99 µg/ml (Mittelwert  $\pm$  2 SD).

**EDTA-Plasma:** 0,83 – 1,43 µg/ml (Mittelwert  $\pm$  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 (MOPHA), Extraktionslösung (EXTSOL), Interner Standard (INTSTD) und Ethanol p.A. (ETHANOL) 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

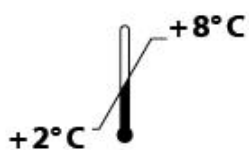
# Coenzyme Q<sub>10</sub> HPLC Kit

*For the determination of Coenzyme Q<sub>10</sub> (Ubiquinone) in  
EDTA-whole blood, serum and EDTA-plasma*

Valid from 19.02.2013



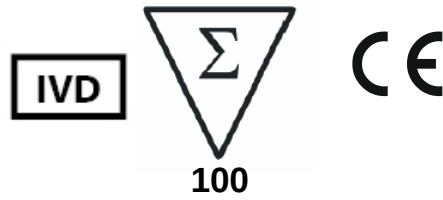
KC 1700



|         |
|---------|
| CAL     |
| INT STD |
| CTRL 1  |
| CTRL 2  |



Immundiagnostik AG



## 1. INTENDED USE

The *Immundiagnostik* Assay is intended for the quantitative determination of Coenzyme Q10 (Ubiquinone) in EDTA-whole 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 tranferred 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 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 by the internal standard method.

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

#### **Summary**

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

#### 4. MATERIAL SUPPLIED

| Cat. No   | Content        | Kit Components                      | Quantity    |
|-----------|----------------|-------------------------------------|-------------|
| KC 1700LM | MOPHA          | Mobile phase                        | 1000 ml     |
| KC 1700KA | CAL            | Calibrator (lyophilized 0.5 ml)     | 5 vials     |
| KC 1700IS | INTSTD         | Internal standard                   | 110 ml      |
| KC 1700RE | RECSOL         | Reconstitution solution             | 5 ml        |
| KC 1700VL | DIL            | Dilution solution                   | 85 ml       |
| KC 1700EX | EXTSOL         | Extraction solution                 | 220 ml      |
| KC 1700ET | ETHANOL        | Ethanol p.A.                        | 20 ml       |
| KC 1700KO | CTRL1<br>CTRL2 | Control 1 and 2, 250 µl lyophilized | 2 x 3 vials |

HPLC column (KC 1700 RP) 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 (Pyrex)
- Centrifuge
- Mixer (Vortex)
- Various pipettes
- HPLC with UV-detector
- Reversed phase C<sub>18</sub>-column
- Evaporation unit

## 6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- Reconstitute the **calibrator** (CAL) in **0.5 ml** reconstitution solution (RECSOL). Take aliquots and store at -20°C for at least 14 days. Avoid repeated freeze-thaw cycles. The coenzyme Q10 concentration might have minor variation from lot to lot.
- Reconstitute the **controls** (CTRL1, CTRL2) in **250 µl** reconstitution solution (RECSOL).
- Calibrator (CAL), internal standard (INTSTD) and controls (CTRL1, CTRL2) are stable at -20 °C up to the expiry date stated on the label.
- All other test reagents are stable at 2-8 °C up to the expiry date stated on the label.

## 7. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- 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 shown on kit label.

## 8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

EDTA-whole blood, serum or EDTA-plasma is 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 wrong use.

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

## Sample and standard preparation

Pipet into 10 ml screw capped glass vials

**200 µl** sample, calibrator (CAL) or control (CTRL1, CTRL2)

+

**800 µl** dilution solution (DIL)

Mix well (10 s vortex mixer)

Add **1 ml** Internal standard (INTSTD)

mix well (10 s vortex mixer)

Add **2 ml** extraction solution (EXTSOL)

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. (ETHANOL)

Inject **100 µl** of the resuspended Solution into the HPLC system.



## Chromatographic conditions

|                          |                            |
|--------------------------|----------------------------|
| <b>Column material:</b>  | Bischof Prontosil AQ; 5 µm |
| <b>Column dimension:</b> | 125 mm x 4 mm              |
| <b>Flow rate:</b>        | 0.8 - 1.2 ml/min           |
| <b>UV-Detection :</b>    | 275 nm                     |
| <b>Temperature:</b>      | 30 °C                      |
| <b>Injection volume:</b> | 100 µl                     |
| <b>Running time:</b>     | 15 min                     |

It is recommended that a guard column is used 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

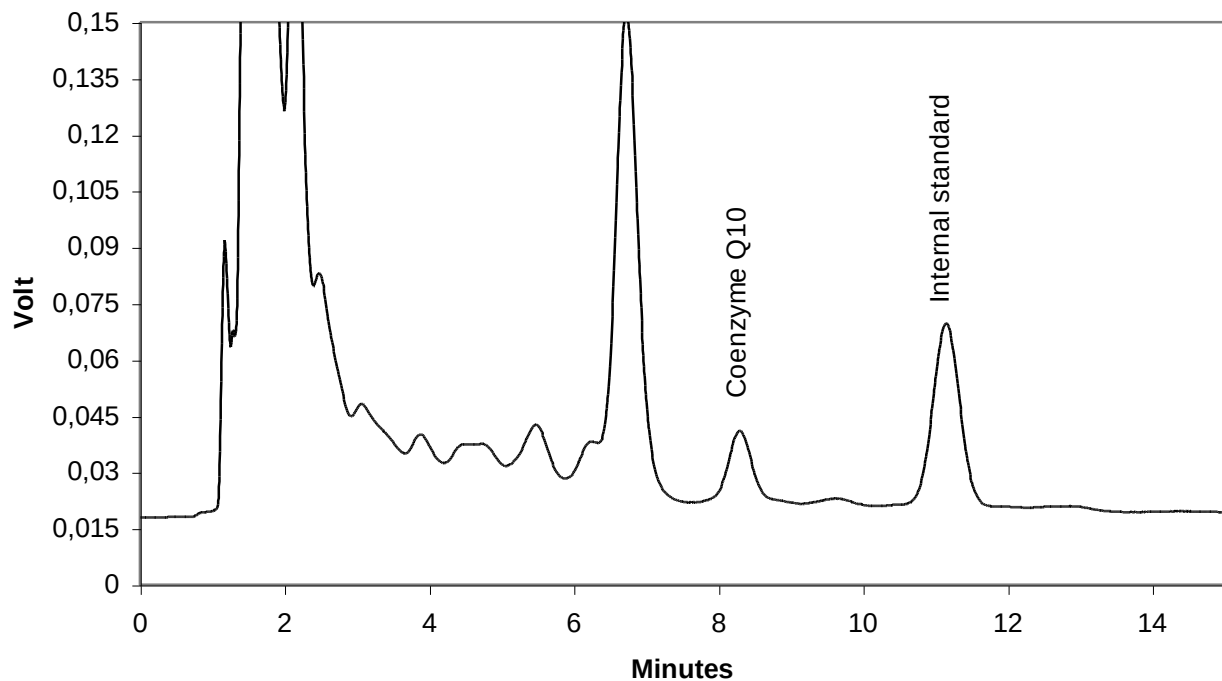
### Calculation

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

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



## Typical chromatogram



## 12. LIMITATIONS

## 13. QUALITY CONTROL

### Expected values

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

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

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

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

|                        |                    |          |
|------------------------|--------------------|----------|
| <b>Intra-Assay CV:</b> | 4.4 % (0.66 µg/ml) | [n = 12] |
|------------------------|--------------------|----------|

|                        |                    |          |
|------------------------|--------------------|----------|
| <b>Inter-Assay VK:</b> | 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 (MOPHA), extraction solution (EXTSOL), internal standard (INTSTD), and ethanol p.A. (ETHANOL) 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 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                                                                                          |
|                          | 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. 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 for research use only.
- The reagents should not be used after the date of expiry stated on the 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.