

Malondialdehyd HPLC Kit

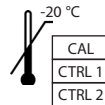
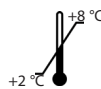
*Zur Bestimmung von Malondialdehyd
in Plasma, Serum und Urin*

Malondialdehyde HPLC Kit

*For the determination of malondialdehyde
in plasma, serum and urine*

Gültig ab / Valid from 2022-09-05

REF KC1900



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
<i>Zusammenfassung</i>	3
4. INHALT DER TESTPACKUNG	4
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
6. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	5
7. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	5
8. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Arbeitsschema</i>	5
<i>Chromatographische Bedingungen</i>	6
9. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE	6
10. AUSWERTUNG	7
<i>Berechnung</i>	7
<i>Musterchromatogramm</i>	7
11. EINSCHRÄNKUNGEN	7
12. QUALITÄTSKONTROLLE	8
<i>Normbereich</i>	8
<i>Kontrollen</i>	8
13. TESTCHARAKTERISTIKA	8
<i>Genauigkeit – Präzision</i>	8
<i>Genauigkeit – Richtigkeit</i>	9
<i>Analytische Sensitivität</i>	9
<i>Analytische Spezifität</i>	10
14. ENTSORGUNG	10
15. MASSNAHMEN BEI STÖRUNGEN	11
16. VORSICHTSMASSNAHMEN	12
17. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12
18. LITERATUR	13

1. VERWENDUNGSZWECK

Die HPLC-Applikation ist für die Bestimmung von Malondialdehyd aus Plasma, Serum und Urin geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

In den letzten Jahren wurde die schädliche Wirkung von Lipidperoxidationsprodukten intensiv untersucht. Diese entstehen, wenn freie Radikale die körpereigenen Schutzmechanismen überwinden und mit ungesättigten Fettsäuren reagieren.

Die Reaktion mit aktivierten Sauerstoffspezies führt zur Bildung von Lipidhydroperoxiden (primäre Lipidperoxidationsprodukte), welche zu den sekundären Lipidperoxidationsprodukten wie Alkanen (z.B. Ethan und Pentan), aliphatischen Aldehyden (Hexanal) sowie ungesättigten Aldehyden (z.B. Malondialdehyd [MDA] und 4-Hydroxynonenal [4-HNE]) weiterreagieren.

Primäre und sekundäre Lipidperoxidationsprodukte wirken auf eine Vielzahl von Molekülen, die für eine ungestörte Zellfunktion notwendig sind.

So können Lipidhydroperoxide relativ leicht die Zellkernmembran durchdringen und Reaktionen mit Nukleinsäuren des Zellkerns eingehen. Proteine können direkt an ihren Thiolgruppen angegriffen werden, so daß sich ihre Stereochemie und damit ihre Funktion ändern kann.

Außerdem führen Lipidhydroperoxide zu einer elementaren Störung der chemischen und physikalischen Eigenschaften der Zellmembranen. Die Membranfluidität nimmt ab und die Rigidität zu. Die Barrierenfunktion der Membranen ist gestört und es kommt zum Verlust intrazellulären Kaliums sowie von intrazellulären Enzymen. Wenn hiervon Erythrozyten betroffen sind, kommt es zur Hämolyse. Das dabei freigesetzte Hämoglobin kann erneut zur Initiierung oder Propagierung einer Lipidperoxidation führen.

Sekundäre Lipidperoxidationsprodukte wie MDA oder 4-HNE können ebenfalls mit der DNA reagieren, vor allem mit den Basen Guanin und Adenin. Auch diese Veränderungen der DNA führen zu fehlerhaften Transkriptionen und damit zu veränderten Genprodukten. In Proteinen können durch MDA Peptidbindungen aufgespalten werden. Aldehyde reagieren mit Aminogruppen von Proteinen unter Bildung von Schiff-Basen, wodurch die Funktion des Proteins elementar gestört werden kann.

Alle diese beschriebenen toxischen Eigenschaften oxidiertes Fettsäuren werden in der Pathogenese vieler Erkrankungen und Organfunktionsstörungen diskutiert. Besonders zu nennen sind hier Atherosklerose, Tumorerkrankungen, Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises sowie der Reperfusionsschaden eines Organes nach Ischämie.

3. TESTPRINZIP

Zur Bestimmung des Malondialdehyds wird im ersten Schritt eine Probenvorbereitung mit Derivatisierung durchgeführt. In der Derivatisierungsreaktion erfolgt die Umsetzung in ein fluoreszierendes Produkt.

Die Trennung erfolgt mittels HPLC in einem isokratischen Verfahren bei 30°C auf einer „reversed phase“-Säule. Die Chromatogramme werden mit einem Fluoreszenzdetektor aufgezeichnet. Die Trennung benötigt ca. 4 Minuten für einen Lauf. Die Quantifizierung erfolgt über den mitgelieferten Plasma-Kalibrator und die Berechnung der Ergebnisse wird über die „externe Standard-Methode“ anhand der Peakhöhe durchgeführt.

Zusammenfassung

Der hier vorliegende Komplettkit zur Bestimmung des Malondialdehyds 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 von Immunoassays bis zu 6 Kalibratoren pro Testansatz. Eine Automatisierung der Probenaufgabe und der Auswertung ist möglich, so dass 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

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KC1900	MOPHA	Laufmittel, gebrauchsfertig (Wichtig: nicht rezirkulieren)	1 000 ml
	CAL	Kalibrator; lyophilisiert (Konzentration siehe Spezifikationsdatenblatt)	4 x
	REABUF	Reaktionslösung	50 ml
	DER	Derivatisierungslösung	100 ml
	CTRL 1	Kontrolle 1; lyophilisiert	4 x
	CTRL 2	Kontrolle 2; lyophilisiert	4 x

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

Die HPLC-Trennsäule (KC1900RP), kann separat bei Immundiagnostik bestellt werden. Um die Lebensdauer Ihrer HPLC-Trennsäule zu verlängern, sollten idealerweise Vorsäulen (KC1900VS) verwendet werden. Diese und auch die Vorsäulenhalter (KC1900VH) können ebenfalls 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

- Reinstwasser*
 - Vortex-Mixer
 - 1,5-ml-Reaktionsgefäße (z. B. Eppendorf)
 - Zentrifuge
 - Wasserbad, Heizblock (bis 95 °C heizbar)
 - div. Pipetten
 - HPLC Gerät mit Fluoreszenz-Detektor
 - reversed phase C₁₈-Säule - Bischoff Prontosil Eurobond C₁₈ 5 µm, 125 x 4 mm
- * Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

6. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Der **Kalibrator** (CAL) wird in 0,25 ml Reinstwasser resuspendiert, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Der Gehalt an Malondialdehyd ändert sich geringfügig von Charge zu Charge, der genaue Gehalt ist auf dem Etikett angegeben. Bei -20°C sind die Aliquots mind. 14 Tage stabil.
- Die **Kontrollen** (CTRL1, CTRL2) werden in 0,25 ml Reinstwasser gelöst. Angaben zur **Lagerung** der Kontrollen sind dem **Spezifikationsdatenblatt** zu entnehmen.
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8°C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Als Patientenprobe sind Plasma, Serum und Urin geeignet. Die Probe sollte in jedem Fall sofort nach der Abnahme kühl gelagert werden. Die Probe kann bei 2–8°C mind. 24 Stunden, bei -20°C mind. 2 Wochen gelagert werden.

8. TESTDURCHFÜHRUNG

Arbeitsschema

Wichtig: Da während der Derivatisierung eine fluoreszierende Verbindung entsteht, die vom Derivatisierungsreagenz stammt, muss ein Wasser-Leerwert in die Analyse einbezogen werden. Die Peakhöhe des Leerwerts wird anschließend von allen Ansätzen subtrahiert.

Je **20 µl Probe, Kalibrator** (CAL) oder **Kontrolle 1 oder 2** (CTRL1, CTRL2) oder **Reinstwasser** (Leerwert) in ein **1,5-ml**-Reaktionsgefäß pipettieren.

Je **1 ml Derivatisierungslösung** hinzugeben und **15 Sekunden** auf einem Vortexmischer mischen.

1 Stunde bei 95°C reagieren lassen.

Diese Inkubationszeit sollte nicht unter- oder überschritten werden, da die angegebenen Malondialdehyd-Konzentrationen für Kalibrator (CAL) und Kontrollen (CTRL1, CTRL2) nur für die hier ausgewiesenen Konditionen gelten.

Bei der Inkubation ist es möglich, dass sich die Deckel der Reaktionsgefäße öffnen. Dies kann verhindert werden indem die Gefäße mit einem Gegenstand beschwert werden.

Die Probe abkühlen (**mind. 15 min bei 2–8 °C**) und anschließend 5 min zentrifugieren.

Je **500 µl** Überstand + **500 µl** Reaktionslösung (REABUF) mischen.

20 µl der Mixtur in das HPLC-System injizieren.

Die aufgearbeitete Probe ist bei 2–8 °C mind. 4 Tage, bei Raumtemperatur mind. 12 Stunden stabil.

Chromatographische Bedingungen

Wichtig:	Das Laufmittel darf bei diesem Testsystem nicht rezirkuliert werden.		
Säulenmaterial :	Bischoff Prontosil Eurobond, 5 µm		
Säulendimension :	125 mm x 4 mm		
Fluss :	0,8–1,2 ml/min		
Detektion :	Fluoreszenzdetektion	Exzitation:	515 nm
		Emission:	553 nm
Temperatur:	30 °C		
Auftragsvolumen:	20 µl		
Laufzeit:	ca. 4 min		

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

9. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE

Nach der Analyse sollte die Trennsäule mit ca. **30 ml** Reinstwasser bei einem Fluss von 1 ml/min gespült werden. Anschließend wird die Säule in 50% Methanol in Reinstwasser gelagert (ca. 30 ml, Fluss 0,7 ml/min).

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

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

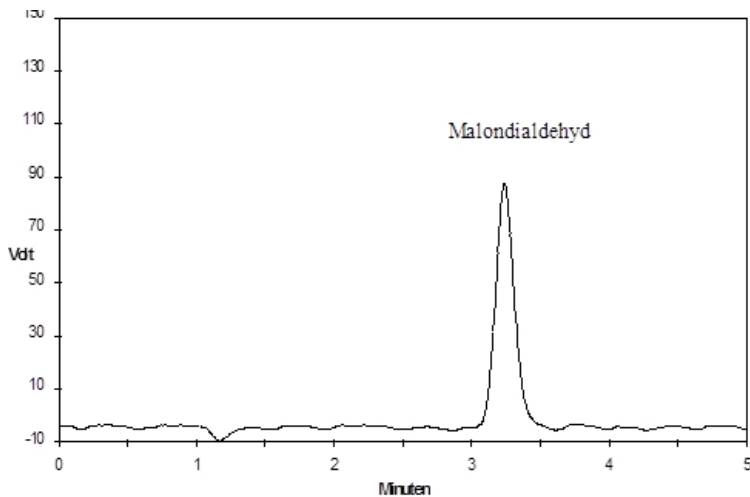
10. AUSWERTUNG

Berechnung

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

Bitte beachten Sie, dass die um den Leerwert korrigierten Peakhöhen zur Quantifizierung eingesetzt werden.

Musterchromatogramm



11. EINSCHRÄNKUNGEN

Vollblut kann nicht verwendet werden.

Stark hämolytische sowie lipämische Proben zeigen mitunter falsche Konzentrationen. Wir raten daher von der Messung solcher Proben ab.

12. QUALITÄTSKONTROLLE

Normbereich

Serum und Heparin-Plasma: $1,97 \pm 0,41 \mu\text{mol/l}$

EDTA-Plasma: $0,61 \pm 0,24 \mu\text{mol/l}$

Wir empfehlen, dass jedes Labor seinen eigenen Normalwerte-Bereich erstellt, 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.

13. TESTCHARAKTERISTIKA

Genauigkeit – Präzision

Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 12

Die Wiederholbarkeit wurde mit einer Kontrollprobe unter **gleichbleibenden** Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Mittelwert [$\mu\text{mol/l}$]	CV [%]
5,98	4,0

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 21

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 2 Kontrollproben unter **variablen** Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [$\mu\text{mol/l}$]	CV [%]
1	2,58	9,3
2	5,51	9,7

Genauigkeit – Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. Dafür wurden drei Serum-Proben sowie 3 Kontrollproben je dreimal mit bekannten Malondialdehyd-Konzentrationen versetzt und gemessen. In der folgenden Tabelle sind die Mittelwerte dargestellt.

Die Wiederfindung für Malondialdehyd lag im Bereich von 96,38 bis 102,95 %.

Probe	Spike [µmol/l]	Erwartet [µmol/l]	Gemessen [µmol/l]	Wieder- findung [%]
3,62	5	8,62	8,79	101,92
4,66	5	9,66	9,79	101,38
3,16	5	8,16	8,39	102,76
2,50	5	7,50	7,23	96,38
4,09	5	9,09	9,17	100,92
1,95	5	6,95	7,16	102,95

Analytische Sensitivität

Unterer Messbereich

Die Nachweisgrenze (*limit of detection*, LoD) wird definiert als Basisrauschen mal Faktor 3. Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$\frac{(3 \times \text{Peakhöhe Basisrauschen}) \times \text{Konzentration Kalibrator } [\mu\text{mol/l}]}{\text{Peakhöhe Kalibrator}} = \text{LoD } [\mu\text{mol/l}]$$

LoD Malondialdehyd: 0,064 µmol/l

Die Bestimmungsgrenze (*limit of quantitation*, LoQ) wird definiert als Basisrauschen mal Faktor 10. Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$\frac{(10 \times \text{Peakhöhe Basisrauschen}) \times \text{Konzentration Kalibrator } [\mu\text{mol/l}]}{\text{Peakhöhe Kalibrator}} = \text{LoQ } [\mu\text{mol/l}]$$

LoQ Malondialdehyd: 0,213 µmol/l

Oberer Messbereich & Linearität

Die obere Messbereichsgrenze gibt an, bis zu welcher Probenkonzentration eine Methode ein lineares Mess-Signal liefert. Dafür wurden 6 Proben mit bekannter Konzentration zweimal gemessen. Im Bereich von 2,5 bis 105 $\mu\text{mol/l}$ lag die berechnete Nicht-Linearität unter 20%.

Probe [$\mu\text{mol/l}$]	Höhe des Signals Messung 1	Höhe des Signals Messung 2
2,5	8 805	10 862
10	34 561	33 645
15	56 909	54 170
25	102 935	97 879
55	249 409	236 687
105	489 665	474 167

Es ist zu beachten, dass der Messbereich sowohl geräte- als auch applikationsabhängig ist.

Analytische Spezifität

Es wurden keine Interferenzen durch andere Blutbestandteile gefunden.

14. ENTSORGUNG

Das MOPHA (Laufmittel), DER (Derivatisierungslösung) und REABUF (Reaktionslösung) müssen als halogenfreier Lösungsmittelabfall entsorgt werden.

Bitte beachten Sie die entsprechenden nationalen Richtlinien.

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. VORSICHTSMASSNAHMEN

- 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. Immun Diagnostik übernimmt keine Haftung.
- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung abzuarbeiten.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg), HCV, HIV-1 und HIV-2 Antikörper getestet und für negativ befunden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Derivatisierungslösung (DER) enthält Säure. Obwohl sie verdünnt ist, muss sie mit Vorsicht benutzt werden und verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.
- Als Vorsichtsmaßnahme wird empfohlen, das verwendete Humanmaterial immer als potentiell infektiös zu betrachten.

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 dürfen nach Ablauf des auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- 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.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.
- Schwerwiegende Vorfälle sind der Immundiagnostik AG und den nationalen Aufsichtsbehörden zu melden.

18. LITERATUR

1. Draper H.H., Hadley M. (1990). A review of recent studies on the metabolism of exogenous and endogenous malondialdehyde. *xenobiotika* **20**; 9; 901-907.
2. Griesmacher A. et al. (1995). Enhanced serum levels of thiobarbitric-acid-reactive substances in diabetes mellitus. *Am J Med* **98**; 469-475.
3. Valenzuela A (1990). The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life sciences* **48**; 301-309

Verwendete Symbole:

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Enthält Plasmaderivate oder menschliches Blut		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Nicht wiederverwenden
	Herstellungskennung		Enthält Material tierischen Ursprungs
	medizinische Substanz		Enthält Material humanen Ursprungs

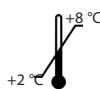
Malondialdehyde HPLC Kit

*For the determination of malondialdehyde
in plasma, serum and urine*

Valid from 2022-09-05



KC1900



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	17
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	17
3. PRINCIPLE OF THE TEST	18
<i>Summary</i>	18
4. MATERIAL SUPPLIED	18
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	19
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	19
7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	19
8. ASSAY PROCEDURE	20
<i>Sample preparation</i>	20
<i>Chromatographic conditions</i>	20
9. TREATMENT OF THE COLUMN	21
10. RESULTS	21
<i>Calculation</i>	21
<i>Typical chromatogram</i>	21
11. LIMITATIONS	21
12. QUALITY CONTROL	22
<i>Expected values</i>	22
<i>Controls</i>	22
13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	22
<i>Accuracy – Precision</i>	22
<i>Accuracy – Trueness</i>	23
<i>Analytical specificity</i>	24
14. DISPOSAL	24
15. TROUBLESHOOTING	24
16. PRECAUTIONS	26
17. GENERAL NOTES ON THE TEST	26

1. INTENDED USE

The Immundiagnostik AG assay is intended for the quantitative determination of malondialdehyde in plasma, serum and urine. This assay is designed for *in vitro* diagnostic use only.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

In the last years the damage effects of lipid peroxidation products were studied intensively. These are formed when free radicals will overcome the radical-trapping-mechanisms of the body and reacting with unsaturated fatty acids.

The reaction of polyunsaturated fatty acids (PUFA's) with activated oxygen species results in lipidhydroperoxides (primary lipid peroxidation products) which were degraded to secondary lipid peroxidation products like alkanes (e.g. ethane and pentane), aliphatic aldehydes (e.g. malondialdehyde [MDA] and 4-hydroxynonenale [4-HNE]).

Primary and secondary lipid peroxidation products have an influence on a lot of molecules responsible for correct cell function.

So lipidhydroperoxides easily pass the nuclear membrane and can react with nucleic acids. Also proteins can be attacked on their thiol groups changing their stereochemistry and function.

Moreover lipidhydroperoxides interfere with chemical and physical properties of the cell membrane. The fluidity decreases and rigidity increases. The so influenced cell membrane can't maintain their barrier function and intracellular potassium ions leak out as well as intracellular enzymes are lost. If erythrocytes are afflicted haemolysis takes place. In this case haemoglobin can initiate or propagate the lipid peroxidation.

Secondary lipid peroxidation products like MDA or 4-HNE can react with DNA as well, in particular with the bases guanin and adenin. These DNA aberrations lead to erroneous transcriptions and therewith to altered gene products. Peptide bonds are broken through the impact of MDA in proteins. Aldehydes react with amino groups of proteins building Schiff-bases, elementary disturbing correct function of proteins.

All these toxic features of oxidised fatty acids are discussed in the pathogeneses of many diseases and dysfunction of organs. In particular, arteriosclerosis, tumor diseases, rheumatic diseases and reperfusion damage of organs after ischämische processes.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The first step in determining malondialdehyde is a sample preparation with derivatisation. The derivatisation reagent transforms malondialdehyde into a fluorescent product. Afterwards the pH is optimised through to addition of a reaction solution. 20 µl of the supernatant 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 4 minutes. The chromatograms are recorded by a fluorescence detector. The quantification is performed with the delivered plasma calibrator; the concentration is calculated via integration of the peak heights by the external standard method.

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 mostly 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.	Label	Kit components	Quantity
KC 1900	MOPHA	Mobile phase	1 000 ml
	CAL	Calibrator; lyophilised (see specification data sheet for concentration)	4 x
	DER	Derivatisation solution	100 ml
	REABUF	Reaction solution	50 ml
	CTRL 1	Control 1; lyophilised	4 x
	CTRL 2	Control 2; lyophilised	4 x

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

The HPLC column (KC1900RP), can be ordered separately from Immundiagnostik. To extend the lifetime of your HPLC column, pre-columns (KC1900VS) are highly recom-

mended. These and also the pre-column holders (KC1900VH) can also be ordered from Immundiagnostik. In addition to the complete kits, all components can also be ordered separately. Please ask for our single component price list.

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultrapure water*
- Vortex
- 1.5 ml reaction tubes (Eppendorf)
- Centrifuge
- Various pipettes
- HPLC with Fluorescence-detector
- Reversed phase C18-column - Bischoff ProntoSil Eurobond C₁₈ 5 µm, 125 x 4 mm
- Water bath or heating block for heating at 95 °C

* Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure water (water type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- Reconstitute the **calibrator** (CAL) in **250 µl** ultrapure water. Take aliquots and store at -20 °C. Reconstituted calibrator is stable for at least 2 weeks at -20 °C. Avoid repeated freeze-thaw circles. The concentration of malondialdehyde might have minor changes from lot to lot.
- Reconstitute **controls** (CTRL1, CTRL2) in **250 µl** ultrapure water. **Storage** details are given in the **specification data sheet**.
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at **2–8 °C**.

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Plasma, serum and urine are suited for this test system. After venipuncture the sample should be stored at 2–8 °C immediately. Samples are stable for at least 24 h at 2–8 °C and 2 weeks at -20 °C.

9. TREATMENT OF THE COLUMN

After the analysis the column should be flushed with 30 ml ultrapure water (1 ml/min) and stored in 50% methanol in aqua bidest (ca. 30 ml, flow 0.7 ml/min). Before use, the system should be equilibrated with ca. **30 ml MOPHA** (mobile phase).

Important: Do not recirculate the MOPHA (mobile phase) in this test system.

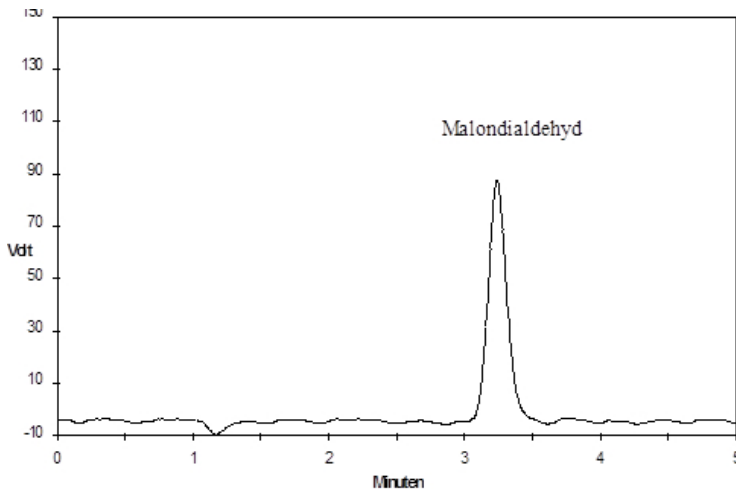
10. RESULTS

Calculation

Take into account that the mentioned heights of calibrator and patient are the heights from which the blank value has been subtracted.

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

Typical chromatogram



11. LIMITATIONS

Do not use whole blood.

Strong haemolytic and lipaemic samples often show pathological concentrations. Do not measure such samples.

12. QUALITY CONTROL

Expected values

Serum, heparin plasma: $1.97 \pm 0.41 \mu\text{mol/l}$

EDTA plasma: $0.61 \pm 0.24 \mu\text{mol/l}$

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 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

Accuracy – Precision

Repeatability (Intra-Assay); n = 12

The repeatability was assessed with one control sample under **constant** parameters (same operator, measurement system, day and kit lot).

Mean value [$\mu\text{mol/l}$]	CV [%]
5.98	4.0

Reproducibility (Inter-Assay); n = 21

The reproducibility was assessed with 2 control samples under **varying** parameters (different operators, measurement systems, days and kit lots).

Sample	Mean value [$\mu\text{mol/l}$]	CV [%]
1	2.58	9.3
2	5.51	9.7

Accuracy – Trueness

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore, three serum samples and three control samples were spiked with known amounts of Malondialdehyde three times. The mean values are shown in the table below.

The recovery for Malondialdehyde was found between 96.38 bis 102.95 %.

Sample	Spike [µmol/l]	Expected [µmol/l]	Obtained [µmol/l]	Recovery [%]
3.62	5	8.62	8.79	101.92
4.66	5	9.66	9.79	101.38
3.16	5	8.16	8.39	102.76
2.50	5	7.50	7.23	96.38
4.09	5	9.09	9.17	100.92
1.95	5	6.95	7.16	102.95

Lower detection limit

The limit of detection (LoD) is defined as 3 times the background noise. It is calculated by the formula below:

$$\frac{(3 \times \text{peak height background noise}) \times \text{concentration calibrator } [\mu\text{mol/l}]}{\text{Peak height calibrator}} = \text{LoD } [\mu\text{mol/l}]$$

LoD Malondialdehyde: 0.064 µmol/l

The limit of quantitation (LoQ) is defined as 10 times the background noise. It is calculated by the formula below:

$$\frac{(10 \times \text{peak height background noise}) \times \text{concentration calibrator } [\mu\text{mol/l}]}{\text{Peak height calibrator}} = \text{LoQ } [\mu\text{mol/l}]$$

LoQ Malondialdehyde: 0.213 µmol/l

Upper detection limit & linearity

The upper limit of detection states up to which concentration a method results in a linear signal. Therefore, 6 samples with known concentrations were measured two times.

Between the range from 2.5 to 105 $\mu\text{mol/l}$ non-linearity was found below 20 %.

Sample [$\mu\text{mol/l}$]	Signal height Experiment 1	Signal height Experiment 2
2.5	8 805	10 862
10	34 561	33 645
15	56 909	54 170
25	102 935	97 879
55	249 409	236 687
105	489 665	474 167

It should be noted that the detection limits depend on the instrument as well as on the application.

Analytical specificity

There were found no interferences to other blood components.

14. DISPOSAL

The mobile phase (MOPHA), derivatisation solution (DER) and reaction solution (REABUF) must be disposed as non-halogenated solvent.

Please refer to the appropriate national guidelines.

15. 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

Problem	Possible reason	Solution
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 yet reach working temperature	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. PRECAUTIONS

- Control samples should be analysed with each run.
- 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 to the enclosed manual.
- 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.
- The test components contain organic solvents. Contact with skin or mucous membranes has to be avoided.
- The derivatisation solution (DER) contains acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped out immediately with copious quantities of water. Do not breathe vapor and avoid inhalation.
- As a precaution, it is recommended that the human material used is always considered potentially infectious.

17. GENERAL NOTES ON THE TEST

















- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on the kit label.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Quality control guidelines should be observed.
- Serious incidents are to be reported to Immundiagnostik AG and the national regulatory authorities.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

18. REFERENCES

1. Draper H.H., Hadley M. (1990). A review of recent studies on the metabolism of exogenous and endogenous malondialdehyde. *xenobiotika* **20**; 9; 901-907.
2. Griesmacher A. et al. (1995). Enhanced serum levels of thiobarbituric-acid-reactive substances in diabetes mellitus. *Am J Med* **98**; 469-475.
3. Valenzuela A (1990). The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life sciences* **48**; 301-309

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
	Contains plasma derivatives or human blood		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		Do not re-use
	Unique Device Identification		Contains material of animal origin
	Medicinal substance		Contains material of human origin

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

