

Malondialdehyd HPLC Kit

Zur Bestimmung von Malondialdehyd in Plasma, Serum und Urin

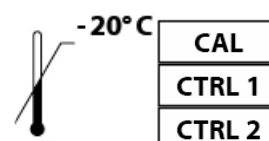
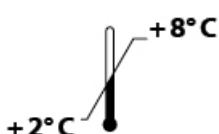
Malondialdehyde HPLC Kit

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

Gültig ab / Valid from 31.08.2010



KC 1900



Immundiagnostik AG

Inhaltsverzeichnis/Table of contents	Seite/Page
1. VERWENDUNGSZWECK	3
2. EINLEITUNG	3
3. TESTPRINZIP	4
4. INHALT DER TESTPACKUNG	5
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	5
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	5
7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	6
8. PROBENVORBEREITUNG	6
9. TESTDURCHFÜHRUNG	6
HINWEISE	6
ARBEITSSCHEMA	7
CHROMATOGRAPHISCHE BEDINGUNGEN	8
10. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE	8
11. AUSWERTUNG	8
BERECHNUNG	8
MUSTERCHROMATOGRAMM	9
12. EINSCHRÄNKUNGEN	9
13. QUALITÄTSKONTROLLE	9
NORMBEREICH	9
KONTROLLEN	10
14. TESTCHARAKTERISTIKA	10
PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT	10
LINEARITÄT	10
NACHWEISGRENZE	10
15. ENTSORGUNG	10
16. MAßNAHMEN BEI STÖRUNGEN	11
17. LITERATUR	12
18. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12

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

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 Lipidperoxydationsprodukten 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 Lipidperoxydationsprodukte), welche zu den sekundären Lipidperoxydationsprodukten wie Alkanen (z.B. Ethanol und Pentan), aliphatischen Aldehyden (Hexanal), sowie ungesättigten Aldehyden (z.B. Malondialdehyd [MDA] und 4-Hydroxynonenal [4-HNE]) weiterreagieren.

Primäre und sekundäre Lipidperoxydationsprodukte 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 Lipidperoxydation führen.

Sekundäre Lipidperoxydationsprodukte 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 oxidierter 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

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
KC1900LM	MOPHA	Laufmittel	1000 ml
KC1900KA	CAL	Kalibrator (lyoph. 0,25 ml; Konzentration siehe Etikett)	5 Fläschchen
KC1900RL	REABUF	Reaktionslösung	50 ml
KC1900DL	DER	Derivatisierungslösung	100 ml
KC1900KO	CTRL1 CTRL2	Kontrolle 1 und 2 (lyoph. 0,25 ml; Konzentration siehe Produktspezifikation)	2 x 3 Fläschchen

Die HPLC Trennsäule (KC 1900RP) 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

- 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

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Der **Kalibrator** (CAL) wird in 0,25 ml Aqua bidest. 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 Aliquoten mind. 14 Tage stabil. Die restlichen Reagenzien werden bei 2-8 °C bis zum Verfallsdatum gelagert.
- Die **Kontrollen** (CTRL1, CTRL2) werden in 0,25 ml Aqua bidest. gelöst.

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 Patientenprobe ist Plasma, Serum und Urin geeignet. Die Probe sollte in jedem Fall sofort nach der Abnahme kühl gelagert werden. Die Probe kann bei 4 °C mind. 24 Stunden, bei –20 °C mind. 2 Wochen gelagert 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.
- **Wichtig:** Da während der Derivatisierung eine fluoreszierende Verbindung entsteht, die vom Derivatisierungsreagenz stammt, muss ein Leerwert in die Analyse einbezogen werden. Die Peakhöhe des Leerwerts wird anschließend von allen Ansätzen subtrahiert.

Arbeitsschema

In **1,5 ml** Reaktionsgefäße (z.B. Eppendorf) werden pipettiert:

20 µl Patientenprobe, Kalibrator (CAL), Kontrollen (CTRL1, CTRL2) oder Leerwert

+

1 ml Derivatisierungslösung (DER) pipettieren 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.

500 µl Überstand

+

500 µl Reaktionslösung (REABUF) mischen.

20 µl in das HPLC-System injizieren.

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

Chromatographische Bedingungen

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.

10. BEHANDLUNG DER TRENNsäULE

Nach der Analyse sollte die Trennsäule mit ca. **30 ml** Aqua bidest bei einem Fluss von 1 ml/min gespült werden. Anschließend wird die Säule in 50% Methanol in Wasser 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.

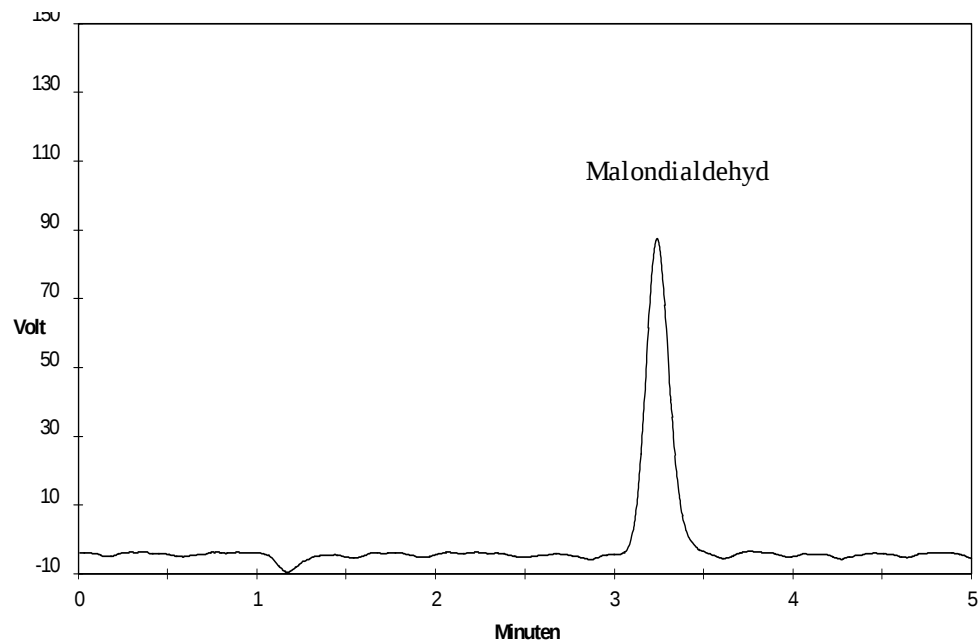
11. AUSWERTUNG

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



12. EINSCHRÄNKUNGEN

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

13. 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.

14. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay VK:	6,1 % (0,48 µmol/l)	[n = 12]
	4,8 % (2,06 µmol/l)	[n = 12]
Inter-Assay VK:	6,9 % (0,46 µmol/l)	[n = 12]
	5,7 % (2,13 µmol/l)	[n = 12]

Linearität

bis 100 µmol/l

Nachweisgrenze

0,15 µmol/l

15. ENTSORGUNG

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

16. MAßNAHMEN BEI STÖRUNGEN

Problemstellung	Mögliche Ursache	Behebung
Kein Signal	Keine oder defekte Verbindung zur Auswerteeinheit.	Signalkabel und Anschluss prüfen.
	Detektorlampe zu alt	Ggf. Lampe erneuern
Keine Peaks	Injektor verstopft	Injektor überprüfen
Doppelpeaks	Totvolumen an Fittings und / oder Säule	Fittings und / oder Säule erneuern
Störpeaks	Injektor verunreinigt	Injektor reinigen
	Kontamination am Säulenkopf	Säule umdrehen und 30 min mit niedrigem Fluss (0,2 ml/min) Laufmittel spülen
	Luft im System	Pumpe entgasen
	Autosamplergefäße verunreinigt	Neue oder mit Methanol gespülte Autosamplergefäße verwenden
Breite Peaks, Tailing	Vorsäule / Säule zu alt	Neue Vorsäule / Säule verwenden
Veränderte Retentionszeit	Temperaturdrift	Säulenofen verwenden
	Pumpe fördert ungenau	Pumpe überprüfen, entlüften
	System noch nicht im Gleichgewicht	System mit mobiler Phase 15 min spülen
Basislinie driftet	Detektorlampe noch kalt	Warten
	Detektorlampe zu alt	Ggf. Lampe erneuern
	System noch nicht im Gleichgewicht	System mit mobiler Phase 15 min spülen
	Pumpe fördert ungenau	Pumpe überprüfen, entlüften

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

17. LITERATUR

1. 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

18. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

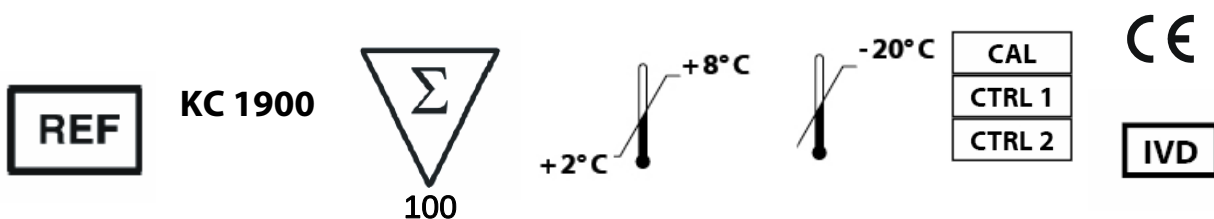
- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Reagenzien dieser Testpackung enthalten organische Lösungsmittel. Berührungen mit der Haut oder den Schleimhäuten sind zu vermeiden.
- Sämtliche in der Testpackung enthaltene Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik eingesetzt werden.
- Die Reagenzien sollten nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden (Verfallsdatum siehe Testpackung).
- Einzelkomponenten mit unterschiedlichen Lot-Nummern aus verschiedenen Testpackungen sollten nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die dafür erstellten Richtlinien für medizinische Laboratorien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten und der Aufbereitung der Proben wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für direkt daraus resultierende Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

Manual

Malondialdehyde HPLC Kit

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

Valid from 31.08.2010



Immundiagnostik AG

1. INTENDED USE

The *Immundiagnostik* 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 oxidized 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 optimized 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

Catalogue No	Content	Kit Components	Quantity
KC 1900LM	MOPHA	Mobile phase	1000 ml
KC 1900KA	CAL	Calibrator, lyophilized	5 vials
KC 1900DL	DER	Derivatisation solution	100 ml
KC 1900RL	REABUF	Reaction solution	50 ml
KC1900KO	CTRL1 CTRL2	Control 1 and 2, 250 µl lyophilized	2 x 3 vials

HPLC column (KC 1900RP) 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

- 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

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- Reconstitute the **calibrator** (CAL) in **250 µl** aqua bidist. 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** aqua bidist.
- All other test reagents are stable at 2-8 °C, up to the date of expiry stated on the label.

7. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- This product contain human source material which was tested and found to be non-reactive to HBsAg, anti-HIV-1/2, and anti-HCV. Since no method can offer complete assurance that hepatitis B virus, HIV-1/2, HVC or other infectious agents are absent, these reagents should be handled as if potentially infectious.
- 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.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on kit label.

8. 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. 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.

Sample preparation

Important: work with a water blank as a fluorescent compound is produced from the derivatisation solution (DER) that has the same retention time as the MDA-derivatisation product. The obtained blank value must be subtracted from all preparations.

Pipet in a 1.5 ml reaction tube (e.g. Eppendorf):

20 µl water, patient sample, calibrator (CAL) or controls (CTRL1, CTRL2)

+

1 ml derivatisation solution (DER) and mix for **15 seconds** on a vortex mixer.

Incubate for **60 min** at 95 °C. Keep incubation time and temperature constant as only at these conditions the given MDA-concentrations for calibrator (CAL) and controls (CTRL1, CTRL2) are valid.

Cool down the solution (**min. 15 min at 2-8 °C**) and centrifuge for 5 min.

Take **500 µl** supernatant and

500 µl reaction solution (REABUF)

and mix thoroughly on a vortex mixer.

Inject **20 µl** of the mixture into the HPLC system.

The derivatized sample is stable at 2-8 °C for at least 4 days and at room temperature for at least 12 hours.

Chromatographic conditions

Important: No recirculation of the eluent is allowed for this test-system

Column material: Bischoff Prontosil Eurobond, 5 µm

Column dimension: 125 mm x 4 mm

Flow rate: 0.8-1.2 ml/min

Detection:	Fluorescence:	Excitation	515 nm
		Emission	553 nm

Temperature: 30 °C

Injection volume: 20 µl

Running time: 4 min

It is recommended that a guard column is used to extend column life.

10. TREATMENT OF THE COLUMN

After the analysis the column should be flushed with 30 ml aqua bidist (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 re-circulate the MOPHA (mobile phase) in this test system.

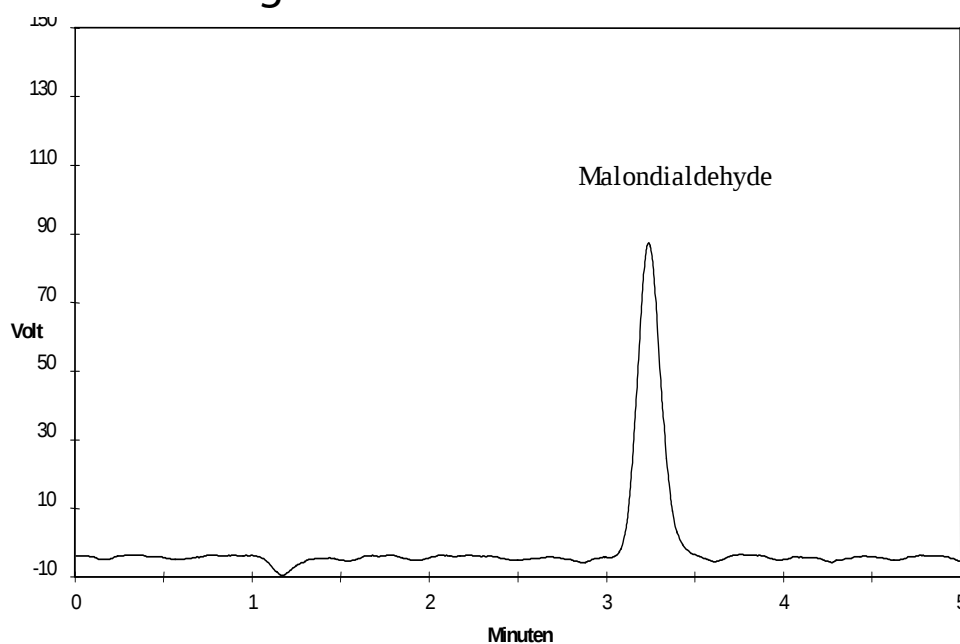
11. RESULTS

Calculation

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

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

Typical chromatogram



12. LIMITATIONS

Do not use whole blood.

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

13. QUALITY CONTROL

Expected values

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

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

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 analyzed 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.

14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay CV:	6.1 % (0.48 µmol/l)	[n = 12]
	4.8 % (2.06 µmol/l)	[n = 12]
Inter-Assay CV:	6.9 % (0.46 µmol/l)	[n = 12]
	5.7 % (2.13 µmol/l)	[n = 12]

Linearity

up to 100 µmol/l

Detection limit

0.15 µmol/l

15. 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.

16. TROUBLESHOOTING

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

17. REFERENCES

1. 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

18. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The test components contain organic solvents. Contact with skin or mucous membranes 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.