

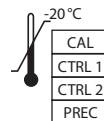
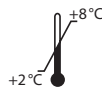
Pregnenolonsulfat LC-MS/MS Kit

*Zur Bestimmung von Pregnenolonsulfat
in EDTA-Plasma und Serum*

*For the determination of pregnenolone sulfate
in EDTA plasma and serum*

Gültig ab / Valid from 2017-02-14

REF **KM2000**



IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	5
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	5
5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	5
6. PROBENVORBEREITUNG	6
7. CHROMATOGRAPHISCHE BEDINGUNGEN	6
<i>UPLC-Methode</i>	6
8. MS/MS-METHODE	7
<i>MRM-Übergänge (m/z)</i>	7
9. AUSWERTUNG	8
10. MUSTERCHROMATOGRAMME	8
<i>Beispielchromatogramme für Pregnenolonsulfat</i>	8
11. QUALITÄTSKONTROLLE	9
<i>Normbereich</i>	9
12. TESTCHARAKTERISTIKA	10
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	10
13. VORSICHTSMASSNAHMEN	10
14. TECHNISCHE MERKMALE	10
15. ENTSORGUNG	11
16. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11
17. LITERATUR	11

1. VERWENDUNGSZWECK

Die hier beschriebene Pregnenolonsulfat LC-MS/MS-Applikation ist für die quantitative Bestimmung von Pregnenolonsulfat in Serum und EDTA-Plasma geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Steroide und Neurosteroiden werden aus Cholesterol, der Grundform für diese Hormone, synthetisiert. Während die klassischen Steroide in Geweben wie der Nebenniere, den Gonaden oder der Plazenta produziert werden, entstehen Neurosteroiden im Zentral- oder peripheren Nervensystem. Baulieu et al. zeigten in den 1980er Jahren, dass Steroide wie Dehydroepiandrosteron und Pregnenolon im Zentralnervensystem *de novo* synthetisiert werden und im Gehirn in höheren Konzentrationen vorliegen als im Plasma. Im Allgemeinen werden diese Steroide als Neurosteroiden bezeichnet und sind unterschiedlich im Gehirn und in der Hypophyse verteilt.

Neurosteroiden werden ausgehend von Cholesterol über Pregnenolon und Progesteron gebildet (siehe Abb.1). Pregnenolon und Progesteron sind damit nicht nur Vorläufermoleküle für die Synthese von Gluco- und Mineralocorticoiden in der Nebenniere und von Sexualhormonen in den Gonaden und der Plazenta, sondern auch für die Synthese von Neurosteroiden im Zentralnervensystem, d.h. Pregnenolon ist ein endogenes, natürlich produziertes Steroid, welches einen Vorläufer für viele körpereigene Hormone darstellt.

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die Neurosteroiden mit Neurotransmitterrezeptoren interagieren, die Erregbarkeit des Gehirns beeinflussen und somit als potente allosterische Modulatoren der Neurotransmitterrezeptoren fungieren können: Das endogene Neurosteroid Allopregnanolon, ein positiver Modulator des γ -Aminobuttersäure-Typ-A (GABA_A)-Rezeptorkomplexes, aktiviert die durch Stress reduzierte GABA_A -Rezeptor-Funktion und zeigt angstlösende und anti-stress Wirkungen. Negative Modulatoren wie Dehydroepiandrosteronsulfat und Pregnenolonsulfat hemmen dagegen den GABA_A -Rezeptor fast vollständig.

Bedingt durch ihre Lipophilie können die meisten freien Steroide die Blut-Hirn-Schranke leicht passieren. Eine Reihe von Steroiden existiert auch als Sulfat- sowie Fettsäureester in Konzentrationen, die die Werte der freien Steroide bei weitem überschreiten. Sie können im Gegensatz zu den freien Steroiden das Gehirn nicht über die Blut-Hirn-Schranke verlassen und stellen damit aktive Formen dar, die an der Kontrolle zahlreicher physiologischer und pathophysiologischer Prozesse beteiligt sind. Neurosteroiden beeinflussen eine Reihe zentralnervöser Prozesse, welche Auswirkungen auf unser Denken und Empfinden haben. Darüber hinaus beeinflussen sie das Sozial- und Sexualverhalten. Gleichzeitig stellen sie eine viel versprechende

Arzneimittelgruppe für wichtige Indikationen wie Epilepsie, Angststörungen und Demenzen dar.

Aus diesen Gründen wird die Bestimmung der Neurosteroiden, insbesondere des Pregnenolons bzw. Pregnenolonsulfats, zum besseren Verständnis ihrer Rolle, zur Diagnose psychischer und mental-psychischer Störungen und zur Entwicklung neuer steroidischer Medikamente beitragen.

Indikationen

- Kognitive Leistungsfähigkeit
- Gedächtnisschwäche
- Stimmungsschwankungen wie Depressionen

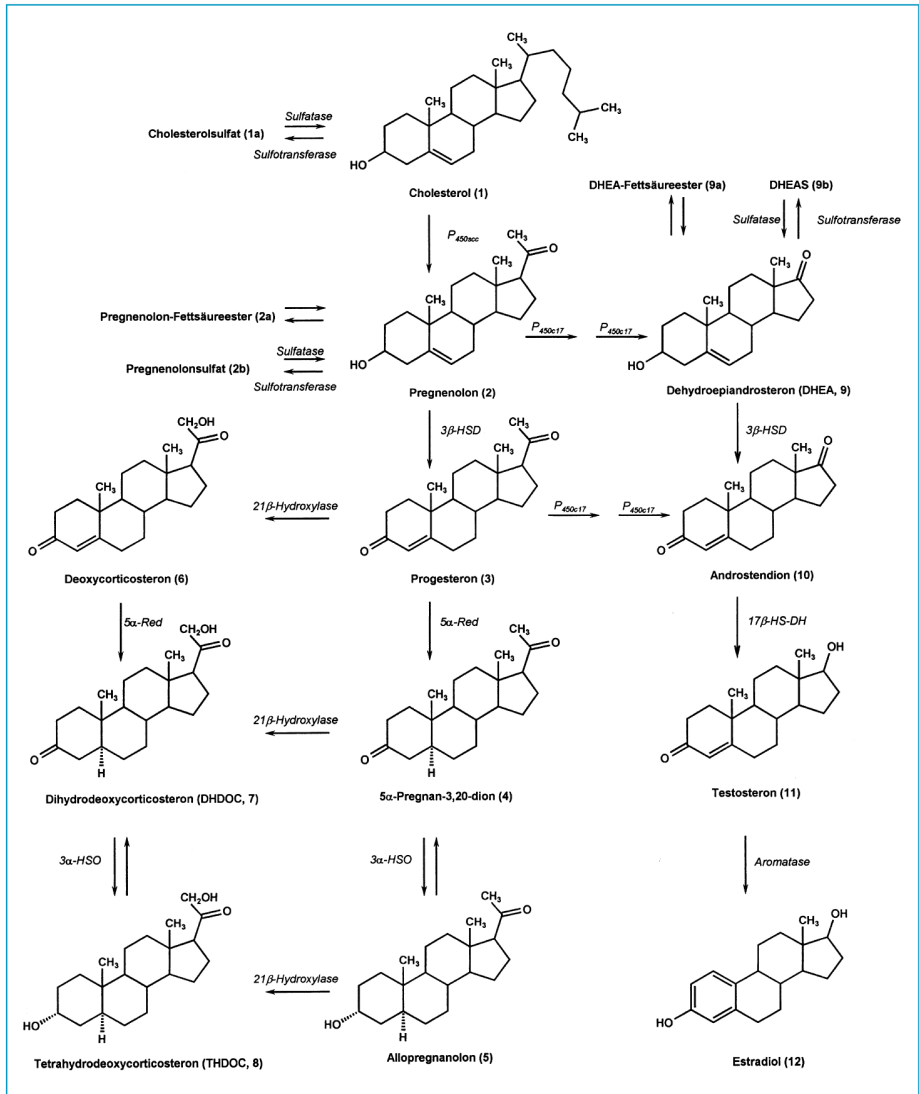


Abb. 1: Biosynthese neuroaktiver Steroide, Weiss M & Hess S, 2000

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KM2000LA	MOPHA A	Laufmittel A	1000 ml
KM2000LB	MOPHA B	Laufmittel B	1000 ml
KM2000KA	CAL	Kalibrator (lyophilisiert, Konzentration siehe Etikett)	5 Fläschchen (à 300 µl)
KM2000KO	CTRL 1 CTRL 2	Kontrolle 1 und 2 (lyophilisiert, Konzentration siehe Produktspezifikation)	je 5 Fläschchen (à 300 µl)
KM2000FR	PREC	Fällungsreagenz (-20°C, enthält den internen Standard)	50 ml
KM2000DIL	DIL	Verdünnungslösung (siehe Probenvorbereitung)	120 ml
	RECSOL	Rekonstitutionslösung	15 ml

Zur Vorbereitung der Immundiagnostik Pregnenolonsulfat-LC-MS/MS-Applikation ist das Tuning notwendig. Das Tuning ist für die Findung der optimalen LC-MS/MS-Einstellungen sowie für die Überprüfung der ausreichenden Empfindlichkeit erforderlich.

Die UPLC-Trennsäule (KM2000RP) kann separat bei Immundiagnostik bestellt werden.

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Zentrifuge, 10000 g für 1,5-ml-Eppendorfreaktionsgefäße, 4°C kühlbar
- Vortex-Mixer
- LC-MS/MS-Anlage
- RP-C18 Säule, z.B. Acquity BEH C18, 1,7 µm (2,1 x 50 mm)

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

Die Kontrollen (CTRL 1 und CTRL 2), der Kalibrator (CAL) und das Fällungsreagenz (PREC) sind bei -20°C bis zum Verfallsdatum verwendbar. Alle übrigen Reagenzien sind bei 2-8°C bis zum Verfallsdatum verwendbar.

Kalibrator und Kontrollen

Der Kalibrator (CAL) und die Kontrollen (CTRL1, CTRL2) werden in 300 µl Rekonstitutionslösung (RECSOL) gelöst.

6. PROBENVORBEREITUNG

Als Probe eignet sich Serum oder EDTA-Plasma.

Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.

1.	Im Test dürfen, bis auf das PREC (Fällungsreagenz), nur Reagenzien und Proben verwendet werden, die Raumtemperatur (18–26 °C) aufweisen. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben gut mischen
2.	In 1,5-ml-Eppendorfreaktionsgefäße werden pipettiert: 200 µl Probe, Kalibrator (CAL) oder Kontrolle (CTRL 1, CTRL 2) + 400 µl -20 °C-kaltes Fällungsreagenz (PREC inkl. interner Standard), gut mischen
3.	15 Minuten bei 2–8 °C stehen lassen und anschließend für 15 Minuten bei 4 °C und 10000 g zentrifugieren
4.	Der Überstand wird mit DIL 1:50 verdünnt (z.B. 10 µl Überstand + 490 µl DIL) und in geeignete LC-MS/MS Reagenzgefäße überführt

7. CHROMATOGRAPHISCHE BEDINGUNGEN

UPLC-Methode

Säulenmaterial:	z. B. Acquity BEH C18; 1,7 µm
Säulendimension:	2,1 x 50 mm
Fluss:	0,5 ml/min
Säulentemperatur:	45 °C
Auftragsvolumen:	50 µl
Laufzeit:	3,5 min

Gradient:	0 min	70 % A	30 % B
	0,5 min	70 % A	30 % B
	1,0 min	50 % A	50 % B
	1,5 min	0 % A	100 % B
	3,5 min	0 % A	100 % B

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

Nach der Analyse sollte die Trennsäule mit ca. 20 ml 50 % Methanol gespült werden. Die Säule kann in 50 % Methanol gelagert werden.

8. MS/MS-METHODE

Die MS/MS-Methode ist beispielhaft aufgeführt für ein Waters Quattro Premier XE Tandem Massenspektrometer.

Modus:	MRM
Polarität:	ESI ⁻
Kapillarspannung (kV):	0,5
Konusspannung (V):	var.
Extraktor (V):	4
RF Linse (V):	0,2
Quellentemperatur (°C):	130
Desolvation Temperatur (°C):	500
Gasfluss am Konus (L/Hr):	50
Desolvation Gas Fluss (L/Hr):	950
Kollision Gas Fluss (mL/Min):	0,25

MRM-Übergänge (m/z)

Pregnenolonsulfat

395,33 > 97,18	Konusspannung: 50	Kollisionsenergie: 35
395,33 > 80,17	Konusspannung: 50	Kollisionsenergie: 90

Interner Standard Pregnenolonsulfat-d6:

399,4 > 97,05	Konusspannung: 50	Kollisionsenergie: 35
399,4 > 80,11	Konusspannung: 50	Kollisionsenergie: 90

9. AUSWERTUNG

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

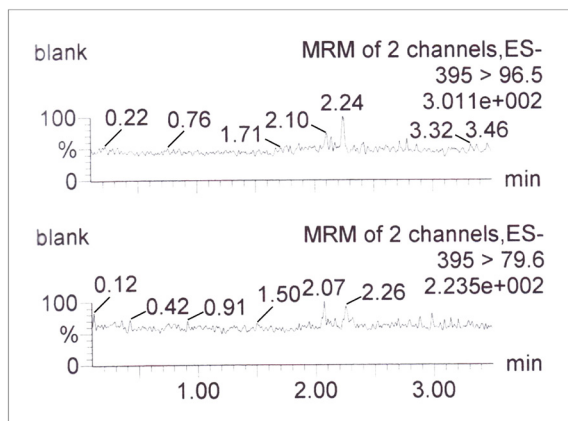
$$F = \frac{\text{Peakhöhe interner Standard des Kalibrators}}{\text{Peakhöhe Kalibrator}}$$

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

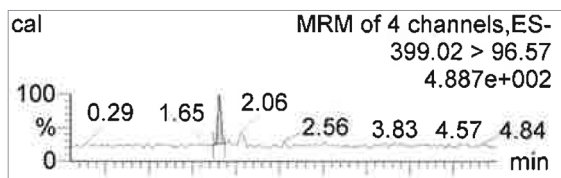
10. MUSTERCHROMATOGRAMME

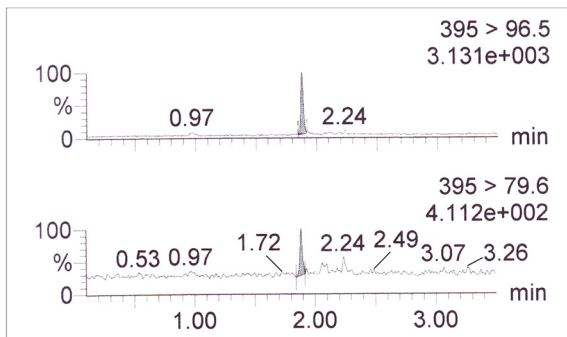
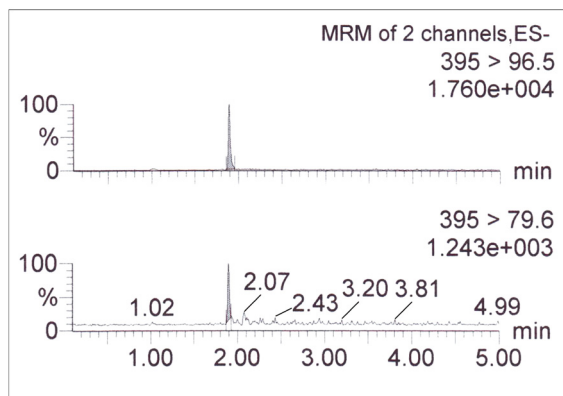
Beispielchromatogramme für Pregnenolonsulfat

Blank:



Interner Standard:



Kalibrator:**Probe:****11. QUALITÄTSKONTROLLE**

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

*Normbereich***EDTA-Plasma und Serum**

11,8–115 ng/ml

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

12. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Inter-Assay (n = 10)

Probe	Pregnenolonsulfat [ng/ml]	VK [%]
1	17,2	7,5
2	150,7	4,8

Intra-Assay (n = 6)

Probe	Pregnenolonsulfat [ng/ml]	VK [%]
1	17,5	7,6

13. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.

14. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

15. ENTSORGUNG

Laufmittel (MOPHA A, MOPHA B), Verdünnungslösung (DIL) und Fällungsreagenz (PREC) müssen als halogenfreier Lösungsmittelabfall entsorgt werden.

16. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurück zu senden.

17. LITERATUR

1. Hu, Z Y, Bourreau, E, Jung-Testas, I, Robel, P, Baulieu, E E: Neurosteroids: oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone, *Proc Natl Acad Sci USA* **84** (1987), 8215-8219
2. Rupprecht, R, Holsboer, F: Neuroactive steroids: mechanism of action and neuropsychological perspectives, *Trends Neurosci* **22** (1999), 410-416
3. Mehta, A K, Ticku, M K: An update on GABAA receptors, *Brain Res Brain Res Rev* **29** (1999), 196-217
4. Lambert, J J, Belelli, D, Hill-Venning, C, Peters, J A: Neurosteroids and GABAA receptor function, *Trends Pharmacol Sci* **16** (1995), 295-303
5. Park-Chung, M, Malayev, A, Purdy, R H, Gibbs, T T, Farb, D H: Sulfated and unsulfated steroids modulate γ -aminobutyric acidA receptor function through distinct sites, *Brain Res* **830** (1999), 72-87

6. Monaghan, E P, Navalta, L A, Shum, L, Ashbrook, D W, Lee, D A: Initial human experience with ganaxolone, a neuroactive steroid with antiepileptic activity, *Epilepsia* **38** (1997), 1026-1031
7. Weiss M & Hess S: Neuroaktive Steroide: Wirkungen und Risiken, *Pharmazie in unserer Zeit* **29. Jahrg** (2000) 6: 372-376
8. Jäntti SE, Tammimäki A, Raattamaa H, Piepponen P, Kostiainen R, Ketola RA: Determination of steroids and their intact glucuronide conjugates in mouse brain by capillary liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* **82** (2010) Apr 15; (8):3168-75

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Zu verwenden mit



Hersteller

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Chargenbezeichnung



Verwendbar bis



Achtung

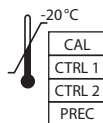
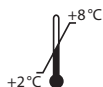
Pregnenolone sulfate LC-MS/MS Kit

*For the determination of pregnenolone sulfate
in EDTA plasma and serum*

Valid from 2017-02-14



KM2000



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	15
2. INTRODUCTION	15
3. MATERIAL SUPPLIED	18
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	18
6. SAMPLE PREPARATION	19
7. CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS	19
<i>UPLC method</i>	19
8. MS/MS METHOD	20
<i>MRM transitions (m/z)</i>	20
9. CALCULATION	21
10. EXAMPLES OF CHROMATOGRAMS	21
<i>Examples of chromatograms for pregnenolone sulfate</i>	21
11. QUALITY CONTROL	22
<i>Normal range</i>	22
12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	23
<i>Precision and reproducibility</i>	23
13. PRECAUTIONS	23
14. TECHNICAL HINTS	23
15. DISPOSAL	23
16. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	24
17. REFERENCES	24

1. INTENDED USE

The described pregnenolone sulfate LC-MS/MS-Application is intended for the quantitative determination of pregnenolone sulfate in serum and EDTA-plasma. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Steroids and neurosteroids are synthesized from cholesterol, the basic building block of all steroid hormones. While the classic steroids are produced in tissues like adrenal gland, gonads or placenta, the synthesis of neurosteroids takes place in the central and peripheral nervous system. In the 1980s, Baulieu et al. demonstrated that several steroids, such as dehydroepiandrosterone and pregnenolone, are synthesized *de novo* in the central nervous system and present in higher concentrations in the brain than in the blood. These steroids are universally referred as neurosteroids and are differently distributed in the brain and the pituitary gland.

Neurosteroids are formed from cholesterol via pregnenolone and progesterone (see Fig.1). Pregnenolone and progesterone are precursors not only of the synthesis of gluco- and mineral corticoids in the adrenal gland and of the sexual hormones in the gonads or placenta, but also of neurosteroids in the central nervous system, i.e. pregnenolone is an endogenous, naturally produced steroid that is a precursor of many body hormones.

Numerous studies have demonstrated that neurosteroids interact with neurotransmitter receptors, influence the brain excitability, thereby functioning as potent allosteric modulators of several neurotransmitter receptors: the endogenous neurosteroid allopregnanolone, a positive modulator of the γ -aminobutyric acid type A (GABA_A) receptor complex, activates the GABA_A receptor functions lowered by various stresses, and has anxiolytic and anti-stress effects. In contrast, negative modulators, like dehydroepiandrosterone sulfate and pregnenolone sulfate, inhibit almost completely the GABA_A-receptor.

Due to their lipophilicity, most of the free steroids can easily pass the blood-brain barrier. A number of steroids are conjugated as sulfate or fatty acid esters and occur in concentrations much higher than these of the free steroids. In contrast to the free steroids, they can not pass through the blood-brain barrier and represent the active forms involved in the control of various physiological and pathophysiological processes.

Neurosteroids affect a number of processes in the central nervous system, which have a powerful effect on our thinking and feeling. Furthermore, neurosteroids influence the social and sexual behavior. At the same time, they are promising pharmaceutical targets for important indications like epilepsy, anxiety disorders and dementia.

For these reasons, the determination of neurosteroids, especially of pregnenolone and pregnenilone sulfate, is expected to be helpful for understanding the roles of neurosteroids, for diagnosis of psychic or mental disorders and for the development of new steroidal therapeutic agents.

Indications

- Cognitive ability
- Weakness of memory
- Mood swings like depression

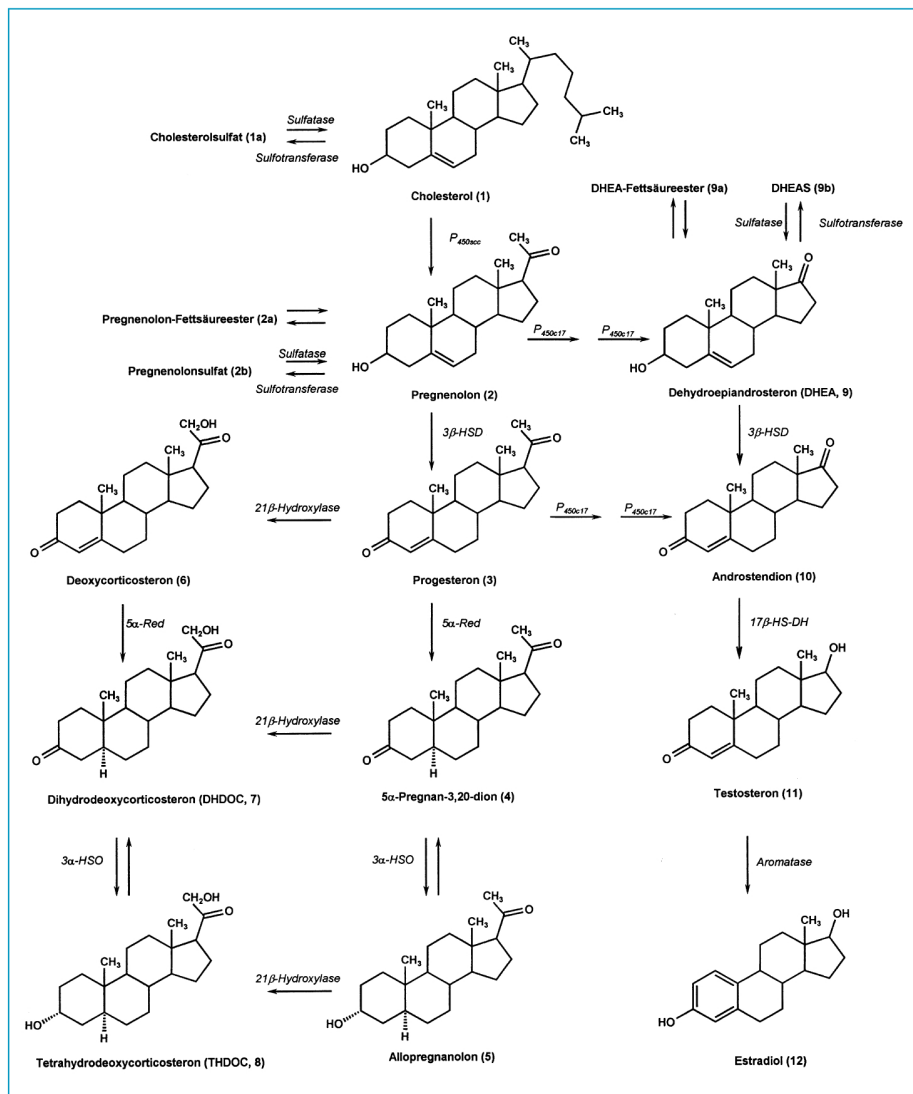


Fig. 1: Biosynthesis of neuroactive steroids, Weiss M & Hess S, 2000

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
KM2000LA	MOPHA A	Mobile phase A	1000 ml
KM2000LB	MOPHA B	Mobile phase B	1000 ml
KM2000KA	CAL	Calibrator (lyophilized, see label for concentration)	5 vials (each 300 µl)
KM2000KO	CTRL 1 CTRL 2	Control 1 and 2 (lyophilized, see product specification for concentration)	5 vials (each 300 µl)
KM2000FR	PREC	Precipitation solution (-20°C, contains internal standard)	50 ml
KM2000DIL	DIL	Dilution solution (see sample preparation)	120 ml
	RECSOL	Reconstitution solution	15 ml

As a first step for the application of the Immundiagnostik AG pregnenolone sulfate LC-MS/MS-Kit, a tuning is necessary to estimate the optimal LC-MS/MS-settings as well as to assess the sufficiency of the sensitivity.

The UPLC separation column (KM2000RP) can be ordered separately from Immundiagnostik AG.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- 1.5 ml Eppendorf reaction tubes
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10–1000 µl
- Cooling centrifuge at 4°C for 1.5 ml Eppendorf reaction tubes and capable of 10000 g
- Vortex-Mixer
- LC-MS/MS-Equipment
- RP-C18 column, e.g. Acquity BEH 18, 1,7 µm (2,1 x 50 mm)

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

The controls (CTRL 1 and CTRL 2), calibrator (CAL) and precipitation solution (PREC) are stable at -20°C until the expiry date. All other test reagents are stable until the expiry date when stored at 2–8°C.

Calibrator and controls

Dissolve **calibrator** (CAL) and **controls** (CTRL1, CTRL2) in 300 µl of reconstitution solution (RECSOL).

6. SAMPLE PREPARATION

Serum and EDTA-plasma samples are suited for the assay.

Control samples should be analyzed with each run.

1.	Prior to use in the assay allow all samples and reagents, except for the precipitation solution (PREC), to come to room temperature (18–26 °C). Mix well samples and reagents before use
2.	Pipette into 1.5 ml Eppendorf reaction tubes: 200 µl Sample, Calibrator (CAL) or Control (CTRL 1, CTRL 2) + 400 µl -20 °C cold precipitation solution (PREC incl. internal standard), mix well
3.	Leave the samples for 15 minutes at 2–8 °C and then centrifuge for 15 minutes at 4 °C and 10000 g
4.	Dilute the supernatant with DIL 1:50 (e.g. 10 µl supernatant + 490 µl DIL) and transfer into LC-MS/MS suitable vials

7. CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS

UPLC method

Column material:	e.g. Acquity BEH C18; 1.7 µm
Column dimension:	2.1 x 50 mm
Flow rate:	0.5 ml/min
Column temperature:	45 °C
Injection volume:	50 µl
Running time:	3.5 min

Gradient:	0 min	70 % A	30 % B
	0.5 min	70 % A	30 % B
	1.0 min	50 % A	50 % B
	1.5 min	0 % A	100 % B
	3.5 min	0 % A	100 % B

It is recommended that a guard column/filter is used to extend column's life.

After the analysis, the separation column should be washed with ca. 20 ml of 50 % methanol. The column can be stored in 50 % methanol.

8. MS/MS METHOD

The MS/MS method listed here is an example for a Waters Quattro Premier XE tandem mass spectrometer.

Mode:	MRM
Polarity:	ESI-
Capillary (kV):	0.5
Cone (V):	var.
Extractor (V):	4
RF Lens (V):	0.2
Source Temperature (°C):	130
Desolvation Temperature (°C):	500
Cone Gas Flow (L/Hr):	50
Desolvation Gas Flow (L/Hr):	950
Collision Gas Flow (mL/Min):	0.25

MRM transitions (m/z)

Pregnenolone sulfate

395.33 > 97,18	Cone voltage: 50	Collisions energy: 35
395.33 > 80,17	Cone voltage: 50	Collisions energy: 90

Internal Standard pregnenolone sulfate-d6:

399,4 > 97,05	Cone voltage: 50	Collisions energy: 35
399,4 > 80,11	Cone voltage: 50	Collisions energy: 90

9. CALCULATION

$$\frac{\text{peak intensity sample} \times \text{calibrator concentration}}{\text{peak intensity internal standard of the sample}} \times F = \text{sample concentration}$$

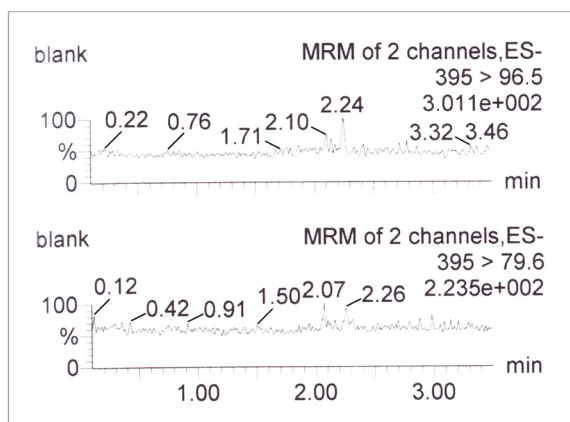
$$F = \frac{\text{peak intensity internal standard of calibrator}}{\text{peak intensity calibrator}}$$

Note: The peak area can be used as an alternative to the peak intensity for analysis.

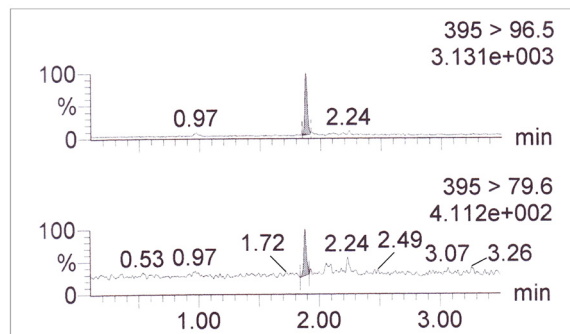
10. EXAMPLES OF CHROMATOGRAMS

Examples of chromatograms for pregnenolone sulfate

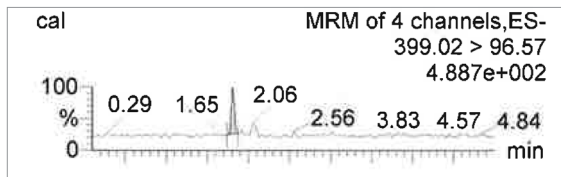
Blank:



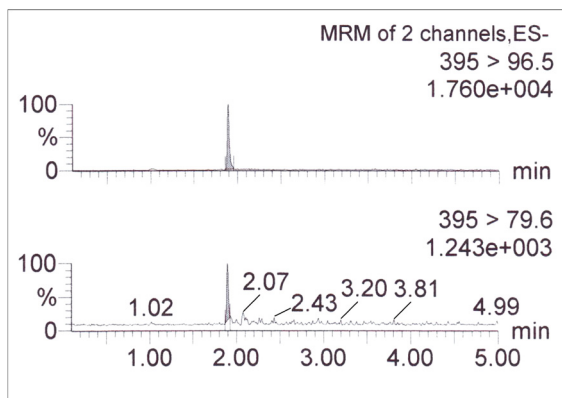
Calibrator:



Internal standard



Sample:



11. QUALITY CONTROL

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.

Normal range

EDTA plasma and serum

11.8–115 ng/ml

We recommend each laboratory to establish its own norm concentration range.

12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 10)

Sample	Pregnenolon sulfate [ng/ml]	CV [%]
1	17.5	7.6

Inter-Assay (n = 6)

Sample	Pregnenolon sulfate [ng/ml]	CV [%]
1	17.2	7.5
2	150.7	4.8

13. PRECAUTIONS

- For in vitro diagnostic use only.
- The quality control guidelines should be followed.
- Human material used in the kit components was 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.

14. TECHNICAL HINTS

- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

15. DISPOSAL

Mobile phases (MOPHA A, MOPHA B) dilution solution (DIL) and precipitation reagent (PREC) must be disposed as non-halogenated solvents.

16. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- 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.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be lodged within 14 days after receipt of the product. The product shall be send to Immundiagnostik AG together with a written complaint.

17. REFERENCES

1. Hu, Z Y, Bourreau, E, Jung-Testas, I, Robel, P, Baulieu, E E: Neurosteroids: oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone, *Proc Natl Acad Sci USA* **84** (1987), 8215-8219
2. Rupprecht, R, Holsboer, F: Neuroactive steroids: mechanism of action and neuropsychological perspectives, *Trends Neurosci* **22** (1999), 410-416
3. Mehta, A K, Ticku, M K: An update on GABAA receptors, *Brain Res Brain Res Rev* **29** (1999), 196-217
4. Lambert, J J, Belelli, D, Hill-Venning, C, Peters, J A: Neurosteroids and GABAA receptor function, *Trends Pharmacol Sci* **16** (1995), 295-303
5. Park-Chung, M, Malayev, A, Purdy, R H, Gibbs, T T, Farb, D H: Sulfated and unsulfated steroids modulate γ -aminobutyric acidA receptor function through distinct sites, *Brain Res* **830** (1999), 72-87
6. Monaghan, E P, Navalta, L A, Shum, L, Ashbrook, D W, Lee, D A: Initial human experience with ganaxolone, a neuroactive steroid with antiepileptic activity, *Epilepsia* **38** (1997), 1026-1031
7. Weiss M & Hess S: Neuroaktive Steroide: Wirkungen und Risiken, *Pharmazie in unserer Zeit* **29. Jahrg** (2000) 6: 372-376
8. Jäntti SE, Tammimäki A, Raattamaa H, Piepponen P, Kostiaainen R, Ketola RA: De-termination of steroids and their intact glucuronide conjugates in mouse brain

by capillary liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* **82** (2010) Apr 15; (8):3168-75

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



To be used with



Manufacturer



Contains sufficient for <n> tests



Lot number



Use by



Attention