

Vitamin A/E HPLC Kit

Zur Bestimmung von Vitamin A/E in Plasma und Serum

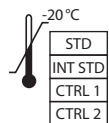
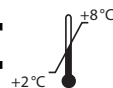
For the determination of vitamin A/E in plasma and serum

Gültig ab / Valid from 2016-03-23

REF **KC1600**



IVD



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. TESTPRINZIP	2
4. INHALT DER TESTPACKUNG	3
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	4
7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	4
8. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	5
9. TESTDURCHFÜHRUNG	5
Hinweise	5
Arbeitsschema	5
Chromatographische Bedingungen	6
10. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE	6
11. AUSWERTUNG	6
Berechnung	6
Musterchromatogramm	7
12. EINSCHRÄNKUNGEN	7
13. QUALITÄTSKONTROLLE	7
Referenzwerte	7
14. TESTCHARAKTERISTIKA	8
Präzision und Reproduzierbarkeit	8
Linearität	8
Nachweisgrenze	8
Wiederfindung	8
15. ENTSORGUNG	8
16. MASSNAHMEN BEI STÖRUNGEN	9
17. LITERATUR	10
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	10

1. VERWENDUNGSZWECK

Diese HPLC-Applikation ist für die Bestimmung von Vitamin A/E in Serum und Plasma geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Die Vitamine A und E gehören zu den fettlöslichen Vitaminen und können über einen längeren Zeitraum im Fettgewebe gespeichert werden. Sowohl Über- als auch Unterversorgung von den Vitaminen A und E können sich in Beschwerden äußern.

Vitamin A (Retinol) ist für den Sehprozess unerlässlich und hält die Haut und Schleimhäute gesund. Ein Mangel an Vitamin A kann daher Einfluss auf die Sehkraft haben, besonders bei Übergängen von hell zu dunkel. Ein schwerer Vitamin-A-Mangel kann zur Erblindung führen. Bei zu hohen Dosen kann es aber auch pathologisch wirken und Kopfschmerzen, Hautveränderungen, Leberschädigungen, schmerzhafte Skelettveränderungen und Fruchtschädigungen verursachen.

Das Vitamin E (Tocopherol) schützt als natürliches Antioxidans die ungesättigten Fettsäuren vor der Oxidation. Es fängt die Radikale ab, bevor sie zerstörend auf die Zelle einwirken können.

Ein Mangel an Vitamin E zeigte im Tierversuch eine Schädigung der Muskulatur, des Nervensystems und Herzens, der Leber und der Fortpflanzung. Beim Menschen wurden derartige Auswirkungen nicht beobachtet. Vitamin E kann in großen Mengen im Fettgewebe gespeichert werden. Zu einer Unterversorgung kann es durch eine gestörte Fettverdauung oder -resorption kommen.

3. TESTPRINZIP

Zur Bestimmung der Vitamine A und E wird im ersten Schritt eine sehr einfache Probenvorbereitung durchgeführt. Den Serum- bzw. Plasmaproben wird der interne Standard zugegeben. Danach erfolgt in einem Fällungsschritt die Abtrennung höhermolekularer Substanzen.

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 bei zwei verschiedenen Wellenlängen (Vitamin A: 325 nm; Vitamin E: 300 nm). Die Trennung benötigt ca. 15 Minuten für einen Lauf. Die Quantifizierung erfolgt über den mitgelieferten Standard und die Berechnung der Ergebnisse wird über die „interne Standard-Methode“ anhand der Integration der Peakfläche/-höhe durchgeführt.

Zusammenfassung

Der hier vorliegende Komplettkit zur Bestimmung der Vitamine A/E ermöglicht eine einfache, schnelle und präzise quantitative Bestimmung. Dieser Komplettkit enthält gebrauchsfertige Reagenzien und Verbrauchsmaterialien für die Aufbereitung der Proben und die analytische HPLC-Trennung.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KC1600LM	MOPHA	Laufmittel	1000 ml
KC1600ST	STD	Standard (Konzentration siehe Etikett)	10 ml
KC1600IS	INT STD	Interner Standard	5 ml
KC1600FR	PREC	Fällungsreagenz	50 ml
KC1600VL	DIL	Verdünnungslösung	10 ml
KC1600KO	CTRL 1 CTRL 2	Kontrolle 1 und 2 (600 µl lyoph.; Konzentration siehe Produktspezifikation)	2 x 3 Fläschchen

Die HPLC-Trennsäule (KC1600RP) 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

- Reinstwasser*
- 1,5-ml-Reaktionsgefäße (z. B. Eppendorf)
- Zentrifuge
- div. Pipetten (100 µl, 1000 µl)
- Wirbelmischer
- HPLC-Gerät mit UV-Detektor
- *reversed phase* C18-Säule

* 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 > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C ($\geq 18,2$ MΩ cm).

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Die lyophilisierten Kontrollen 1 und 2 (**CTRL 1 und CTRL 2**) sind bei -20 °C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor Gebrauch werden sie in je 600 µl Reinstwasser resuspendiert. Der Gehalt an Vitamin A/E ändert sich geringfügig von Charge zu Charge, der genaue Gehalt ist der Produktspezifikation zu entnehmen.
- Der Standard (**STD**) ist bei -20 °C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Der Gehalt an Vitamin A/E ändert sich geringfügig von Charge zu Charge, der genaue Gehalt ist auf dem Etikett angegeben.
- Der interne Standard (**INT STD**) ist bei -20 °C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei 2–8 °C zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Kontrolle 1 und 2 (CTRL 1 und CTRL 2) sind auf Humanplasma aufgebaut. Sie sind auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befunden 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. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Als Patientenprobe ist Plasma und Serum geeignet. Die Probe sollte in jedem Fall sofort nach der Abnahme kühl gelagert werden. Die Probe kann bei 2–8°C mind. 12 Stunden (Vitamin A) bzw. 3 Tage (Vitamin E) gelagert werden und ist bei -20°C 1 Monat (Vitamin A) bzw. mind. 3 Monate (Vitamin E) stabil.

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettivolumen 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.

Arbeitsschema

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

	Standard:	Proben bzw. Kontrollen :
1.	250 µl Standard (STD)	250 µl Serumprobe bzw. Kontrollen (CTRL 1 und 2)
2.	+ 50 µl interner Standard (INT STD)	+ 50 µl interner Standard (INT STD)
3.	+ 250 µl Verdünnungslösung (DIL)	
4.	+ 250 µl Fällungsreagenz (PREC)	+ 500 µl Fällungsreagenz (PREC)
5.	Gut mischen, 30 min bei 4°C inkubieren und 10 min bei 10.000 g zentrifugieren	
6.	100 µl in HPLC-System injizieren.	

Chromatographische Bedingungen

Säulenmaterial:	Nucleosil C18; 10 µm
Säulendimension:	125 mm × 4 mm
	0,8–1,2 ml/min
Fluss:	(der genaue Fluss ist auf der Produktspezifikation der jeweiligen Säule angegeben)
UV-Detektion:	Vitamin A: 325 nm Vitamin E: 300 nm
Injektionsvolumen:	100 µl
Laufzeit/Chromatogramm:	15 min
Temperatur:	30 °C
Die Umschaltung erfolgt nach ca 7 min.	

Um Verschleppungen von Probe zu Probe auszuschließen ist als Spülflüssigkeit im Autosampler Laufmittel zu verwenden.

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

10. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE

Die Säule kann nach der Analyse im Laufmittel (MOPHA) belassen werden. Vor der Analyse sollte das System mit 30 ml Laufmittel (MOPHA) erst ohne, dann mit der Säule äquilibriert werden.

11. AUSWERTUNG

Berechnung

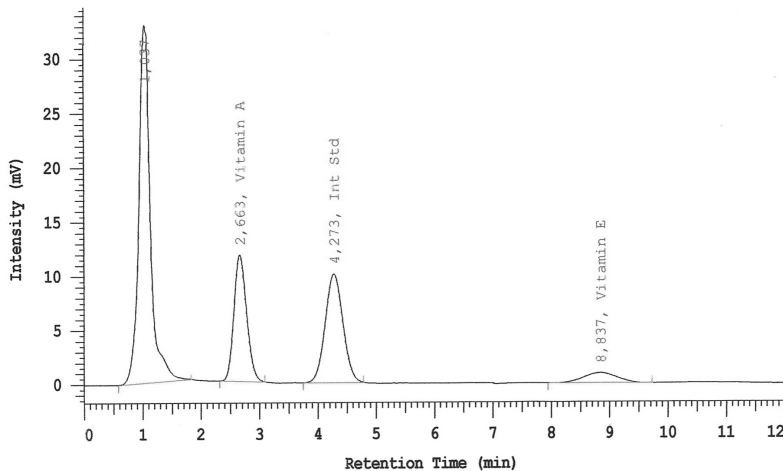
$$\frac{\text{Peakhöhe Probe} \times \text{Konzentration des Standards}^*}{\text{Peakhöhe Interner Standard der Probe}} \times F = \text{Konzentration Probe}$$

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

* siehe Etikett

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

Musterchromatogramm



12. EINSCHRÄNKUNGEN

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

13. QUALITÄTSKONTROLLE

Referenzwerte

Vitamin A: 200–800 µg/l

Vitamin E: 3–14 mg/l

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren, da Referenzbereiche stark von der Auswahl des Probandenkollektivs abhängig sind. Die Angabe des Referenzbereichs 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

Vitamin A:	1,9 % (0,55 mg/l)	[n = 6]
Vitamin A:	1,2 % (1,18 mg/l)	[n = 6]
Vitamin E:	1,5 % (9,0 mg/l)	[n = 6]
Vitamin E:	1,1 % (14,9 mg/l)	[n = 6]

Inter-Assay-VK

Vitamin A:	4,9 % (0,6 mg/l)	[n = 8]
Vitamin A:	3,1 % (1,0 mg/l)	[n = 8]
Vitamin E:	4,6 % (8,3 mg/l)	[n = 8]
Vitamin E:	4,7 % (24 mg/l)	[n = 8]

Linearität

Vitamin A:	bis zu 10 mg/l
Vitamin E:	bis zu 50 mg/l

Nachweisgrenze

Vitamin A:	0,05 mg/l
Vitamin E:	1 mg/l

Wiederfindung

Vitamin A:	98,8 %
Vitamin E:	101 %

15. ENTSORGUNG

Das Laufmittel (MOPHA), Fällungsreagenz (PREC), der interne Standard (INT STD) und der Standard (STD) 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. LITERATUR

1. Sushil K.J., Mc Coy B., Wise R. (1994). Vitamin E and the hypercoagulability of neonatal blood. *Clin Cim Acta* **225**; 97-103.
2. Comstock G.W., Alberg A.J., Helzlsouer K.J. (1993). Reported effects of long-term freezer storage on concentrations of retinol, β -carotene, and α -tocopherol in serum or plasma summarised. *Clin Chem* **39**/6; 1075-1078

14. 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.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Zu verwenden mit



Hersteller



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Chargenbezeichnung



Verwendbar bis



Achtung

Vitamin A/E HPLC Kit

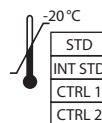
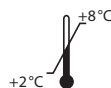
For the determination of vitamin A/E in plasma and serum

Valid from 2016-03-23

REF **KC1600**



IVD



STD
INT STD
CTRL 1
CTRL 2



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. PRINCIPLE OF THE TEST 15

4. MATERIAL SUPPLIED 16

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED 16

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS 16

7. PRECAUTIONS 17

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION 17

9. ASSAY PROCEDURE 17

Procedural notes 17

Sample and standard 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

14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS 20

Precision and reproducibility 20

Linearity 21

Detection limit 21

Recovery 21

15. DISPOSAL 21

16. TROUBLESHOOTING 21

17. REFERENCES 22

18. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE 23

1. INTENDED USE

This HPLC application is intended for the quantitative determination of vitamin A/E in serum and plasma. This assay is designed for *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Vitamin A (Retinol) and vitamin E (tocopherol) are fat-soluble vitamins, which can be stored for longer periods in the adipose tissue. Both, lack and excess, can express in complaints.

Vitamin A is essential for the visual process and recovers the skin and mucosa. A lack of vitamin A will reduce the visual power up to total blindness. An excess of vitamin A could cause headache, damage of the skin, liver disease, painful alteration in the skeleton or foetal damage.

Vitamin E (tocopherol) is an antioxidant and protects unsaturated fatty acids against oxidation. It also protects the cells of the body by catching radicals.

A lack of vitamin E in animal experiments demonstrates diseases of muscle, nervous system, heart, liver and reproduction system. These symptoms were not observed in humans. Vitamin E can be stored in the adipose tissue in large amounts. A lack can be caused by a malfunction in digestion or resorption of fatty acids.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The first step in the determination of vitamin A and E includes the sample preparation. In the first step an internal standard solution is added. During the precipitation higher molecular substances are removed. After centrifugation the supernatant is used for injection 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 detection is performed by an UV detector at two different wavelengths (Vitamin A: 325 nm; Vitamin E: 300 nm). The quantification is performed with the delivered standard solution; the concentration is calculated via integration of the peak areas/heights in the internal standard calibration mode.

Summary

The application of vitamin A and E for HPLC allows the determination of both vitamins in an easy, fast, and precise method. The kit includes reagents in ready to use form for preparation and separation of the samples with exception of the columns.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
KC1600LM	MOPHA	Mobile phase	1000 ml
KC1600ST	STD	Standard (see label for concentration)	10 ml
KC1600IS	INT STD	Internal Standard	5 ml
KC1600FR	PREC	Precipitation reagent	50 ml
KC1600VL	DIL	Dilution solution	10 ml
KC1600KO	CTRL 1 CTRL 2	Control 1 and 2; 600 µl lyoph. (see specification for concentration)	2 x 3 vials

The HPLC column (KC1600RP) 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

- Ultra pure water*
- 1.5 ml reaction tubes (Eppendorf)
- Centrifuge
- Various pipettes
- HPLC with UV-detector
- Reversed phase C18-column

* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure 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

- The lyophilised controls 1 and 2 (**CTRL 1 and CTRL 2**) are stable at -20 °C until the expiry date stated on the label. Before use, they have to be reconstituted with each 600 µl ultra pure water. The concentration of vitamin A/E slightly changes from lot to lot, the exact concentration is stated on the specification.
- The standard (**STD**) is stable at -20 °C until the expiry date stated on the label. The concentration of vitamin A/E slightly changes from lot to lot, the exact concentration is stated on the label.
- The internal standard (**INT STD**) is stable at -20 °C until the expiry date stated on the label.

- All other test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at 2–8°C.

7. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- This product contains 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.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on kit label.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum and EDTA plasma are suited as samples. The sample is light and temperature sensitive; therefore samples have to be protected from light and cooled and centrifuged immediately. The samples are stable in the dark at 2–8°C for 12 h (vitamin A) and 48 h (vitamin E). At -20°C, vitamin A is stable for 1 month, vitamin E for 3 months.

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- The quality control guidelines should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure, that are not coordinated with the producer, may influence the test results. Immundiagnostik can therefore not be held reliable for any damage resulting from this.
- The assay should always be performed due to the manual which is given in the kit.

Sample and standard preparation

Pipet into 1.5 ml reaction tubes:

	Standard:	Samples and controls
1.	250 µl standard (STD)	250 µl sample or controls (CTRL1 and 2)
2.	+ 50 µl internal standard (INT STD)	+ 50 µl internal standard (INT STD)
3.	+ 250 µl dilution solution (DIL)	
4.	+ 250 µl precipitation reagent (PREC)	+ 500 µl precipitation reagent (PREC)
5.	Mix well. Leave the tubes for 30 minutes at 2–8 °C and centrifuge afterwards at 10 000 g for 10 minutes.	
6.	Inject 100 µl of the supernatant for chromatography into the HPLC-system.	

Chromatographic conditions

Column material: Nucleosil C18; 10 µm

Column dimension: 125 mm × 4 mm

Flow rate: 0.8–1.2 ml/min

Please refer to the quality certificate of the column

UV detection: Vitamin A: 325 nm

Vitamin E: 300 nm

Injection volume: 100 µl

Running time: 15 min

Temperature: 30 °C

The wavelength should be switched after 7 min.

To avoid contamination of the next run, mobile phase (MOPHA) must be used to wash the auto sampler.

Immundiagnostik recommends to use a guard-column to enlarge lifetime of the column.

10. TREATMENT OF THE COLUMN

After analysis, the column could be left in mobile phase (MOPHA). Before use, the system should be equilibrated with ca. 30 ml mobile phase (MOPHA), first without, then with the column.

11. RESULTS

Calculation

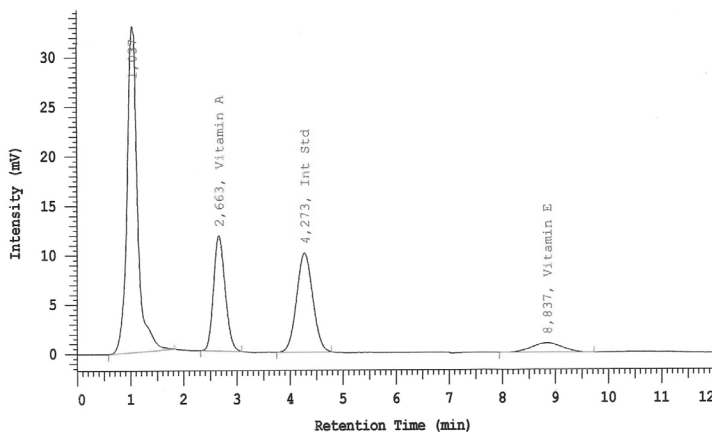
$$\frac{\text{Peak height sample} \times \text{concentration standard}^*}{\text{Peak height internal standard in the sample}} \times F = \text{concentration of the sample}$$

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

* see label

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

Typical chromatogram



12. LIMITATIONS

Hemolytic and lipemic samples should not be measured.

13. QUALITY CONTROL

Expected values

Vitamin A: 200–800 µg/l

Vitamin E: 3–14 mg/l

We recommend each laboratory to establish an own reference range as reference ranges depend on the chosen subjects. The above mentioned values are meant to be a guideline only and can deviate 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

Intra-Assay VK

Vitamin A: 1.9 % (0.55 mg/l) [n = 6]

Vitamin A: 1.2 % (1.18 mg/l) [n = 6]

Vitamin E: 1.5 % (9.0 mg/l) [n = 6]

Vitamin E: 1.1 % (14.9 mg/l) [n = 6]

Inter-Assay VK

Vitamin A: 4.9 % (0.6 mg/l) [n = 8]

Vitamin A: 3.1 % (1.0 mg/l) [n = 8]

Vitamin E: 4.6 % (8.3 mg/l) [n = 8]

Vitamin E: 4.7 % (24 mg/l) [n = 8]

Linearity

Vitamin A: up to 10 mg/l

Vitamin E: up to 50 mg/l

Detection limit

Vitamin A: 0.05 mg/l

Vitamin E: 1 mg/l

Recovery

Vitamin A: 98.8 %

Vitamin E: 101 %

15. DISPOSAL

Mobile phase (MOPHA), precipitation reagent (PREC), internal standard (INT STD) and standard (STD) must be disposed as non-halogenated solvent.

Please refer to the appropriate national guidelines.

16. TROUBLESHOOTING

Problem	Possible reasons	Solution
No signal	No or defect connection to evaluation system.	Check signal cord and connection.
	Detector lamp is altered	Change lamp
No peaks	Injector is congested	Check injector
Double peaks	Dead volume in fittings and/or column	Renew fittings and/or column

Problem	Possible reasons	Solution
Contaminating peaks	Injector dirty	Clean injector
	Contamination at the head of the column	Change direction of the column and rinse for 30 min at low flow rate (0.2 ml/min) with mobile phase
	Air in the system	Degas pump
	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 calm	Pump delivers imprecise	Check pump, degas the system
	Detector flow cell is dirty	Clean flow cell

17. REFERENCES

1. Sushil K.J., Mc Coy B., Wise R. (1994). Vitamin E and the hypercoagulability of neonatal blood. *Clin Cim Acta* **225**; 97-103.
2. Comstock G.W., Alberg A.J., Helzlsouer K.J. (1993). Reported effects of long-term freezer storage on concentrations of retinol, β -carotene, and α -tocopherol in serum or plasma summarised. *Clin Chem* **39**/6; 1075-1078

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 to be used for *in vitro* diagnostic use only.
- The reagents should not be used after the date of expiry stated on the label.
- Single components with different lot numbers should not be mixed or exchanged.
- The guidelines for medical laboratories should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure, that are not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held reliable for any damage resulting from this.

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		