

Arbeitsanleitung / Manual

*Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal /
For professional use only*

Vitamin A/E HPLC Kit

Zur Bestimmung von Vitamin A/E in Plasma und Serum

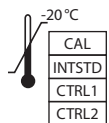
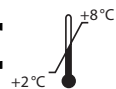
For the determination of vitamin A/E in plasma and serum

Gültig ab / Valid from 2023-08-28

REF **KC1600**



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

Sicherheitshinweise

Dieses Zubehör ist ausschließlich nach der beigefügten Arbeitsanleitung zu nutzen. Wichtige Sicherheitshinweise zu diesem Produkt sind dem Kapitel 16 zu entnehmen.

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. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	4
8. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Arbeitsschema</i>	5
<i>Chromatographische Bedingungen</i>	5
9. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE	5
10. AUSWERTUNG	6
<i>Berechnung</i>	6
<i>Musterchromatogramm</i>	6
11. EINSCHRÄNKUNGEN	6
12. QUALITÄTSKONTROLLE	6
<i>Referenzwerte</i>	6
13. TESTCHARAKTERISTIKA	7
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	7
<i>Linearität</i>	7
<i>Nachweisgrenze</i>	7
<i>Wiederfindung</i>	7
14. ENTSORGUNG	8
15. MASSNAHMEN BEI STÖRUNGEN	8
16. VORSICHTSMASSNAHMEN	9
17. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	9
18. LITERATUR	10
19. SYMBOLE	11

1. ZWECKBESTIMMUNG

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. 8 Minuten für einen Lauf. Die Quantifizierung erfolgt über den mitgelieferten Kalibrator und die Berechnung der Ergebnisse wird über die „interne Standard-Methode“ anhand der Integration der 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
KC1600	MOPHA	Laufmittel, gebrauchsfertig (Wichtig: nicht rezirkulieren)	1 000 ml
	INTSTD	Interner Standard, gebrauchsfertig	5 ml
	PREC	Fällungsreagenz, gebrauchsfertig	50 ml
	CAL	Kalibrator, lyophilisiert	4 x
	CTRL1	Kontrolle 1, lyophilisiert	4 x
	CTRL2	Kontrolle 2, lyophilisiert	4 x
K 0005.15	RECSOL	Rekonstitutionslösung	15 ml

Die HPLC-Trennsäule (KC1600RP), kann separat bei Immundiagnostik AG bestellt werden. Um die Lebensdauer Ihrer HPLC-Trennsäule zu verlängern, sollten idealerweise Vorsäulen (KC1600VS) verwendet werden. Diese und auch die Vorsäulenhalter (KC1600VH) können ebenfalls bei Immundiagnostik AG 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
- div. Pipetten (100 µl, 1 000 µl)
- Vortex-Mischer
- HPLC-System mit UV-Detektor
- Reversed phase C18-Säule

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Die lyophilisierten Kontrollen (**CTRL1 und CTRL2**) sind bei -20°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor Gebrauch werden sie in x µl Rekonstitutionslösung (**RECSOL**) resuspendiert (x= siehe Produktspezifikation). Der Gehalt an Vitamin A/E ändert sich geringfügig von Charge zu Charge, der genaue Gehalt ist der Produktspezifikation zu entnehmen.
- Der lyophilisierte Kalibrator (**CAL**) ist bei -20°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor Gebrauch in x µl Rekonstitutionslösung (**RECSOL**) resuspendieren (x= siehe Produktspezifikation). Der Gehalt an Vitamin A/E ändert sich geringfügig von Charge zu Charge, der genaue Gehalt ist der Produktspezifikation zu entnehmen.
- Der interne Standard (**INTSTD**) 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. 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.

8. TESTDURCHFÜHRUNG

Arbeitsschema

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

1.	250 µl Probe bzw. Kalibrator (CAL) und Kontrollen (CTRL1 und CTRL2)
2.	50 µl interner Standard (INTSTD) zugeben
4.	500 µl Fällungsreagenz (PREC) zugeben
5.	Gut mischen, 30 min bei 2–8 °C inkubieren und 5 min bei 10.000 g zentrifugieren
6.	100 µl in HPLC-System injizieren.

Chromatographische Bedingungen

Säulenmaterial:	Nucleosil C18; 10 µm alternativ: VDSpher PUR C18 M-E; 10 µm
Säulendimension:	125 mm × 4 mm
Fluss:	2,0 ml/min
UV-Detektion:	Vitamin A: 325 nm Vitamin E: 300 nm
Injektionsvolumen:	100 µl
Laufzeit/Chromatogramm:	8 min
Temperatur:	30 °C
Die Umschaltung erfolgt nach ca 4 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.

9. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE

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

10. AUSWERTUNG

Berechnung

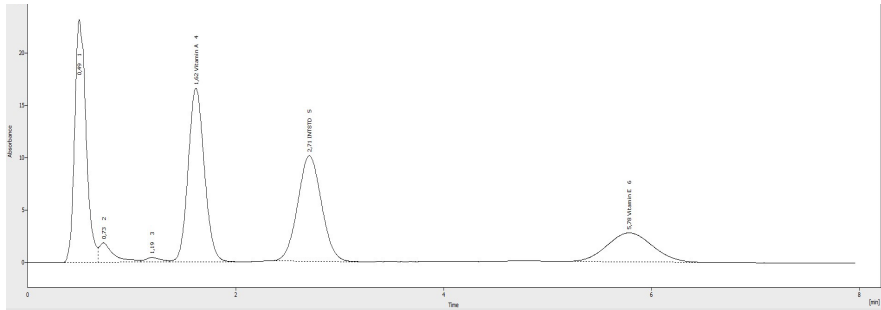
$$\frac{\text{Peakhöhe Probe} \times \text{Konzentration des Standards}^*}{\text{Peakhöhe Interner Standard der Probe}} \times F = \text{Konzentration Probe}$$

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

* siehe Etikett

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

Musterchromatogramm



11. EINSCHRÄNKUNGEN

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

12. 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.

13. 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 %

14. ENTSORGUNG

Das Laufmittel (**MOPHA**), Fällungsreagenz (**PREC**) und der interne Standard (**INT-STD**) 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

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

16. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Kalibrator (**CAL**) und Kontrollen (**CTRL1** und **CTRL2**) 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.
- Reagenzien dieser Testpackung enthalten organische Lösungsmittel. Berührungen mit der Haut oder den Schleimhäuten sind zu vermeiden.

17. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Sämtliche in der Testpackung enthaltene Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik eingesetzt werden.
- Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden (Verfallsdatum siehe Testpackung).
- Einzelkomponenten mit unterschiedlichen Lot-Nummern aus verschiedenen Testpackungen nicht mischen oder austauschen.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.

- Für die Qualitätskontrolle sind die dafür erstellten Richtlinien für medizinische Laboratorien 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, zurückzusenden.
- Qualitätskontrollen immer mitmessen.
- Die Bestimmung ist immer nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Schwerwiegende Vorfälle im Zusammenhang mit dem Testkit sind der Immundiagnostik AG sowie der nationalen Aufsichtsbehörde zu melden

18. 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

19. SYMBOLE

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	<i>In-Vitro</i> -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

Vitamin A/E HPLC Kit

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

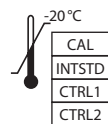
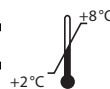
Valid from 2023-08-28

REF **KC1600**



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

Safety information

These accessories are to be used exclusively in accordance with the enclosed instructions for use. Important safety information for this product can be found in chapter 16.

Table of Contents

1. INTENDED PURPOSE	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. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	17
8. ASSAY PROCEDURE	17
<i>Sample and standard preparation</i>	17
<i>Chromatographic conditions</i>	18
9. TREATMENT OF THE COLUMN	18
10. RESULTS	18
<i>Calculation</i>	18
<i>Typical chromatogram</i>	19
11. LIMITATIONS	19
12. QUALITY CONTROL	19
<i>Expected values</i>	19
13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	20
<i>Precision and reproducibility</i>	20
<i>Linearity</i>	20
<i>Detection limit</i>	20
<i>Recovery</i>	20
14. DISPOSAL	20
15. TROUBLESHOOTING	21
16. PRECAUTIONS	22
17. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	22
18. REFERENCES	23
19. SYMBOLS	23

1. INTENDED PURPOSE

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 and E belong to the fat-soluble vitamins and can be stored in the fatty tissue over a longer period of time. Both an over- and an undersupply of vitamins A and E can manifest themselves in complaints.

Vitamin A (retinol) is essential for the visual process and keeps the skin and mucous membranes healthy. A deficiency of vitamin A can therefore have an impact on vision, especially during transitions from light to dark. A severe vitamin A deficiency can lead to blindness. Too high doses however, can also have a pathological effect and cause headaches, skin changes, liver damage, painful skeletal changes and damage to the foetus.

Vitamin E (tocopherol) is a natural antioxidant that protects unsaturated fatty acids from oxidation. It intercepts the radicals before they can have a destructive effect on the cell. A deficiency of vitamin E showed damage to the musculature, nervous system and heart, liver and reproduction in animal experiments. In humans such effects have not been observed. Vitamin E can be stored in large quantities in fatty tissue. An undersupply can occur due to impaired fat digestion or absorption.

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 8 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 calibrator; 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
KC1600	MOPHA	Mobile phase, ready-to-use (important: do not recirculate)	1 000 ml
	INTSTD	Internal standard, ready-to-use	5 ml
	PREC	Precipitation reagent, ready-to-use	50 ml
	CAL	Calibrator, lyophilised	4 x
	CTRL1	Control 1, lyophilised	4 x
	CTRL2	Control 2, lyophilised	4 x
K 0005.15	RECSOL	Reconstitution solution	15 ml

The HPLC column (KC1600RP), can be ordered separately from Immundiagnostik AG. To extend the lifetime of your HPLC column, pre-columns (KC1600VS) are highly recommended. These and also the pre-column holders (KC1600VH) can also be ordered from Immundiagnostik AG.

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

- 1.5 ml reaction tubes (Eppendorf)
- Centrifuge
- Various pipettes (100 µl, 1 000 µl)
- Vortex
- HPLC system with UV-detector
- Reversed phase C18-column

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- The lyophilised controls (**CTRL1** and **CTRL2**) are stable at -20°C until the expiry date stated on the label. Before use, they have to be reconstituted each with xµl reconstitution solution (**RECSOL**) (x= please see product specification). The concentration of vitamin A/E slightly changes from lot to lot, the exact concentration is stated in the product specification.

- The lyophilised calibrator (**CAL**) is stable at -20°C until the expiry date stated on the label. Before use, it has to be reconstituted with xµl reconstitution solution (**RECSOL**) (x= please see product specification). The concentration of vitamin A/E slightly changes from lot to lot, the exact concentration is stated in the product specification.
- The internal standard (**INTSTD**) 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. 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 3 days (vitamin E). Vitamin A is stable for 1 month, vitamin E for at least 3 months when stored at -20°C.

8. ASSAY PROCEDURE

Sample and standard preparation

Pipet into 1.5 ml reaction tubes:

1.	250 µl sample, calibrator (CAL) and controls (CTRL1 and CTRL2)
2.	Add 50 µl internal standard (INTSTD)
4.	Add 500 µl precipitation reagent (PREC)
5.	Mix well, incubate for 30 minutes at 2–8°C and then centrifuge at 10 000 g for 5 minutes .
6.	Inject 100 µl of the supernatant for chromatography into the HPLC system.

Chromatographic conditions

Column material:	Nucleosil C18; 10 µm alternatively: VDSpher PUR C18 M-E; 10 µm
Column dimension:	125 mm × 4 mm
Flow rate:	2.0 ml/min
UV detection:	Vitamin A: 325 nm Vitamin E: 300 nm
Injection volume:	100 µl
Running time:	8 min
Temperature:	30 °C
Switch the wavelength after approx. 4 min.	

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

Immundiagnostik AG recommends to use a pre-column to extend the lifetime of the column.

9. TREATMENT OF THE COLUMN

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

10. RESULTS

Calculation

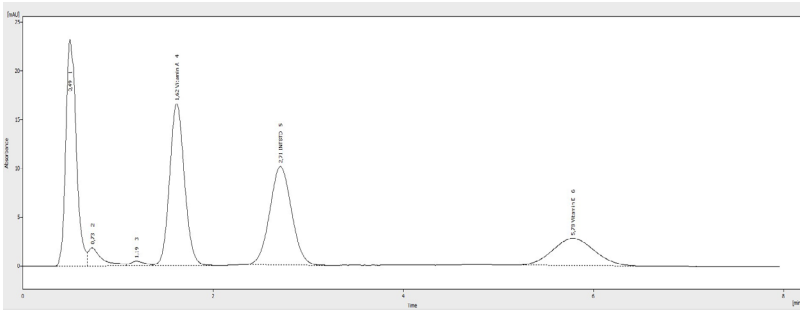
$$\frac{\text{Peak height sample} \times \text{concentration standard}^*}{\text{Peak height internal standard in the sample}} \times F = \text{concentration of the sample}$$

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

* see label

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

Typical chromatogram



11. LIMITATIONS

Strongly haemolytic as well as lipaemic samples sometimes show wrong concentrations. We therefore advise against measuring such samples.

12. 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 analysed 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 acceptance limits, the results for the patient sample may not be valid.

13. 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 %

14. DISPOSAL

Mobile phase (**MOPHA**), precipitation reagent (**PREC**) and internal standard (**INTSTD**) must be disposed of as non-halogenated solvent. Please refer to the appropriate national guidelines.

15. TROUBLESHOOTING

Problem	Possible reasons	Solution
No signal	No or defect connection to evaluation system	Check signal cord and connection
	Detector lamp is too old	Change lamp
No peaks	Injector is congested	Check injector
Double peaks	Dead volume in fittings and/or column	Renew fittings and/or column
Contaminating peaks	Injector dirty	Clean injector
	Contamination at the head of the column	Change direction of the column and rinse for 30 min at low flow rate (0.2 ml/min) with mobile phase
	Air in the system	Degas pump
	Autosampler vials contaminated	Use new vials or clean them with methanol
Broad peaks, tailing	Precolumn/column exhausted	Use new precolumn/column
Variable retention times	Drift in temperature	Use a column oven
	Pump conveys inaccurately	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 conveys inaccurately	Check pump, degas the system

Problem	Possible reasons	Solution
Baseline is not calm	Pump conveys inaccurately	Check pump, degas the system
	Detector flow cell is dirty	Clean flow cell

16. PRECAUTIONS

- Calibrator (**CAL**) and controls (**CTRL1** and **CTRL2**) are based on human plasma. They have been tested for HIV and hepatitis B and found to be negative. However, as a precaution, the test components should always be handled as potentially infectious material.
- The test components contain organic solvents. Avoid contact with skin or mucous membranes.

17. 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.
- Do not use reagents beyond the expiration date stated on the kit label.
- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- Follow the guidelines for medical laboratories.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which has not been consulted with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be lodged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.
- Analyse controls with each run.

- Always perform the assay according to the enclosed manual.
- Serious incidents are to be reported to Immundiagnostik AG and the national regulatory authorities.

18. 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

19. 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

