

Vitamin A/E

HPLC

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 20.10.2004

Artikelnummer/Catalogue no.: KC 1600

Packungsgröße/Package size: 100 Tests/100 determinations

Lagerung/Storage: 20-25 °C, Standard und int. Standard bei -20 °C

20-25 °C, standard and int. standard at -20 °C



Immundiagnostik AG, Wiesenstr. 4, D 64625 Bensheim

Tel.: ++49 6251 70190 0

Fax: ++ 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

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

1. INTENDED USE	14
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	14
3. PRINCIPLE OF THE TEST	14
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	16
9. ASSAY PROCEDURE	17
PROCEDURAL NOTES	17
SAMPLE AND STANDARD PREPARATION	17
CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS	18
10. TREATMENT OF THE COLUMN	18
11. RESULTS	18
CALCULATION	18
TYPICAL CHROMATOGRAM	19
12. LIMITATIONS	19
13. QUALITY CONTROL	19
EXPECTED VALUES	19
CONTROLS	19
14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	20
PRECISION AND REPRODUCIBILITY	20
LINEARITY	20
DETECTION LIMIT	20
RECOVERY	20
15. DISPOSAL	21
16. TROUBLESHOOTING	21
17. REFERENCES	22
18. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	23

1. VERWENDUNGSZWECK

Die HPLC-Applikation ist für die Bestimmung von Vitamin A/E aus 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 20-25°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 durchgeführt.

Zusammenfassung

Der hier vorliegende Komplettkit zur Bestimmung der Vitamine A/E 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, sodaß 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.	Kit Komponenten	Menge
KC1600lm	Laufmittel	1000 ml
KC1600st	Standard (Konzentration siehe Etikett)	10 ml
KC1600is	Interner Standard	5 ml
KC1600fr	Fällungsreagenz	50 ml
KC1600vl	Verdünnungslösung	10 ml

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

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

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

Alle Testreagenzien werden gebrauchsfertig in gelöster Form geliefert. Die Testreagenzien sind bei Raumtemperatur, die Standards bei -20 °C bis zum Verfallsdatum (siehe Etikett) haltbar.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Standards und Kontrollen 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 und Serum geeignet. Die Probe sollte in jedem Fall sofort nach der Abnahme kühl gelagert werden. Die Probe kann bei 4 °C mind. 12 Stunden (Vitamin A) bzw. 3 Tage (Vitamin E) gelagert werden. 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 Pipettiervolumen 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:

250 µl Standard

+

50 µl interner Standard

+

250 µl Verdünnungslösung

+

250 µl Fällungsreagenz

Proben bzw. Kontrollen:

250 µl Serumprobe bzw. Kontrolle

+

50 µl internen Standard zugeben,

+

500 µl Fällungsreagenz

gut mischen, **30 min** bei 4 °C inkubieren und 10 min bei 10.000 g zentrifugieren

100 µl in HPLC-System injizieren.

Chromatographische Bedingungen

Säulenmaterial:	Nucleosil C18; 10 µm
Säule:	Dimension: 150 mm x 4 mm
Fluß:	0,8 ml/min.
UV-Detektion:	Vitamin A: 325 nm
	Vitamin E: 300 nm

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 belassen werden. Vor der Analyse sollte das System mit 50 ml Laufmittel äquilibriert werden.

11. AUSWERTUNG

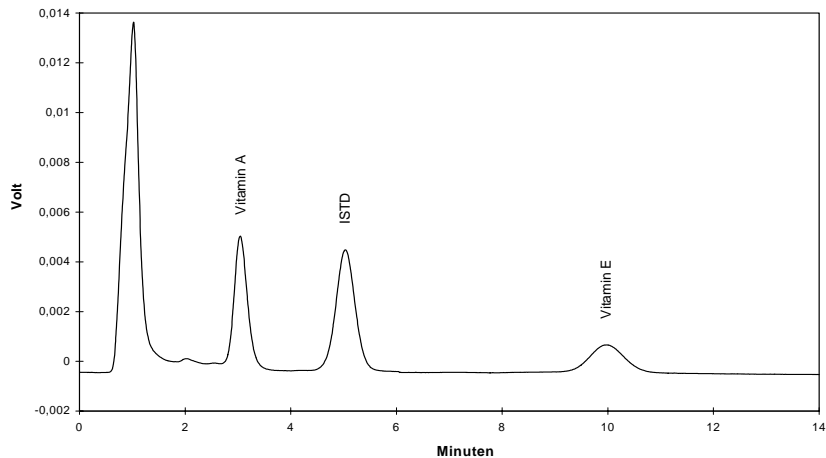
Berechnung

$$F = \frac{\text{Peakhöhe Patient} \cdot \text{Konzentration des Standards}}{\text{Peakhöhe interner Standard Patient}} \cdot F = \text{Konzentration Patientenprobe}$$

Faktorberechnung

$$F = \frac{\text{Peakhöhe interner Standard der Standardmischung}}{\text{Peakhöhe Reinsubstanz des Standards}}$$

Musterchromatogramm



12. EINSCHRÄNKUNGEN

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

13. QUALITÄTSKONTROLLE

Vitamin A:	200 - 800 µg/l
Vitamin E:	3 - 14 mg/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:	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, Fällungsreagenz, interner Standard und Standard 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

Sushil K.J., Mc Coy B., Wise R. (1994). Vitamin E and the hypercoagulability of neonatal blood. Clin Cim Acta 225; 97-103.

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 summarized. Clin Chem 39/6; 1075-1078

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.

Vitamin A/E

HPLC – Application

*For the determination of Vitamin A/E in
plasma and serum*

Catalogue No.: KC 1600
Package size: 100 determinations
Storage: 20-25 °C standard and int. standard -20 °C

CE

1. INTENDED USE

The *Immundiagnostik* Assay 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. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Vitamin A (Retinol) and Vitamin E (Tocopherol) are fatsoluble vitamins, which could be stored for longer periods in the adipose tissue. Both, lack and excess could 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 25°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 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 all reagents in ready to use form for preparation and separation of the samples with exception of the columns.

As many other parameters the advantage of HPLC analytics is the simultaneous handling of many analytes in a single test. The HPLC complete system enables even laboratories without experience in „high performance liquid chromatography“ to use this technique for clinical chemical routines quickly and precisely. Mostly a one-point calibration is sufficient for calibrating the test system - unlike immuno assays with up to 6 calibrators per test. It is possible to automate the sample application and calculation of the results so that even higher number of samples can be handled nearly without control. (With short test series the one-point calibration is much more economic than 6-point calibration for immuno assays).

4. MATERIAL SUPPLIED

Catalogue No	Kit Components	Quantity
KC1600lm	Mobile phase	1000 ml
KC1600st	Standard (conc. is given on the label)	10 ml
KC1600is	Internal Standard	5 ml
KC1600fr	Precipitation reagent	50 ml
KC1600vl	Dilution solution	10 ml

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

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

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

All reagents are ready to use and become delivered in soluble form.

All reagents are stable at 20-25 °C, the standard solution and the internal standard at -20 °C up to the date of expiry (see label of the test package).

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 month.

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

Pipette into 1.5 ml reaction tubes:

Standard:

250 µl standard solution

+

50 µl internal standard solution

+

250 µl dilution solution

+

250 µl precipitation solution

Samples and controls:

250 µl sample or control

+

50 µl internal standard solution

+

500 µl precipitation solution

Mix well. Leave the tubes for **30 minutes at 2-8°C** and centrifuge afterwards at 10.000g for 10 minutes.

Inject **100 µl** of the supernatant for chromatography into the HPLC-system

Chromatographic conditions

Column material:	Nucleosil C ₁₈ ; 10 µm; 150 x 4 mm
Flow rate:	0.8 ml/min
Detection:	UV
	Vitamin A: 325 nm
	Vitamin E: 300 nm

The wavelength should be switched after 7 min

Running time per chromatogram: 15 minutes

To avoid contamination of the next run, mobile phase has to be used as autosampler wash solution.

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 the mobile phase. Before use, the system should be equilibrated with ca. 50 ml eluent.

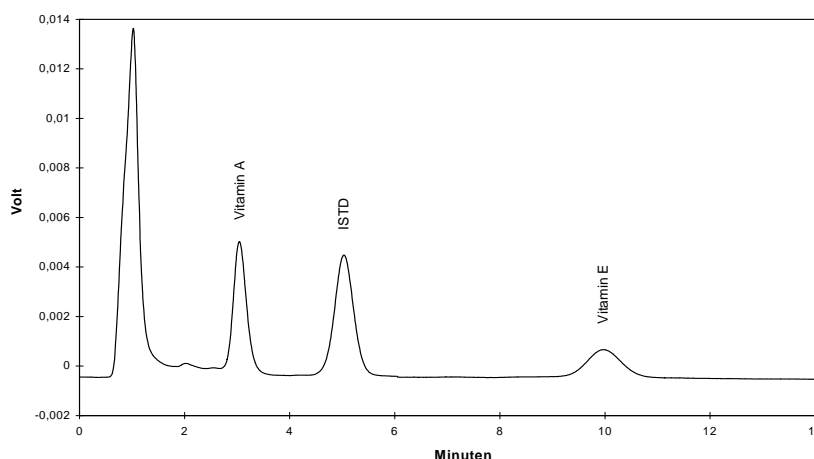
11. RESULTS

Calculation

$$\frac{\text{peak area patient} \cdot \text{concentration of the standard}}{\text{peak area Internal standard patient}} * F = \text{concentration patient sample}$$

$$F = \frac{\text{peak area Internal standard of the standard - mixture}}{\text{peak area of each vitamin of the standard - mixture}}$$

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, that each laboratory should develop their own normal range. The values mentioned above are only for orientation 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

The mobile phase, precipitation reagent, internal standard and standard 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 signalcord and connection
	Detectorlamp is altered	Change lamp
No peaks	Injector is congested	Check Injector
Doublepeaks	Dead volume in fittings and / or column	Renew fittings and / or column
Contaminating peaks	Injector dirty	Clean injector
	Contamination at the head of the column	Change direction of the column and rinse for 30 min at low flow rate (0.2 ml/min) with mobile phase
	Air in the system	Degas pump
	Autosampler vials contaminated	Use new vials or clean them with methanol
Broad peaks, tailing	Precolumn / column exhausted	Use new precolumn / column
Variable retention times	Drift in temperature	Use a column oven
	Pump delivers imprecise	Check pump, degas the system
	System is not in steady state yet	Rinse system mobile phase for 15 min

Problem	Possible reason	Solution
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 flowcell is dirty	Clean flow cell

17. REFERENCES

Sushil K.J., Mc Coy B., Wise R. (1994). Vitamin E and the hypercoagulability of neonatal blood. Clin Cim Acta 225; 97-103.

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 summarized. 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 research 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.