

Vitamin C HPLC Kit

Zur Bestimmung von Vitamin C in Li-Heparin Plasma

For the determination of vitamin C in Li-heparine plasma

Gültig ab / Valid from 2022-09-07

REF KC2900

Σ
100

+2°C +8°C

-20°C
CAL
CTRL 1
CTRL 2

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

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. TESTPRINZIP	2
4. INHALT DER TESTPACKUNG	3
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
6. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZEN	4
7. PROBENVORBEREITUNG	5
8. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Arbeitsschema</i>	5
<i>Chromatographische Bedingungen</i>	5
9. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE	6
10. AUSWERTUNG	6
<i>Berechnung</i>	6
<i>Musterchromatogramm</i>	6
11. EINSCHRÄNKUNGEN	7
12. QUALITÄTSKONTROLLE	7
<i>Referenzbereich</i>	7
<i>Kontrollen</i>	7
13. TESTCHARAKTERISTIKA	7
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	7
<i>Linearität</i>	7
<i>Nachweisgrenze</i>	7
14. ENTSORGUNG	8
15. MASSNAHMEN BEI STÖRUNGEN	8
16. VORSICHTSMASSNAHMEN	9
17. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	10
18. LITERATUR	10

1. VERWENDUNGSZWECK

Diese HPLC-Applikation ist für die Bestimmung von Vitamin C aus Plasma geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Im 15.–17. Jahrhundert starben mehr Seefahrer an Skorbut als durch alle anderen Ursachen zusammen. Die übliche Schiffsverpflegung enthielt keine Vitamin-C-haltigen Lebensmittel. Bereits im 16. Jahrhundert entdeckte man die Bedeutung von Zitrusfrüchten für die Heilung des Skorbut und erkannte ihn als eine Mangelkrankheit.

Ascorbinsäure (Vitamin C) ist ein starkes Reduktionsmittel. Unter physiologischen Bedingungen führt ihre Oxidation über eine radikalische Zwischenstufe zur Dehydroascorbinsäure. Die drei Formen stellen ein reversibles Redoxsystem dar.

Ascorbinsäure spielt eine wichtige Rolle bei Hydroxylierungsreaktionen, z. B. bei der Bildung von Kollagen. Es ist somit äußerst wichtig für die Neubildung von Knochen, Knorpel und Zähnen, sowie für die Wundheilung und Narbenbildung. Des Weiteren wird Ascorbinsäure für die Bildung von Noradrenalin benötigt. Eine weitere wichtige Rolle kommt dem Vitamin C als Antioxidans zu, d. h. es schützt andere Substanzen vor schädlichen Einflüssen von Sauerstoff. Vitamin C fördert im Darm die Resorption von Eisen aus Nahrungsmitteln und hemmt die Bildung von krebserregenden Nitrosaminen im Körper.

Erste unspezifische Anzeichen eines Vitamin-C-Mangels äußern sich in Müdigkeit und Schwäche, geistiger und körperlicher Leistungsminderung und erhöhter Anfälligkeit gegenüber Infektionskrankheiten. Psychische Beeinträchtigungen, z. B. Depressionen oder Hysterie, können ebenfalls auftreten.

Indikationen

- Ermittlung des Vitamin-C-Status

3. TESTPRINZIP

Zur Bestimmung des Vitamin C wird im ersten Schritt eine sehr einfache Probenvorbereitung durchgeführt. In einem Fällungsschritt werden höhermolekulare Substanzen abgetrennt.

Die Trennung mittels HPLC erfolgt in einem isokratischen Verfahren bei 30°C auf einer reversed-phase-Säule. Die Trennung benötigt 12 Minuten für einen Lauf. Die Aufnahme der Chromatogramme erfolgt mit einem UV Detektor. Die Quantifizierung wird über den mitgelieferten Kalibrator und die Berechnung der Ergebnisse

über die „externe Standard-Methode“ anhand der Integration der Peakfläche/-höhe durchgeführt.

Zusammenfassung

Der hier vorliegende Komplettkit zur Bestimmung des Vitamin C 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 Analyte 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 zu Immunassays mit 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 Immunassays.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 0005.15	RECSOL	Rekonstitutionslösung	3 x 15 ml
KC2900	MOPHA	Laufmittel, gebrauchsfertig (Wichtig: nicht rezirkulieren)	1 000 ml
	CAL	Kalibrator; lyophilisiert (Konzentration siehe Spezifikationsdatenblatt)	4 x
	PREC	Fällungsreagenz	1,25 g
	CTRL1	Kontrolle1; lyophilisiert	4 x
	CTRL2	Kontrolle2; lyophilisiert	4 x

Die HPLC-Trennsäule (KC2900RP), kann separat bei Immundiagnostik bestellt werden. Um die Lebensdauer Ihrer HPLC-Trennsäule zu verlängern, sollten idealerweise Vorsäulen (KC2900VS) verwendet werden. Diese und auch die Vorsäulenhalter (KC2900VH) können ebenfalls bei Immundiagnostik bestellt werden. Neben den kompletten Kits können auch alle Komponenten einzeln bestellt werden. Bitte fordern Sie unsere Einzelkomponentenpreisliste an.

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

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

6. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- **Der lyophilisierte Kalibrator (CAL)** ist bei **-20 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor Gebrauch wird er in **250 µl Rekonstitutionslösung (RECSOL)** resuspendiert. Der Gehalt an Vitamin C ändert sich geringfügig von Charge zu Charge, der genaue Gehalt ist auf dem Etikett angegeben. **Kalibrator (rekonstituierter CAL) ist nicht stabil und kann nicht gelagert werden.**
- **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 **250 µl Rekonstitutionslösung (RECSOL)** resuspendiert. Der Gehalt an Vitamin C ändert sich geringfügig von Charge zu Charge, der genaue Gehalt ist dem Spezifikationsdatenblatt zu entnehmen. **Kontrollen (rekonstituierte CTRL 1 und 2) sind nicht stabil und können nicht gelagert werden.**
- Das **lyophilisierte Fällungsreagenz (PREC)** ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor Gebrauch wird es in **25 ml Rekonstitutionslösung (RECSOL)** innerhalb von ca. 10 min resuspendiert. Das **Fällungsreagenz (rekonstituiertes PREC)** ist bei **2–8 °C** für **3 Monate** stabil.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2–8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. PROBENVORBEREITUNG

Als Probe eignet sich Lithium-Heparinat-Plasma, das aus venösem Nüchternblut gewonnen wird. Der Handel bietet hierzu entsprechende Abnahmeröhrchen an (z.B. Sarstedt S-Monovette LH). Die so abgenommene Probe ist bei 4 °C 24 Stunden stabil. Da Vitamin C sehr oxidationsempfindlich ist, muss die Probe direkt nach Ankunft im Labor stabilisiert werden. Die Plasmaprobe wird mit dem stabilisierenden Fällungsreagenz versetzt und anschließend zentrifugiert (siehe Arbeitsschema). Der so gewonnene Überstand ist bei –20 °C mind. 8 Wochen stabil.

Nach dem Auftauen der Proben sollte schnellstmöglich die Analyse erfolgen.

8. TESTDURCHFÜHRUNG

Arbeitsschema

Je 200 µl Probe, Kalibrator oder Kontrolle 1 oder 2 in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß pipettieren.
Je 200 µl Fällungsreagenz zugeben, gut mischen .
10 min bei 2–8 °C inkubieren.
Für 10 min bei 10 000 g zentrifugieren, den Überstand abnehmen. Der Überstand ist jetzt als Probe für mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur, im Dunkeln, stabil.
Je 20 µl Überstand in das HPLC-System injizieren.

Chromatographische Bedingungen

Säulenmaterial:	Bischoff Prontosil AQ; 5 µm
Säulendimension:	125 mm × 4 mm
Fluss:	0,75 ml/min
UV-Detektion:	254 nm
Temperatur:	30 °C
Auftragsvolumen:	20 µl
Laufzeit:	12 Minuten

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

9. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE

Nach der Analyse sollte die Trennsäule mit ca. 30 ml Reinstwasser bei einem Fluss von 1 ml/min gespült werden. Anschließend wird die Säule in 50% Methanol in Wasser gelagert (ca. 30 ml, Fluss 0,7 ml/min).

Zur Wiederinbetriebnahme wird das ganze System mit ca. 30 ml Laufmittel (MOPHA) äquilibriert.

10. AUSWERTUNG

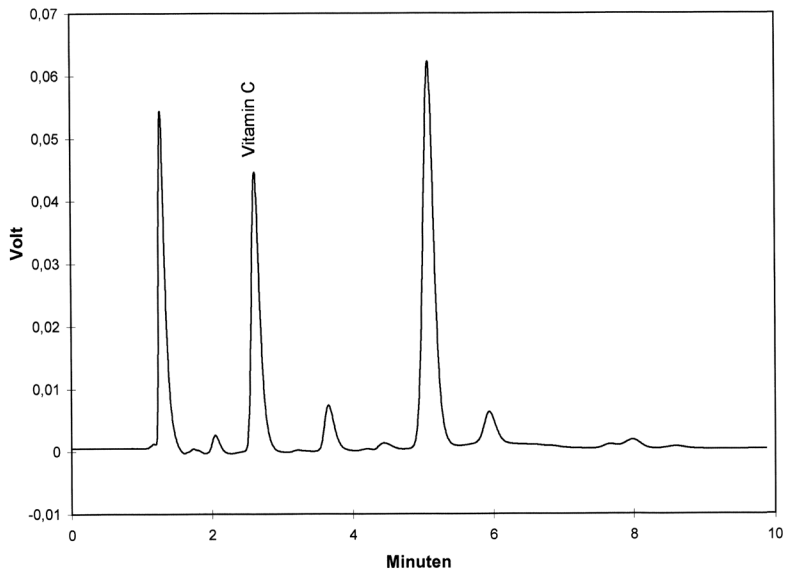
Berechnung

$$\text{Probenkonzentration} = \frac{\text{Peakhöhe Probe} \times \text{Kalibratorkonzentration}^*}{\text{Peakhöhe Kalibrator}}$$

* siehe Etikett

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

Musterchromatogramm



11. EINSCHRÄNKUNGEN

EDTA-Vollblut eignet sich nicht für die Messung.

12. QUALITÄTSKONTROLLE

Referenzbereich

4–20 mg/l

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren. Die Angabe des Referenzbereichs dient lediglich der Orientierung und kann von anderen publizierten Daten abweichen.

Kontrollen

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

13. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay-VK

5,6 % (4,4 mg/l) [n = 6]

4,1 % (18,8 mg/l) [n = 6]

Inter-Assay-VK

8,8 % (4,4 mg/l) [n = 8]

5,9 % (18,6 mg/l) [n = 8]

Linearität

bis 250 mg/l

Nachweisgrenze

0,58 mg/l

14. ENTSORGUNG

Das Laufmittel (MOPHA) und das Fällungsreagenz (PREC) können mit Natronlauge neutralisiert und bei neutralem pH als Salzlösung entsorgt werden.

Achtung: Wärmeentstehung!

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

- 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.
- Reagenzien dieser Testpackung enthalten organische Lösungsmittel. Berührungen mit der Haut oder den Schleimhäuten sind zu vermeiden.
- Das Fällungsreagenz (PREC) besteht aus Säure und muss mit Vorsicht benutzt werden. Es verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Als Vorsichtsmaßnahme wird empfohlen, das verwendete Humanmaterial immer als potentiell infektiös zu betrachten.

17. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST










- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.

- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt 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, zurückzusenden.
- Schwerwiegende Vorkommnisse sind der Immundiagnostik AG und den nationalen Aufsichtsbehörden zu melden.

18. LITERATUR

1. Hultqvist M. et al. (1997). Plasma concentrations of vitamin C, vitamin E and/or malondialdehyde as markers of oxygen free radical production during hemodialysis. *Clin Nephrol* **47**; 37-46.
2. Falch J.A. (1998). Low levels of serum ascorbic acid in elderly patients with hip fracture. *Scand J Clin Lab Invest* **58**; 225-228.
3. Ballmer et al. (1994). Depletion of plasma vitamin C but not of vitamin E in response to cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg* **108**; 311-320.

Verwendete Symbole:

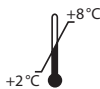
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Enthält Plasmoderivate oder menschliches Blut		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Nicht wiederverwenden
	Herstellungskennung		Enthält Material tierischen Ursprungs
	medizinische Substanz		Enthält Material humanen Ursprungs

Vitamin C HPLC Kit

For the determination of vitamin C in Li-heparine plasma

Valid from 2022-09-07

REF **KC2900**



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

Table of Contents

1. INTENDED USE	15
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	15
3. PRINCIPLE OF THE TEST	15
4. MATERIAL SUPPLIED	16
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	17
6. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	17
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	18
9. ASSAY PROCEDURE	18
<i>Procedural notes</i>	18
<i>Test procedure</i>	18
<i>Chromatographic conditions</i>	19
10. TREATMENT OF THE COLUMN	19
11. RESULTS	19
<i>Calculation</i>	19
<i>Typical chromatogram</i>	20
12. LIMITATIONS	20
13. QUALITY CONTROL	20
<i>Reference range</i>	20
<i>Controls</i>	20
14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	21
<i>Precision and reproducibility</i>	21
<i>Linearity</i>	21
<i>Detection limit</i>	21
15. DISPOSAL	21
16. TROUBLESHOOTING	21
17. PRECAUTIONS	23
18. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	23
19. REFERENCES	24

1. INTENDED USE

This HPLC application is intended for the quantitative determination of vitamin C in plasma. For *in vitro* diagnostic use only.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

In the 15th to 17th century, more sailors died of scorbout than of any other disease. The food provided on board contained nearly no vitamin C. In the 16th century, the importance of vitamin C supplied by citrus fruits in healing scorbout was discovered.

Ascorbic acid (vitamin C) is a strong reducing substance. The oxidation of vitamin C leads over a radical intermediate to dehydroascorbic acid *in vivo*. The three forms mentioned constitute a reversible redox-system.

Ascorbic acid plays an important role in hydroxylation reactions, i.e. in the synthesis of collagen. So it is rather important for the *de novo* synthesis of bone, cartilage and tooth, and for the healing of wounds. Vitamin C is needed for the production of noradrenalin. Another important role of vitamin C is its antioxidant capability, e.g. protection of other substances from oxidative damage. Ascorbic acid promotes the resorption of iron in the intestine. In addition, it reduces the production of nitrosamines which might cause cancer.

The primary unspecific signals of a lack of vitamin C are tiredness, physical and mental weakness and increased susceptibility for infections. Psychic disturbances like depressions or hysteria are possible.

Indication

- Determination of vitamin C status

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The first step in the vitamin C determination is precipitation of the higher molecular components. After their removal by centrifugation, the supernatant is injected into the HPLC system.

The vitamin C analysis via HPLC follows an isocratic method at 30°C using a reversed phase column. One run lasts 12 minutes. The chromatograms are recorded by an UV detector. The quantification is performed with the delivered calibrator. The concentration is calculated via integration of the peak areas/heights by the external standard method.

Summary

This HPLC application allows the quantitation of vitamin C in an easy, fast, and precise way. The kit contains all reagents necessary for sample preparation and separation in ready-to-use form except the column.

As for 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 immunoassays 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 immunoassays.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 0005.15	RECSOL	Reconstitution solution	3 x 15 ml
KC2900	MOPHA	Mobile phase (important: do not recirculate)	1 000 ml
	CAL	Calibrator; lyophilised (see specification data sheet for concentration)	4 x
	PREC	Precipitation reagent	1.25 g
	CTRL1	Control1; lyophilised	4 x
	CTRL2	Control2; lyophilised	4 x

The HPLC column (KC2900RP), can be ordered separately from Immundiagnostik. To extend the lifetime of your HPLC column, pre-columns (KC2900VS) are highly recommended. These and also the pre-column holders (KC2900VH) can also be ordered from Immundiagnostik. 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 (e.g. Eppendorf)
- Centrifuge
- Various pipettes
- HPLC with UV detector
- Reversed phase C₁₈ column
- Vortex

6. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- **The lyophilised calibrator (CAL)** is stable at **-20°C** until the expiry date stated on the label. Before use, the CAL has to be reconstituted with **250 µl reconstitution solution (RECSOL)**. The concentration of vitamin C slightly changes from lot to lot, the exact concentration is stated on the label. **Calibrator (reconstituted CAL) is not stable and cannot be stored.**
- **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 **250 µl reconstitution solution (RECSOL)**. The concentration of vitamin C slightly changes from lot to lot, the exact concentration is stated on the specification data sheet. **Controls (reconstituted CTRL 1 and 2) are not stable and cannot be stored.**
- **The lyophilised precipitation reagent (PREC)** is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. Before use, the PREC has to be reconstituted with **25 ml reconstitution solution (RECSOL)** for ~10 min. **Precipitation reagent (reconstituted PREC) is stable at 2–8°C for 3 months.**
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2–8°C**.

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Lithium-heparine plasma is suitable for this test system. Commercially available sample tubes (e.g. Sarstedt S-Monovette LH) should be used. A sample treated in this way is stable for 24 hours at 4°C.

Vitamin C is highly sensitive against oxidation; therefore, samples should be stabilized immediately after arrival in the laboratory. For stabilisation, the precipitation reagent must be added and centrifuged (see assay procedure). Afterwards, the supernatant is stable for at least 8 weeks at -20°C.

After thawing the samples, the analysis should be done as soon as possible.

8. ASSAY PROCEDURE

Test procedure

Pipet each 200 µl sample, calibrator or control 1 or 2 into an 1.5 ml reaction tube.
Add each 200 µl precipitation reagent and mix well.
Incubate for 10 min at 2–8 °C .
Centrifuge for 10 min at 10 000 g and take the supernatant. The supernatant is stable for at least 24 hours at room temperature if kept in the dark.
Inject 20 µl supernatant into the HPLC system.

Chromatographic conditions

Column material:	Bischoff Prontosil AQ; 5 µm
Column dimension:	125 mm × 4 mm
Flow rate:	0.75 ml/min
UV detection::	254 nm
Temperature:	30 °C
Injection volume:	20 µl
Running time:	12 min

It is recommended to use a guard column to extend column life.

9. TREATMENT OF THE COLUMN

After analysis, the column should be flushed with 30 ml ultra pure water (1 ml/min) and stored in 50% methanol in water (~30 ml, flow 0.7 ml/min). Before use, the system should be equilibrated with ~ 30 ml mobile phase (MOPHA).

10. RESULTS

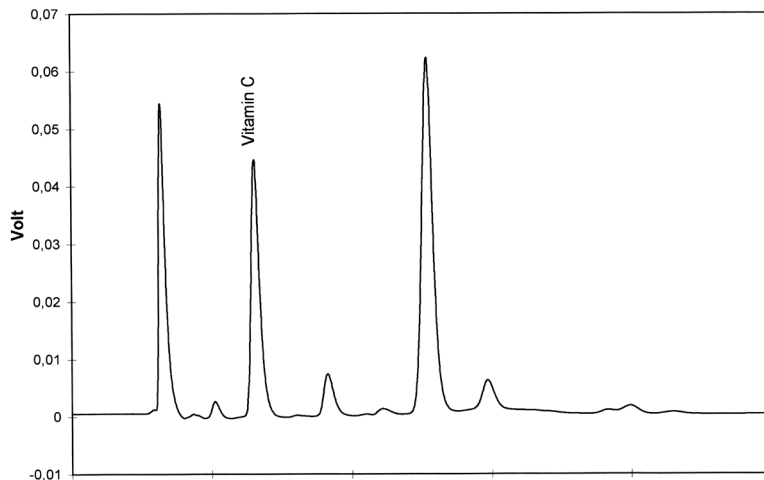
Calculation

$$\text{Sample concentration (nmol/l)} = \frac{\text{Peak height sample} \times \text{calibrator concentration}^*}{\text{Peak height calibrator}}$$

* see label

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

Typical chromatogram



11. LIMITATIONS

EDTA-blood is not suitable for this test system and should not be used.

12. QUALITY CONTROL

Reference range

4–20 mg/l

We recommend each laboratory to establish its own reference range. The values mentioned above are only for orientation and may deviate from other published data.

Controls

Control samples should be analysed 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.

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intraassay CV

5.6 % (4.4 mg/l) [n=6]

4.1 % (18.8 mg/l) [n=6]

Interassay CV

8.8 % (4.4 mg/l) [n=8]

5.9 % (18.6 mg/l) [n=8]

Linearity

up to 250 mg/l

Detection limit

0.58 mg/l

14. DISPOSAL

The mobile phase (MOPHA) and precipitation reagent (PREC) can be neutralized to neutral pH with NaOH and disposed as a salt solution.

Important: Reaction will produce heat, be careful!

Please refer to the appropriate national guidelines.

15. TROUBLESHOOTING

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

Problem	Possible cause	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 smooth	Pump delivers imprecise	Check pump, degas the system
	Detector flow cell is dirty	Clean flow cell

16. PRECAUTIONS

- Human materials used in kit components were 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.
- The precipitation reagent (PREC) contains acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water. Do not breathe the vapor and avoid inhalation.
- The test components contain organic solvents. Contact with skin or mucous membranes must be avoided.
- As a precaution, it is recommended that the human material used is always considered potentially infectious.

















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 interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- Control samples should be analysed with each run.
- Serious incidents are to be reported to Immundiagnostik AG and the national regulatory authorities.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.
- Plugs and caps of different reagents should not be swapped.
- 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 incorrect use.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

18. REFERENCES

1. Hultqvist M. et al. (1997). Plasma concentrations of vitamin C, vitamin E and/or malondialdehyde as markers of oxygen free radical production during hemodialysis. *Clin Nephrol* **47**; 37-46.
2. Falch J.A. (1998). Low levels of serum ascorbic acid in elderly patients with hip fracture. *Scand J Clin Lab Invest* **58**; 225-228.
3. Ballmer et al. (1994). Depletion of plasma vitamin C but not of vitamin E in response to cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg* **108**; 311-320.

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
	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

