

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 26.08.2005

Artikelnummer/Catalogue no.:	KC 2900
Packungsgröße/Package size:	100 Tests/100 Determinations
Lagerung/Storage:	2-8 °C, Kalibrator und Kontrollen bei -20 °C 2-8 °C, Calibrator and controls at -20 °C



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

1. INTENDED USE	14
2. SUMMARY AND EXPLANATION	14
3. PRINCIPLE OF THE TEST	15
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	17
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	20
14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	20
PRECISION AND REPRODUCIBILITY	20
LINEARITY	20
DETECTION LIMIT	20
15. DISPOSAL	20
16. TROUBLESHOOTING	21
17. REFERENCES	22
18. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	22

1. VERWENDUNGSZWECK

Die HPLC-Applikation ist für die Bestimmung von Vitamin C aus Serum und 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 20-25°C auf einer "reversed phase" Säule. Die Trennung benötigt ca. 15 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 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 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 zu Immunoassays 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 Immuno-Assays).

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Kit Komponenten	Menge
KC2900LM	Laufmittel	1000 ml
KC2900KA	Kalibrator (0,25 ml; Konzentration siehe Etikett)	8 Fläschchen
KC2900FR	Fällungsreagenz lyoph.	1 Stück
KC2900RL	Rekonstitutionslösung	27 ml
KC2900KO	Kontrolle 1 und 2 (lyoph. 250 µl; Konzentration siehe Produktspezifikation)	2 x 3 Fläschchen

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL:

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

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Der **Kalibrator** wird mit 0,25 ml Aqua bidest. resuspendiert. Nicht verbrauchte Reste sind zu entsorgen, da erneutes Einfrieren den Kalibrator teilweise zerstört. Der Gehalt an Vitamin C ändert sich geringfügig von Charge zu Charge, der genaue Gehalt ist auf dem Etikett angegeben.
- Die **Kontrollen** werden in 0,25 ml Aqua bidest. rekonstituiert.
- Das **Fällungsreagenz** wird in 25 ml Rekonstitutionslösung im Ultraschallbad (ca. 10 min.) gelöst. Das gelöste Fällungsreagenz ist dann bei 2-8 °C 3 Monate stabil.
- Die Testreagenzien sind bei 2-8 °C, der **Kalibrator und die Kontrollen** bei -20°C bis zum Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur zur *in vitro* Diagnostik
- 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.
- Das Fällungsreagenz besteht aus Säure und muß auch im verdünnten Zustand mit Vorsicht behandelt werden. Es verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muß die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

8. PROBENVORBEREITUNG

Als Probe eignet sich Lithium-Heparinat-Plasma, daß 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.

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 AG 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:

200 µl Patientenprobe, Standard oder Kontrolle

+

200 µl Fällungsreagenz

gut mischen, **10 Minuten bei 2-8 °C** stehen lassen und anschließend für **10 min** bei 10.000 g zentrifugieren.

20 µl des Überstandes in das HPLC-System injizieren.

Der Überstand ist als Probe jetzt mindestens **24 Stunden** bei 20 °C im Dunkeln stabil.

Chromatographische Bedingungen

Säulenmaterial:	Bischoff Prontosil AQ 5 µm
Säulendimension:	125 mm x 4 mm
Fluß :	0,75 ml/min
UV-Detektor :	254 nm
Injektionsvolumen:	20 µl
Laufzeit pro Chromatogramm :	12 Min.

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

10. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE

Nach der Analyse sollte die Trennsäule mit ca. **50 ml** Aqua bidest. bei einem Fluß von 1 ml/min gespült werden. Anschließend wird die Säule in 20% Methanol in Wasser gelagert (ca. 30 ml, Fluß 0,7 ml/min)

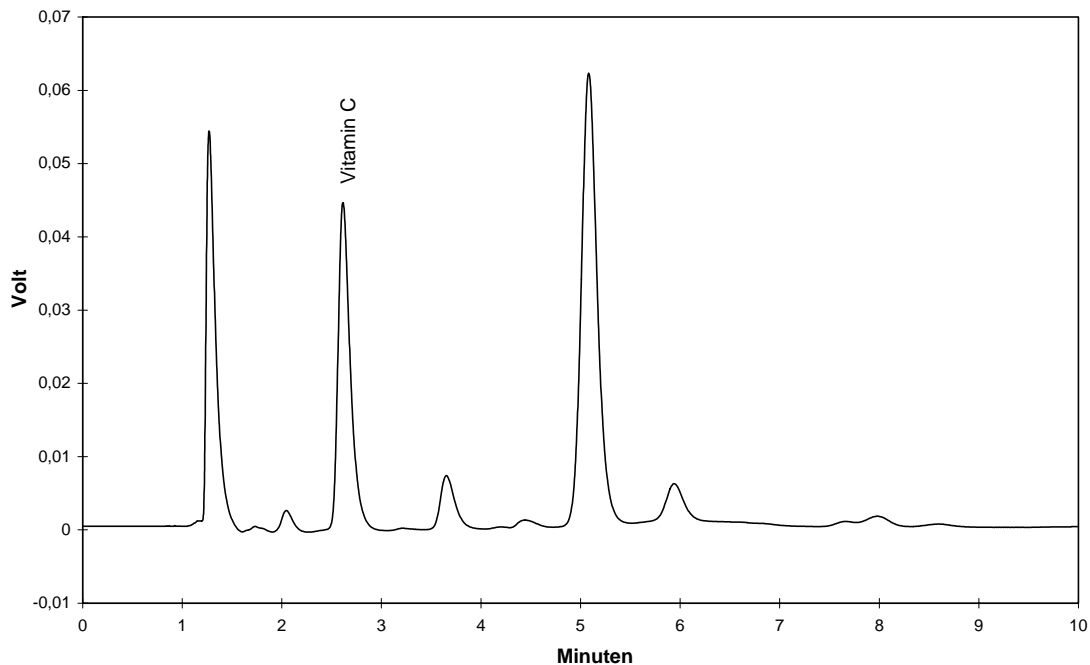
Zur Wiederinbetriebnahme wird das ganze System mit ca. **50 ml** Laufmittel äquilibriert.

11. AUSWERTUNG

Berechnung

$$\text{Konz. Patient} = \frac{\text{Peak Fläche Patient} \times \text{Konz. Kalibrator (mg/l)}}{\text{Peak Fläche Kalibrator}}$$

Musterchromatogramm



12. EINSCHRÄNKUNGEN

EDTA-Vollblut eignet sich nicht für die Messung.

13. QUALITÄTSKONTROLLE

Normbereich

4 - 20 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: 1,6 % (10,3 mg/l) [n = 10]

Inter-Assay VK: 2,7 % (7,3 mg/l) [n = 10]

Linearität

bis 250 mg/l

Nachweisgrenze

0,25 mg/l

15. ENTSORGUNG

Das Laufmittel und das Fällungsreagenz kann mit Natronlauge neutralisiert und bei neutralem pH als Salzlösung entsorgt werden. (**Achtung:** Wärmeentstehung).

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

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.

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 Immun Diagnostik AG übernimmt für direkt daraus resultierende Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

Vitamin C HPLC Kit

For the determination of Vitamin C in Li-heparine plasma

Valid from 26.08.2005

Artikelnummer/Catalogue no.:	KC 2900
Packungsgröße/Package size:	100 Tests/100 Determinations
Lagerung/Storage:	2-8 °C, Kalibrator und Kontrollen bei -20 °C 2-8 °C, Calibrator and controls at -20 °C



1. INTENDED USE

The Immundiagnostik HPLC application is a chromatographic procedure intended for the quantitative determination of Vitamin C in plasma and serum. This application is designed for *in vitro* diagnostic use only.

2. SUMMARY AND EXPLANATION

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 that of an antioxidant, that means it protects other substances from the oxidizing effects of oxygen. Ascorbic acid promotes the resorption of iron in the intestine. 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.

The advantage of HPLC analysis is the simultaneous handling of many analytes in a single test. The complete HPLC system enables even laboratories without experience in „high performance liquid chromatography“ to use this technique for clinical chemical routine diagnostics. In most cases a one-point calibration is sufficient for calibrating the test system - unlike immuno assays with up to 6 calibrators per assay. It is possible to automate the sample application and calculation of the results so that even higher number of samples can be handled.

Indication

- Determination of Vitamin C status

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The application of Vitamin C for HPLC allows the determination of Vitamin C in an easy, fast, and precise method. The kit includes all reagents in ready to use for preparation and separation of the samples. The columns are not included.

The first step in the determination of Vitamin C is a fast and easy sample preparation. During the precipitation higher molecular substances are removed. After centrifugation the supernatant is injected into the HPLC system.

The separation via HPLC follows an isocratic method at 25°C using a „reversed phase“ column; one run lasts 12 minutes. Vitamin C is detected by an UV-monitor. The quantification is performed with the delivered calibrator; the concentration is calculated via integration of the peak areas by the external standard method.

4. MATERIAL SUPPLIED

Artikel Nr.	Kit Komponenten	Menge
KC2900LM	Mobile phase	1000 ml
KC2900KA	calibrator (0,25 ml; lyoph. concentration is given on the label)	8 vials
KC2900FR	Precipitating reagent (lyoph.)	1 vial
KC2900RL	Reconstitution solution	27 ml
KC2900KO	Control 1 and 2; 250 µl lyophilized (concentration, see the product data sheet)	2 x 3 vials

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Vortex- mixer
- Centrifugation tubes (1.5 ml)
- High precision pipettes
- HPLC pump with UV-detector
- reversed phase C₁₈-column
- Centrifuge

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- Reconstitute the **calibrator** with 250 µl aqua bidest. The reconstituted standard solution is not stable and can not be used for a second time. Do **not freeze** it again. The concentration is given on the label.
- Reconstitute the **controls** in 250 µl aqua bidest.
- Reconstitute the **precipitating reagent** in 25 ml reconstitution solution in a ultrasonic bath (approx. 10 min.). The precipitation solution is stable for 3 months at 2-8 °C.
- All reagents are stable at 2-8 °C, **calibrator and controls** at -20 °C up to the date of expiry (see label of the test package).

7. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- The calibrators and controls contain 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, HCV or other infectious agents are absent, these reagents should be handled as if potentially infectious.
- The precipitating reagent contains acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped out immediately with copious quantities of water. Do not breath vapor and avoid inhalation.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on kit label.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Venous fasting blood is suitable for this test system. We recommend to use Lithium-heparine plasma because of a better stability of vitamin C. Therefore commercial available sample tubes (e.g. Sarstedt S-Monovette LH) should be used. The best stability is achieved when a 7.5 ml tube is filled with 2 ml of blood.

Vitamin C is highly sensitive against oxidation; therefore samples should be stabilized immediately after arrival in the laboratory. For stabilisation, the precipitating reagent is added (see 9. Assay procedure).

Plasma or serum, containing the precipitating reagent is stable for 24 h at 2-8°C. After centrifugation the supernatant is stable for 3 month at -20°C.

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 AG 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

Add into 1.5 ml reaction tubes:

200 µl patient sample, standard and controls

+

200 µl precipitating reagent

Mix well. Incubate the tubes for **10 minutes at 2-8°C** and then centrifuge at 10.000 x g for 10 min.

Inject **20 µl** of the supernatant (The supernatant is stable at least for 24 hours at room temperature, if kept in the dark).

Chromatographic conditions

Column material:	Bischoff Prontosil AQ 5 µm
Dimension:	125 x 4 mm
Flow rate:	0.75 ml/min
UV-Detector:	254 nm
Injection volume:	20 µl
Running time/sample:	12 min

10. TREATMENT OF THE COLUMN

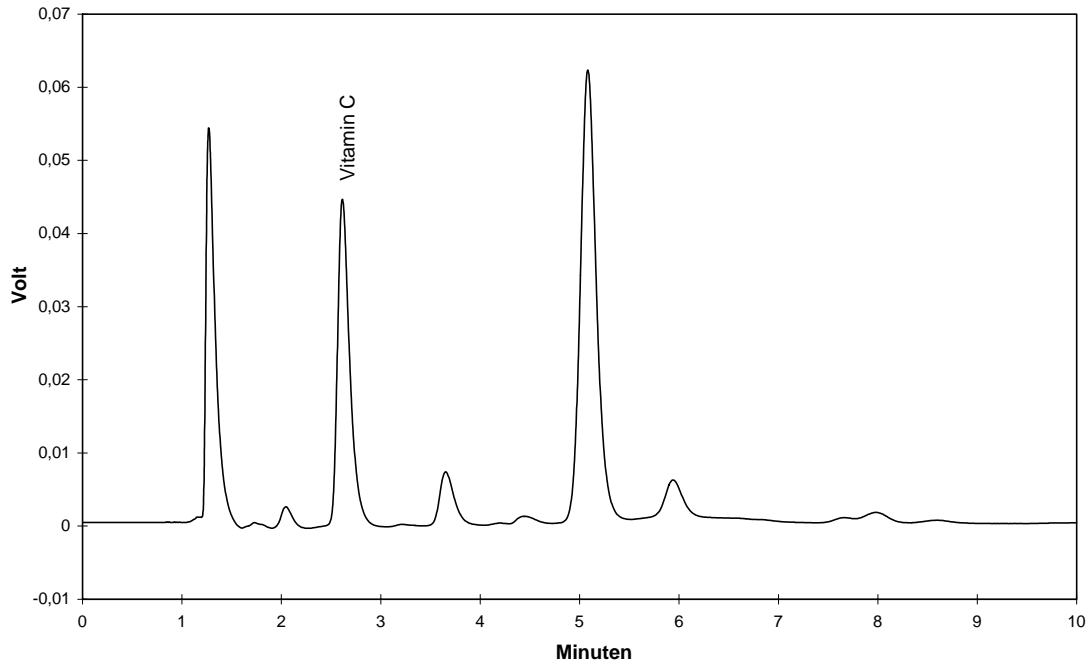
After each run the column should be washed with 50 ml aqua bidest (1 ml/min) and stored in 20% methanol (v/v in aqua bidest, 30 ml), flow rate 0.7 ml/min. Before use, the system should be equilibrated with ca. 50 ml eluent.

11. RESULTS

Calculation

$$C_{patient} = \frac{\text{Peak area patient} \times \text{conc. calibrator (mg/l)}}{\text{Peak area calibrator}}$$

Typical chromatogram



12. LIMITATIONS

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

13. QUALITY CONTROL

Expected values

4 to 20 mg/l (mean \pm 2 SD).

It is recommended, that each laboratory should develop its own normal range. The values mentioned above are established in Immundiagnostik AG laboratories and could deviate from other published data.

Controls

Control samples or plasma 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

Intraassay CV%: 1.6 (10.3 mg/l) [n=10]

Interassay CV%: 2.7 (7.3 mg/l) [n=10]

Linearity

up to 250 mg/l

Detection limit

0.25 mg/l

15. DISPOSAL

The mobile phase and the precipitation solution could be neutralized with NaOH and if the pH value is neutral it can be disposed as salt solution. (**Important:** Reaction will produce heat, be careful)

Please refer to the appropriate national guidelines.

16. TROUBLESHOOTING

Problem	Possible reason	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
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

17. 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.

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.
- The test components which are made of human serum are tested for Australia antigen and HIV and found to be negative. However, since no test method can offer complete assurance that infectious agents are absent, these reagents should be handled as recommended for any potentially infectious human serum or blood specimen. The normal precautions for laboratory working should be observed.
- Reagents of the test package contain sodium azide as a bactericide. Contact with skin or mucous membranes has to be avoided.
- All reagents in the test package are to be used for in-vitro diagnostics only.
- The reagents should not be used after the date of expiry (see label on the test package).
- 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.