

# IDK<sup>®</sup> Vitamin C

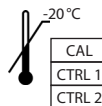
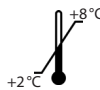
*Zur kolorimetrischen Bestimmung von Vitamin C  
in Li-Heparinat-Plasma, Serum und Urin*

*For colorimetric determination of Vitamin C  
in Li-heparine plasma, serum and urine*

Gültig ab / Valid from 2022-09-07



**K 4000**



**Immundiagnostik AG**, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)



# Inhalt

<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>2</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
<b>3. TESTPRINZIP</b>	<b>2</b>
<b>4. INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>3</b>
<b>5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>3</b>
<b>6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>4</b>
<b>7. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG</b>	<b>4</b>
<b>8. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>5</b>
<i>Probenvorbereitung</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	5
<b>9. AUSWERTUNG</b>	<b>6</b>
<b>10. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>6</b>
<i>Referenzwerte</i>	6
<b>11. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>7</b>
<i>Genauigkeit – Präzision</i>	7
<i>Genauigkeit – Richtigkeit</i>	7
<i>Linearität</i>	7
<i>Analytische Sensitivität</i>	8
<i>Analytische Spezifität</i>	8
<b>12. VORSICHTSMASSNAHMEN</b>	<b>8</b>
<b>13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>9</b>
<b>14. LITERATUR</b>	<b>10</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Dieser kolorimetrische Mikrotiterplattentest ist für die Bestimmung von Vitamin C (Ascorbinsäure) in Li-Heparinat-Plasma, Serum und Urin geeignet.

Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

## 2. EINLEITUNG

Neben seiner Funktion als Coenzym (z.B. bei der Kollagen-Biosynthese) ist Vitamin C aufgrund seiner leichten Oxidierbarkeit das zentrale Antioxidanz unter den wasserlöslichen Antioxidanzien. Es spielt außerdem bei der Detoxifizierung von Nebenprodukten der Atmungskette eine Rolle. Normalerweise konvertiert die Superoxiddismutase (SOD)  $O_2^-$  zu  $H_2O_2$  und  $O_2$ , aber in Gegenwart von  $Fe^{2+}$  kann das Hydrogenperoxid in das hochreaktive Hydroxyl-Radikal ( $\cdot OH$ ) umgewandelt werden. Das Hydroxyl-Radikal kann innerhalb einer Zelle unerwünschte und schädliche chemische Reaktionen hervorrufen, indem es einer organischen Verbindung ein Wasserstoffatom ( $H\cdot$ ) wegnimmt, um damit selbst ein  $H_2O$ -Molekül zu bilden. Dadurch entstehen weitere, möglicherweise noch stärker reaktive, freie Radikale. Ein Ascorbinsäure-Molekül kann ein Wasserstoffatom an freie Radikale abgeben und damit diese Radikalbildung stoppen.

Im Serum/Plasma finden sich sowohl Ascorbinsäure als auch die oxidierte Form der Ascorbinsäure, die Dehydroascorbinsäure. Beide Formen sind biologisch aktiv. In verschiedenen Krankheitsbildern wird der Vitamin-C-Spiegel, bedingt durch den verstärkten oxidativen Stress, gesenkt. Bei HIV-positiven Patienten sinkt der Blutplasma-Gehalt von  $75,7 \mu\text{mol/l}$  auf  $40,7 \mu\text{mol/l}$ . Rauchen bewirkt im Blutplasma einen starken Vitamin-C-Verbrauch. Es werden allgemein Proteinthiole oxidiert, und nachdem der Vitamin-C-Pool aufgebraucht ist, beginnt die Lipidperoxidation.

### Indikationen

- Bestimmung des Vitamin-C-Status (z. B. bei HIV-Patienten oder Rauchern)
- Verlaufskontrolle bei Infusionstherapie
- Überprüfung der individuellen Resorptionsfähigkeit bei oraler Substitution

## 3. TESTPRINZIP

Unser Vitamin-C-Test misst den Analyten über eine vorgeschaltete Oxidation und erfasst dadurch sowohl Ascorbinsäure- als auch Dehydroascorbinsäure-Moleküle. Ein Farbumschlag erfolgt von Gelb nach Orange. Die Messung erfolgt fotometrisch bei 492 oder 520 nm. Die Konzentration der Probe wird mit Hilfe eines mitgeführten Kalibrators sowie des Leerwerts ermittelt.

#### 4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 4000	PREC	Fällungsreagenz	20 ml
	SOLA	Reagenzlösung A	7 ml
	SOLB	Reagenzlösung B	1 ml
	SOLC	Reagenzlösung C	1 ml
	STOP	Schwefelsäure	20 ml
	CAL	Kalibrator; lyophilisiert (Konzentration siehe Spezifikationsdatenblatt)	4 x
	CTRL1	Kontrolle1; lyophilisiert	4 x
	CTRL2	Kontrolle2; lyophilisiert	4 x
	PLATE	Mikrotiterplatte (MTP)	1 x
	FOL	Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte	2 x

Neben den kompletten Kits können auch alle Komponenten einzeln bestellt werden. Bitte fordern Sie unsere Einzelkomponentenpreisliste an.

#### 5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser\*
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 20–200 µl und 100–1 000 µl
- 1,5 ml-Reaktionsgefäße (z. B. Eppendorf)
- 15 ml-Röhrchen (z. B. Falcon)
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Mikrotiterplattenschüttler
- Zentrifuge
- Vortex-Mixer
- Inkubator 37 °C
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 490–520 nm
- Geeignete Unterlage für den Umgang mit SOL A, da der Farbstoff auf Kunststoffoberflächen nicht zu entfernen ist

\* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

## 6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf, dass die Reagenzien, wie in der Vorschrift beschrieben, gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- **Der lyophilisierte Kalibrator (CAL)** ist bei **-20 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Der CAL wird vor Verwendung mit **250 µl Reinstwasser** rekonstituiert und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. Der **Kalibrator** (rekonstituierter CAL) **ist nicht stabil und kann nicht gelagert werden**.
- **Die lyophilisierten Kontrollen (CTRL)** sind bei **-20 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die Rekonstitutionsvorgaben für CTRL sind der Spezifikation zu entnehmen. **Kontrollen** (rekonstituierte CTRL) **sind nicht stabil und können nicht gelagert werden**.
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

## 7. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG

### Urinproben

**Urinproben** müssen zuerst **1:4 verdünnt** werden (z.B. 250 µl Urin + 750 µl Reinstwasser). Der Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration berücksichtigt werden.

Aus der Verdünnung werden 200 µl entnommen und in der unten beschriebenen Probenvorbereitung eingesetzt.

### Serum- und Plasmaproben

Serum- und Plasmaproben werden unverdünnt in der Probenvorbereitung eingesetzt.

### Lagerung

**Achtung:** Proben müssen kühl und lichtgeschützt aufbewahrt werden. Eine Messung ist dann bis zu 24 Stunden nach Probenentnahme möglich. Bei Raumtemperatur sind die Proben nicht stabil.

## 8. TESTDURCHFÜHRUNG

Als **Leerwert** (Nullstandard) wird **Wasser** pipettiert.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

### Probenvorbereitung

1.	200 µl vorbereitete Probe bzw. <b>Kalibrator</b> (rekonstituierter CAL), <b>Leerwert</b> und <b>Kontrolle 1</b> bzw. <b>Kontrolle 2</b> (rekonstituierte CTRL1 bzw. CTRL2) in 1,5 ml-Reaktionsgefäße pipettieren und mit 200 µl <b>Fällungsreagenz</b> (PREC) versetzen.
2.	Gut vortexen.
3.	Zentrifugation bei 10 000 g, 30 Minuten.

### Pipettierschema

1.	Die <b>Arbeitslösung</b> muss direkt vor dem Test <b>frisch angesetzt</b> werden: 10 Volumen <b>Reagenzlösung A</b> (SOL A) werden mit je 1 Volumen <b>Reagenzlösung B</b> und <b>Reagenzlösung C</b> (SOL B und C) versetzt (z. B. für eine ganze Platte: 6 ml Reagenzlösung A mit je 600 µl Reagenzlösung B und Reagenzlösung C). <b>Bitte beachten Sie:</b> Es wird empfohlen, beim Umgang mit <b>Reagenzlösung A</b> eine geeignete Unterlage zu verwenden, da der Farbstoff von Kunststoffoberflächen nicht zu entfernen ist.
2.	Für eine Doppelbestimmung werden <b>2 x je 100 µl</b> der Überstände des <b>Kalibrators</b> (CAL), des <b>Leerwerts</b> , der <b>Kontrolle 1</b> bzw. <b>Kontrolle 2</b> (CTRL1 bzw. CTRL2) und der <b>Proben</b> in die <b>Mikrotiterplatte</b> (PLATE) pipettiert.
3.	Zugabe von je <b>50 µl</b> der frisch vorbereiteten <b>Arbeitslösung</b> in die Wells
4.	<b>Mikrotiterplatte</b> (PLATE) mit Folie abkleben und für <b>3 h bei 37°C</b> inkubieren.
5.	Zugabe von je <b>150 µl Schwefelsäurelösung</b> (STOP) in die Wells.

6.	Die <b>Mikrotiterplatte</b> (PLATE) auf einem Horizontalschüttler bei <b>Raumtemperatur</b> (15–30 °C) <b>20 Minuten</b> schütteln (ohne Abkleben mit Folie). Der gebildete orange Farbstoff kann ausflocken. Durch 2-3-maliges Aufziehen mit einer Pipette können die Flocken wieder aufgelöst werden.
7.	Messung der Absorption erfolgt bei 492 oder 520 nm.

## 9. AUSWERTUNG

Für die Auswertung der Messergebnisse wird die lineare Regression verwendet. Dem Leerwert wird hierbei der Wert null zugewiesen.

**Bitte beachten Sie:** für die Auswertung von **Urinproben** ist die verwendete Verdünnung mit einzuberechnen.

Die Konzentrationen des Kalibrators (CAL) ist der Kalibratorspezifikation zu entnehmen.

Die Konzentrationen der Kontrollen (CTRL) sind der Kontrollspezifikation zu entnehmen.

## 10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

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 AG die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

### *Referenzwerte*

**10–37,5 mg/l**

Dieser Referenzwert wurde anhand von 80 Patientenproben (Serum und Plasma-proben) evaluiert.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.



## 11. TESTCHARAKTERISTIKA

### *Genauigkeit – Präzision*

#### **Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n=12**

Die Wiederholbarkeit wurde gemäß CLSI-Richtlinie EP5-A2 mit einer Li-Heparinat-Plasmaprobe unter **gleichbleibenden Bedingungen** (Bediener, System, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [mg/l]	VK [%]
1	54,7	6,5

#### **Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n=42**

Die Reproduzierbarkeit wurde gemäß CLSI-Richtlinie EP5-A2 mit Li-Heparinat-Plasmaproben unter **variablen Bedingungen** (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [mg/l]	VK [%]
1	27,1	7,1
2	40,3	7,9

### *Genauigkeit – Richtigkeit*

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. Dafür wurden 9 Li-Heparinat-Plasmaproben mit bekannten Vitamin-C-Konzentrationen gemessen und die Wiederfindung berechnet.

Die Wiederfindung lag im Bereich von 100,5 bis 118,0%.

### *Linearität*

Die Linearität zeigt die Fähigkeit einer Methode, ein Ergebnis proportional zur Analytkonzentration in einer Probe zu liefern. Sie wurde gemäß CLSI-Richtlinie EP06-A mittels serieller Verdünnung einer Li-Heparinat-Plasmaprobe nachgewiesen.

Für Vitamin C in Serum, Li-Heparinat-Plasma und Urin wurde ein lineares Verhalten im Bereich von 11,2 bis 55,7 mg/l nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als  $\pm 20\%$ .

Probe	Verdünnung	Erwartet [mg/l]	Gemessen [mg/l]	Wiederfindung [%]
1	Unverdünnt	57,4	57,4	-
	1 : 1,2	50,6	55,7	110,1
	1 : 1,5	41,3	48,8	118,0
	1 : 2,2	32,1	37,0	115,2
	1 : 4,0	22,8	25,5	111,6
	1 : 19,2	13,6	14,1	103,3

### Analytische Sensitivität

Die im Folgenden aufgeführten Werte wurden in Bezug auf die Kalibrationskurve ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungsfaktoren ermittelt.

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als  $B_0 + 3 \text{ SD}$ . Gemessen wurde 22-mal der Standard null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 1,98 mg/l.

Probe	Mittelwert [OD]	Standardabweichung [OD]	Nachweisgrenze [mg/l]
1	0,0135	0,0021	1,98

### Analytische Spezifität

Es wurden keine Interferenzen durch andere Blutbestandteile gefunden.

## 12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Als Vorsichtsmaßnahme wird empfohlen, das verwendete Humanmaterial stets als potenziell infektiös zu betrachten.
- 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.
- Die Schwefelsäurelösung (STOP) besteht aus verdünnter Schwefelsäure ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ).  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit

Vorsicht benutzt werden.  $H_2SO_4$  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. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.

- Das Fällungsreagenz (PREC) besteht aus Säure und muss mit Vorsicht behandelt werden. Sie 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. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.
- Reagenzien dieser Testpackung enthalten organische Lösungsmittel. Berührungen mit der Haut oder den Schleimhäuten sind zu vermeiden.

### 13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- IDK® ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettierolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundia-



agnostik 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 Vorfälle im Zusammenhang mit dem Testkit sind der Immundiagnostik AG sowie der nationalen Aufsichtsbehörde zu melden.

## 14. LITERATUR

1. Esteve MJ, Farre R, Frigola A, Garcia-Cantabella JM (1997) Determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in blood plasma and serum by liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* **24**;688(2):345-9.
2. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz textbook of clinical chemistry, 5th ed. Saunders: Philadelphia, 2011

### Verwendete Symbole:

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-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

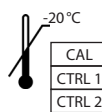
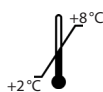
# IDK<sup>®</sup> Vitamin C

*For colorimetric determination of Vitamin C  
in Li-heparine plasma, serum and urine*

Valid from 2022-09-07



**K 4000**



**Immundiagnostik AG**, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

# Table of Contents

<b>1. INTENDED USE</b>	<b>13</b>
<b>2. INTRODUCTION</b>	<b>13</b>
<b>3. PRINCIPLE OF THE TEST</b>	<b>13</b>
<b>4. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>14</b>
<b>5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>14</b>
<b>6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS</b>	<b>15</b>
<b>7. SAMPLE PREPARATION AND STORAGE</b>	<b>15</b>
<b>8. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>16</b>
<i>Sample preparation</i>	16
<i>Test procedure</i>	16
<b>9. RESULTS</b>	<b>17</b>
<b>10. QUALITY CONTROL</b>	<b>17</b>
<i>Reference range</i>	17
<b>11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>17</b>
<i>Accuracy – Precision</i>	17
<i>Accuracy – Trueness</i>	18
<i>Linearity</i>	18
<i>Analytical sensitivity</i>	19
<i>Analytical specificity</i>	19
<b>12. PRECAUTIONS</b>	<b>19</b>
<b>13. GENERAL NOTES ON THE TEST</b>	<b>20</b>
<b>15. REFERENCES</b>	<b>20</b>

## 1. INTENDED USE

This colorimetric microtiter plate assay is suitable for the determination of vitamin C (ascorbic acid) in Li-heparine plasma, serum and urine.

For *in vitro* diagnostic use only.

## 2. INTRODUCTION

Vitamin C (ascorbic acid), being a part of the antioxidative defense system, is found in both the cytosol and extracellular spaces. Depending on the concentration and the availability of transitional metals, it has antioxidative as well as prooxidative features. The antioxidative effect dominates, especially in extracellular space. Since it acts through formation of semi-dehydro-ascorbate and dehydro-ascorbate respectively, as an electron donor transferring hydrogen to acceptor substances by reversibility, ascorbic acid has strong reducing effects.

Vitamin C contributes to the antioxidative defense system in two different ways: it reacts with reactive oxygen species, especially peroxide radicals, and regenerates  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E). Vitamin C also has a pro-oxidative effect in combination with transition metals. It catalyses the reduction of  $\text{Fe}^{3+}$  to  $\text{Fe}^{2+}$ . The created bivalent iron ions react faster with  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Therefore, the formation of  $\text{OH}\cdot$  radicals is supported through the Haber-Weiss-Reaction.

Due to the very small concentration of free transition metals in biological tissues, the antioxidative features are predominant. As a result of increased oxidative stress, the level of vitamin C is reduced in various syndromes, e.g. the level of vitamin C in blood from HIV positive patients is significantly lower. The content in blood plasma falls from  $75.7 \mu\text{mol/l}$  to  $40.7 \mu\text{mol/l}$ . Smoking causes a high consumption of vitamin C in the blood plasma. Protein thiols are oxidised and after the vitamin C pool has been depleted, lipid peroxidation begins.

### Indications

- Determination of vitamin C status
- Monitoring infusion therapy
- Monitoring of oral vitamin C substitution (checking the individual capacity of gastro-intestinal vitamin C resorption)

## 3. PRINCIPLE OF THE TEST

In serum and plasma vitamin C is found as ascorbic acid as well as its oxidized form, dehydro-ascorbate. Both forms are biologically active. In our vitamin C assay, an oxidation is induced prior to analysis so that both forms are measured. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 492 nm) vs. concentration is

generated, using the values obtained from the standard. The concentration of the sample is determined using the value obtained from calibrator and the blank value.

#### 4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit Components	Quantity
K 4000	PREC	Precipitation reagent	20 ml
	SOLA	Reagent solution A	7 ml
	SOLB	Reagent solution B	1 ml
	SOLC	Reagent solution C	1 ml
	STOP	Sulfuric acid	20 ml
	CAL	Calibrator; lyophilised (see specification data sheet for concentration)	4 x
	CTRL1	Control1; lyophilised	4 x
	CTRL2	Control2; lyophilised	4 x
	PLATE	Microtiter plate (MTP)	1 x
	FOL	Microtiter plate coverfoil	2 x

Individual components can be ordered separately from Immundiagnostik. Please ask for the price list of the individual components.

#### 5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultrapure water\*
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 20–200 µl and 100–1 000 µl
- Multi-channel dispenser or repeating dispenser
- 1.5 ml reaction tubes (e.g. Eppendorf)
- 15 ml tubes (e.g. Falcon)
- Horizontal microtiter plate shaker
- Centrifuge
- Vortex mixer
- Incubator for 37 °C
- Microtiter plate reader at 490–520 nm
- A suitable place mat when working with solution A, because solution A contains dye which cannot be cleaned off plastic surfaces

\* Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure water (water type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).



## 6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- The **lyophilised calibrator** (CAL) is stable at **-20°C** until the expiry date stated on the label. The CAL must be reconstituted with **250 µl of ultrapure water**. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes at room temperature, and mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. **Calibrator** (reconstituted CAL) **is not stable and cannot be stored.**
- The **lyophilised controls** (CTRL) are stable at **-20°C** until the expiry date stated on the label. **Reconstitution** details are given in the **specification**. **Controls** (reconstituted CTRL) **are not stable and cannot be stored.**
- 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. SAMPLE PREPARATION AND STORAGE

### Urine samples

**Urine samples** must first be **diluted 1:4** (e.g. 250 µl urine + 750 µl ultrapure water). This dilution factor must be taken into consideration when calculating the concentration.

Take 200 µl of the diluted sample and use it for the sample preparation explained below.

### Serum and plasma samples

Serum and plasma samples are not to be diluted and used directly for the sample preparation explained below.

### Storage

**Attention:** Samples should be kept in a cool and dark place. Samples can then be measured withing 24 hours after blood withdrawal. Samples are not stable at room temperature.

## 8. ASSAY PROCEDURE

**Water** is used as **blank** (zero standard).

We recommend to carry out the tests in duplicate.

### Sample preparation

1.	Pipet 200 µl prepared sample, <b>calibrator</b> (reconstituted CAL), blank and <b>control 1</b> and <b>control 2</b> (reconstituted CTRL1 and CTRL2) into 1.5 ml reaction tubes and add 200 µl <b>precipitation agent</b> (PREC).
2.	Mix well.
3.	Centrifuge at 10 000 <i>g</i> , 30 minutes.

### Test procedure

1.	The <b>working solution</b> must be <b>prepared directly before the test</b> : mix 10 volumes of <b>reagent solution A</b> (SOL A) with each 1 volume of <b>reagent solution B</b> and <b>reagent solution C</b> (SOL B and C); example for a whole plate: 6 ml SOL A plus each 600 µl SOL B and SOL C. <b>Please note: reagent solution A</b> contains dye which cannot be cleaned off plastic surfaces. It is therefore recommended to use a suitable place mat when working with reagent solution A.
2.	Add <b>2 x 100 µl</b> of the <b>supernatants</b> of <b>calibrator</b> (CAL), <b>blank</b> , <b>control 1</b> and <b>control 2</b> (CTRL1 and CTRL2) or <b>samples</b> into the <b>microtiter plate</b> (PLATE) wells in duplicates.
3.	Add <b>50 µl</b> of the freshly prepared <b>working solution</b> in the wells.
4.	Cover the <b>microtiter plater</b> (PLATE) with foil and incubate <b>for 3 h at 37 °C</b> .
5.	Add <b>150 µl</b> of <b>sulfuric acid</b> (STOP) in the wells.
6.	Shake <b>microtiter plate</b> (PLATE) on a horizontal shaker at <b>room temperature</b> (15-30 °C) <b>for 20 min</b> (without any foil cover). An orange precipitate can be formed. The precipitate can be dissolved by repeatedly (2-3 times) drawing up the solution with the pipette.
7.	Determine the absorption at 492 nm or 520 nm.

## 9. RESULTS

Linear regression is used to calculate the results. The blank must be specified with the value zero.

**Please note:** for the analysis of **urine samples** the used dilution factor has to be taken into consideration.

Please refer to the calibrator specification for the concentration of the calibrator (CAL).

Please refer to the control specification for the concentrations of controls (CTRL).

## 10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

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.

### *Reference range*

**10 – 37,5 mg/l**

The reference range was evaluated with 80 patient plasma and serum samples. We recommend each laboratory to establish its own reference range.

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Accuracy – Precision*

#### **Repeatability (Intra-Assay); n=12**

The repeatability was assessed according to CLSI guideline EP5-A2 with a Li-heparin plasma sample under constant parameters (same operator, measurement system, day and kit lot).

Sample	Mean value [mg/l]	CV [%]
1	54.7	6.5

### Reproducibility (Inter-Assay); n=42

The reproducibility was assessed according to CLSI guideline EP5-A2 with 2 Li-heparine plasma samples under varying parameters (different operators, measurement systems, days and kit lots).

Sample	Mean value [mg/l]	CV [%]
1	27.1	7.1
2	40.3	7.9

### Accuracy – Trueness

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore, 2 Li-heparine plasma samples with known concentrations were measured and the recovery was calculated.

The recovery was found between 100.5 and 118.0%.

### Linearity

The linearity states the ability of a method to provide results proportional to the concentration of analyte in the test sample within a given range. This was assessed according to CLSI guideline EP06-A with a serial dilution of a Li-heparine plasma sample.

For vitamin C in serum, Li- heparine plasma and urine, the method has been demonstrated to be linear from 11.2 to 55.7, showing a non-linear behaviour of less than  $\pm 20\%$  in this interval.

Sample	Dilution	Expected [ab/cd]	Obtained [ab/cd]	Recovery [%]
1	Undiluted	57.4	57.4	–
	1 : 1.2	50.6	55.7	110.1
	1 : 1.5	41.3	48.8	118.0
	1 : 2.2	32.1	37.0	115.2
	1 : 4.0	22.8	25.5	111.6
	1 : 19.2	13.6	14.1	103.3

*Analytical sensitivity*

Sample	Mean value [OD]	Standard Deviation [OD]	Detection limit [mg/l]
1	0.0135	0.0021	1.98

*Analytical specificity*

There were found no interferences to other blood components.

**12. PRECAUTIONS**

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- 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.
- Sulfuric acid (STOP) is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. It 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.
- Precipitating reagent (PREC) contains acid and 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 breath vapour 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.

















### 13. GENERAL NOTES ON THE TEST

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on the kit label.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.
- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- *IDK*® is a trademark of Immundiagnostik AG.
- 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.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.
- Serious incidents are to be reported to Immundiagnostik AG and the national regulatory authorities.

### 15. REFERENCES

1. Esteve MJ, Farre R, Frigola A, Garcia-Cantabella JM (1997) Determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in blood plasma and serum by liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 24;688(2):345-9.
2. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *Tietz textbook of clinical chemistry*, 5th ed. Saunders: Philadelphia, 2011

**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