



## CITRIC ACID



DETERMINAZIONE QUANTITATIVA UV dell'ACIDO CITRICO su LIQUIDO SEMINALE e URINE  
con Analizzatore MINDRAY BS-300



400 tests (6 x 20 mL)



NCI8822

### DESTINAZIONE D'USO

L'acido citrico è un debole acido organico ed in biochimica il suo sale relativo, citrato, è un importante intermedio nel ciclo di Krebs. La piruvato deidrogenasi forma acetil-CoA, da piruvato e cinque cofattori quindi la citrato sintetasi catalizza la condensazione dell'ossalacetato con acetil-CoA per formare citrato. Elevate concentrazioni di citrato possono inibire la fosfofruttokinasi, catalizzatore di uno dei passaggi limitanti la velocità della glicolisi. Nel citoplasma, il citrato può anche essere scisso in acetil-CoA per la sintesi degli acidi grassi. Modula positivamente la acetil-CoA carboxilasi, enzima che converte l'acetil-CoA in malonil-CoA (primo step della lipogenesi). E' in grado di complessare gli ioni calcio e può pertanto inibire la coagulazione. Il test nelle urine si usa per diagnosticare l'acidosi tubulare renale ed una tendenza a formare calcoli renali di calcio. Lo scompenso renale cronico, il diabete, l'ipoparatiroidismo, l'eccessiva attività fisica, gli inibitori di ACE possono diminuirne i livelli nelle urine. Possono aumentarlo una dieta ricca di carboidrati, una terapia con estrogeni, l'aumento della vitamina D. L'acido citrico può essere determinato anche nello sperma, nell'eiaculato. Nell'uomo viene formato nella prostata. La sua concentrazione nello sperma, come per il fruttosio, dipende dalla produzione del testosterone delle cellule di Leydig; così la sua determinazione pare utile come test funzionale per il testosterone nel corpo ed un forte strumento nell'indagine di fertilità. Valori bassi di acido citrico sono stati trovati nelle prostatiti croniche ed acute.

### PRINCIPIO

L'acido citrico viene convertito in ossalacetato e acetato dalla CL (citrato liase). Questa reazione avviene in presenza di un secondo enzima, che trasforma l'ossalacetato formatosi prima (e il suo prodotto decarbossilato, il piruvato) in presenza di LDH (lattato deidrogenase), MDH (malato deidrogenase) e NADH. L'intensità dell'assorbimento UV alla lunghezza d'onda indicata è proporzionale alla concentrazione di acido citrico nel campione testato.

Usando lo standard contenuto nel kit **REFCTOG111** è possibile preparare una curva di calibrazione a cui fare riferimento. Riportando sulla medesima i valori di assorbanza e le concentrazioni dei singoli punti, si possono determinare le concentrazioni dei singoli campioni.

### PRECAUZIONI D'USO

1. Questo prodotto è stato formulato per uso diagnostico in vitro.
2. Una variazione proporzionale dei volumi di reazione non modifica il risultato.
3. NON miscelare tra loro Reagenti da diversi lotti di produzione.
4. Per concentrazioni di Acido Citrico maggiori di 400 mg/L (2.08 mmol/L), diluire il campione 1:4 con soluzione fisiologica, ritestare e moltiplicare il risultato x 4.
5. Oltre alle eventuali indicazioni di rischio, il Reagente contiene conservanti (sodio azide o altri), la cui concentrazione totale è inferiore ai limiti riportati nelle Dir. 67/548/CEE e 88/379/CEE e relative modifiche per la classificazione, etichettatura ed imballaggio di preparati pericolosi (Reagenti). Tuttavia si

raccomanda di manipolare i reagenti con cautela, evitandone l'ingestione ed il contatto con gli occhi, la pelle e le mucose; di seguire quindi le norme di buona pratica di laboratorio nell'utilizzo di questi materiali. Nelle schede di sicurezza vengono descritte le procedure operative per la manipolazione di questo prodotto. Le schede di sicurezza vengono fornite su richiesta.

### ATTENZIONE!

A) Le applicazioni su analizzatori di routine possono essere totalmente diverse da quanto sviluppato come determinazione manuale; inoltre le procedure sono specifiche per ciascun analizzatore.

B) Elevata attenzione deve essere data alle sostanze interferenti: alcuni farmaci ed altre sostanze potrebbero influenzare i livelli od il dosaggio di Acido Citrico (cfr Bibliografia 2).

C) Il Reagente deve essere impiegato SOLO per l'uso indicato, da personale esperto e addestrato, seguendo le norme della buona pratica di laboratorio.

D) La diagnosi clinica non può essere fatta correttamente usando il risultato di un solo test, ma deve essere fatta integrando criticamente i risultati di diversi test di laboratorio con differenti dati clinici.

E) Una serie di fattori, quali la temperatura ambientale, la temperatura dei reagenti di lavoro, l'accuratezza dei lavaggi e il tipo di spettrofotometro, possono influire sulle prestazioni del test.

F) La curva di calibrazione deve essere sempre ripetuta ad ogni cambio di lotto del Reagente e/o del calibratore.

G) Per la manipolazione dei Reagenti devono essere osservate le precauzioni normalmente adottate in laboratorio.

Tutti i calibratori e controlli vanno considerati come campioni umani, quindi potenzialmente infettivi; devono quindi essere adottate tutte le misure di protezione adeguate allo scopo di evitare ogni tipo di potenziale rischio biologico.

### REAGENTI

Composizione del kit:

#### R1 - BUFFER

Good buffer > 10 mmol/L

#### R2 - MDH, NADH

LDH > 500 U/L

NADH > 0.1 mmol/L

MDH > 200 U/L

#### R3 - CL

CL > 300 U/L

#### R4 - DILUENT

Good buffer > 10 mmol/L

Aminoacidi Stabilizzanti

Na<sub>3</sub>N < 0.1%

**REF** NCI8822

2 x 70 mL

6 x 20 mL

6 x 2 mL

1 x 12 mL

**STABILITÀ:** i Reagenti chiusi sono stabili fino alla data di scadenza indicata sulle etichette, se conservati nel loro contenitore primario integro, a 2-8°C se non esposti a fonti termiche e/o variazioni di pressione. In caso di danneggiamento del contenitore primario provvedere allo smaltimento.

### REAGENTI AUSILIARI PER IL CONTROLLO QUALITÀ

Per garantire l'adeguata prestazione del test utilizzare i seguenti kit (vedere le relative informazioni d'uso (IFU)):



## CITRIC ACID



- CI+OX CALIBRATOR liquid
- SUBSTRATE ELEVATED CONTROL Iyo
- SUBSTRATE LOW CONTROL Iyo

REF CTOG111  
REF 0G3005  
REF 0G3006

La curva di calibrazione deve essere sempre ripetuta ad ogni cambio di lotto del Reagente e/o del calibratore.

### PREPARAZIONE DEL REAGENTE DI LAVORO

Dissolvere un vial di **R2 - MDH, NADH** con 20 mL di **R1 - BUFFER**, mescolare gentilmente evitando la formazione di schiuma. Portare i Reagenti alla temperatura di lavoro prima dell'uso. Chiudere immediatamente dopo l'impiego. I prodotti vanno manipolati in modo adeguato, tale da evitare ogni contaminazione.

L'uso non competente ci solleva da ogni responsabilità.

### STABILITA' DEL REAGENTE DI LAVORO

Il REAGENTE DI LAVORO - 12 giorni a 2-8°C. ;  
- 5 settimane a -20°C. Dopo ricostituzione, NON VANNO CONGELATI/SCONGELATI per più di una volta.

### PREPARAZIONE DEL REAGENTE STARTER

Ricordarsi che questo prodotto è termosensibile (>30°C).

Dissolvere un vial di **R3 - CL** con 2 mL di **R4 - DILUENT**, mescolare gentilmente evitando la formazione di schiuma. Portare i Reagenti alla temperatura di lavoro prima dell'uso. Chiudere immediatamente dopo l'impiego. I prodotti vanno manipolati in modo adeguato, tale da evitare ogni contaminazione.

L'uso non competente ci solleva da ogni responsabilità.

### STABILITA' DEL REAGENTE STARTER

Il REAGENTE STARTER è stabile:

- 12 giorni a 2-8°C. ;
- 5 settimane a -20°C. Dopo ricostituzione, NON VANNO CONGELATI/SCONGELATI per più di una volta.

### MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

Normale attrezzatura da laboratorio.  
Micropipette in grado di erogare da 3 a 1000 µL.  
Puntali monouso per micropipette.  
Provette in vetro trasparente per la diluizione dei campioni.  
Soluzione fisiologica, Controlli.  
Spettrofotometro od analizzatore automatico di chimica clinica.

### CAMPIONI

- Urine;
  - Liquido seminale.
- Raccolta dei campioni in accordo con CLSI (NCCLS) (cfr Bibliografia 3).  
I campioni possono essere conservati fino a 6 giorni a 2-8°C (cfr. Bibliografia 1).

### PRETRATTAMENTI DEI CAMPIONI

- Usare campioni limpidi; se necessario filtrare.
- Usare campioni a pH neutro; neutralizzare i campioni acidi ad un pH neutro (max pH ≤ 8.0);
- Campioni proteici vanno deproteinizzati come segue:
  - aggiungere acido perclorico (0.33N) 2 mL  
al campione 0.2 mL
  - miscelare e centrifugare 5 minuti x 5000 rpm
  - conservare 1 mL di surnatante
  - neutralizzare con 1 mL di idrossido di sodio (NaOH 0.3 N)
  - usare direttamente questa soluzione come campione.

- **RICORDARE** che il fattore di diluizione sarà  $F = 22$ ; tenerlo in considerazione per il calcolo
- Se sarà necessario una ulteriore diluizione, ritornare alle PRECAUZIONI D'USO nota 4).

### SMALTIMENTO DEI MATERIALI

Per lo smaltimento dei rifiuti attenersi alle regolamentazioni locali vigenti.

### PROCEDURA ANALITICA su SPETTROFOTOMETRO MANUALE

- Lunghezza d'onda: 340 nm (334-365 nm)
- Cammino ottico: 1 cm
- Lettura: contro aria o acqua distillata
- Temperatura: 37°C
- Metodo: end-point
- Reazione: 8 - 13 minuti
- Rapporto campione/reagente: 1/40/4

### Portare i reagenti alla temperatura di lavoro prima dell'uso.

Pipettare nelle provette o nelle cuvette così etichettate:

R/B: bianco reagente; S: Campione

	R/B	S
<b>REAGENTE DI LAVORO</b>	1000 µL	1000 µL
Acqua distillata	25 µL	----
Campione	----	25 µL

Miscelare e incubare per circa 3 minuti a 37°C. Misurare l'assorbanza AS1 e AR/B1. Poi aggiungere:

<b>REAGENTE STARTER</b>	100 µL	100 µL
-------------------------	--------	--------

Miscelare gentilmente, incubare a 37°C ed aspettare la fine della reazione. (5-10 minuti). Leggere AR/B2, AST2 e AS2.

Calcolare per il Bianco/Reagente  $AR/B = (AR/B1 - AR/B2)$ ;

Calcolare per il Calibratore  $AST = (AST1 - AST2)$ ;

Calcolare per il campione  $AS = (AS1 - AS2)$ .

### ATTENZIONE!

Il kit è sperimentato per spettrofotometro manuale e per sistemi HITACHI, COBAS e MINDRAY.

Le applicazioni su analizzatori automatici possono essere totalmente diverse da quanto sviluppato come determinazione manuale.

### VALORI DI RIFERIMENTO (cfr Bibliografia 1)

Valori normali Acido Citrico:

Adulti MASCHI 115 - 922 mg/24 h (0.6 - 4.8 mmol/24 h)

Adulti FEMMINE 250 - 1153 mg/24h (1.3 - 6.0 mmol/24 h)

Poiché i valori normali dipendono dall'età, dal sesso, dalla dieta, dall'area geografica e da altri fattori, ogni laboratorio deve stabilire i propri valori normali per questa procedura.

### CALCOLO

Usare questa formula generale per calcolare la concentrazione:

$(AS - AR/B)$

----- x conc. Calibratore (in mg/L) = mg/L di Acido Citrico  
 $(AST - AR/B)$

### PRESTAZIONI ANALITICHE (validate su MINDRAY BS300)

Le prestazioni del Reagente CITRIC ACID sono state sperimentate con un analizzatore MINDRAY BS300. I dati, pur rappresentando le caratteristiche del prodotto, potrebbero variare





## CITRIC ACID



per ogni singolo laboratorio e per i diversi analizzatori.

**Limitazioni del metodo:** non sono conosciute limitazioni.

**Linearità del metodo:** il test è lineare fino a 400 mg/L (2.08 mmol/L). Per concentrazioni  $\geq 400$  mg/L (2.08 mmol/L), diluire il campione 1:4 con soluzione salina, ripetere la determinazione e moltiplicare il risultato x 4.

**Sensibilità del metodo (LoD) :** il limite di sensibilità, ovvero la concentrazione minima che può essere distinta dallo zero è 8 mg/L (0.042 mmol/L).

**Interferenze:** cfr Bibliografia punto 2.

Criterio delle prove di interferenza: recupero  $\pm 10\%$  del valore iniziale. Non si sono osservate interferenze su campioni con:

- bilirubina totale fino a 40 mg/dL;
- emoglobina fino a 4600 mg/dL;
- lipemia [Intralipid ®] fino a 4000 mg/dL;
- acido ascorbico fino a 50 mg/dL.

**Precisione nella serie:** determinata su 20 replicati di due campioni.

I risultati ottenuti sono i seguenti:

Campione	Media (mg/L) $\pm 2s$	CV%
Umano 1	212 $\pm$ 8	1.71
Umano 2	391 $\pm$ 4	0.55

**Precisione tra le serie:** determinata per 5 giorni su 20 replicati al giorno per due campioni.

I risultati ottenuti sono i seguenti:

Campione	Media (mg/L) $\pm 2s$	CV%
Umano 1	209 $\pm$ 8	1.69
Umano 2	398 $\pm$ 6	0.80

**Accuratezza:** un gruppo di 20 urine è stato testato con questa procedura ed usando un reagente simile disponibile in commercio. Il confronto ha dato i seguenti risultati:

Regressione lineare  $y = 0.9894x + 0.005$   
Coefficiente di correlazione  $r = 0.9988$   $n = 20$

### BIBLIOGRAFIA

1. Textbook of Clinical Chemistry, Ed. by N.W. Tietz, W.B. Saunders Co., Philadelphia (1999).
2. Young D.S., Effect of drugs on Clinical Lab. Test, 5th Ed. AACC Press (2000).
3. Tietz Textbook of Clin. Chem. and Molecular Diagnostics, W.B. Saunders Co., Philadelphia (2012), (119; 154; 581).

CODICE RAMO CND W01010299



## CITRIC ACID



CITRIC ACID QUANTITATIVE UV ASSAY on SPERMATIC LIQUID and URINE  
with MINDRAY BS-300 Analyzer



400 tests (6 x 20 mL)

**REF** NCI8822

### INTENDED USE

Citric acid is a weak organic acid and in biochemistry its relative salt, citrate, is an important intermediate in the Krebs cycle.

Pyruvate dehydrogenase complex forms acetyl CoA, from pyruvate and five cofactors then citrate synthase catalyzes the condensation of oxaloacetate with acetyl CoA to form citrate. High citrate conc. can inhibit phosphofructokinase, catalyst of one of the rate-limiting steps of glycolysis. Into the cytoplasm, citrate can also be broken down into acetyl-CoA for fatty acid synthesis. It modulates positively acetyl-CoA carboxylase, enzyme which converts acetyl-CoA into malonyl-CoA (the first step in fatty acid synthesis). It is able to chelate calcium ions, can therefore inhibits coagulation.

The test in urine is used to diagnose renal tubular acidosis and a tendency to form calcium kidney stones. Chronic kidney failure, diabetes, hypoparathyroidism, excessive muscle activity, ACE inhibitors may decrease urine levels.

May increase it an high carbohydrate diet, estrogen therapy, increase of vitamin D.

Citric acid may also be determining citric acid in the sperm, in the ejaculate. In man it is formed in the prostate.

Its concentration in the sperm, as for fructose, depends on the testosterone production of the Leydig's cells; so the citric acid determination appear useful as a functional test for testosterone level in the body and a strong instrument in fertility investigations. Low citric acid values have been found in acute or chronic prostatitis.

### PRINCIPLE

The Citric acid is changed in oxalacetate and acetate by CL (citrate lyase). This reaction is helped by a secondary one, who transforms the oxalacetate originated before (and its decarboxilated product, pyruvate) in the presence of LDH (lactate dehydrogenase), MDH (malate dehydrogenase) and NADH.

The intensity of the UV-colour at this wavelength is proportional to the concentration of Citric acid in the tested sample.

Using the standard contained in the kit **REF** TOG111 it is possible to prepare a Calibration Curve to refer. Plotting on the Calibration Curve absorbance values and concentration for each single sample, may be determined the concentration of each sample

### PRECAUTIONS FOR USE

1. This product has been formulated for in vitro diagnostic use.
2. A proportional variation of the reaction volumes does not change the result.
3. DO NOT mix Reagents from different Production lots.
4. For concentration of Citric Acid higher than 400 mg/L (2.08 mmol/L), dilute the sample 1:4 with saline solution, repeat the determination and multiply the result by 4.
5. In addition to the possible risk indications, the Reagent can contain preservatives (as sodium azide or others), which total concentration is lower than the limits mentioned in Dir. 67/548/CEE e 88/379/CEE and following modifications regarding classification,

labelling and packaging of dangerous preparations (Reagents). However it is recommended to handle the reagents carefully, avoiding ingestion and contact with eyes, mucous membranes and skin; to use reagents according to good laboratory practice. On the material safety data sheet are detailed the operating procedures for the manipulation of this product. Material safety data sheet should be supplied on request.

### ATTENTION!

A) Applications on routine analyzers may be totally different from what developed as manual determination; in addition the procedures are specific for each analyzer.

B) Very deep attention must be given to interfering substances: certain drugs and other substances are able to influence levels of Citric Acid (see References 2).

C) The reagent must be used ONLY for the intended destinations, by expert and trained people and in according to good laboratory practice.

D) The clinical diagnosis cannot be done correctly using the result of only one test, but have to be done integrating critically the results of different laboratory tests and clinical data.

E) A lot of factors, as ambient temperature, the working reagent temperature, wash accuracy and the type of spectrophotometer, may affect the tests performances.

F) The calibration curve has to be always repeated at each change of the lot of the Reagent and/or calibrator.

G) All the precautions normally used in the laboratory must be respected for reagents handling.

All the calibrators and controls must be considered as human sample, so potentially infectious; all the protection actions must be applied to avoid any potential biological risk.

### REAGENTS

Components of the kit:

<b>R1 - BUFFER</b>		<b>REF</b> NCI8822
Good buffer	> 10 mmol/L	2 x 70 mL
<b>R2 - MDH, NADH</b>		6 x 20 mL
LDH	> 500 U/L	
NADH	> 0.1 mmol/L	
MDH	> 200 U/L	
<b>R3 - CL</b>		6 x 2 mL
CL	> 300 U/L	
<b>R4 - DILUENT</b>		1 x 12 mL
Good buffer	> 10 mmol/L	
Aminoacids		
Stabilizers		
NaN <sub>3</sub>	< 0.1%	

**STABILITY:** the Reagents are stable up to the expiry date mentioned on the labels, stored at 2-8 °C, if closed and kept in their intact primary container; if not exposed to heat sources and/or pressure variations.

In case of damaging of the primary container organize the waste disposal.



## CITRIC ACID



### AUXILIARY REAGENTS FOR QUALITY CONTROL

To grant the right performances use following kits (see the relative information for use (IFU)):

- CI+OX CALIBRATOR liquid
- SUBSTRATE ELEVATED CONTROL Iyo
- SUBSTRATE LOW CONTROL Iyo

REF CTOG111  
REF OG3005  
REF OG3006

The calibration curve has to be always repeated at each change of the lot of the Reagent and/or calibrator.

### PREPARATION OF THE WORKING REAGENT

Dissolve a vial of **R2 - MDH, NADH** with 20 mL of **R1 - BUFFER**, mix gently avoid foaming.

Let the reagent reach the room temperature before use.

Close immediately after handling.

The Reagents have to be used correctly, to avoid contamination.

An incompetent handling relieves us from any responsibility.

### STABILITY OF THE WORKING REAGENT

The **WORKING STARTER** is stable:

- 12 days at 2-8°C.;
- 5 weeks at -20°C, when frozen. After reconstitution FREEZE only ONE TIME, DO NOT REPEAT FREEZING.

### PREPARATION OF THE WORKING STARTER

**Rem that this product is temperature sensitive (>30°C).**

Dissolve a vial of **R3 - CL** with 2 mL of **R4 - DILUENT**, mix gently avoid foaming.

Let the reagent reach the room temperature before use.

Close immediately after handling.

The Reagents have to be used correctly, to avoid contamination.

An incompetent handling relieves us from any responsibility.

### STABILITY OF THE WORKING STARTER

The **WORKING STARTER** is stable 12 days at 2-8°C.

### MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Normal laboratory equipment.

Micropipettes to deliver from 3 to 1000 µL.

Disposable micropipettes tips .

Transparent glass tubes for sample dilution.

Saline solution.

Spectrophotometer or automatic analyzer for Clinical Chemistry.

### SAMPLES

- Urine.
- Spermatic liquid.

Samples collection in compliance with CLSI (NCCLS) (see References 3).

The sample can be stored at 2-8°C, up to 6 days.

(see References 1).

### SAMPLES PRETREATMENT

- Use limpid samples; If necessary, filter the samples.
- Use samples at neutral pH; neutralize the Acidic Samples at a neutral pH (max pH ≤ 8.0).
- Proteic samples may be required deproteinization as follows:
  - add perchloric acid (0.33N) 2 mL  
to the sample 0.2 mL
  - mix and centrifuge 5 minutes x 5000 rpm
  - keep 1 mL of the supernatant
  - neutralize with 1 mL sodium hydroxide (NaOH 0.3 N)

- use directly this solution as sample.

- REM that the Dilution Factor will be  $F = 22$ ; keep in mind for the Calculation

- if it will be need further dilutions, please return to PRECAUTIONS FOR USE note 4).

### WASTE DISPOSAL

Observe all federal, state and local environmental regulations for waste disposal.

### ANALYTICAL PROCEDURE ON MANUAL SPECTROPHOTOMETER

- Wavelength: 340 nm (334 - 365 nm)
- Pathlength: 1 cm
- Reading: against air or distilled water
- Temperature: 37°C
- Method: end-point
- Reaction: 8 - 13 minutes
- Sample/reagent: 1/40/4

**Let reagents reach the working temperature before use.**

Pipette in a test tube or cuvette so labelled:

R/B: Reagent Blank, S: Sample

	R/B	S
<b>WORKING REAGENT</b>	1000 $\mu$ L	1000 $\mu$ L
Distilled water	25 $\mu$ L	----
Sample	----	25 $\mu$ L

Mix and incubate for about 3 minutes at 37°C. Measure the absorbance AS1 and AR/B1. Then add:

<b>WORKING STARTER</b>	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L

Mix carefully, incubate at 37°C and wait the end of the reaction (5-10 minutes). Read AR/B2, AST2 and AS2.

Calculate for the Reagent/Blank  $AR/B = (AR/B1 - AR/B2)$ ;

Calculate for the Calibrator  $AST = (AST1 - AST2)$ ;

Calculate for the Sample  $AS = (AS1 - AS2)$ .

### ATTENTION!

**The kit is tested for a manual spectrophotometer and for HITACHI, COBAS and MINDRAY systems. The applications on automatic analysers could be completely different by what has been developed as manual determination.**

### REFERENCE VALUES (see References 1)

Normal Values Citric Acid:

Adults MALES 115 - 922 mg/24 h (0,6 - 4,8 mmol/24 h)

Adults FEMALES 250 - 1153 mg/24h (1,3 - 6,0 mmol/24 h)

Since the normal values depend on age, sex, diet, geographic area and other factors, each laboratory should establish its own normal values for this procedure.

### CALCULATION

Use this general formula to calculate the concentration:

$(AS - AR/B)$

----- x conc. Calibrator (in mg/L) = mg/L of Citric Acid

$(AST - AR/B)$

### ANALYTICAL PERFORMANCES

(validate on MINDRAY BS300)

The performances of the Reagent **CITRIC ACID** have been tested





## CITRIC ACID

**IVD**

with a MINDRAY BS300 analyzer. The data, while representing the characteristics of the product, could be different for each laboratory and for different analyzers.

**Method Limitations:** are not know limitations.

**Method Linearity:** the test is linear up to 400 mg/L (2.08 mmol/L). For concentrations  $\geq 400$  mg/L (2.08 mmol/L), it is recommended to dilute the sample 1:4 with saline solution, test again and multiply the result x 4.

**Method Sensitivity (LoD):** the sensitivity limit, that is the minimum concentration that can be distinguished by zero, is 8 mg/L (0.042 mmol/L).

**Interferences:** see References 2.

Interference test criterion: recovery  $\pm 10\%$  of initial value. No interference found on samples with:

- total bilirubin up to 40 mg/dL;
- haemoglobin up to 600 mg/dL,
- lipemia [Intralipid®] up to 4000 mg/dL;
- ascorbic acid up to 50 mg/dL.

**Within-run Precision:** determined on 20 replications of 2 samples.

The results obtained are following:

Sample	Mean (mg/L) $\pm 2s$	CV %
--------	----------------------	------

Human 1	212 $\pm$ 8	1.71
Human 2	391 $\pm$ 4	0.55

**Run-to-run Precision:** determined for 5 days with 20 replications for each days, for two samples.

The results obtained are the following:

Sample	Mean (mg/L) $\pm 2s$	CV %
Human 1	209 $\pm$ 8	1.69
Human 2	398 $\pm$ 6	0.80

**Accuracy:** a group of 20 urine has been tested using this procedure and using a similar reagent available on the market. The comparison gave these results:

Linear regression equation  $y = 0.9894x + 0.005$   
Correlation coefficient  $r = 0.9988$   $n = 20$

### REFERENCES

1. Textbook of Clinical Chemistry, Ed. by N.W. Tietz, W.B. Saunders Co., Philadelphia (1999).
2. Young D.S., Effect of drugs on Clinical Lab. Test, 5th Ed. AACC Press (2000).
3. Tietz Textbook of Clin. Chem. and Molecular Diagnostics, W.B. Saunders Co., Philadelphia (2012), (119; 154; 581).

