

Glutathione HPLC Kit

Zur Bestimmung von Glutathion in EDTA-Vollblut

For the determination of glutathione in EDTA whole blood

Gültig ab / Valid from 2018-06-07

REF **KC1800**

Σ
100
(50 Bestimmungen)

+2°C \pm 8°C

-20°C
CAL
CTRL 1
CTRL 2
REDSOL

IVD **CE**

+ 50 Bestimmungen
reduziertes
Glutathion)



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

1. VERWENDUNGSZWECK

Diese HPLC-Applikation ist für die Bestimmung von Glutathion aus EDTA-Vollblut geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Glutathion ist ein in biologischen Geweben ubiquitär vorkommendes Tripeptid, das Zellen vor oxidativen Prozessen schützt. Daneben übernimmt es wichtige Funktionen in verschiedenen Stoffwechselwegen, bei Aktivierung und Inhibition von Enzymen und Transportproteinen, sowie beim Transport von Aminosäuren.

Vor allem trägt es zur Stabilisierung von Protein- und Nicht-Protein-Sulfhydrylgruppen und zur Aufrechterhaltung eines reduzierenden intrazellulären Milieus bei.

Veränderungen im Glutathionstatus sind an der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen beteiligt :

Reperfusionsschäden, Leberschäden, Tumoren, Diabetes mellitus, Katarakt, entzündlichen Erkrankungen, chronischem Lymphödem und Strahlenschäden.

Auch Schäden durch Umwelttoxinen, Zigarettenrauch, Arzneimittelnebenwirkungen und Alterungsprozesse können mit veränderten Glutathion-Spiegeln einhergehen.

Der größte Teil des Glutathions liegt als **reduziertes Glutathion (GSH)** vor (in EDTA-Vollblut ca. 90%), nur ein kleiner Teil in der **oxidierten Form (GSSG)**. Das deutlich zugunsten von GSH ausgerichtete Gleichgewicht wird durch die NADPH-abhängige Glutathionreduktase garantiert.

Bei oxidativem Stress wird GSH für verschiedene Reaktionen des primären und sekundären antioxidativen Schutzes verbraucht.

3. TESTPRINZIP

Die Bestimmung des Glutathions erfolgt auf zwei verschiedene Weisen nach Zugabe einer Verdünnungslösung zur Probe.

Zur Messung des reduzierten Glutathions (GSH) wird einem Aliquot der verdünnten Probe ein Reaktionspuffer und Derivatisierungslösung zugegeben. Nach Mischen und zwanzigminütiger Inkubation schließt sich ein Fällungsschritt zur Abtrennung höhermolekularer Bestandteile an.

Das andere Probenaliquot wird analog aufgearbeitet, nur dass anstelle des Reaktionspuffers eine Reduktionslösung und ein interner Standard zupipettiert werden. Dadurch findet eine Überführung des oxidierten Glutathions (GSSG) in je zwei Moleküle reduziertes Glutathion (GSH) statt, so dass in diesem Schritt das gesamte vorhandene GSH (**GSH total**) erfasst wird.

In der Derivatisierungsreaktion wird das Glutathion in ein fluoreszierendes Produkt umgesetzt.

Die Trennung mittels HPLC erfolgt in einem isokratischen Verfahren bei 30°C auf einer *Reversed-phase*-Säule in zwei Läufen hintereinander. Die Chromatogramme werden mit einem Fluoreszenzdetektor aufgenommen. Die Trennung benötigt ca. 10 Minuten für einen Lauf. Die Quantifizierung erfolgt über den mitgelieferten EDTA-Vollblut-Kalibrator und die Berechnung der Ergebnisse wird unter Zuhilfenahme eines internen Standards anhand der Integration der Peakfläche/-höhe durchgeführt. Die Messung des reduzierten Glutathions (GSH) erfolgt ohne internen Standard, da ansonsten Mischsulfide gebildet werden. Durch Subtraktion des GSH von GSH total kann der Anteil an oxidiertem Glutathion (GSSG) berechnet werden. Bitte berücksichtigen Sie, dass die ermittelte Differenz noch durch zwei dividiert werden muss, da oxidiertes Glutathion bei der Reduktion in zwei GSH gespalten wird. Die zu verwendende Formel lautet daher:

$$\frac{\text{GSH total} - \text{GSH}}{2} = \text{GSSG}$$

Zusammenfassung

Der hier vorliegende Komplettkit zur Bestimmung des Glutathions ermöglicht eine einfache, schnelle und präzise quantitative Bestimmung. Dieser Komplettkit enthält gebrauchsfertig alle Reagenzien und Verbrauchsmaterialien für insgesamt 100 Bestimmungen, d. h. 50 Bestimmungen GSH total und 50 Bestimmungen reduziertes Glutathion (GSH). Für die Bestimmung von Gesamt- und reduziertem Glutathion in 100 Proben werden zwei Kits benötigt.

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
KC1800LM	MOPHA	Laufmittel	1000 ml
KC1800KA	CAL	Kalibrator (250 µl lyoph.; Konzentration siehe Spezifikationsdatenblatt)	8 Fläschchen
KC1800IS	INT STD	Interner Standard	6 ml
KC1800RE	RECSOL	Rekonstitutionslösung	15 ml
KC1800RB	REABUF	Reaktionspuffer	27 ml
KC1800VL	DIL	Verdünnungslösung	25 ml
KC1800RL	REDSOL	Reduktionslösung (1,2 ml lyoph.)	1 Fläschchen
KC1800DL	DER	Derivatisierungslösung	12 ml
KC1800FR	PREC	Fällungsreagenz (Säure)	12 ml
KC1800KO	CTRL 1 CTRL 2	Kontrolle 1 und 2 (250 µl lyoph.; Konzentration siehe Spezifikationsdatenblatt)	2 x 3 Fläschchen

Die HPLC-Trennsäule (KC1800RP) kann separat 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

- Reinstwasser*
- 1,5-ml-Reaktionsgefäße (z. B. Eppendorf)
- Zentrifuge
- Wasserbad
- diverse Pipetten
- HPLC Gerät mit Fluoreszenz-Detektor
- reversed phase C₁₈-Säule

* 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. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- **Der lyophilisierte Kalibrator (CAL)** ist bei **-20°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor Gebrauch wird er in **0,25 ml Rekonstitutionslösung (RECSOL)** resuspendiert. Der Gehalt an Glutathion ändert sich geringfügig von Charge zu Charge, der genaue Gehalt ist dem Spezifikationsdatenblatt zu entnehmen. **Kalibrator (rekonstituierter CAL) ist nicht stabil und kann nicht gelagert werden.**
- **Die lyophilisierten Kontrollen 1 und 2 (CTRL 1 und 2)** sind bei **-20°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor Gebrauch werden sie in je **0,25 ml Rekonstitutionslösung (RECSOL)** resuspendiert. Der Gehalt an Glutathion 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.**
- **Die lyophilisierte Reduktionslösung (REDSOL)** ist bei **-20°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor Gebrauch wird sie in **1,2 ml Rekonstitutionslösung (RECSOL)** resuspendiert. **Reduktionslösung (rekonstituierte REDSOL) kann 3 Monate bei 2–8°C** gelagert werden.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2–8°C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. HINWEISE UND 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.
- 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.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

8. PROBENVORBEREITUNG

Als Probe eignet sich EDTA-Vollblut, welches aus venösem Nüchternblut gewonnen wurde.

Da Glutathion sehr oxidationsempfindlich ist, muss die Probe gekühlt versendet werden.

Die Haltbarkeit der Probe beträgt bei 2–8 °C 2 Tage, bei -20 °C 14 Tage. Bei längerer Lagerung nimmt der Anteil des oxidierten Glutathion zu.

Um Glutathion aus den Erythrozyten freizusetzen, muss die Probe vor der Analyse eingefroren und wieder aufgetaut werden.

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- 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.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

Arbeitsschema

Probenverdünnung

Pipettieren Sie **100 µl Patientenprobe, Kalibrator** oder **Kontrolle 1 oder 2** in 1,5-ml-Reaktionsgefäße (z. B. Eppendorf)

200 µl Verdünnungslösung (DIL) zugeben, mischen

Probenbearbeitung

GSH total	Reduziertes Glutathion
50 µl der verdünnten Probe	50 µl der verdünnten Probe
100 µl interner Standard (INT STD)	100 µl Reaktionspuffer (REABUF)
20 µl Reduktionslösung	100 µl Derivatisierungslösung (DER)
100 µl Derivatisierungslösung (DER)	
Gut mischen, 20 min bei 60 °C reagieren lassen	
100 µl Fällungsreagenz (PREC) zugeben, gut mischen	
10 min bei 2–8 °C stehen lassen und anschließend für 10 min bei 10 000 g zentrifugieren	
200 µl Reaktionspuffer (REABUF) in Autosampler-Vials vorlegen und 200 µl Überstand zugeben, gut mischen	
20 µl in das HPLC-System injizieren	

Chromatographische Bedingungen

Säulenmaterial:	MZ Inertsil ODS-2; 5 µm MZ PerfectBond ODS-2; 5 µm Bischoff Prontosil Eurobond; 5 µm
Säulendimension:	125 × 4 mm
Fluss:	0,75–1,0 ml/min
Fluoreszenzdetektion:	Exzitation: 385 nm Emission: 515 nm
Temperatur:	30 °C
Auftragsvolumen:	20 µl
Laufzeit:	ca. 10 Minuten

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

10. 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 äquilibriert.

11. AUSWERTUNG

Berechnung

GSH total

$$\frac{\text{Peakhöhe Probe} \times \text{Kalibratorkonzentration}^*}{\text{Peakhöhe interner Standard der Probe}} \times F = \text{Probenkonzentration}$$

$$F = \frac{\text{Peakhöhe interner Standard des Kalibrators}}{\text{Peakhöhe Kalibrator}}$$

Reduziertes Glutathion

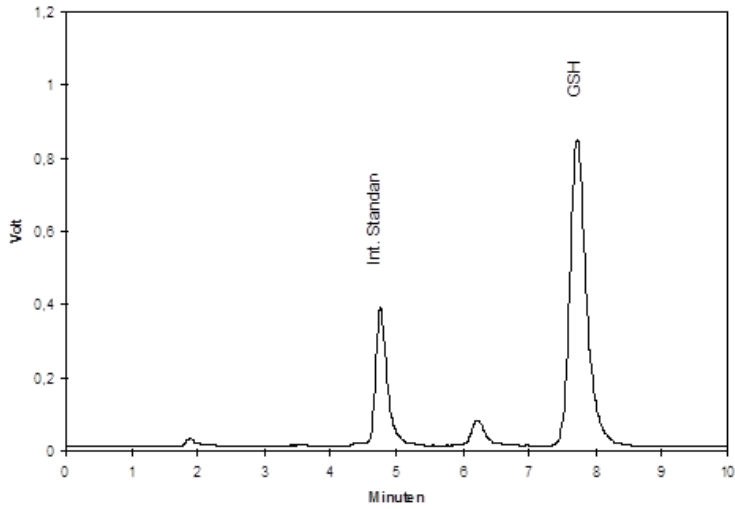
$$\text{Probenkonzentration (nmol/l)} = \frac{\text{Peakhöhe Probe} \times \text{Kalibratorkonzentration}^*}{\text{Peakhöhe Kalibrator}}$$

* siehe Spezifikationsdatenblatt

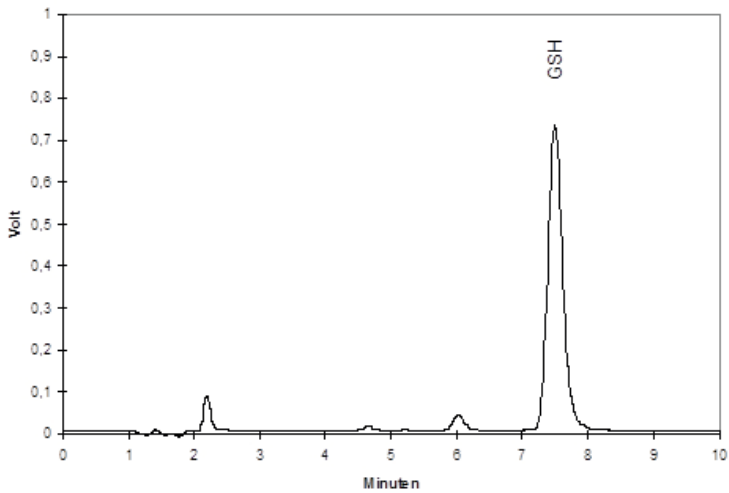
Hinweis: Alternativ zur Peakhöhe kann auch die Peakfläche zur Auswertung herangezogen werden.

Musterchromatogramme

GSH-Gesamt



freies GSH



12. EINSCHRÄNKUNGEN

Seren und Plasmen sind zur Messung nicht geeignet, da sie sehr niedrige Glutathion-Konzentrationen aufweisen. Aus diesem Grund ist eine Differenzierung in oxidiertes und reduziertes Glutathion in Serum und Plasma nicht möglich. Lipämische Proben sollten zur Messung nicht verwendet werden.

13. QUALITÄTSKONTROLLE

Bitte beachten Sie, dass alle unsere Angaben sich auf reduziertes Glutathion (GSH bzw. total GSH) beziehen.

Referenzbereich

Anhand einer laborinternen Studie mit Proben von augenscheinlich Gesunden (n = 50) wurden folgende Werte ermittelt.

GSH total:	763–1191 µmol/l
Reduziertes Glutathion (GSH):	620–970 µmol/l
Glutathion _{reduziert/total} :	81–93 %

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren. Die Angabe des Referenzbereichs für Glutathion 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.

14. TESTCHARAKTERISTIKA

Bitte beachten Sie, dass alle unsere Angaben sich auf reduziertes Glutathion (GSH bzw. total GSH) beziehen.

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 12)

- GSH total: 3,9% (577 µmol/l)
- Reduziertes Glutathion: 3,3% (360 µmol/l)

Inter-Assay (n = 12)

- GSH total: 4,2 % (544 µmol/l)
- Reduziertes Glutathion: 3,3 % (108 µmol/l)

Linearität

- GSH total: bis 10 mmol/l
- Reduziertes Glutathion: bis 10 mmol/l

Nachweisgrenze

- GSH total: 6 µmol/l
- Reduziertes Glutathion: 6 µmol/l

15. ENTSORGUNG

Das Laufmittel (MOPHA), Reduktionslösung (REDSOL), Reaktionspuffer (REABUF), interner Standard (INT STD) und Derivatisierungslösung (DER) müssen als halogenfreier Lösungsmittelabfall entsorgt werden. Das Fällungsreagenz (PREC) 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

Problemstellung	Mögliche Ursache	Behebung
Störpeaks	Injektor verunreinigt	Injektor reinigen
	Kontamination am Säulen- kopf	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 ver- wenden
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
Unruhige Basislinie	Pumpe fördert ungenau	Pumpe überprüfen, entlüften
	Detektorzelle verschmutzt	Detektorzelle reinigen

17. LITERATUR












1. Chawla, R. et al., 1984. Plasma cysteine, cystine, and glutathione in cirrhosis. *Gastroenterology*, **87**(4), pp.770–776.
2. Henning, S.M. et al., 1991. Glutathione blood levels and other oxidant defense indices in men fed diets low in vitamin C. *The Journal of nutrition*, **121**(12), pp.1969–1975.

3. Meister, A., 1995. Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. *Biochimica et biophysica acta*, **1271**, pp.35–42.

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.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr 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.

Verwendete Symbole:

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		

Glutathione HPLC Kit

For the determination of glutathione in EDTA whole blood

Valid from 2018-06-07

REF **KC1800**


100
(50 determinations
total glutathione
+ 50 determina-
tions reduced
glutathione)

+2°C +8°C

-20°C
CAL
CTRL 1
CTRL 2
REDSOL

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	17
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	17
3. PRINCIPLE OF THE TEST	17
4. MATERIAL SUPPLIED	18
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	19
6. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	19
7. PRECAUTIONS	20
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	20
9. ASSAY PROCEDURE	20
<i>Procedural notes</i>	20
<i>Test procedure</i>	21
<i>Chromatographic conditions</i>	22
10. TREATMENT OF THE COLUMN	22
11. RESULTS	22
<i>Calculation</i>	22
<i>Typical chromatograms</i>	23
12. LIMITATIONS	24
13. QUALITY CONTROL	24
<i>Reference range</i>	24
<i>Controls</i>	24
14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	24
<i>Precision and reproducibility</i>	24
<i>Linearity</i>	25
<i>Detection limit</i>	25
15. DISPOSAL	25
16. TROUBLESHOOTING	25
17. REFERENCES	26
18. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	27

1. INTENDED USE

This HPLC application is intended for the quantitative determination of glutathione in EDTA whole blood. For *in vitro* diagnostic use only.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Glutathione is an intracellular tripeptide common in all tissues, which protects the cells against oxidative processes. It has important functions in several metabolic pathways like activation or inhibition of enzymes, and transport of molecules and at the transport of amino acids.

A very important function is stabilizing SH-groups in proteins and other molecules to maintain a reducing intracellular environment.

Alterations in the glutathione status are involved in the pathogenesis of several diseases:

Reperfusion damage, liver injury, cancer, diabetes mellitus, cataract, inflammatory diseases, chronic lymphatic oedema, radiation damages.

Altered glutathione concentrations might also be due to pollution, cigarette smoke, side effects of drugs and aging.

Most of the total cellular glutathione is **reduced (GSH)**, in EDTA-blood approx. 90%, only a minor amount of 10% is **oxidised (GSSG)**. This steady state is maintained by the NADPH-dependent glutathione reductase.

In case of oxidative stress, GSH is needed for several reactions of the primary and secondary anti oxidative protection.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The determination of glutathione starts by adding a dilution solution to the sample and dividing it in two aliquots.

The measurement of the reduced fraction is performed by the addition of reaction buffer and derivatisation solution. After an incubation of 20 minutes, in which GSH is transformed into a fluorescent product, a precipitation reagent is added to separate higher molecular substances.

The measurement of the total glutathione is performed by the addition of the reduction solution, internal standard and derivatisation solution. After that, the sample is handled like the reduced fraction. The reduction solution reduces all the oxidised glutathione (GSSG) to each two molecules GSH, resulting in the measurement of **total GSH**.

20 µl of the supernatant are injected into the HPLC system.

The separation via HPLC follows an isocratic method at 30°C using a reversed phase column in two runs. One run lasts 10 minutes. The chromatograms are recorded by a fluorescence detector. The quantification is performed with the delivered EDTA-blood calibrator; the concentration is calculated via integration of the peak area/height by the external standard method for the reduced fraction and the internal standard method for the total GSH fraction. For the measurement of the reduced fraction, it is not possible to use the internal standard because of the production of mixed sulfides.

The amount of oxidised glutathione (GSSG) can be calculated by subtraction of the reduced glutathione (GSH) from the total GSH. Please note that the obtained difference must be divided by two as oxidised glutathione (GSSG) is composed of two GSH molecules. The formula to be used is as follows:

$$\frac{\text{total GSH} - \text{GSH}}{2} = \text{GSSG}$$

Summary

This HPLC application allows the quantitation of total and reduced glutathione in an easy, fast, and precise way. The kit includes all reagents for a total of 100 determinations, i.e. 50 total GSH and 50 reduced glutathione (GSH). For the determination of total and reduced glutathione in a total of 100 samples 2 kits are required.

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
KC1800LM	MOPHA	Mobile phase	1000 ml
KC1800KA	CAL	Calibrator (250 µl lyoph.; see specification data sheet for concentration)	8 vials
KC1800IS	INT STD	Internal standard	6 ml
KC1800RE	RECSOL	Reconstitution solution	15 ml

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
KC1800VL	DIL	Dilution solution	25 ml
KC1800RL	REDSOL	Reduction solution (1.2 ml lyoph.)	1 vial
KC1800RB	REABUF	Reaction buffer	27 ml
KC1800DL	DER	Derivatisation solution	12 ml
KC1800FR	PREC	Precipitation solution (acid)	12 ml
KC1800KO	CTRL 1 CTRL 2	Control 1 and 2 (250 µl lyoph.; see specification data sheet for concentration)	2 x 3 vials

The HPLC column (KC1800RP) as well as individual components can be ordered separately from Immundiagnostik. Please ask for the price list of the individual components.

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- 1.5 ml reaction tubes (e.g. Eppendorf)
- Centrifuge
- Various pipettes
- HPLC with fluorescence detector
- Reversed phase C₁₈ column
- Water bath

* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure 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. 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 **0.25 ml reconstitution solution (RECSOL)**. The concentration of glutathione slightly changes from lot to lot, the exact concentration is stated on the specification data sheet. **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 **0.25 ml reconstitution solution (RECSOL)**. The concentration of glutathione 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 reduction solution** (REDSOL) is stable at **-20 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, the REDSOL has to be reconstituted with **1.2 ml reconstitution solution** (RECSOL). **Reduction solution** (reconstituted REDSOL) can be stored for **3 months at 2–8 °C**.
- 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. 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 consists of an acid. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

EDTA-blood is suited for this test system.

Glutathione is quite sensitive against oxidation. Samples should be transported at 2–8 °C.

Samples are stable for at least 2 days at 2–8 °C or for 2 weeks at -20 °C. During longer storage, the content of oxidised glutathione increases.

Note: Before analysis, lyse the erythrocytes by freezing and thawing in order to release glutathione.

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Control samples should be analyzed with each run.
- 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.

- The assay should always be performed according the enclosed manual.

Test procedure

Sample dilution

Pipet 100 µl patient sample, calibrator or control 1 or 2 in 1.5 ml reaction tubes (e.g. Eppendorf)
--

Add 200 µl dilution solution (DIL) and mix

Sample processing

Total GSH	Reduced glutathione
50 µl of the diluted sample	50 µl of the diluted sample
100 µl internal standard (INT STD)	100 µl reaction buffer (REABUF)
20 µl reduction solution	100 µl derivatisation solution (DER)
100 µl derivatisation solution (DER)	
Mix well, incubate for 20 min at 60 °C	
Add 100 µl precipitation reagent (PREC) , mix well	
Precipitate for 10 min at 2–8 °C , then centrifuge for 10 min at 10 000 g	
Pipet 200 µl reaction buffer (REABUF) into an autosampler vial and add 200 µl supernatant, mix well	
Inject 20 µl into the HPLC system	

Chromatographic conditions

Column material:	MZ Inertsil ODS-2; 5 µm
	MZ PerfectBond ODS-2; 5 µm
	Bischoff Prontosil Eurobond; 5 µm
Column dimension:	125 × 4 mm
Flow rate:	0.75–1.0 ml/min
Fluorescence detection::	Excitation: 385 nm
	Emission: 515 nm
Temperature:	30 °C
Injection volume:	20 µl
Running time:	~ 10 min

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

10. 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).

11. RESULTS

Calculation

Total GSH

$$\frac{\text{Peak height sample} \times \text{calibrator concentration}^*}{\text{Peak height internal standard of the sample}} \times F = \text{sample concentration}$$

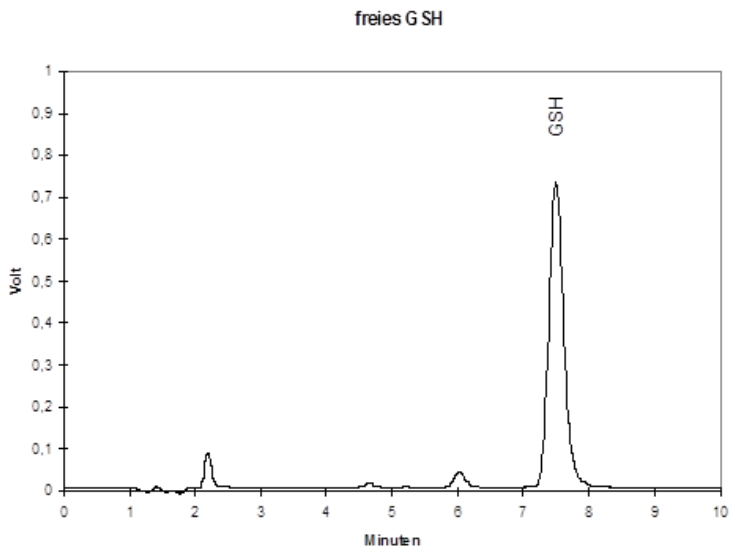
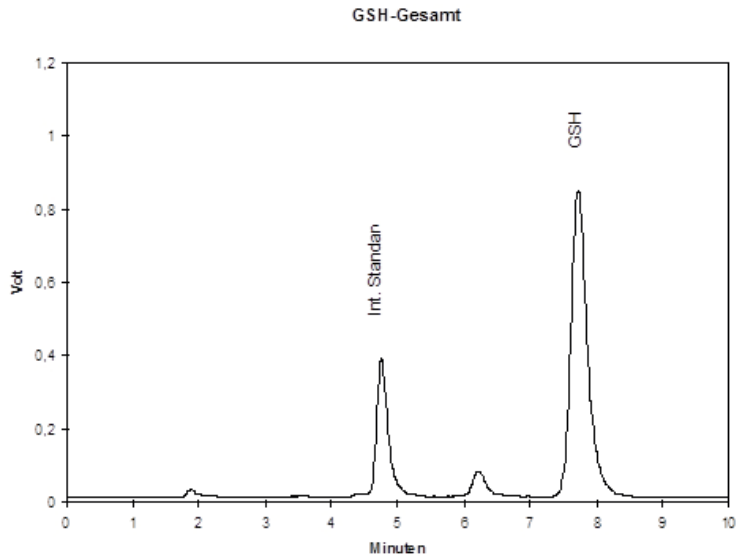
$$F = \frac{\text{Peak height internal standard of the calibrator}}{\text{Peak height calibrator}}$$

Reduced glutathione (GSH)

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

* see specification data sheet

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

Typical chromatograms

12. LIMITATIONS

Do not use serum or plasma samples. The content of glutathione in serum and plasma is lower, and it is not possible to distinguish between the oxidised and reduced glutathione form. Do not use lipaemic samples.

13. QUALITY CONTROL

Please keep in mind that all data mentioned here are referring to reduced glutathione (GSH or total GSH).

Reference range

Based on Immundiagnostik AG in-house studies of samples of apparently healthy persons (n = 50), the following values were estimated.

total GSH:	763–1191 µmol/l
reduced glutathione (GSH):	620–970 µmol/l
GSH/total GSH:	81–93 %

We recommend each laboratory to establish its own reference range. The above mentioned values are only for orientation and may vary 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.

14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Please keep in mind that all data mentioned here are referring to reduced glutathione (GSH or total GSH).

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 12)

- Total GSH: 3.9% (577 µmol/l)
- Reduced glutathione: 3.3% (360 µmol/l)

Inter-Assay (n = 12)

- Total GSH: 4.2 % (544 µmol/l)
- Reduced glutathione: 3.3 % (108 µmol/l)

Linearity

- Total GSH: up to 10 mmol/l
- Reduced glutathione: up to 10 mmol/l

Detection limit

- Total GSH: 6 µmol/l
- Reduced glutathione: 6 µmol/l

15. DISPOSAL

The mobile phase (MOPHA), reduction solution (REDSOL), internal standard (INT STD), and derivatisation solution (DER) must be disposed as non-halogenated solvents. The precipitation reagent (PREC) can be neutralised with NaOH to pH 7.0 and disposed as salt solution.

Important: Reaction will produce heat, be careful!

Please refer to the appropriate national guidelines.

16. 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

Problem	Possible cause	Solution
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. Chawla, R. et al., 1984. Plasma cysteine, cystine, and glutathione in cirrhosis. *Gastroenterology*, **87**(4), pp.770–776.

2. Henning, S.M. et al., 1991. glutathione blood levels and other oxidant defense indices in men fed diets low in vitamin C. *The Journal of nutrition*, **121**(12), pp.1969–1975.
3. Meister, A., 1995. Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. *Biochimica et biophysica acta*, **1271**, pp.35–42.

18. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The test components contain organic solvents. Contact with skin or mucous membranes must be avoided.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- 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.

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
	Attention		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		