

Glutathion HPLC Kit

Zur Bestimmung von Glutathion in EDTA-Vollblut

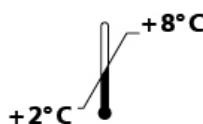
Glutathione HPLC Kit

For the determination of Glutathione in EDTA-blood

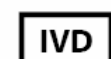
Gültig ab/valid from 30.06.2008



KC 1800



CAL
INT STD
CTRL 1
CTRL 2



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim
Tel.: ++49 6251 70190-0
Fax: ++ 49 6251 849430
e.mail: Info@immundiagnostik.com
www.immundiagnostik.com

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

1. INTENDED USE	17
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	17
3. PRINCIPLE OF THE TEST	17
4. MATERIAL SUPPLIED	19
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	19
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	20
7. PRECAUTIONS	20
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	20
9. ASSAY PROCEDURE	21
PROCEDURAL NOTES	21
SAMPLE AND STANDARD PREPARATION	22
CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS	23
10. TREATMENT OF THE COLUMN	23
11. RESULTS	23
CALCULATION	23
TYPICAL CHROMATOGRAM	24
12. LIMITATIONS	25
13. QUALITY CONTROL	25
EXPECTED VALUES	25
CONTROLS	25
14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	26
PRECISION AND REPRODUCIBILITY	26
LINEARITY	26
DETECTION LIMIT	26
15. DISPOSAL	26
16. TROUBLESHOOTING	27
17. REFERENCES	28
18. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	28

1. VERWENDUNGSZWECK

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

2. EINLEITUNG

Glutathion (GSH) 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 Nichtprotein-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 Umweltnoxen, Zigarettenrauch, Arzneimittelnebenwirkungen und Alterungsprozesse können mit veränderten GSH-Spiegeln einhergehen.

Der weitaus größte Teil des Gesamtglutathions liegt als reduziertes Glutathion 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 2 verschiedenen Weisen nach Zugabe einer Verdünnungslösung zur Probe.

Zur Messung des reduzierten 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 das anstelle des Reaktionspuffers eine Reduktionslösung und ein interner Standard zupipettiert werden. Dadurch findet eine Überführung des oxidierten Glutathions (GSSG) in reduziertes GSH statt, so daß in diesem Schritt das gesamte vorhandene Glutathion 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 über die "interne Standard-Methode" anhand der Integration der Peakfläche durchgeführt. Die Messung des reduzierten Glutathions erfolgt ohne internen Standard, da ansonsten Mischsulfide gebildet werden. Durch Subtraktion

$$\text{GSH}_{\text{gesamt}} - \text{GSH}_{\text{reduziert}}$$

kann der Anteil an oxidiertem Glutathion berechnet werden.

Hinweis: Bitte berücksichtigen Sie, dass die ermittelte Differenz noch durch zwei dividiert werden muss, da oxidiertes Glutathion bei der Reduktion in zwei GSH gespalten wird

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 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 von 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.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
KC1800LM	MOPHA	Laufmittel	1000 ml
KC1800KA	CAL	Kalibrator (lyoph. 0,25 ml; Konzentration siehe Etikett)	8 Fläschchen
KC1800IS	INT STD	Interner Standard	6 ml
KC1800RE	RECSOL	Rekonstitutionslösung	5 ml
KC1800RB	REABUF	Reaktionspuffer	27 ml
KC1800VL	DIL	Verdünnungslösung	25 ml
KC1800RL	REDSOL	Reduktionslösung (lyoph. 1,2 ml)	1 Fläschchen
KC1800DL	DER	Derivatisierungslösung	12 ml
KC1800FR	PREC	Fällungsreagenz	12 ml
KC1800KO	CTRL 1 CTRL 2	Kontrolle 1 und 2 (lyoph. 250 µl; Konzentration, siehe Produktspezifikation)	2 x 3 Fläschchen

Die HPLC Trennsäule (KC 1800RP) 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

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

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Der **Kalibrator** (CAL) wird in 0,25 ml der mitgelieferten Rekonstitutionslösung (RECSOL) resuspendiert. Nicht verbrauchte Reste sind zu entsorgen, da erneutes Einfrieren den Kalibrator teilweise zerstört. Der Gehalt an Glutathion ändert sich geringfügig von Charge zu Charge, der genaue Gehalt ist auf dem Etikett angegeben.
- Die **Kontrollen** (CTRL1, CTRL2) werden in 0,25 ml Rekonstitutionslösung (RECSOL) gelöst. Der genaue Gehalt ist der Produktspezifikation zu entnehmen.
- Die lyophilisierte **Reduktionslösung** (REDSOL) wird mit 1,2 ml Rekonstitutionslösung (RECSOL) versetzt und ist dann bei 2-8 °C 3 Monate haltbar.
- Die Testreagenzien sind bei 2-8 °C, der **Kalibrator** (CAL), der **Interne Standard** (INT STD) und die **Kontrollen** (CTRL) bei -20 °C bis zum Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- **Kalibrator** (CAL) und **Kontrollen** (CTRL1, CTRL2) sind auf Vollblut aufgebaut. Sie sind auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befunden worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- 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 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 wird.

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.

Das Glutathion wird aus den Erythrozyten freigesetzt indem die Proben vor der Aufbereitung eingefroren werden.

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettierolumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik 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:

100 µl Patientenprobe, Kalibrator (CAL) oder Kontrolle (CTRL1, CTRL2)

+

200 µl Verdünnungslösung (DIL)

Mischen

Gesamt-Glutathion

50 µl der verdünnten Probe

+

100 µl Interner Standard (INT STD)

+

20 µl Reduktionslösung (REDSOL)

+

100 µl Derivatisierungslösung (DER)

Reduziertes Glutathion

50 µl der verdünnten Probe

+

100 µl Reaktionspuffer (REABUF)

+

100 µl Derivatisierungslösung (DER)

Gut mischen, **20 Minuten** bei 60 °C reagieren lassen

100 µl Fällungsreagenz (PREC) zugeben, gut mischen

10 Minuten 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 mm x 4 mm		
Fluss:	0,75 – 1,0 ml/min		
Detektion:	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** Aqua bidest 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

Glutathion_{gesamt}

$$\frac{\text{Peakhöhe Probe} \times \text{Konzentration des Kalibrators}}{\text{Peakhöhe Interner Standard der Probe}} \times F = \text{Konzentration Probe}$$

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

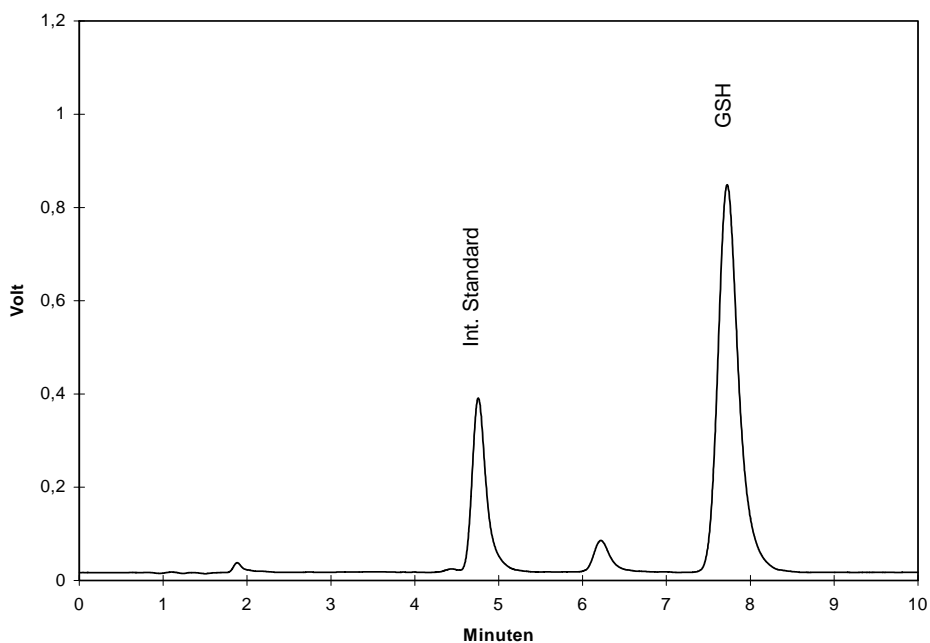
Glutathion_{reduziert}

$$\text{Konzentration Probe (nmol/l)} = \frac{\text{Peakhöhe Probe} \times \text{Konzentration des Kalibrators}^*}{\text{Peakhöhe Kalibrator}}$$

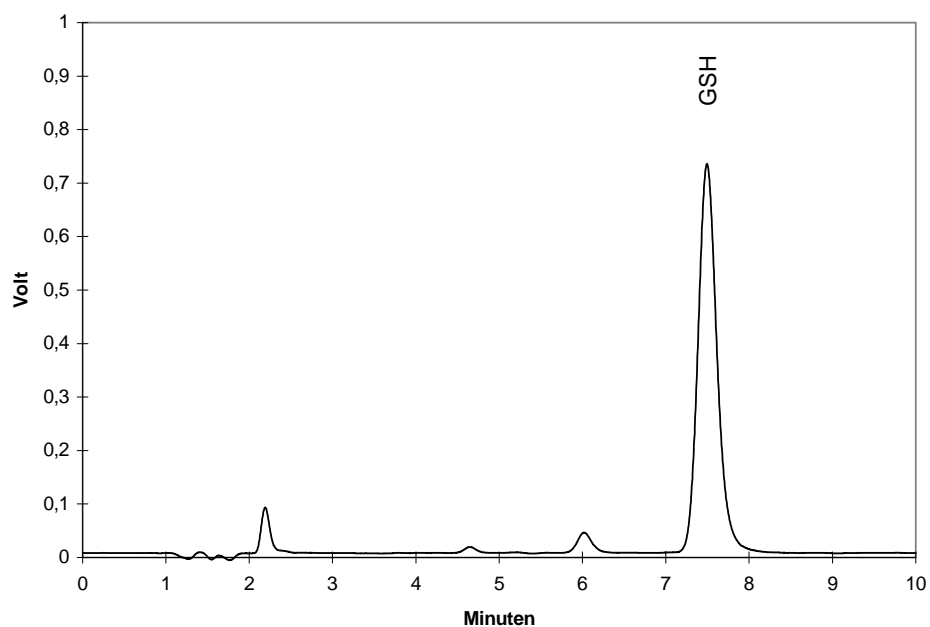
(* siehe Etikett)

Musterchromatogramm

GSH-Gesamt



freies GSH



12. EINSCHRÄNKUNGEN

Seren und Plasmen zeigen sehr niedrige Glutathion-Konzentrationen. 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

Normbereich

(n=50)	GSH _{total} :	763 – 1191 µmol/l
	GSH _{red.} :	620 – 970 µmol/l
	GSH _{red./total} :	81 – 93 %

Wir empfehlen jedem Labor seinen eigenen Normalwerte-Bereich zu erstellen, weil Referenzbereiche stark von der Auswahl des Probandenkollektivs abhängig sind. Die Angabe des Normalbereichs für Glutathion 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:	gesamt:	3,9 % (577 µmol/l)	[n = 12]
	reduziert:	3,3 % (360 µmol/l)	[n = 12]
Inter-Assay VK:	gesamt:	4,2 % (544 µmol/l)	[n = 12]
	reduziert:	3,3 % (108 µmol/l)	[n = 12]

Linearität

gesamt: bis 10 mmol/l

reduziert: bis 10 mmol/l

Nachweisgrenze

gesamt: 6 µmol/l

reduziert: 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 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
Unruhige Basislinie	Pumpe fördert ungenau	Pumpe überprüfen, entlüften
	Detektorzelle verschmutzt	Detektorzelle reinigen

17. LITERATUR

Henning S.M., J.Z. Zhang, R.W. McKee, M.E. Swendseid, R.A. Jacob. Glutathion blood levels and other oxidant defence indices in men fed diets low in vitamin C. American institute of nutrition, 1991, 1969-1975.

Rajender K.C., F.W. Lewis, M.H. Kutner, D.M. Bate, R.G.B. Roy, D. Rudman. Plasma cysteine, cystin, and glutathione in cirrhosis. Gastroenterology 1984; 87; 770-776

Meister A. Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. Biochim Biophys Acta 1995; 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.
- 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 Pipettierolumina 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 Immundiagnostik AG übernimmt für direkt daraus resultierende Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

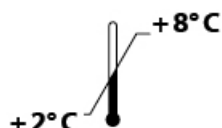
Glutathione HPLC Kit

For the determination of Glutathione in EDTA-blood

Gültig ab/valid from 30.06.2008



KC 1800



CAL
INT STD
CTRL 1
CTRL 2



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim
Phone: ++49 6251 70190-0
Fax: ++ 49 6251 849430
e.mail: Info@immundiagnostik.com
www.immundiagnostik.com

1. INTENDED USE

The *Immundiagnostik* Assay is intended for the quantitative determination of glutathione in EDTA-blood. This assay is designed for *in vitro* diagnostic use only.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Glutathione (GSH) 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 cellular glutathione is reduced (in EDTA-blood approx. 90 %), only a minor amount of 10 % is oxidized (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 solution 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. Depending on the reduction solution all the glutathione (GSH and GSSG) is reduced to GSH.

20µl 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 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 oxidized glutathione can be calculated by subtraction of:

$$\text{Glutathione}_{\text{total}} - \text{Glutathione}_{\text{reduced}}$$

Note that the obtained difference must be divided by two as oxidized glutathione (GSSG) is composed of two GSH molecules.

Summary:

Besides many other parameters the advantage of HPLC method lies in the simultaneous handling of many analytes in a single test. The HPLC system enables even laboratories without experience in high performance liquid chromatography to use this technique for clinical routine determination in a quick and precise manner. Unlike immuno assays with up to six calibrators per test, a one-point calibration is mostly sufficient to calibrate the test system. It is possible to automate the sample application and calculation of the results so that even higher numbers of samples can be handled nearly without control.

4. MATERIAL SUPPLIED

Catalogue No	Content	Kit Components	Quantity
KC 1800LM	MOPHA	Mobile phase	1000 ml
KC 1800KA	CAL	Calibrator, lyophilized	8 vials
KC 1800IS	INT STD	Internal standard	6 ml
KC 1800T	RECSOL	Reconstitution solution	5 ml
KC 1800VL	DIL	Dilution solution	25 ml
KC 1800RL	REDSOL	Reduction solution (lyoph. 1.2 ml)	1 vial
KC 1800RB	REABUF	Reaction buffer	27 ml
KC 1800DL	DER	Derivatisation solution	12 ml
KC 1800FR	PREC	Precipitation solution	12 ml
KC 1800KO	CTRL 1 CTRL 2	Control 1 and 2, 250 µl lyophilized	2 x 3 vials

HPLC column (KC 1800RP) 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

- 1.5 ml reaction tubes (Eppendorf)
- Centrifuge
- Various pipettes
- HPLC with Fluorescence-detector
- Reversed phase C₁₈-column
- Oven or water bath for heating at 60 °C

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- Reconstitute **calibrator** (CAL) in **250 µl** reconstitution solution (RECSOL). The content of one vial is intended for one examination. Discard remaining unused material. The concentration of glutathione might have minor changes from lot to lot.
- Reconstitute **controls** (CTRL1, CTRL2) in **250 µl** reconstitution solution (RECSOL). Take the exact concentration from the product data sheet.
- Reconstitute **reduction solution** (REDSOL) in **1.2 ml** reconstitution solution (RECSOL). The reconstituted reduction solution is stable for 3 months when stored at **2-8 °C**.
- **The lyophilized reagents should be stored at -20 °C**. All other test reagents are stable at **2-8 °C**, up to the date of expiry stated on the label.

7. PRECAUTIONS

- 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.
- Precipitation solution contains acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water. Do not breathe vapor and avoid inhalation.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the 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 2 weeks at -20 °C. During longer storage, the content of oxidized glutathione increases.

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

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Quality control guidelines should be observed.
- 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 wrong use.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

Sample preparation

Pipette in a 1.5 ml reaction tube (e.g. Eppendorf):

100 µl Patient sample, calibrator (CAL) or control (CTRL1, CTRL2)

+

200 µl dilution solution (DIL)

mix

Total-glutathione

50 µl diluted sample

+

100 µl internal standard (INT STD)

+

20 µl reduction solution (REDSOL)

+

100 µl derivatisation solution (DER)

Reduced glutathione

50 µl diluted sample

+

100 µl reactions buffer (REABUF)

+

100 µl derivatisation solution (DER)

Mix well, incubate for **20 minutes** at 60 °C

Add **100 µl** precipitation solution (PREC), mix well

Precipitate for **10 minutes** at 2 -8 °C and centrifuge for **10 min** at 10.000 g

Add **200 µl** supernatant to **200 µl** reaction buffer (REABUF) in auto sampler-vials, mix well

Inject **20 µl** in 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 mm x 4 mm		
Flow rate:	0.75 - 1.0 ml/min		
Detection :	Fluorescence:	Excitation	385 nm
		Emission	515 nm
Temperature:	30 °C		
Injection volume:	20 µl		
Running time:	10 min		

It is recommended that a guard column is used to extend column life.

10. TREATMENT OF THE COLUMN

After analysis, the column should be flushed with 30 ml aqua bidest. (1 ml/min) and stored in 50% methanol in aqua bidest. (approx. 30 ml, flow 0.7 ml/min). Before use, the system should be equilibrated with ca. 30 ml eluent.

11. RESULTS

Calculation

Calculation of glutathione_{total}

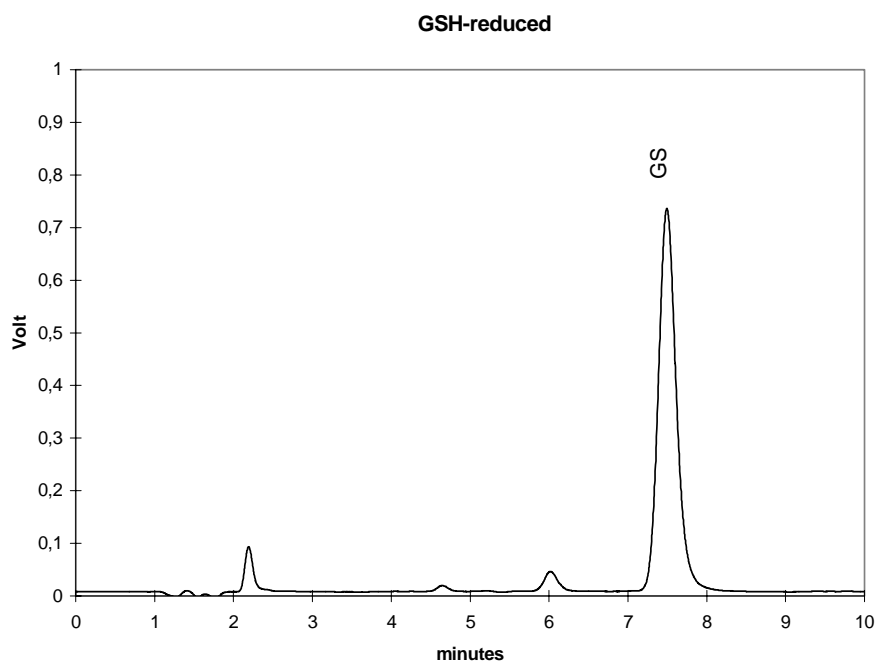
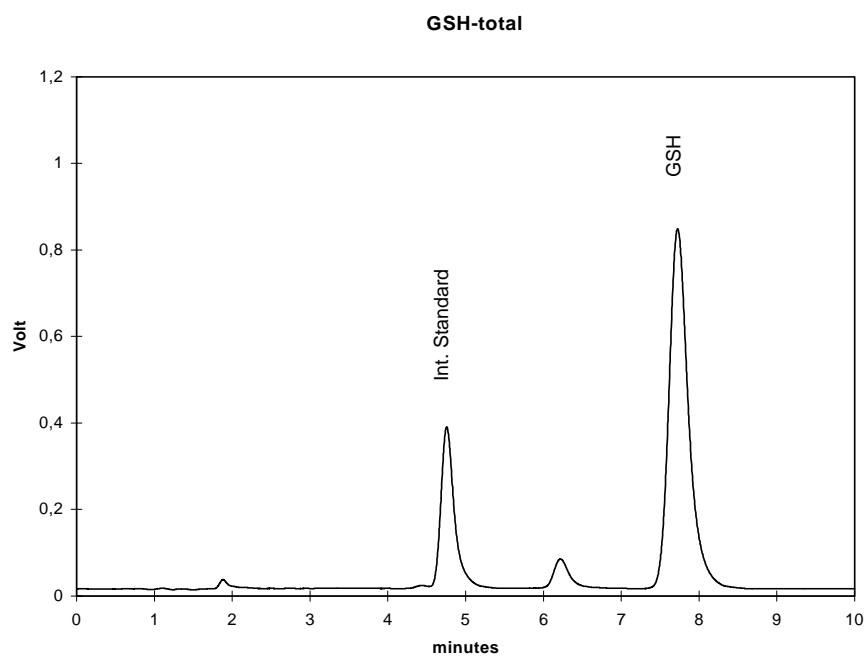
$$\frac{\text{Peak height sample} \times \text{Concentration of the calibrator}}{\text{Peak height internal standard in the sample}} \times F = \text{Concentration sample}$$

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

Calculation of glutathione_{reduced}

$$\text{Concentration sample (nmol/l)} = \frac{\text{Peak height sample} \times \text{Concentration of the calibrator}}{\text{Peak height calibrator}}$$

Typical chromatogram



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 oxidized and reduced glutathione form. Do not use lipemic samples.

13. QUALITY CONTROL

Expected values

(n=50)

GSH _{total} :	763 – 1191 µmol/l
GSH _{reduced} :	620 – 970 µmol/l
GSH _{reduced/total} :	81 – 93 %

It is recommended that each laboratory should establish its own normal range. Above mentioned values are only for orientation and may vary from other published data.

Controls

Control samples should be analyzed 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

Precision and reproducibility

Intra-Assay CV: GSH_{total}: 3.9 % [n = 12]

GSH_{reduced}: 3.3 % [n = 12]

Inter-Assay CV: GSH_{total}: 4.2 % [n = 12]

GSH_{reduced}: 3.3 % [n = 12]

Linearity

up to 10 mmol/l (GSH_{total} and GSH_{reduced})

Detection limit

6 µmol/l (GSH_{total} and GSH_{reduced})

15. DISPOSAL

The MOPHA (mobile phase), REDSOL (reduction solution), INT STD (internal standard), and DER (derivatisation solution) must be disposed as non-halogenated solvents. The PREC (precipitation solution) can be neutralized 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 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

Henning S.M., J.Z. Zhang, R.W. McKee, M.E. Swendseid, R.A. Jacob. Glutathion blood levels and other oxidant defence indices in men fed diets low in vitamin C. American institute of nutrition, 1991, 1969-1975.

Rajender K.C., F.W. Lewis, M.H. Kutner, D.M. Bate, R.G.B. Roy, D. Rudman. Plasma cysteine, cystin, and glutathione in cirrhosis. Gastroenterology 1984; 87; 770-776

Meister A. Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. Biochim Biophys Acta 1995; 35-42.

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 must be avoided.
- All reagents in the test package are for in-vitro diagnostic use only.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Quality control guidelines should be observed.
- 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 wrong use.