

INTRODUZIONE

Il glutatione ridotto (GSH) partecipa, mediante diversi meccanismi biochimici, al metabolismo di vari composti endogeni: esso funziona in alcuni casi da coenzima, in altri da substrato, interviene nel trasporto degli aminoacidi e probabilmente anche nel trasporto di alcuni gruppi aminici e peptidici.

In particolare alcuni studi hanno confermato l'importanza del glutatione nella protezione delle membrane cellulari e delle proteine costitutive attraverso il mantenimento dei gruppi –SH. Il glutatione svolge inoltre un ruolo centrale nel metabolismo xenobiotico in dipendenza della reattività del gruppo –SH e della sua polarità e grandezza.

Il ruolo centrale di questa molecola nella funzione protettiva dell'integrità strutturale della cellula si svolge attraverso due fondamentali momenti tra loro interconnessi: il mantenimento allo stato ridotto dei gruppi –SH delle proteine di membrana e l'inibizione della perossidazione lipidica indotta dai prodotti intermedi ossigenati instabili liberatesi nel corso del metabolismo ossidativo dell'etanolo e di svariati farmaci, oppure in seguito ad irradiazione. La mancata disponibilità di glutatione ridotto, che si verifica nel deficit congenito di glucosio 6-fosfato deidrogenasi o del glutatione stesso, può causare gravi alterazioni del globulo rosso.

Per il dosaggio del glutatione ridotto sono stati descritti numerosi metodi colorimetrici / fluorimetrici basati o sull'ossidazione o sulle reazioni del gruppo solfidrilico.

Attualmente i metodi di maggior impiego si basano sulla cromatografia liquida ad alte prestazioni con rivelazione spettrofluorimetrica o elettrochimica.

 EUREKA S.R.L. LAB DIVISION
Via M. D'Antona 28
60033 Chiaravalle (AN) - Italy
Tel. +39 071 7450790
eureka-support@sentinel.it
www.eurekakit.com



Questo prodotto adempie a tutte le esigenze della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro (IVD). La dichiarazione di conformità CE è disponibile su richiesta.

N° 002		06/2024
--------	--	---------

CARATTERISTICHE DEL KIT

Principio del Metodo:

Il **Glutathione totale (ossidato + ridotto)** viene analizzato trattando il Sangue Intero con un opportuno riducente e derivatizzando il Glutathione ridotto così ottenuto con un reagente specifico a 55 °C per 15 minuti. Dopo deproteinizzazione la soluzione viene direttamente iniettata in HPLC.

Il **Glutathione ridotto endogeno** viene analizzato derivatizzando il Sangue Intero direttamente (senza aggiunta di riducente) con un reagente specifico a 55 °C per 15 minuti. Dopo deproteinizzazione la soluzione viene direttamente iniettata in HPLC.

Il **Glutathione ossidato** viene calcolato per differenza tra il **Glutathione Totale** ed il **Glutathione ridotto endogeno**.

Sensibilità del Metodo : 5,0 mg/l

Range dinamico del metodo : 5,0 – 3.000 mg/l

Accuratezza intra serie (errore relativo %) :

Ci	Cs
250 mg/l	750 mg/l
3,94%	6,08%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) :

Ci	Cs
250 mg/l	750 mg/l
7,44%	9,49%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) :

C LLOQ	Cm	Cs
5 mg/l	500 mg/l	1.000 mg/l
4,65%	1,65%	3,59%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) :

C LLOQ	Cm	Cs
5 mg/l	500 mg/l	1.000 mg/l
7,44%	10,76%	7,64%

Coefficiente di Correlazione + DS : 0,9913 ± 0,0045

Range di normalità Glutathione ridotto endogeno su sangue intero: 307 – 450 mg/l

Range di normalità Glutathione totale endogeno su sangue intero: dati non disponibili

<u>Contenuto della confezione :</u>	Tutti i reagenti sono pronti all'uso, eccetto i Reagenti A e B , e stabili 3 anni a 2 –8 °C.
Reagente A – Soluzione Riducente, 1 x 20 mg	(Da ricostituire con 3 ml di buffer Reagente D)
Reagente B – Soluzione Derivatizzante, 2 x 0,5 ml	(Ogni flacone va diluito con 1 ml di buffer Reagente D al momento dell'uso)
Reagente C – Soluzione Deproteinizzante, 1 x 5 ml	
Reagente D – Soluzione Buffer, 1 x 25 ml	
Reagente E – Soluzione Standard Interno, 1 x 5 ml	
Reagente F – Soluzione Test, 1 x 5 ml	
Calibratore liofilo , 1 x 1 ml	<u>Codice Z30016</u>
Reagente L – Soluzione Lisante, 1 x 200 ml	<u>Confezionato a parte – Vedi scheda tecnica</u>
Reagente M – Fase mobile, 2 x 500 ml	

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento HPLC isocratico con loop da 50 µl
 Detector fluorimetrico $\lambda_{EX}=385\text{ nm}$ $\lambda_{EM}=515\text{ nm}$
 Registratore di cromatogrammi
 Autocampionatore
 Preparatore automatico del campione
 Computer gestionale
 Prelevare 3 ml di sangue in una provetta con anticoagulante **citrato**.
 Stabile 3 settimane a 2–8 °C o 4 mesi a – 20 °C.

Dotazione opzionale :

Modalità per il prelievo ematico :

PROCEDURA PREANALITICA – GLUTATIONE TOTALE su SANGUE INTERO

FASE 1 : Ricostituzione del **Reagente A** e del **Reagente B**

- Aggiungere al **Reagente A – Sol. riducente** 3 ml di **Reagente D – Sol. buffer**
- Aggiungere al **Reagente B – Sol. derivatizzante** 1 ml di **Reagente D – Sol. buffer** (**Stabile 6 settimane a 2–8 °C**)

FASE 2 : Preparazione della Soluzione Test a circa 37,1 mg/l

In una provetta pipettare :

- 900 µl di H₂O di grado HPLC
- 100 µl di **Reagente F – Sol. Test**

Si otterrà una soluzione test contenente circa 37,1 mg/l

In una provetta da 1,5 ml con tappo di chiusura pipettare:

- 200 µl di **Reagente D – Sol. Buffer**
- 50 µl di Sol. Test
- 50 µl di **Reagente A – Sol. Riducente**
- 50 µl di **Reagente E – Standard Interno**
- 30 µl di **Reagente B – Sol. Derivatizzante**

Al vortex per 10 secondi

- Incubare a 55 °C per 15 minuti

Raffreddare

- Aggiungere 50 µl di **Reagente C – Sol. Deproteinizzante**

Al vortex per 10 secondi

- Centrifugare a 5000 rpm per 5 minuti
- Prelevare 200 µl di sovranatante limpido

INIEZIONE :

- Iniettare 10 µl della soluzione nel cromatografo HPLC ed attendere la stampa del cromatogramma.

Verificare che la Sol. Test abbia un tempo di ritenzione simile a quello riportato in fig. 1. Se il Test ha dato esito positivo si può procedere alla seduta analitica. Se così non fosse verificare la funzionalità del sistema analitico.

Importante : Questa Soluzione così ottenuta non deve essere usata come calibratore

PROCEDURA ANALITICA – GLUTATIONE TOTALE su SANGUE INTERO

FASE 1 : Preparazione dei campioni

Diluire il Calibratore e i Campioni nel modo seguente:

- 1950 µl di **Reagente L – Lisante** + 50 µl di Sangue Intero

FASE 2 : Dispensare in provetta :

	Calibratore	Campione
Reagente D – Sol. buffer	200 µl	200 µl
Calibratore diluito	50 µl	
Campione diluito		50 µl
Reagente A – Sol. riducente	50 µl	50 µl
Reagente E – Standard Interno	50 µl	50 µl
Reagente B – Sol. derivatizzante	30 µl	30 µl

Al vortex per 10 secondi

FASE 3 : Incubare a 55 °C per 15 minuti

Lasciar raffreddare

FASE 4 : Aggiungere 50 µl di **Reagente C – Sol. deproteinizzante**

Al vortex per 10 secondi

FASE 5 : Centrifugare a 5000 rpm per 5 minuti

FASE 6 : Prelevare 200 µl di sovranatante limpido

N.B.: il campione così preparato è stabile 3 giorni a 2-8 °C

INIEZIONE :

- Iniettare 10 µl della soluzione nel cromatografo HPLC ed attendere la stampa del cromatogramma

PROCEDURA PREANALITICA – GLUTATIONE RIDOTTO su SANGUE INTERO

FASE 1 : Ricostituzione del **Reagente A** e del **Reagente B**

- Aggiungere al **Reagente A – Sol. riducente** 3 ml di **Reagente D – Sol. buffer**
- Aggiungere al **Reagente B – Sol. derivatizzante** 1 ml di **Reagente D – Sol. buffer** (Stabile 6 settimane a 2–8 °C)

FASE 2 : Preparazione della Soluzione Test a circa 37,1 mg/l

In una provetta pipettare:

- 900 µl di H₂O di grado HPLC
- 100 µl di **Reagente F – Sol. Test**

Si otterrà una soluzione test contenente circa 37,1 mg/l

In una provetta da 1,5 ml con tappo di chiusura pipettare:

- 200 µl di **Reagente D – Sol. Buffer**
- 50 µl di Sol. Test
- 50 µl di **Reagente A – Sol. Riducente**
- 50 µl di **Reagente E – Standard Interno**
- 30 µl di **Reagente B – Sol. Derivatizzante**

Al vortex per 10 secondi

- Incubare a 55 °C per 15 minuti

Raffreddare

- Aggiungere 50 µl di **Reagente C – Sol. Deproteinizzante**

Al vortex per 10 secondi

- Centrifugare a 5000 rpm per 5 minuti
- Prelevare 200 µl di sovranatante limpido

INIEZIONE :

- Iniettare 10 µl della soluzione nel cromatografo HPLC ed attendere la stampa del cromatogramma.

Verificare che la Sol. Test abbia un tempo di ritenzione simile a quello riportato in fig. 1. Se il Test ha dato esito positivo si può procedere alla seduta analitica. Se così non fosse verificare la funzionalità del sistema analitico.

Importante : Questa Soluzione così ottenuta non deve essere usata come calibratore

PROCEDURA ANALITICA – GLUTATIONE RIDOTTO su SANGUE INTERO

FASE 1 : Preparazione dei campioni

Diluire il Calibratore e i Campioni nel modo seguente:

- 1950 µl di **Reagente L – Lisante** + 50 µl di Sangue Intero

FASE 2 : Dispensare in provetta :

	Calibratore	Campione
Reagente D – Sol. buffer	200 µl	200 µl
Calibratore diluito	50 µl	
Campione diluito		50 µl
Acqua	50 µl	50 µl
Reagente E – Standard Interno	50 µl	50 µl
Reagente B – Sol. derivatizzante	30 µl	30 µl

Al vortex per 10 secondi

FASE 3 : Incubare a 55 °C per 15 minuti

Lasciar raffreddare

FASE 4 : Aggiungere 50 µl di **Reagente C – Sol. deproteinizzante**

Al vortex per 10 secondi

FASE 5 : Centrifugare a 5000 rpm per 5 minuti

FASE 6 : Prelevare 200 µl di sovranatante limpido

N.B.: il campione così preparato è stabile 3 giorni a 2-8 °C

INIEZIONE :

- Iniettare 10 µl della soluzione nel cromatografo HPLC ed attendere la stampa del cromatogramma

GLUTATIONE su SANGUE INTERO - Avvertenze

REAGENTE F : SOLUZIONE TEST

GLUTATIONE	371 mg/l
------------	----------

PARAMETRI DEL DETECTOR SPETTROFLUORIMETRICO

λ_{EX}	385 nm
λ_{EM}	515 nm
GAIN	1 x 100
TEMPO DI INTEGRAZIONE	10 secondi

PROTEZIONE DELLA COLONNA ANALITICA

Per salvaguardare la colonna analitica Reverse Phase Poroshell EC C18 (50 x 4,6 mm, 2,7 μ , è tassativo l'uso dei Prefiltri Javelin (1 x 10 pz.) cod. S90199511.
--

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica <u>nuova</u> Reverse Phase Poroshell EC C18 (50 x 4,6 mm, 2,7 μ . Disconnettere il detector e far passare 30 ml di una soluzione di H ₂ O : Metanolo (20 : 80 v/v) e successivamente 30 ml di H ₂ O per HPLC, al flusso di 1,2 ml/minuto. Non riciclare i liquidi di lavaggio . Filtrare la fase mobile con pompa da vuoto e filtro idoneo da 0,22 μ o 0,45 μ . Condizionare la colonna con la fase mobile M al flusso di 1,2 ml/minuto e scaricare i primi 30 ml. Condizionare ulteriormente per 30 minuti anche a ricircolo di fase. Al termine, iniettare lo Standard chimico derivatizzato per individuare il Tempo di Ritenzione (RT) del Glutatione ridotto derivatizzato. E' possibile effettuare analisi a ricircolo di fase. Se la T Amb del Laboratorio è > 20 °C si consiglia di conservare a 2-8 °C la Fase Mobile fra una seduta analitica e l'altra.
--

PULIZIA DELLA COLONNA

Disconnettere il detector. Flussare 30 ml di H ₂ O e scaricare. Flussare una soluzione di H ₂ O : Metanolo (20 : 80 v/v) per 30 minuti scaricandola. Quando la colonna verrà usata di nuovo far passare 30 ml di H ₂ O prima di condizionarla con la Fase Mobile.
--

LAVAGGIO AGO INIEZIONE

Lavare con una soluzione di Acqua / Etanolo (75 : 25 v/v).
--

PARAMETRI HPLC

LOOP	50 μ l
Flusso di lavoro consigliato	1,2 ml/minuto
Pressione corrispondente	Circa 150 bar

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
Z30016	Calibratore su sangue intero per Glutatione	4 x 1 ml
Z30019	Controllo su sangue intero per Glutatione – Livelli 1 e 2	2 x 5 x 1 ml
Z699675902	Colonna Analitica Poroshell 120 EC C18 (50 x 4,6mm -2,7 μ m)	1 PZ
S90199511	Prefiltri Javelin	1 x 10 PZ
Z51843550	Vial di vetro a volume ridotto da 1,5 ml a 15 μ l	1 x 100 PZ
Z51820717	Tappi per vial di vetro a volume ridotto da 1,5 ml a 15 μ l	1 x 100 PZ



GLUTATIONE SU SANGUE INTERO (Cromatogrammi di Riferimento)

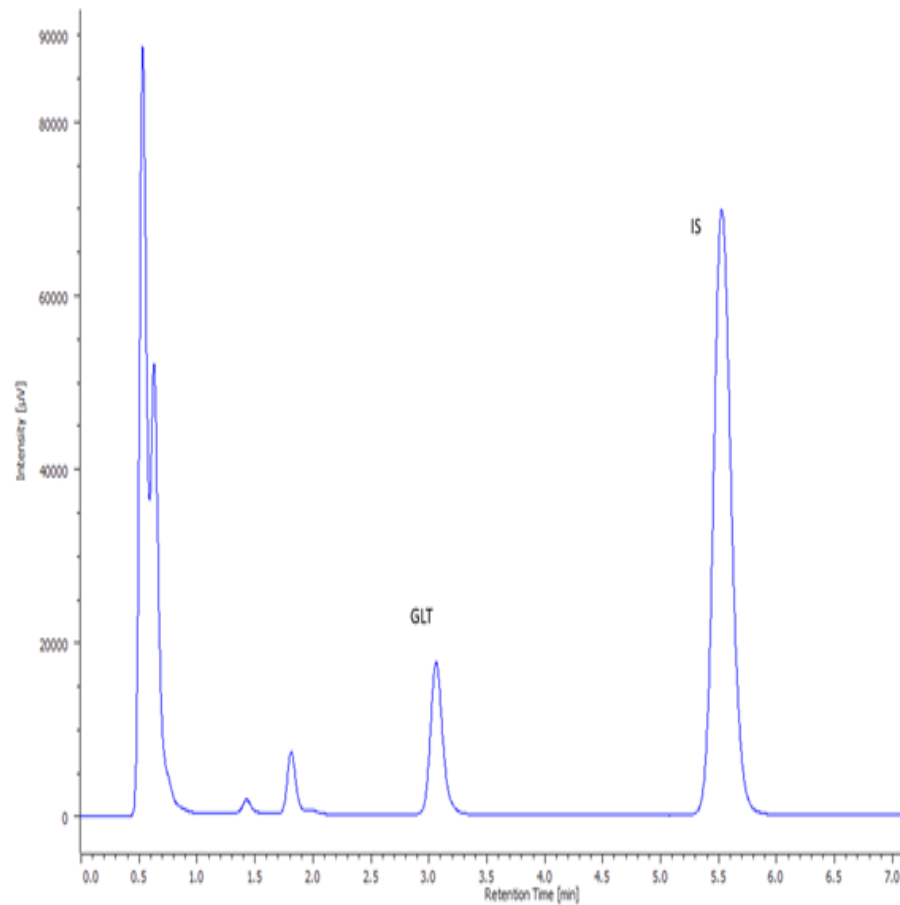


Fig. 1 :	Calibratore liofilo su sangue intero
	R.T. 3.1 Glutazione totale 250 mg/l
	R.T. 5.6 Standard interno

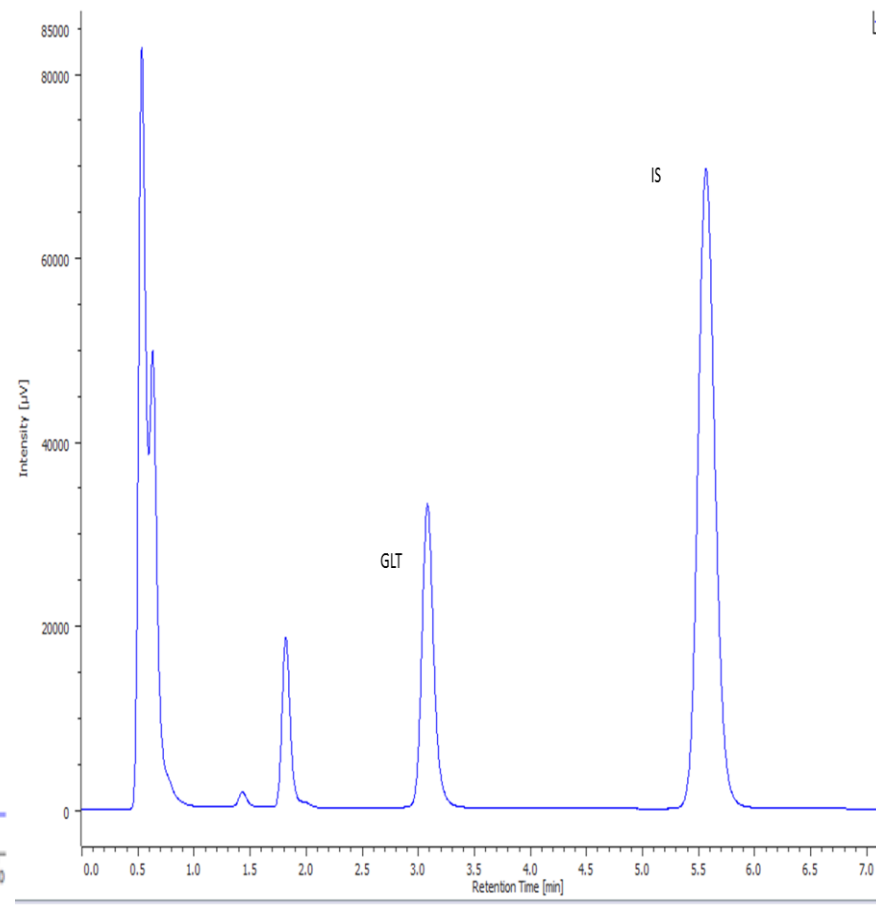


Fig. 2 :	Calibratore liofilo su sangue intero
	R.T. 3.1 Glutazione totale 500 mg/l
	R.T. 5.6 Standard interno

GLUTATIONE SU SANGUE INTERO (Cromatogrammi di Riferimento)

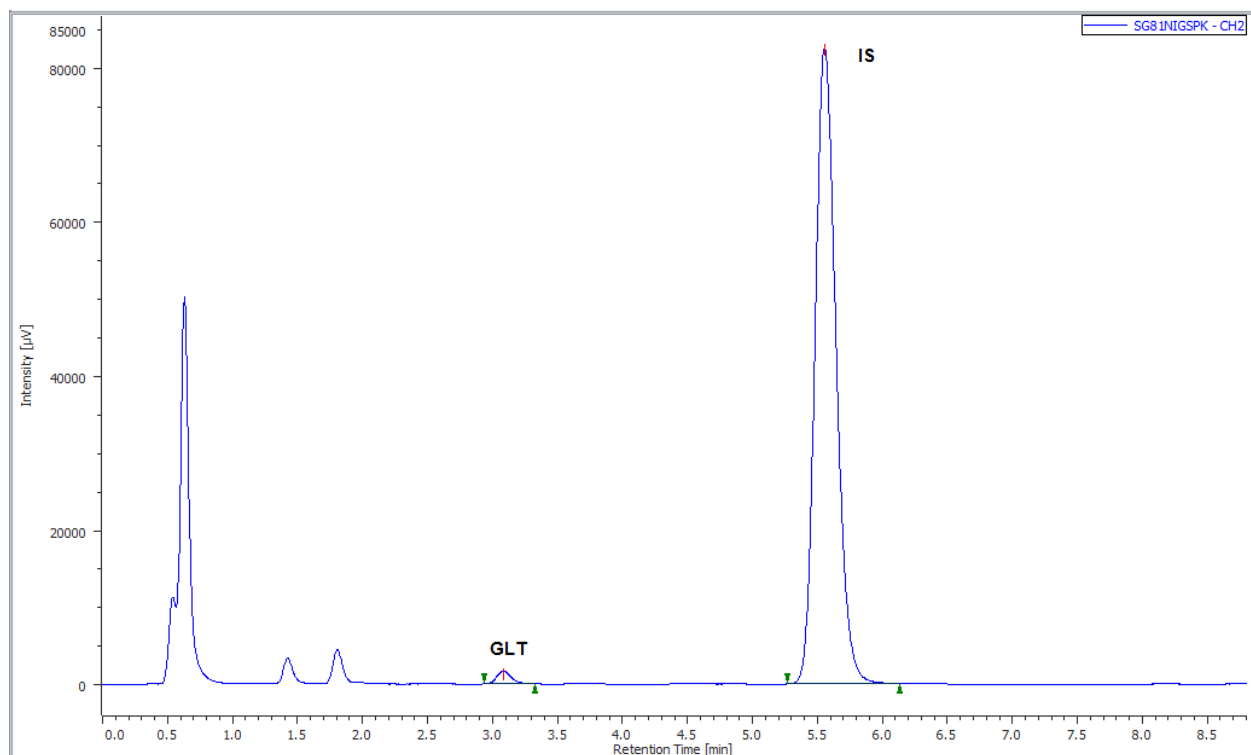


Fig. 3 :	Campione di sangue intero
	R.T. 3.1 Glutazione
	R.T. 5.6 Standard interno