

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Analýza glutathionu a γ -glutamylcysteinu pomocí spojení kapalinové
chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Mgr. Miroslav Kubát

Diplomová práce

2022

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Mgr. Miroslav Kubát**
Osobní číslo: **C19610**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Analýza glutathionu a γ -glutamylcysteinu pomocí spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. V dostupné vědecké literatuře vyhledejte a rešeršně zpracujte téma funkce glutathionu a γ -glutamylcysteinu v lidském organismu. Popište principy kapalinové chromatografie a detekce hmotnostní spektrometrií a zpracujte přehled metod pro stanovení glutathionu a γ -glutamylcysteinu kapalinovou chromatografií.
2. Proměřte retenční charakteristiky obou látek na vybraných kolonách v systému chromatografie hydrofilních interakcí. Optimalizujte podmínky analýzy s cílem dosáhnout co nejlepší separace.
3. Získaná experimentální data kriticky zhodnoťte a diskutujte.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:
Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.**
Katedra analytické chemie
Konzultant diplomové práce: **doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání diplomové práce: **7. února 2022**
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 21. února 2022

Prohlašuji: Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 6. 5. 2022

Miroslav Kubát

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval doc. Ing. Petru Česlovi, Ph.D. za odbornou konzultaci, rady a předané zkušenosti v průběhu zpracování této diplomové práce. Rád bych poděkoval také doc. RNDr. Tomáši Roušarovi, Ph.D. za odborné konzultace, rady, trpělivost a vstřícnost.

ANOTACE

Glutathion je nejvýznamnější antioxidant v lidském těle, detoxifikuje toxické elektrofilny a mimo jiné se účastní také eliminace xenobiotik. Ve své diplomové práci popisuji také metabolismus glutathionu a poukazuji na snížení jeho hladin během mnoha patologických stavů. V této souvislosti vyzdvihuji γ -glutamylcystein jako účinný prostředek navýšení hladin glutathionu orální suplementací. Další část je věnována analýze glutathionu, zejména pak metodám HPLC-MS, které porovnávám. V rámci experimentální části byla optimalizována separace glutathionu, glutathiondisulfidu, γ -glutamylcysteinu, glycinu, glutamové kyseliny, cysteinu a cystinu bez nutnosti využití derivatizace.

KLÍČOVÁ SLOVA

Glutathion, γ -glutamylcystein, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie

TITLE

Analysis of glutathione and γ -glutamylcysteine by liquid chromatography coupled with mass spectrometry

ANNOTATION

Glutathione is the most important antioxidant in the human body, detoxifies toxic electrophiles and, among other things, also participates in the elimination of xenobiotics. In this diploma thesis, I also describe the metabolism of glutathione and point out the reduction of its levels during many pathological conditions. In this context, I highlight γ -glutamylcysteine as an effective means of increasing glutathione levels by oral supplementation. The next part is devoted to the analysis of glutathione, especially HPLC-MS methods, which I compare. Within the experimental part, the separation of glutathione, glutathione disulfide, γ -glutamylcysteine, glycine, glutamic acid, cysteine and cystine were optimized without the need for derivatization.

KEYWORDS

Glutathione, γ -glutamylcysteine, liquid chromatography, mass spectrometry

OBSAH

1. Úvod.....	19
2. Teoretická část	20
2.1 Glutathion.....	20
2.1.1 Funkce.....	20
2.1.1.1 Antioxidační ochrana	21
2.1.1.2 Detoxifikační funkce	22
2.1.2 Metabolismus.....	24
2.1.2.1 Výskyt v těle	24
2.1.2.2 Syntéza	24
2.1.2.3 Transport	25
2.1.2.4 Degradace.....	25
2.1.2.5 Ovlivnění koncentrace glutathionu	26
2.2 γ -glutamylcystein	27
2.3 Stanovení koncentrace glutathionu a jeho metabolitů	29
2.3.1 Příprava vzorku.....	30
2.3.1.1 Redukce disulfidů.....	31
2.3.1.2 Odstranění proteinů.....	31
2.3.1.3 Derivatizace.....	32
2.3.2 Separace pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.....	34
2.3.2.1 Módy separace	34
2.3.2.2 Konkrétní metody.....	35
2.3.2.3 Typy detekce	37
2.3.3 Detekce pomocí hmotnostní spektrometrie	37
2.3.3.1 Iontové zdroje.....	38
2.3.3.2 Hmotnostní analyzátory	38
2.3.4 Metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí.....	40
2.3.4.1 Stanovení glutathionu a glutathiondisulfidu	41
2.3.4.2 Simultánní stanovení koncentrace glutathionu a dalších thiolů.....	42
2.3.4.3 Trendy v instrumentaci	43

3.	Experimentální část.....	44
3.1	Chemikálie a pomůcky.....	44
3.1.1	Chemikálie.....	44
3.1.2	Drobné laboratorní přístroje.....	44
3.2	Příprava roztoků.....	45
3.2.1	Příprava zásobních roztoků standardů.....	45
3.2.2	Příprava pracovní směsi standardů.....	45
3.2.3	Příprava roztoků thiomocoviny a acenaftenu.....	45
3.2.4	Příprava mobilních fází.....	45
3.3	Sestava HPLC-MS.....	47
3.4	Podmínky MS detekce.....	47
3.5	Optimalizace separace.....	48
3.5.1	Testované kolony.....	48
3.5.2	Testované směsi mobilní fáze.....	48
3.6	Zpracování naměřených dat.....	49
4.	Výsledky.....	51
4.1	Testování kolon a mobilních fází.....	51
4.2	Selekce kolon a mobilních fází.....	54
4.3	Optimalizace separace.....	57
5.	Diskuse.....	63
6.	Závěr.....	67
7.	Přílohy.....	69
7.1	Tabulky.....	69
7.2	Obrázky.....	77
8.	Seznam literatury.....	97

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Glutathion.....	20
Obrázek 2: Cyklus konverze GSH a GSSG.....	21
Obrázek 3: Glutathionylace proteinů.....	21
Obrázek 4: Reakce GSH s kyselinou chlornou.....	22
Obrázek 5: Tvorba konjugátu GSH s 4-HNE.....	23
Obrázek 6: Cyklus glutathionu.....	26
Obrázek 7: γ -glutamylcystein.....	28
Obrázek 8: Schéma HPLC-MS instrumentace.....	40
Obrázek 9: Isokratická separace standardů GGC a GSH na koloně ZIC-HILIC (150 × 2,1 mm, 3 μ m), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 0,05 % TFA ve vodě/acetonitrilu, 10 % vodné fáze.....	55
Obrázek 10: Isokratická separace standardů GGC a GSH na koloně ZIC-HILIC (150 × 2,1 mm, 3 μ m), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 5 mmol/l HCOONH ₄ ve vodě a 0,2 % HCOOH ve vodě/acetonitrilu, 16 % vodné fáze.....	55
Obrázek 11: Isokratická separace standardů GGC a GSH na koloně Chromolith Performance Si (100 × 4,6 mm), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 10 mmol/l NH ₄ HCO ₃ ve vodě a 0,2 % HCOOH v acetonitrilu, 18 % vodné fáze.....	56
Obrázek 12: Isokratická separace standardů GGC a GSH na koloně Chromolith Performance Si (100 × 4,6 mm), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 5 mmol/l HCOONH ₄ ve vodě a 0,2 % HCOOH ve vodě/acetonitrilu, 16 % vodné fáze,.....	56
Obrázek 13: Isokratická separace standardů GGC, GSH, Gly, Cys a Glu na koloně ZIC-HILIC (150 × 2,1 mm, 3 μ m), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 0,05 % TFA ve vodě/acetonitrilu, 12 % vodné fáze.....	58
Obrázek 14: Isokratická separace standardů GGC, GSH, Gly, Cys, Glu, cystinu a GSSG na koloně ZIC-HILIC (150 × 2,1 mm, 3 μ m), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 0,05 % TFA ve vodě/acetonitrilu, 18 % vodné fáze.....	59
Obrázek 15: Isokratická separace standardů GGC, GSH, Gly, Cys a Glu na koloně ZIC-HILIC (150 × 2,1 mm, 3 μ m), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 0,1 % DFA ve vodě/acetonitrilu, 12 % vodné fáze.....	59

- Obrázek 16: Isokratická separace standardů GGC, GSH, Gly, Cys, Glu, cystinu a GSSG na koloně Chromolith Performance Si (100 × 4,6 mm), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 10 mmol/l NH₄HCO₃ ve vodě a 5 mmol/l NH₄HCO₃ s 5 % vody v acetonitrilu, 16 % vodné fáze.....61
- Obrázek 17: Gradientová separace standardů GGC, GSH, Gly, Cys, Glu, cystinu a GSSG na koloně ZIC-HILIC (150 × 2,1 mm, 3 μm), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 0,05 % TFA ve vodě/acetonitrilu, gradient 12-20 % vodné fáze, čas separace 15 min62
- Obrázek 18: Gradientová separace standardů GGC, GSH, Gly, Cys, Glu, cystinu a GSSG na koloně ZIC-HILIC (150 × 2,1 mm, 3 μm), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 0,05 % TFA ve vodě/acetonitrilu, průtok 0,4 ml/min, gradient 12-24 % vodné fáze, čas separace 10 min62
- Obrázek 19: Isokratická separace standardů GGC a GSH na koloně ZIC-HILIC (150 × 2,1 mm, 3 μm), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 0,05 % TFA ve vodě/acetonitrilu, 14 % vodné fáze, standardy rozpuštěny ve vodě63
- Obrázek 20: Isokratická separace standardů GGC a GSH na koloně ZIC-HILIC (150 × 2,1 mm, 3 μm), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 0,05 % TFA ve vodě/acetonitrilu, 14 % vodné fáze, standardy rozpuštěny ve vodě/acetonitril, 1:1 (v/v).....64
- Obrázek 21: Isokratická separace standardů GGC a GSH na koloně ZIC-HILIC (150 × 2,1 mm, 3 μm), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 0,05 % TFA ve vodě/acetonitrilu, 14 % vodné fáze, standardy rozpuštěny ve vodě/acetonitril, 1:9 (v/v).....64
- Obrázek 22: Isokratická separace standardů GGC a GSH na koloně ZIC-HILIC (150 × 2,1 mm, 3 μm), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 0,05 % TFA ve vodě/acetonitrilu, 10 % vodné fáze, standardy rozpuštěny ve vodě65
- Obrázek 23: Isokratická separace standardů GGC a GSH na koloně ZIC-HILIC (150 × 2,1 mm, 3 μm), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 0,05 % TFA ve vodě/acetonitrilu, 10 % vodné fáze, standardy rozpuštěny ve vodě/acetonitrilu, 1:9 (v/v).....65
- Obrázek 24: Závislost retence (log k_i) standardů GGC a GSH na koncentraci vody v MF (log φ) během isokratických analýz na kolonách Atlantis HILIC Silica (A), Waters XBridge HILIC (B), Chrommolith Performance Si (C), SUPELCOSIL LC-SI (D);

- 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 0,1 % HCOOH ve vodě/acetonitrilu, standardy rozpuštěny ve vodě77
- Obrázek 25: Závislost retence ($\log k_i$) standardů GGC a GSH na koncentraci vody v MF ($\log \varphi$) během isokratických analýz na kolonách Waters XBridge HILIC (A, B, C) a Chromolith Performance Si (D, E, F); 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 5 mmol/l (A, D), 10 mmol/l (B, E) a 20 mmol/l (C, F) NH_4HCO_3 ve vodě a acetonitril, standardy rozpuštěny ve vodě78
- Obrázek 26: Vliv koncentrace NH_4HCO_3 ve vodné fázi MF na retenci standardů GGC a GSH na koloně Chromolith Performance Si (A) a na koloně Waters XBridge HILIC (B); 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 5 mmol/l NH_4HCO_3 ve vodě a acetonitril, standardy rozpuštěny ve vodě.....79
- Obrázek 27: Závislost retence ($\log k_i$) standardů GGC a GSH na koncentraci vody v MF ($\log \varphi$) během isokratických analýz na kolonách Atlantis HILIC Silica (A), Chromolith Performance Si (B), Waters XBridge HILIC (C), Chromolith Performance Si (D), SUPELCOSIL LC-SI (E) a ZIC-HILIC (F); 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 5 mmol/l HCOONH_4 ve vodě a 0,2 % HCOOH ve vodě/acetonitrilu (A, C, D, E, F), MF s 5 mmol/l HCOONH_4 ve vodě a 0,1 % HCOOH ve vodě/acetonitrilu (B), standardy rozpuštěny ve směsi voda/acetonitril, 1:9, (v/v).....80
- Obrázek 28: Závislost retence ($\log k_i$) standardů GGC a GSH na koncentraci vody v MF ($\log \varphi$) během isokratických analýz na kolonách Atlantis HILIC Silica (A), Ascentis Express RP-Amide (B), Waters XBridge HILIC (C), Chromolith Performance Si (D), SUPELCOSIL LC-SI (E) a ZIC-HILIC (F); 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 5 mmol/l NH_4HCO_3 ve vodě a acetonitril, standardy rozpuštěny ve směsi voda/acetonitril, 1:9, (v/v)81
- Obrázek 29: Závislost retence ($\log k_i$) standardů GGC a GSH na koncentraci vody v MF ($\log \varphi$) během isokratických analýz na kolonách Atlantis HILIC Silica (A), ZIC-HILIC (B), Waters XBridge HILIC (C), Chromolith Performance Si (D), SUPELCOSIL LC-SI (E) a ZIC-HILIC (F); 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 0,05 % TFA ve vodě/acetonitrilu (A, C, D, E, F), MF s 10 mmol/l NH_4HCO_3 ve vodě a acetonitril (B), standardy rozpuštěny ve směsi voda/acetonitril, 1:9, (v/v).....82
- Obrázek 30: Závislost retence ($\log k_i$) standardů GGC, GSH, Cys, Gly, Glu, cystinu a GSSG na koncentraci vody v MF ($\log \varphi$) během isokratických analýz na koloně ZIC-

- HILIC (150 × 2,1 mm, 3 μm), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 0,05 % TFA ve vodě/acetonitrilu, standardy rozpuštěny ve směsi voda/acetonitril, 1:9, (v/v).....83
- Obrázek 31: Okénkový diagram separace kritických párů GGC, GSH, Cys, Gly, Glu, cystinu a GSSG. Závislost rozlišení (R_{ij}) jednotlivých párů na koncentraci vodné fáze (φ) v MF během isokratických analýz na koloně ZIC-HILIC (150 × 2,1 mm, 3 μm), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 0,05 % TFA ve vodě/acetonitrilu, standardy rozpuštěny ve směsi voda/acetonitril, 1:9, (v/v) 84
- Obrázek 32: Závislost retence ($\log k_i$) standardů GGC, GSH, Cys, Gly a Glu na koncentraci vody v MF ($\log \varphi$) během isokratických analýz na koloně ZIC-HILIC (150 × 2,1 mm, 3 μm), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 0,1 % DFA ve vodě/acetonitrilu, standardy rozpuštěny ve směsi voda/acetonitril, 1:9, (v/v).....85
- Obrázek 33: Okénkový diagram separace kritických párů GGC, GSH, Cys, Gly a Glu. Závislost rozlišení (R_{ij}) jednotlivých párů na koncentraci vodné fáze (φ) v MF během isokratických analýz na koloně ZIC-HILIC (150 × 2,1 mm, 3 μm), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 0,1 % DFA ve vodě/acetonitrilu, standardy rozpuštěny ve směsi voda/acetonitril, 1:9, (v/v).....86
- Obrázek 34: Závislost retence ($\log k_i$) standardů GGC, GSH, Cys, Gly, Glu, cystinu a GSSG na koncentraci vody v MF ($\log \varphi$) během isokratických analýz na koloně Chromolith Performance Si (100 × 4,6 mm), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 5 mmol/l NH_4HCO_3 ve vodě a acetonitril, standardy rozpuštěny ve směsi voda/acetonitril, 1:9, (v/v)87
- Obrázek 35: Okénkový diagram separace kritických párů GGC, GSH, Cys, Gly, Glu, cystinu a GSSG. Závislost rozlišení (R_{ij}) jednotlivých párů na koncentraci vodné fáze (φ) v MF během isokratických analýz na koloně Chromolith Performance Si (100 × 4,6 mm), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 5 mmol/l NH_4HCO_3 ve vodě a acetonitril, standardy rozpuštěny ve směsi voda/acetonitril, 1:9, (v/v).....88
- Obrázek 36: Závislost retence ($\log k_i$) standardů GGC, GSH, Cys, Gly, Glu, cystinu a GSSG na koncentraci vody v MF ($\log \varphi$) během isokratických analýz na koloně Chromolith Performance Si (100 × 4,6 mm), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 5 mmol/l NH_4HCO_3 ve vodě a 0,1 % HCOOH v acetonitrilu, standardy rozpuštěny ve směsi voda/acetonitril, 1:9, (v/v)89

- Obrázek 37: Okénkový diagram separace kritických párů GGC, GSH, Cys, Gly, Glu, cystinu a GSSG. Závislost rozlišení (R_{ij}) jednotlivých párů na koncentraci vodné fáze (φ) v MF během isokratických analýz na koloně Chromolith Performance Si (100 × 4,6 mm), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 5 mmol/l NH_4HCO_3 ve vodě a 0,1 % HCOOH v acetonitrilu, standardy rozpuštěny ve směsi voda/acetonitril, 1:9, (v/v).....90
- Obrázek 38: Závislost retence ($\log k_i$) standardů GGC, GSH, Cys, Gly, Glu, cystinu a GSSG na koncentraci vody v MF ($\log \varphi$) během isokratických analýz na koloně Chromolith Performance Si (100 × 4,6 mm), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 5 mmol/l NH_4HCO_3 ve vodě a 0,2 % HCOOH v acetonitrilu, standardy rozpuštěny ve směsi voda/acetonitril, 1:9, (v/v)91
- Obrázek 39: Okénkový diagram separace kritických párů GGC, GSH, Cys, Gly, Glu, cystinu a GSSG. Závislost rozlišení (R_{ij}) jednotlivých párů na koncentraci vodné fáze (φ) v MF během isokratických analýz na koloně Chromolith Performance Si (100 × 4,6 mm), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 5 mmol/l NH_4HCO_3 ve vodě a 0,2 % HCOOH v acetonitrilu, standardy rozpuštěny ve směsi voda/acetonitril, 1:9, (v/v).....92
- Obrázek 40: Závislost retence ($\log k_i$) standardů GGC, GSH, Cys, Gly, Glu, cystinu a GSSG na koncentraci vody v MF ($\log \varphi$) během isokratických analýz na koloně Chromolith Performance Si (100 × 4,6 mm), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 2,5 mmol/l NH_4HCO_3 ve vodě/acetonitrilu, standardy rozpuštěny ve směsi voda/acetonitril, 1:9, (v/v)93
- Obrázek 41: Okénkový diagram separace kritických párů GGC, GSH, Cys, Gly, Glu, cystinu a GSSG. Závislost rozlišení (R_{ij}) jednotlivých párů na koncentraci vodné fáze (φ) v MF během isokratických analýz na koloně Chromolith Performance Si (100 × 4,6 mm), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 2,5 mmol/l NH_4HCO_3 ve vodě/acetonitrilu, standardy rozpuštěny ve směsi voda/acetonitril, 1:9, (v/v).....94
- Obrázek 42: Závislost retence ($\log k_i$) standardů GGC, GSH, Cys, Gly, Glu, cystinu a GSSG na koncentraci vody v MF ($\log \varphi$) během isokratických analýz na koloně Chromolith Performance Si (100 × 4,6 mm), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 10 mmol/l NH_4HCO_3 ve vodě a 5 mmol/l NH_4HCO_3 s 5 % vody v acetonitrilu, standardy rozpuštěny ve směsi voda/acetonitril, 1:9, (v/v).....95

Obrázek 43: Okénkový diagram separace kritických párů GGC, GSH, Cys, Gly, Glu, cystinu a GSSG. Závislost rozlišení (R_{ij}) jednotlivých párů na koncentraci vodné fáze (φ) v MF během isokratických analýz na koloně Chromolith Performance Si (100 × 4,6 mm), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 10 mmol/l NH_4HCO_3 ve vodě a 5 mmol/l NH_4HCO_3 s 5 % vody v acetonitrilu, standardy rozpuštěny ve směsi voda/acetonitril, 1:9, (v/v)96

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Porovnání kolon a mobilních fází dle hodnot retenčních faktorů pro standardy GGC a GSH rozpuštěné ve vodě.....	69
Tabulka 2: Porovnání kolon a mobilních fází dle hodnot retenčních faktorů pro standardy GGC a GSH rozpuštěné ve směsi acetonitril/voda, 9:1, (v/v)	70
Tabulka 3: Retenční faktory pro kolonu SUPELCO SIL, standardy GGC a GSH rozpuštěny ve směsi acetonitril/voda, 9:1, (v/v)	71
Tabulka 4: Parametry regresních přímk závislosti logaritmu isokratického retenčního faktoru ($\log k_i$) na logaritmu procentuální koncentrace vodné fáze v mobilní fázi ($\log \varphi$) na kolonách ZIC-HILIC a Chromolith Performace Si vypočtené pro GGC, GSH, Cys, Gly, Glu, cystin a GSSG	71
Tabulka 5: Retenční faktory GGC, GSH, Cys, Gly, Glu, cystinu a GSSG pro různé mobilní fáze na koloně ZIC-HILIC	72
Tabulka 6: Retenční faktory GGC, GSH, Cys, Gly, Glu, cystinu a GSSG pro různé mobilní fáze na koloně Chromolith Performace Si	73
Tabulka 7: Přehled testovaných gradientových analýz na koloně ZIC-HILIC	74
Tabulka 8: Přehled retenčních časů GGC, GSH, Cys, Gly, Glu, cystinu a GSSG u gradientových analýz.....	75
Tabulka 9: Přehled šířek pík GGC, GSH, Cys, Gly, Glu, cystinu a GSSG u gradientových analýz.....	76

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

4-HNE	4-hydroxy-2-nonenal
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
ATP	adenosintrifosfát
CBNF	4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluorid
CMQT	2-chloro-1-methylchinolinium tetrafluorborát
DCM	dichlormethan
DTNB	5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoová kyselina)
DTT	dithiothreitol
EC	elektrochemická (detekce)
ESI	ionizace elektrosprejem
FDNB	1-fluoro-2,4-dinitrobenzen
FL	fluorescenční (detekce)
FT-ICR	ioncyklotronová resonance s Fourierovou transformací
GCL	glutamátcysteinligáza
GGC	γ -glutamylcystein
GGT	γ -glutamyltransferáza
GPx	glutathionperoxidáza
GS	glutathionsyntetáza
GSH	γ -glutamylcysteinylglycin, glutathion
GSSG	glutathiondisulfid
GST	glutathion-S-transferáza
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IAA	kyselina jodoctová
IT	iontová past
LOD	limit detekce
MALDI	ionizace laserem za účasti matrice
MBB	monobrombiman
MF	mobilní fáze
MRM	multiplexní analýza (z angl. multiple reaction monitoring)
MRP	multidrug resistance protein
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NAC	<i>N</i> -acetylcystein
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NEM	<i>N</i> -ethylmaleimid
NOX	NADPH-oxidáza
NPLC	chromatografie na normálních fázích
OPA	o-ftalaldehyd
PCA	perchloroctová kyselina
PDI	proteindisulfidisomeráza
Prdx 6	peroxiredoxin 6
PSSG	proteinový disulfid s glutathionem
Q	quadrupól
QqQ	trojitý quadrupól
ROS	reaktivní sloučeniny kyslíku
RP	reverzní fáze

RPLC	chromatografie na reverzních fázích
SBD-F	7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfonát
SIM	analýza jednoho iontu (z angl. single ion monitoring)
SOD	superoxiddismutáza
SPE	extrakce na pevné fázi
TCA	trichloroctová kyselina
TCEP	tris-(2-karboxyethyl)fosfin
TFA	trifluoroctová kyselina
TOF	analyzátor doby letu
UHPLC	ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie

1. ÚVOD

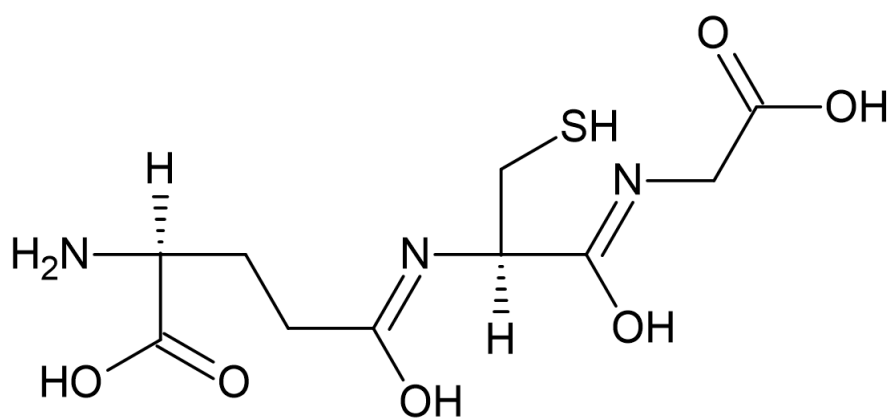
Glutathion, formálně γ -glutamylcysteinylglycin (GSH), je v přírodě všudypřítomný tripeptid, produkují jej organismy od bakterií, rostlin až po živočichy. Glutathion je nejvýznamnějším antioxidantem, je syntetizován v cytosolu buněk pomocí dvou enzymů v elegantně regulovaném systému, který umožňuje udržovat různé úrovně GSH v různých typech tkání s největším zastoupením v játrech. GSH v buňce plní mnoho důležitých funkcí, jako jsou detoxifikace toxických elektrofilů, těžkých kovů, neutralizace volných radikálů či redukce reaktivních sloučenin kyslíku, jako je peroxid vodíku, čímž také udržuje redoxní rovnováhu. GSH se také účastní metabolismu xenobiotik, regulace buněčného cyklu, proliferace, apoptózy či recyklace dalších antioxidantů [1-4], také slouží jako zásobní forma aminokyseliny cysteinu [5].

Glutathion je kofaktor, koenzym a také substrát pro mnoho enzymů. Účastní se mnoha redukčních a konjugačních reakcí. Vyskytuje se zejména v thiol-redukované formě (GSH), ale také jako glutathiondisulfid (GSSG), tedy dvě molekuly GSH spojené disulfidovou vazbou v postranním řetězci cysteinu, z celkového glutathionu představuje GSSG asi jednu setinu [6]. GSSG je často nepřesně označován jako oxidovaný GSH, oxidovaný však může být např. i S-nitrosoglutathion [7] či glutathionpersulfid [8]. Poměr mezi GSH a GSSG je udržován glutathionreduktázou (GR), dependentní na kofaktoru $\text{NADPH} + \text{H}^+$ [9]. Tento poměr je významný indikátor buněčného oxidačního stresu a také biomarker mnoha onemocnění či poruch, jako jsou katarakta, rakovina, Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba, diabetes, selhání ledvin, zápal plic, cystická fibróza, neurodegenerativní onemocnění, HIV, infekce jater či otrava těžkými kovy [10].

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Glutathion

Jak již bylo zmíněno, GSH je tripeptid skládající se z aminokyselin glycinu, cysteinu a glutamátu. Co však činí tuto molekulu strukturně unikátní, je spojení postranní karboxylové skupiny glutamátu (v gama pozici) s aminoskupinou cysteinu, tuto vazbu většina proteáz či peptidáz nedokáže rozštěpit [11]. Hlavní funkční skupinou, která umožňuje tvorbu konjugátů či disulfidů, je thiolová (SH) skupina cysteinu, jež je pro svou důležitost zahrnuta i v zavedené zkratce – GSH. Struktura je uvedena na obrázku 1.



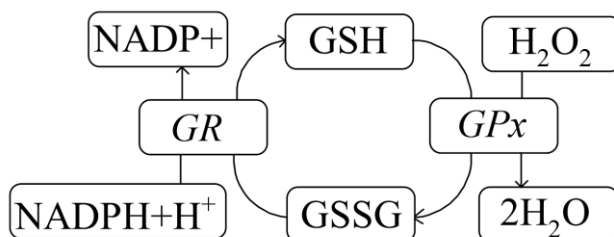
Obrázek 1: Glutathion

2.1.1 Funkce

Glutathion hraje důležitou roli při odstraňování či neutralizaci mnoha reaktivních sloučenin, jako jsou volné radikály či reaktivní sloučeniny kyslíku (ROS). Volný radikál je jakýkoliv atom či molekula obsahující nepárový elektron. Fyziologicky nejvýznamnější reaktivní sloučeniny kyslíku (ROS) jsou superoxidový anion, hydroxylový radikál, oxid dusnatý či peroxid vodíku (H₂O₂). Kromě přímé interakce s ROS působí GSH antioxidačně také nepřímě, a to interakcí s dalšími antioxidanty [9]. Za určitých okolností však může rychlost produkce ROS překročit rychlost produkce GSH, což způsobuje oxidační stres, chronický zánět nebo až poškození tkání [12], proto je velmi důležité udržet homeostázu GSH, který efektivně eliminuje nadprodukcí ROS [13, 14]. Mimo své velmi důležité antioxidační funkce plní GSH významnou roli také v detoxifikaci mnoha toxických látek endogenního i exogenního původu – eobiotik, xenobiotik či těžkých kovů [5].

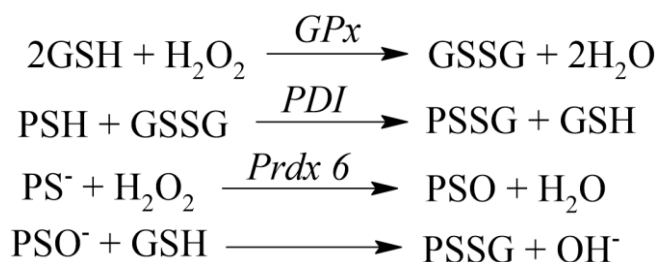
2.1.1.1 Antioxidační ochrana

Glutathionová antioxidační ochrana uvnitř buněk je zprostředkována enzymy z rodiny glutathionperoxidáz (GPx) [15] a peroxiredoxinem 6 (Prdx 6) [16]. Tyto enzymy katalyzují redukci H_2O_2 glutathionem na vodu a GSSG. Existují také GPx speciálně pro fosfolipidové a lipidové hydroperoxydy [17]. Vznikající GSSG je potenciálně toxický, avšak uvnitř buněk se nachází GR, která má vysokou aktivitu a udržuje většinu GSH v redukované formě, tento cyklus je znázorněn na obrázku 2.



Obrázek 2: Cyklus konverze GSH a GSSG

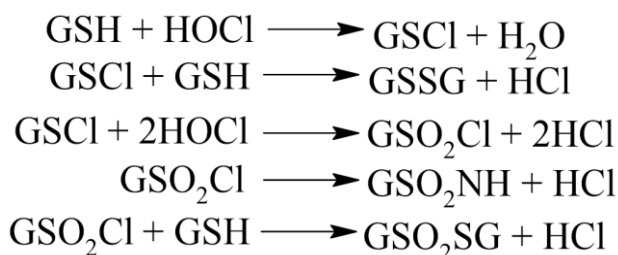
Část GSSG je z buněk vyloučena. GSSG může reagovat také s thiolovou skupinou proteinů (možná katalýza proteindisulfidisomerázou, PDI) za vzniku proteinových disulfidů s glutathionem (PSSG), které pak mohou reagovat s dalším proteinem za vzniku proteinového disulfidu, reakce jsou znázorněny na obrázku 3. Glutathionylace proteinů (vznik PSSG) hraje roli pravděpodobně v přenosu signálu uvnitř buněk [9]. Pro hlubší pochopení významu antioxidační ochrany je v následujících odstavcích shrnuta také geneze oxidantů.



Obrázek 3: Glutathionylace proteinů

Příčinou vzniku zmíněných reaktivních sloučenin mohou být látky schopné redoxní cyklizace, jako jsou chinony, které jsou také součástí některých xenobiotik. Při redoxní cyklizaci vzniká například radikál superoxidu či H_2O_2 [9]. Reaktivní sloučeniny kyslíku jsou také produkovány fagocyty, zde se jedná o hlavní mechanismus usmrcení mikroorganismů. NADPH-oxidáza (NOX) produkuje superoxid [18], který je dále přeměněn na H_2O_2 buď neenzymaticky, nebo za katalýzy superoxiddismutázou (SOD). Některé fagocyty také sekretují myeloperoxidázy, jež katalyzují reakci H_2O_2 s halogenidy za vzniku kyseliny chlorné či bromné, které efektivně

usmrcují mikroorganismy, ale také poškozují tkáň a tím podporují zánět [19]. Reakce GSH s kyselinou chlornou jsou znázorněny na obrázku 4.



Obrázek 4: Reakce GSH s kyselinou chlornou

H_2O_2 je nebezpečný zejména v přítomnosti redukováných kovů (např. Fe^{2+}), kdy při tzv. Fentonově reakci vzniká vysoce reaktivní hydroxylový radikál [9], který však může vznikat také rozpadem peroxydusitanu [11]. Reakcí radikálu oxidu dusnatého a radikálu superoxidu vzniká peroxydusitan a jeho protonací vzniká peroxydusitá kyselina, která má reaktivitu dusitanového radikálu (součást cigaretového kouře) a hydroxylového radikálu [9].

V případě produkce hydroxylového radikálu blízko membrány jsou oxidovány lipidy, což vyvolá řetězovou reakci, která poškozuje membránu. Vznikají lipidové radikály, které reagují s kyslíkem za vzniku hydroperoxidových radikálů, jež reagují s dalším lipidem za tvorby lipoperoxidu a dalšího lipidového radikálu [20]. Produktem lipoperoxidace nenasycených mastných kyselin jsou například 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) či α , β -nenasycené aldehydy, které jsou toxické [21], reagují s proteiny, které pak mohou ztratit svou funkci, například dojde k inaktivaci enzymu [9].

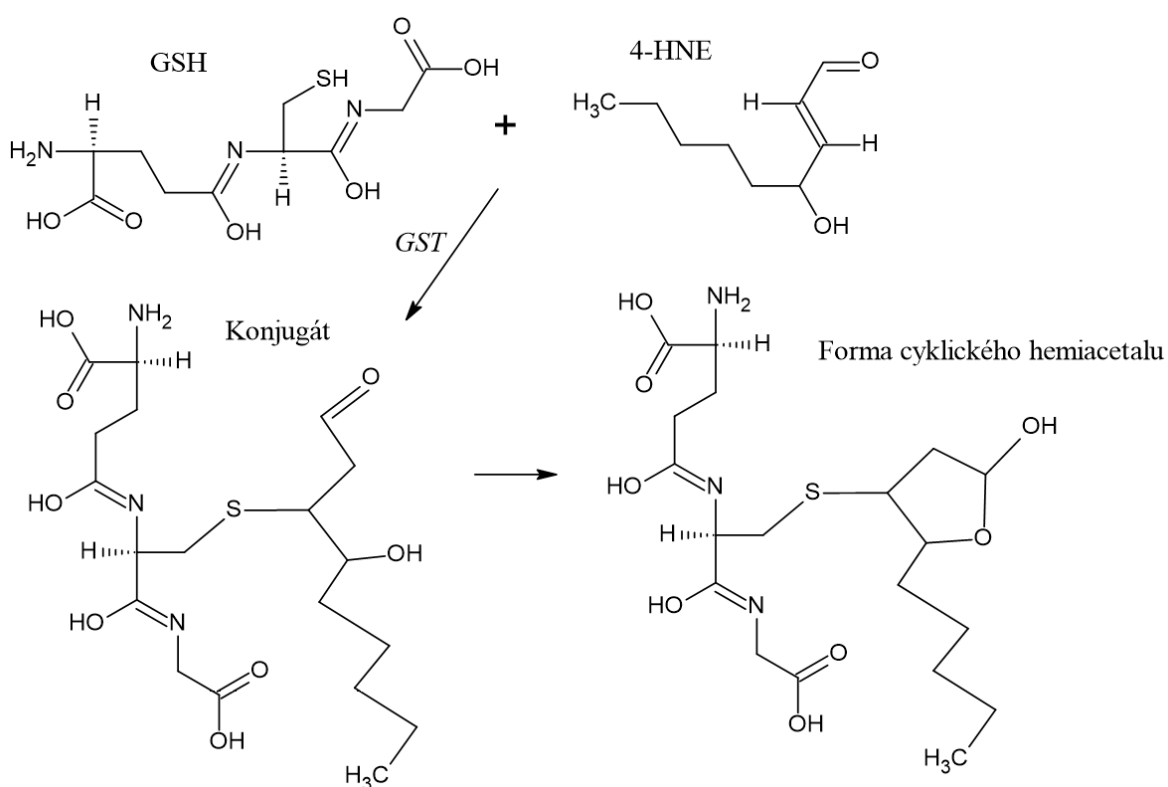
Glutathion je nejdůležitější nízkomolekulární antioxidant, z potravy však přijímáme další nízkomolekulární antioxidanty, jako jsou vitamin E (α -tokoferol) a vitamin C (kyselina askorbová). Vitamin E například redukuje lipidové hydroxylové radikály či lipidové peroxidy vznikající oxidací polynenasycených mastných kyselin. Oxidovaný vitamin E je poté rychlou neenzymatickou reakcí redukován vitaminem C a oxidovaný vitamin C je pak enzymatickou reakcí redukován glutathionem [9].

2.1.1.2 Detoxifikační funkce

Jak již bylo zmíněno, GSH hraje významnou roli také v detoxifikaci mnoha toxických látek endogenního původu, jako jsou oxidativní produkty metabolismu lipidů, nukleových kyselin či katecholaminů, a také v detoxifikaci xenobiotik ať už tělu přirozených či uměle vytvořených, jako jsou léky, drogy či kontaminanty. GSH detoxifikuje také těžké kovy, jako je rtuť, kadmium

či arzen, které jsou velmi toxické. Působení toxinů může vést k poškození tkání či až ke vzniku rakoviny [5].

Glutathion reaguje s mnoha elektrofilů za vzniku glutathion-S-konjugátů. Jednou z hlavních funkcí glutathionu je eliminace xenobiotik, a to právě konjugací xenobiotika s GSH a následnou sekrecí tohoto konjugátu z buňky skrz membránový transportér MRP (z anlg. multidrug resistance protein) [22]. Tyto konjugační reakce (Michaelisova adice) jsou katalyzovány glutathion-S-transferázou (GST), avšak některé látky jako chinon a menadion mohou tvořit konjugáty s GSH i bez účasti GST. Podobnou konjugační reakcí a následnou exkrecí konjugátu z buňky GSH eliminuje také toxické elektrofilů, jako je 4-HNE (exkretovaný konjugát GSH s 4-HNE může mít také formu cyklického hemiacetalu) [23], viz. obrázek 5. Vzniklé konjugáty jsou obecně mnohem víc rozpustné ve vodě než původní látky, mohou tak být jednoduše exkretovány do moči nebo metabolizovány v játrech na méně toxické sloučeniny [5]. Jelikož jsou játra hlavní detoxifikační orgán, hladiny GSH jsou zde vyšší než v kterékoliv jiné tkáni či orgánu [24].



Obrázek 5: Tvorba konjugátu GSH s 4-HNE

Léky způsobené toxikózy jater jsou v USA hlavní příčinou akutního selhání jater u dospělých nad 50 let [25] a většina těchto toxikóz byla asociována s reaktivními metabolity, které jsou detoxifikovány primárně konjugací s GSH [26]. Narušení homeostázy GSH a schopnosti

detoxifikace mohou také přímo či nepřímo vést k progresi onemocnění jater způsobených požíváním alkoholu [27].

2.1.2 Metabolismus

2.1.2.1 Výskyt v těle

Glutathion se nachází zejména v cytosolu eukaryotických buněk v koncentračním rozmezí od 1 do 10 mmol/l [6, 28], přičemž ve většině buněk je koncentrace asi 1-2 mmol/l, zatímco v hepatocytech je koncentrace asi 10 mmol/l, játra jsou tedy díky své vysoké metabolické aktivitě zásobárnou GSH. V plazmě je koncentrace GSH přibližně tisíckrát nižší, tedy v řádu $\mu\text{mol/l}$ [9, 29]. Ačkoliv jsou běžně v extracelulárních prostorech hladiny GSH nízké, v tenké vrstvě tekutiny pokrývající dýchací cesty nacházejí vysoké koncentrace GSH, neboť epitel plic je konstantně vystaven oxidantům, ať už z vnitřního prostředí (produkty metabolismu leukocytů, buněk epitelu a endotelu) či vnějšího prostředí (vzduch, ozon, oxid dusičitý, oxid siřičitý, výfukové plyny, cigaretový kouř a také ultrafialové či ionizující záření) [11]. Z tohoto důvodu je GSH sekretován endotelovými epitelovými buňkami plic, které chrání před oxidací. Například u kuřáků je vyšší riziko zánětu v plicích, přičemž dochází k uvolnění kyseliny chlorné neutrofilů, která reaguje s GSH a snižuje zde jeho hladinu [30, 31].

2.1.2.2 Syntéza

Syntéza GSH probíhá u živočichů a hub v cytosolu, u rostlin probíhá částečně i v plastidech [6]. GSH je syntetizován ze tří aminokyselin pomocí dvou po sobě následujících enzymově katalyzovaných reakcí vyžadujících ATP [32]. První reakcí je formace dipeptidu γ -glutamylcysteinu (GGC), kdy za katalýzy glutamátcysteinligázou (GCL) vzniká peptidová vazba mezi aminoskupinou cysteinu a vedlejší karboxylovou skupinou glutamátu [33]. Druhou reakcí je již samotná syntéza tripeptidu γ -glutamylcysteinylglycinu, tedy GSH, kdy za katalýzy glutathionsyntetázou (GS) vzniká peptidová vazba mezi karboxylovou skupinou γ -glutamylcysteinu a aminoskupinou glycinu [34, 35].

První reakce, katalyzovaná ATP dependentní glutamátcysteinligázou (GCL), je kontrolním bodem pro homeostázu celulórního GSH. Regulace homeostázy GSH je velmi komplexní, probíhá na mnoha úrovních – genetické (transkripce, translace) a biochemické (post-translační). GCL se skládá z těžké (73 kDa) a lehké (30 kDa) podjednotky, přičemž lehká podjednotka je enzymaticky neaktivní, ale plní regulační funkci snižováním Michaelisovy konstanty (K_M) pro glutamát a zvyšováním této konstanty pro GSH [33, 36]. Kinetika obou podjednotek GCL je pravděpodobně regulována fosforylací [37]. Poměr zastoupení těchto podjednotek se liší,

většinou převažuje katalyticky aktivní těžká podjednotka, avšak např. pacienti s cystickou fibrózou mají funkční polymorfismus genu kódujícího těžkou podjednotku GCL [38], což bylo dokázáno sníženou hladinou GSH v tekutině epitelu plic [39]. Syntéza GSH je fyziologicky zvýšena během oxidačního stresu a zánětu (nejprve je zaznamenán pokles a poté nárůst hladiny GSH v důsledku zvýšené exprese GCL) [11].

Druhý krok syntézy GSH je katalyzován ATP dependentní GS, která se nachází intracelulárně všech buněk, kde rychle liguje substráty GGC a glycin za tvorby GSH [40]. Za přítomnosti GS je intracelulární koncentrace GGC velmi nízká (asi 5 $\mu\text{mol/l}$), rychlost tvorby GSH je tedy limitována GCL [41], což podporuje také fakt, že zvýšená exprese GS u kvasinek nevedla ke zvýšení hladiny GSH, kdežto zvýšená exprese GCL ano [42].

Jelikož GCL je specifický ke glutamylovému zbytku, může být fyziologicky kompetitivně inhibován glutathionem [33, 43] nebo také dostupností aminokyseliny cysteinu [32]. Intracelulární koncentrace glutamátu je asi desetkrát vyšší než K_M , zatímco intracelulární koncentrace cysteinu je přibližně stejná jako je K_M [44]. To vedlo k domněnce, že cystein je limitním substrátem pro GCL, a falešnému předpokladu, že deplece GSH při různých chronických onemocněních je způsobena nedostatkem cysteinu ve stravě, což je nepravděpodobné, neboť cysteinu přijímáme stravou dostatečné množství [45].

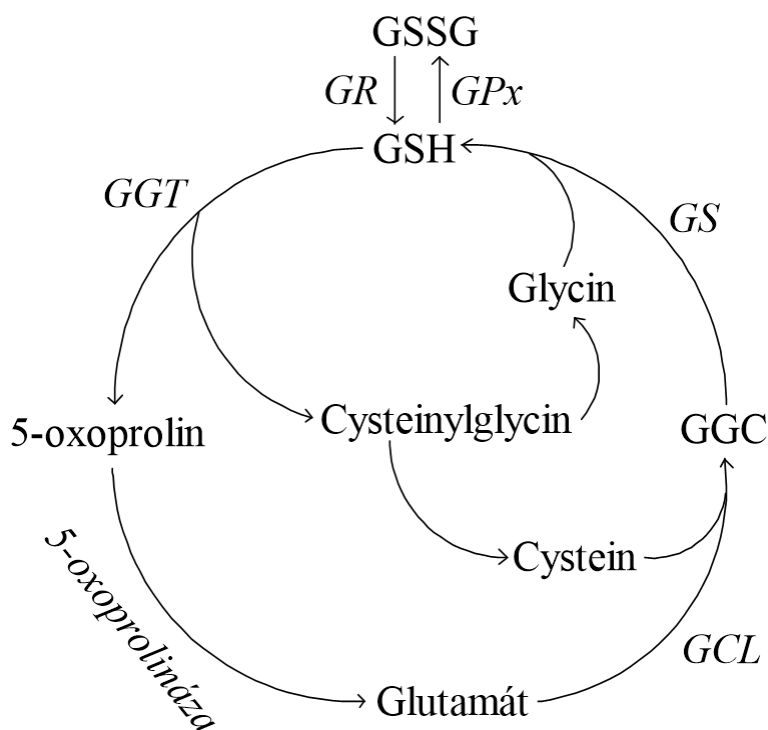
2.1.2.3 Transport

Hladina GSH intracelulárně se pohybuje v řádu mmol/l , kdežto hladina GSH extracelulárně se pohybuje v řádu $\mu\text{mol/l}$. Tento strmý koncentrační gradient pohání export GSH ven z buňky a ze stejného důvodu je transport GSH z extracelulárního prostoru do buňky termodynamicky nevýhodný [46, 47]. GSH je za fyziologického pH záporně nabitý a nemůže volně difundovat skrz lipidové membrány. Import či export mezi buněčnými kompartmenty a cytolem zprostředkovávají membránové transportéry [6]. GSSG může být z buněk rovněž exkretován, ale také může být v buňce zpětně redukován za katalýzy GR a spotřeby $\text{NADPH} + \text{H}^+$, nicméně *de novo* syntéza GSH z jednotlivých aminokyselin je esenciální pro zvýšení hladiny GSH, je fyziologickou odpovědí na oxidační stres [6].

2.1.2.4 Degradace

Extracelulárně nastává degradace GSH, a to pouze na buňkách, které na svém povrchu tvoří γ -glutamyltransferázu (GGT). Tento membránový ektoenzym je jediným enzymem, který dokáže zlomit gama vazbu v GSH a jeho konjugátech, což je esenciální pro uvolnění cysteinu. GGT katalyzuje přenos γ -glutamyly z glutathionu na jinou aminokyselinu za vzniku

γ -glutamyl-aminokyseliny a cysteinylglycinu, primárně však vzniká GGC, který je vstřebán do buňky, kde je ihned přeměněn na GSH [11]. Ostatní γ -glutamyl-aminokyseliny mohou být transportovány zpět do buněk, kde se stanou substrátem pro γ -glutamylcyklotransferázu, tento enzym tvoří 5-oxoprolin a uvolňuje aminokyselinu či peptid navázaný na glutamát. 5-Oxoprolin je převeden na glutamát ATP-dependentní 5-oxoprolinázou. Další produkt rozpadu GSH, cysteinylglycin, je transportován zpět do buňky a rozštěpen nespecifickými dipeptidázami na cystein a glycin, které jsou připraveny na resysntézu GSH. Popsaný proces umožňuje uvolnění cysteinu, který může být využit k proteosyntéze. GSH tedy slouží také jako funkční úložiště cysteinu, který je jinak ve své volné formě nestabilní [6, 36, 48]. Cyklus GSH zahrnující syntézu i degradaci je znázorněn na obrázku 6.



Obrázek 6: Cyklus glutathionu

2.1.2.5 Ovlivnění koncentrace glutathionu

Snížení koncentrace GSH pod homeostatickou úroveň se v odborné literatuře označuje také jako deplece GSH. Tato deplece může nastat za mnoha různých podmínek, jako jsou nadměrné zvýšení hladiny ROS během mikrobiální infekce či zánětu, chronický zánět či chronická onemocnění [49-51], akutní nebo chronická otrava xenobiotiky, alkoholem, přírodními toxiny či těžkými kovy [5]. Při většině onemocnění či poruch a také při samotném stárnutí dochází ke snížení kapacity produkce GSH na homeostatické úrovni potřebné k boji s onemocněními či oxidačním stresem. Hladina GSH klesá také v důsledku nezdravého životního stylu, působení

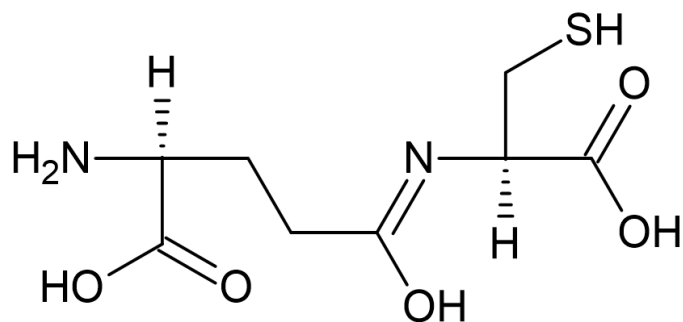
vnějších stresorů či po dlouhotrvající nebo extrémní fyzické námaze. Hladina GSH tedy může být negativně ovlivněna mnoha faktory, udržení homeostázy GSH je však pro lidské zdraví esenciální [12]. Pokud je tedy homeostáza GSH narušena a buňky jej nestíhají produkovat (v důsledku stáří, chronických onemocnění, poranění či toxinů), je vhodné navýšit GSH na homeostatickou hladinu uměle [45].

Jelikož během mnoha chronických onemocnění dochází k depleci GSH, byly v posledních letech intenzivně zkoumány suplementy, které mají potenciál zvýšit hladinu GSH. Suplementace čistě glutathionem nezvyšuje celulární GSH, neboť extracelulární koncentrace je asi tisíckrát menší oproti intracelulární. Tento strmý koncentrační gradient zabraňuje glutathionu vstoupit do buněk [24], pravděpodobně z tohoto důvodu selhala většina pokusů o navýšení hladiny GSH prostou suplementací glutathionem [46, 47].

Hlavním kandidátem byl *N*-acetylcystein (NAC), který se používá jako antidotum při akutním předávkování paracetamolem, kdy dochází k akutní depleci GSH. V tomto případě je vyčerpán cystein a NAC slouží jako netoxický zdroj cysteinu [52, 53]. Nicméně žádné klinické studie nepotvrdily efektivitu zvýšení GSH podáním NAC pacientům s chronicky sníženou hladinou GSH, nízké hladiny GSH tedy nejsou způsobeny nedostatkem cysteinu ve stravě, ale pravděpodobně zhoršením mnoha kontrolních mechanismů GCL [54, 55]. Pro zvýšení hladiny GSH byla navržena také mnohá glutathionová analoga jako je *N*-acystelin, *N*-isobutyrylcystein, erdostein či fudostein [56], která však nedosahují tak slibných výsledků jako γ -glutamylcystein [45].

2.2 γ -glutamylcystein

γ -glutamylcystein je dipeptid a přímý prekurzor GSH, od kterého se liší pouze absencí aminokyseliny glycinu (viz. obrázek 7). GGC je pro savce esenciální, neboť myši s knockoutovanou GCL se nevyvíjí dále než do fáze embrya a umírají ještě před narozením, GGC je považován také za netoxickou formu cysteinu [41]. Na rozdíl od NAC, podáním GGC je možné zvýšit hladinu GSH nad úroveň homeostázy [57]. Zvýšení hladiny GSH nad homeostatickou úroveň je klíčové při různých chronických onemocněních a GGC se zdá být prvním účinným suplementem, kterým je toho možné dosáhnout. Navíc GGC sám o sobě vykazuje antioxidační vlastnosti [58], odstraňuje ROS, jako je H_2O_2 či superoxid, nezávisle na GSH, což by mohlo být užitečné u mnoha případů mitochondriálních onemocnění, kdy není dostatek ATP pro syntézu GSH [45, 59].



Obrázek 7: γ -glutamylcystein

Intracelulární koncentrace GGC je obecně velmi nízká, neboť GGC rychle reaguje s glycinem za vzniku GSH. Jak již bylo zmíněno, přímá suplementace GSH nezvyšuje intracelulární hladinu GSH, neboť výrazný koncentrační gradient brání GSH vniknout do buňky [47]. Vstupu GGC do buňky výrazný gradient nebrání, neboť hladiny GGC se pohybují extracelulárně v rozmezí 1-5 $\mu\text{mol/l}$ [57] a intracelulárně 5-10 $\mu\text{mol/l}$ [60], GGC tedy může difundovat do buňky, kde je rychle přeměněn na GSH. Díky těmto vlastnostem je GGC některými považován za transportní formu GSH [24].

Studie na myších ukázaly, že intraperitoneálně podaný GGC dokáže obnovit depletovaný GSH v orgánech [57]. *In vitro* studie prokázaly účinky GGC na zmírnění oxidačního stresu v neuronech a také navýšení GSH *in vivo* [61]. Další *in vivo* studie neurálních, srdečních či jaterních tkání ukázaly, že extracelulární podání GGC-ethylesteru také zvyšuje hladiny GSH [62-64]. *In vitro* studie na izolovaných mitochondriích navíc ukázala, že GGC může nahradit funkci GSH [58]. Byl zkoumán také potenciál systémové biodostupnosti orálně podaného GGC. Obecně dipeptidy jako je GGC nejsou využívány jako orální terapeutika, neboť jsou často hydrolyzovány trávicími či sérovými proteázami, nicméně γ -glutamyllová vazba GGC je rezistentní k hydrolyze většiny proteáz či aminoproteáz [65].

Klinické studie na zdravých nehladovějících lidech ukázaly, že po orálním podání GGC dochází ke značnému zvýšení hladiny GSH v lymfocytech, což prokazuje systémovou biodostupnost a terapeutický potenciál GGC [66]. GGC je postupně vstřebán v gastrointestinálním traktu a přes vrátnicovou žílu a játra je vaskulárním systémem distribuován do těla, kde je absorbován lymfocyty a velmi pravděpodobně také ostatními buňkami. Jakmile je GGC vstřebán do buňky, je přeměněn na GSH. Perorální podání dávek 2 a 4 g vedlo během 2-3 hodin ke dvoj- až trojnásobnému zvýšení bazální hladiny GSH. Po dalších 2-3 hodinách klesla hladina GSH zpět na bazální úroveň pravděpodobně v důsledku zpětné inhibice aktivity GCL [45, 67].

Produkce celulórního GGC s narůstajícím věkem klesá [68], stejně tak při progresi mnoha chronických onemocnění [69], v těchto případech nabízí suplementace GGC zdravotní benefity, zejména pak v případech akutního snížení GSH, například po těžké fyzické zátěži, během trauma či při intoxikacích (např. paracetamolem). Bylo reportováno také antioxidační působení GGC v mozku [61] a možnost využití při léčbě sepse [70]. GGC má široký terapeutický potenciál, jako je zvýšení hladiny GSH u starších lidí [68], dále při chronických onemocněních, jako je Alzheimerova choroba [71], a v neposlední řadě také ve sportu [58, 59, 72].

Cvičit a sportovat je zdravé, avšak čím je intenzita cvičení a fyzická zátěž vyšší, tím vzrůstá také respirace a produkce ROS, což může vést k oxidačnímu stresu a poškození tkání. Jak již bylo mnohokrát zmíněno, GSH je hlavním antioxidantem neutralizujícím volné radikály a ROS. Během dlouhotrvající a intenzivní fyzické zátěže však buňky nemají kapacity k produkci tak velkého množství GSH, aby udrželo oxidoredukční homeostázu, dochází tedy k depleci GSH, což se fyzicky projevuje ztrátou energie, únavou a vyčerpáním. Proto se sportovcům doporučovalo užívat antioxidanty, doplnění hladin GSH však donedávna nebylo tak jednoduché [73].

Suplementací samotným GSH nebo NAC nelze navýšit hladinu GSH nad homeostatickou úroveň, což znamená, že neposkytnou benefit cvičenci, který bude vystaven extrémní zátěži. Suplementace NAC však může poskytnout benefit jedincům s již sníženou hladinou GSH [74]. Efektivního zvýšení hladiny GSH nad homeostatickou úroveň je možno dosáhnout suplementací GGC, který je přímým prekurzorem GSH, během několika hodin je buňkami vstřebán a převeden na GSH. GGC jako jediný ze zmíněných suplementů poskytuje preventivní ochranu před oxidačním stresem v důsledku intenzivního cvičení, což se projeví vyšší energií a výdrží cvičence a kratším časem potřebným k regeneraci [45, 75].

2.3 Stanovení koncentrace glutathionu a jeho metabolitů

Pro určení a charakterizaci oxidačního stresu je důležité odlišit různé formy thiolů a určit jejich hladiny, zejména pak GSH a GSSG, ale také GGC a další [9]. Pro stanovení hladin GSH bylo vyvinuto mnoho metod, málo z nich je však standardizováno pro měření GSH či jiných thiolů v krvi, plazmě, tkáních či buňkách. Nejčastější jsou spektroskopické metody využívající GR, např. enzymatická recyklační metoda vyvinutá Tietzem [76], tyto metody jsou jednoduché a levné, ale méně citlivé a specifické. Vysokou citlivost poskytují enzymatické metody fluorescenční [77] či chemiluminiscenční [78]. Technika nukleární magnetické resonance

umožňuje dokonce stanovení GSH *in vivo* v mozku či *in cyto* v živých buňkách [79]. Dále je nutné zmínit také elektrochemické (EC) metody detekce, kterých je využíváno zejména v biosenzorech či po chromatografické separaci [80]. V posledních letech je čím dál více využíváno separačních metod, zejména vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), ale také kapilární elektroforézy, s detekcí nejčastěji fluorescenční (FL) nebo pomocí hmotnostní spektrometrie (MS) [81]. Právě spojení separačních metod s MS poskytuje tolik postrádanou selektivitu a zároveň specificitu i citlivost detekce. Před vlastní analýzou touto poměrně nákladnou technikou je však vhodné vzorek náležitě zpracovat.

2.3.1 Příprava vzorku

Správná příprava vzorku je nezbytná nejen pro správné a selektivní stanovení, ale také pro ochranu analytické instrumentace [82]. Stanovení však GSH provází řada komplikací, kterým je třeba předejít. Jednou z těchto komplikací je autooxidace GSH na GSSG při $\text{pH} > 7$ či metabolizace obou forem glutathionu γ -glutamyltransferázou s optimální aktivitou při neutrálním pH , z těchto důvodů je třeba vzorky ihned ochladit a zpracovat. Ke vzorku se nejčastěji přidává kyselina, která nejen lyzuje buňky, ale také precipituje mnoho kontaminujících proteinů, zabraňuje metabolizaci a autooxidaci. Nicméně při úpravě vzorku krve kyselinou dochází k lyzi erytrocytů a uvolnění nadměrného množství železa, které může oxidovat GSH i v kyselém prostředí [83, 84].

Největším zdrojem chyb při stanovení GSH a GSSG v plné krvi či plazmě je hemolýza červených krvinek či skladování vzorku při pokojové teplotě. Hemolýza i malého množství erytrocytů může značně zkreslit (nadhodnotit) výsledné hodnoty GSH v plazmě, neboť koncentrace GSH v buňkách je až tisíckrát vyšší než plazmě. Vzorek je třeba ihned ochladit, neboť skladování při pokojové teplotě může vést k autooxidaci a proteolýze. Dále se doporučuje vzorky ihned centrifugovat, zkumavky se vzorky by měly obsahovat EDTA, která slouží jako antikoagulant a chelatační činidlo vychytávající Fe^{2+} ionty, které by mohly oxidovat GSH [83-85]. Jako velmi účinné chelatační činidlo byla navržena také kyselina diethylentriaminopentaoctová [86]. Ačkoliv Steghens a kol. reportovali, že GSH je v plné krvi stabilní po několik hodin [87], recentnější studie Kand'ára a kol. uvádí pokles GSH v plné krvi až o 33 % během jedné hodiny [88]. Proto by měly být vzorky ihned zpracovány a analyzovány, zpracované vzorky mohou být uskladněny po dobu až tří měsíců při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ [89].

2.3.1.1 Redukce disulfidů

Pro stanovení volného i vázaného GSH je třeba redukovat disulfidové vazby s jinými thiolů či thiolovými skupinami proteinů. Avšak redukovaný GSH může být před derivatizací opět reoxidován, což může vést k chybným výsledkům [90]. Již 1 % oxidace GSH může způsobit odchylku při stanovení GSSG až 150 % [91]. Tomuto jevu je možno předejít využitím thiol-maskujících činidel, jako jsou *N*-ethylmaleinimid (NEM) či kyselina jodoctová (IAA). K redukcí disulfidů je možno využít redukčních činidel obsahujících sulfhydrylovou skupinu, jako jsou dierythritol, dithiothreitol (DTT) či 2-merkapt ethanol, která však kompetitivně reagují s monobrombimánem (MBB) a *o*-ftalaldehydem (OPA), což může vést k tvorbě interferujících fluorescenčních sloučenin [83]. Dále je možno využít trialkylfosfíny, například tributylfosfín či trifenyfosfín, které nereagují s thiol-specifickými činidly. Dalším zástupcem redukčních činidel je tris-(2-karboxyethyl)fosfín (TCEP), kterým je možno dosáhnout reprodukovatelnějších výsledků, avšak může interferovat s derivatizačními činidly obsahujícími disulfidovou vazbu, např. 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoová kyselina) (DTNB). Lepší reaktivitu a také schopnost penetrovat fosfolipidové dvojvrstvy nabízí esterová analoga TCEP, například trimethyl-TCEP. Všechny fosfíny však oproti DTT reagují méně ochotně s proteinovými disulfidy [90, 92, 93].

2.3.1.2 Odstranění proteinů

Dalším důležitým krokem před samotnou analýzou je odstranění proteinů, které se běžně vyskytují v komplexních biologických vzorcích. Přítomnost proteinů ve vzorku může nejen zhoršit analytickou proceduru, ale také životnost instrumentace. Proteiny je možno precipitovat minerálními kyselinami, jako jsou kyselina 5-sulfosalicylová [94], trichloroctová (TCA), trifluoroctová (TFA) či perchloroctová (PCA). 15 % PCA vykazuje nejmenší ztráty GSH a byla doporučena pro analýzu GSH v plné krvi [95]. Kyselina 5-sulfosalicylová byla použita ke stanovení GSH s využitím derivatizačního činidla 6-iodacetamidofluorescein [85]. Nadbytek TCA či derivatizačních činidel je doporučeno odstranit použitím nemísitelných rozpouštědel, jako je ether, ethylacetát či dichlormethan (DCM), který je preferován, neboť utvoří separátní spodní organickou fázi a usnadní odebrání supernatantu vrchní vodné fáze obsahující GSH [76].

Obnovení neutrálního až alkalického pH vede ke snížení koncentrace thiolů, pokud nebyly použity thiol-maskující činidla. Mírně alkalické pH je totiž nutné pro derivatizaci s některými chromofory či fluorofory [83, 84]. Proteiny je možno odstranit precipitací v organickém rozpouštědle, jako je acetonitril, aceton či methanol, nicméně organická rozpouštědla nebrání

autooxidaci, jako je tomu u kyselin, přesto jsou preferována při využití MS detekce [83]. Extrakce organickým rozpouštědlem není z důvodu vysoké polaritě GSH vhodná [9], navíc zvýšená teplota při odpařování organického rozpouštědla zvyšuje riziko ztráty GSH. Další možností je extrakce na pevné fázi (SPE), která je však pro rutinní analýzu poměrně finančně nákladná [10], proto je preferována výše popsaná proteinová precipitace. Nicméně byla vyvinuta metoda SPE využívající grafenového adsorbentu k citlivému stanovení GSH v biologických vzorcích, uvedená výtěžnost této extrakční metody je okolo 100 % [82].

K odstranění proteinů je možno využít také ultrafiltrace [96], např. ve spojení s odstředivou mikrokoncentrací [97], což nevyžaduje využití kyselin či organických rozpouštědel, které mohou značně ovlivňovat analytický proces. Dále je možno využít mikro dialýzu, která má však nízkou výtěžnost (recovery) a vyžaduje citlivou detekci [98]. Zlepšení separace a zvýšení účinnosti stanovení thiolů je možno dosáhnout adsorpcí na holý povrch stříbrných nanočástic, s jejichž pozitivně nabitým povrchem přímo reagují thiolové skupiny [99]. Za zmínku stojí také reverzní micelární mikroextrakce využívající kationického surfaktantu methyltrioktylamonium chlorid, touto metodou je možno extrahovat polární látky do reverzních micel v organické fázi [100].

2.3.1.3 Derivatizace

Jelikož GSH ve své molekule neobsahuje žádný silný chromofor ani fluorofor, nemůže být citlivě spektrofotometricky či spektrofluorimetricky detekován, proto se v případě detekce těmito metodami provádí derivatizace s vhodným činidlem, ať už za účelem zvýšení limitu detekce (LOD) nebo vůbec umožnění detekce. UV detektory s prodlouženou detekční vlnovou délkou mohou poskytovat uspokojivé LOD i pro nederivatizovaný GSH, ne však GGC. GSH a GGC může být derivatizován na třech místech – karboxylová, aminová a thiolová funkční skupina. Preferována je derivatizace na thiolové skupině, protože tím je thiolová skupina chráněna před oxidací. GSSG může být derivatizován pouze na karboxylové a aminové skupině [101].

Spektrofotometrické metody a UV detekce poskytuje menší citlivost, ve srovnání s fluorescenční či elektrochemickou detekcí jsou ale jednodušší [90]. Nejpoužívanějšími derivatizačními činidly pro zavedení chromoforu jsou NEM [102], IAA [103] či jodacetamid [104], které dávají vznik thioetherům. Derivatizace činidlem NEM je rychlá a nevyžaduje zahřátí, NEM navíc dokáže penetrovat do buněk a nevratně blokovat GR [91], což však může být problém při využití enzymatické recyklační metody. Jak již bylo zmíněno, NEM je

využíván také jako thiol maskující činidlo (čímž zabraňuje autooxidaci GSH). Za mírně alkalického pH může NEM reagovat také s aminoskupinou, což může být problém při použití některých jiných derivatizačních činidel, která reagují s aminoskupinou, například 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen (FDNB), v obou případech musí být přebytek NEM odstraněn [84, 88, 104]. Pro zlepšení UV absorbance je možno využít také analoga NEM [105]. Nevýhodou NEM je nižší citlivost při FL detekci, což však může být kompenzováno využitím MS detekce, která je ze své podstaty velmi citlivá [91]. Dalším činidlem využívaným například při enzymatické recyklační metodě je DTNB, známá také jako Ellmanovo činidlo, kterou je možno derivatizovat GSH i GSSG [76, 102]. V novějších metodách je k derivatizaci thiolů, včetně GSH, využíváno sloučenin, jako jsou 2-chloro-1-methylchinolinium tetrafluorborát (CMQT) [106] nebo 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluorid (CBNF) [107].

Fluorescenční detekcí je možno dosáhnout mnohem lepšího LOD oproti spektrofotometrické detekci. Derivatizační činidla by měla s GSH reagovat specificky a poskytovat stabilní fluoreskující adukty, činidlo samo o sobě by fluoreskovat nemělo. Činidla reagující s aminoskupinou umožňují simultánní stanovení GSH i GSSG [83, 90]. Příkladem může být činidlo OPA, které tvoří fluoreskující tricyklický isoindol derivát, reaguje za mírných podmínek i s dalšími thioley či aminokyselinami. S aminothioly, jako jsou GSH či GGC, reaguje OPA bez přítomnosti doprovodného činidla, GSSG může být stanoven stejným způsobem po redukci [108, 109]. Dále je možno zmínit například MBB, který za pokojové teploty reaguje s thioley za tvorby thioetherů, ale je fluorescenční sám o sobě, nicméně poskytuje velmi vysokou citlivost při hmotnostní detekci [94]. Fluorobenzofurany, jako je 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfonát (SBD-F), samostatně nefluoreskují a tvoří stabilní produkty [83, 90]. Dále jsou známa činidla na bázi fluoresceinu nebo také benzoxazolu [110]. Deriváty maleinimidů poskytují velmi citlivou a specifickou detekci thiolů [111]. Existují také fluorofory pro použití *in vivo* (tzv. bioimaging), například dithiol odvozený od fluoresceinu a rhodaminu nebo další na bázi anilinu či rhodaminu, kdy při rozštěpení funkčně důležité vazby dojde k uvolnění fluoreskující látky [112, 113]. Dále je možno zmínit také difluoroboradiaza-s-indacen, který efektivně fluoreskuje a je více stabilní na světle a v širokém rozmezí pH [114].

Derivatizací GSH mohou díky jeho chirálním centrům vznikat diastereoizomery, které mohou být separovány běžnými kolonami na HPLC a tvořit tedy dva píky, čímž se může snížit citlivost nebo naopak zvýšit selektivita výběrem vhodného píku pro stanovení [10]. Derivatizace je však většinou poměrně časově náročná, což také může zvyšovat variabilitu metody, chrání před autooxidací a degradací, ale ne před redukcí GSSG, jehož poločas rozpadu v krvi je menší

než 2 minuty, čemuž nezabrání ani precipitace proteinů, ale pouze velmi nízké pH [115], nebo také blokace GR derivatizačním činidlem NEM [91]. V případě analýz pomocí HPLC-MS derivatizace není nutná, což usnadní přípravu vzorku, avšak autooxidace může vést ke zkresleným výsledkům. Nicméně i v tomto případě může derivatizace podstatně usnadnit separaci či zlepšit citlivost detekce [101, 103].

2.3.2 Separace pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Kapalinová chromatografie (LC) je již několik desetiletí široce využívána ve farmacii, biomedicíně či metabolomice k analýze léčiv, biomarkerů, xenobiotik či eobiotik. Tato separační technika využívá k separaci analytů stacionární a mobilní fáze (MF). Stacionární fáze může být pevná, například tenkovrstvá chromatografie či vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), nebo kapalná (např. papírová chromatografie). V závislosti na principu separace rozlišujeme několik chromatografických metod [116, 117]:

- První je adsorpční chromatografie, která je založená na separaci jednotlivých složek v závislosti na afinitě ke stacionární fázi. Složky s vyšší afinitou ke stacionární fázi budou eluovány déle, naopak složky s nižší afinitou budou eluovány dříve.
- Rozdělovací chromatografie je založena na principu rozdělení složek mezi dvě rozpouštědla. Stacionární fází je kapalina, nemísitelná s MF, která je adsorbována na pevném povrchu.
- Iontově-výměnná chromatografie je založena na nevratné výměně iontů mezi ionty MF a stacionární fáze. Podle náboje iontů se pak označuje jako kationt- či aniont-výměnná chromatografie.
- Gelová permeační chromatografie využívá porézních kuliček, přičemž menší molekuly pronikají hlouběji do pórů a jsou eluovány později oproti větším molekulám, které se tak hluboko do pórů nedostanou. Tato technika se využívá zejména k separaci proteinů či peptidů, neboť separuje látky dle jejich velikosti.
- Afinitní chromatografie využívá protilátek, proteinů či enzymů z biologických matric. Principem jsou velmi specifické vazby enzym-substrát, receptor-ligand či antigen-protilátka. Na koloně se tedy zadrží pouze látka specificky se vázající na stacionární fázi, tuto látku je poté možno eluovat změnou iontové síly či pH.

2.3.2.1 Módy separace

Naprostá většina metod je založena na principu adsorpční chromatografie. Tyto metody můžeme dále dělit dle separačních módů. Prvním je chromatografie na normálních fázích

(NPLC), při tomto módu je stacionární fáze polární a MF nepolární, zvýšením podílu polárního rozpouštědla v MF je polární analyt eluován. Dalším módem je chromatografie na reverzních fázích (RPLC), v tomto módu je využito nepolární stacionární fáze a polární MF, přičemž zvýšením podílu nepolárního rozpouštědla v MF je nepolární analyt eluován. Zvláštním módem je hydrofilní interakční chromatografie (HILIC), která využívá hydrofilní polární fáze jako NPLC, naopak MF jsou vodné roztoky (směs vody či pufru a organického rozpouštědla) podobně jako u RPLC. Mnohé stacionární fáze mají navíc vlastnosti iontoměniče, což může značně zlepšit selektivitu. Retence polárních analytů klesá s rostoucí polaritou MF a také je značně závislá na koncentraci soli v MF a jejím pH [116, 117].

Vysoce polární sloučeniny, jako jsou GSH a GGC, není vhodné separovat na konvenčních reverzních fázích (RP), neboť se na nich téměř nezadržují, nicméně po jejich derivatizaci lze dosáhnout výborné separace a zároveň velmi citlivé detekce, a právě na tomto principu je založena většina metod. Naproti tomu HILIC či iontově-výměnná chromatografie jsou dobrou alternativou, neboť umožňují separovat velmi polární analyty i bez nutnosti jejich derivatizace, navíc vysoký podíl organické fáze v MF usnadňuje desolvatační krok při MS detekci [10]. Většina metod využívá pufrů o kyselém pH, aby se jednak zmírnila autooxidace thiolů a jednak aby GSH nedisocioval, což by mělo zlepšit interakci se stacionární fází. Do MF je možno přidat TFA, která funguje také jako iont-párové činidlo, čímž potlačuje rozmývání píků a zlepšuje rozlišení [101].

2.3.2.2 Konkrétní metody

Jak již bylo zmíněno, vzhledem k polární povaze analytů je vhodné využít separace na HILIC kolonách, například na ZIC-HILIC koloně byly separovány SBD-F deriváty thiolů, včetně GSH a GGC za využití pufru 10 mmol/l HCO_3NH_4 (pH 3,0) a acetonitrilu v MF [118]. V jiné studii bylo na kolonách ZIC-HILIC a Inertsil Amide separováno pět SBD-F derivátů thiolů, včetně GSH, MF se skládala ze 40 mmol/l mravenčanu amonného v acetonitrilu, pH 3,0 [119]. V další studii byly na koloně ZIC-HILIC separovány GSH a GSSG bez derivatizace za využití MF s 1 % HCOOH ve vodě a acetonitrilu [120], reprezentativní chromatogramy však neuvedli. Nederivatizované thioly, včetně GSH a GGC, byly separovány na koloně TSK-Gel Amide 80 za využití obdobného složení MFs rozdílem 0,5 mmol/l mravenčanu amonného ve vodné fázi o pH 4,5 [121]. V poměrně nové studii uvádí separaci GSH a dalších metabolitů na koloně Acquity UPLC BEH HILIC bylo využito k separaci GSH a s ním spojených metabolitů, MF byla složena z roztoků 0,1 % HCOOH ve vodě a acetonitrilu [122], k reálné separaci

na zmíněné koloně však nedošlo, neboť všechny analyty byly eluovány prakticky ve stejný čas, autoři se opírají zejména o specifickou MS/MS detekci.

V další studii byla pro separaci GSH a GSSG derivátů NEM použita Hypercarb kolona a MF o složení 0,1 % HCOOH ve vodě a acetonitrilu [123]. Podobně je možno této separace dosáhnout na koloně Modulo Cart QS Kromasil 5 C18 [98] nebo opět na Hypercarb koloně za využití MF o složení 0,1 % TFA a 5 mmol/l octan amonný ve vodě a 0,1 % TFA v acetonitrilu [124].

Většina metod však využívá reverzních fází, například na koloně Adsorbosil C18 byly separovány deriváty thiolů, MF byla složena z vodného roztoku 0,1 % TFA a acetonitrilu [125]. Kolona Phenomenex Synergi Polar-RP byla využita k separaci GSH od neurotransmiterů, MF obsahovala 1 % HCOOH a 0,5 % heptafluormáslé kyseliny [126]. GSH a GSSG byly separovány také na koloně Synergy Hydro-RP s MF, skládající se z 1 % acetonitrilu a fosfátového pufru 20 mmol/l, upravené na pH 2,7 kyselinou fosforečnou, detekce však byla EC, neboť fosfáty jsou vysoce iontově aktivní a při MS detekci by docházelo k iontové supresi. Stejní autoři separovali stejné analyty také na koloně Luna PFP(2) za využití MF, složené z methanolu a 0,75 mmol/l mravenčanu amonného, upravené na pH 3,5 kyselinou mravenčí, zde již byla možná detekce MS [115].

Separace derivátů thiolů a jejich disulfidů je možná také na koloně Agilent Zorbax Eclipse XDB-C8 (RP) za využití MF, skládající se z pufru 10 mmol/l mravenčanu amonného a acetonitrilu, upravené na pH 4,0 kyselinou mravenčí [127]. GSH a GSSG je možno separovat také na koloně Stability BSC 17 kombinující anionické a reverzní fáze při využití MF skládající se ze směsi octanu amonného 7,5 mmol/l, vody a methanolu [87]. Separace GSH a dalších thiolů bylo dosaženo také na koloně AQ-C18 s MF skládající se z pufru mravenčanu amonného 5 mmol/l a 0,15 % HCOOH ve vodě a 0,15 % HCOOH v acetonitrilu [128].

Separace thiolů na RP využívá mnoho dalších metod, například na kolonách Utisphere C18 [103], Acquity C18 [129], Phenomenex Luna C18 [130], Acquity HSS T3 [131] [132], Chromolith Performance RP-18 [133], BDS HYPERSIL C18 ODS [94] či Atlantis T3 RP [134] [135]. Složení MF při separacích těmito kolonami bylo v naprosté většině 0,1 % HCOOH ve vodě a 0,1 % HCOOH v acetonitrilu. Často se však jednalo o separace derivátů se zaměřením pouze na GSH a GSSG. Podle toho, zda se jedná o derivát, je třeba zvolit vhodný typ detekce.

2.3.2.3 Typy detekce

Detekčními systémy v HPLC mohou být UV absorpance, fluorescenční (FL) detekce, elektrochemická (EC) či hmotnostní (MS) detekce [10]. Kuriozitou je spojení HPLC a atomové fluorescenční spektrometrie studených par využívající derivátu GSH se sloučeninou rtuti [136].

Metody HPLC s UV detekcí využívají derivatizace, neboť samotný GSH či další thioly absorbují UV jen málo nebo vůbec, některé metody kombinují UV detekci pro stanovení derivátu GSH a EC detekci pro stanovení nederivatizovaného GSSG [101, 137, 138]. Novějšími metodami HPLC-UV je možno po derivatizaci sloučeninami CMQT nebo CBNF, stanovit GSH či další thioly s limitem detekce až v řádu desetin $\mu\text{g/ml}$ [106, 107].

Metod HPLC-FL bylo publikováno mnohem více, stejně tak je možno využít mnoho derivatizačních činidel, z nichž nečastější je NEM, který zároveň zabraňuje autooxidaci blokad thiolových skupin, pro derivatizaci GSSG je využíván OPA [88] nebo může být stanoven elektrochemicky, jak již bylo zmíněno výše. Metodami HPLC-FL bylo za využití derivatizace simultánně stanoveno mnoho thiolů, jako jsou GSH, GSSG, homocystein, cystein či NAC, s LOD od $\mu\text{mol/l}$ [139] až po desetiny nmol/l [140]. Isokawa a kol. vyvinuli metodu HPLC-FL pro stanovení pěti thiolů, včetně GSH a GGC po derivatizaci činidlem SBD-F. Dosáhli přesnosti pod 3 % a LOD v rozmezí 0,2-4 nmol/l . Koncentrace GSH a GGC v séru byly 77.5 ± 29.2 a $8.2 \pm 0.9 \mu\text{M}$ [119]. Kono a kol. zavedli metodu HPLC-FL pro stanovení cysteinu, cysteinylglycinu, GSH a GGC v lidském séru. Tato metoda dosahuje vysoké citlivosti (v řádu fmol/l), ale zahrnuje časově náročnou derivatizaci SBD-F a FL detekci. Stanovené koncentrace cysteinu, cysteinylglycinu, GSH a GGC byly 226 ± 4.7 , 23.4 ± 1.3 , 3.7 ± 0.2 a $3.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$, navíc bylo zjištěno, že koncentrace thiolů u mužského pohlaví byly statisticky významně vyšší než u ženského pohlaví [118]. Huang a kol. stanovili GSH v lidské plazmě, po derivatizaci a SPE s grafenovými částicemi, detekce byla FL s limitem až 0,01 nmol/l [82].

Metody HPLC-EC mají výbornou citlivost, a to i bez derivatizace. Amperometrickou detekcí byl například detekován GSH v myším mozku a játrech [141], další metoda využívá coulometrické detekce GSH, GSSG a dalších sloučenin s citlivostí až 15 fmol/l [142]. Pozornost však bude věnována zejména metodám HPLC s hmotnostní detekcí (HPLC-MS).

2.3.3 Detekce pomocí hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je velmi účinnou analytickou technikou, která dosahuje vysokého rozlišení a citlivosti detekce. Vzorek je nejčastěji separován na HPLC a následně putuje do iontového zdroje, kde je převeden na ionty v plynné fázi, které jsou poté v hmotnostním

analyzátoru rozděleny dle jejich poměru hmoty a náboje (m/z), nakonec je signál těchto iontů zesílen a detekován. Výsledkem je hmotnostní spektrum udávající molekulovou hmotnost analytu a informace o chemické struktuře či izotopovém složení [117, 143]. V následujícím textu budou nejprve stručně představeny jednotlivé části této poměrně složité instrumentace, počínaje iontovými zdroji.

2.3.3.1 Iontové zdroje

V iontovém zdroji jsou jednotlivé složky vzorku převedeny na ionty v plynné fázi. Běžnými iontovými zdroji v analýze biologických molekul jsou ionizace elektrosprejem (ESI) či chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI). Tyto iontové zdroje jsou nazývány také jako měkké, neboť jsou relativně šetrné ke struktuře i větších molekul. Dalším měkkým iontovým zdrojem je desorpční ionizace laserem za účasti matrice (MALDI), který však na rozdíl od předchozích dvou pracuje ve vakuu [143, 144].

Zdaleka nejvyužívanějším iontovým zdrojem ve spojení s HPLC je ESI, tato technika produkuje elektrosprej aplikací silného elektrického pole na konec kapiláry a kapalinu, jež touto kapilárou protéká. Vzniklé nabitě kapičky se odpařují, což vede ke zhuštění náboje, až nakonec coulombické odpuzování překoná povrchové napětí a dojde k uvolnění iontů do plynné fáze. Principem APCI je odpaření a zmlžení vzorku za přítomnosti inertního plynu (nejčastěji dusík) a vysokých teplot. Zmlžený vzorek je následně elektrickým výbojem ionizován [145, 146].

MALDI je velmi šetrná ionizační technika, proto se využívá pro analýzu zejména velkých či labilních molekul, jako jsou peptidy, proteiny, polymery a další. Tato technika využívá smíchání vzorku s matricí, která slouží jako rozpouštědlo pro analyt a zároveň absorbuje UV záření přivedené dusíkovým laserem, tato směs je následně vysušena. Při ozáření dochází k desorpci a ionizaci matrice a jejím prostřednictvím také k desorpci a ionizaci analytu [144, 147].

2.3.3.2 Hmotnostní analyzátory

Ionty v plynné fázi z iontového zdroje jsou separovány v hmotnostním analyzátoru dle jejich poměru m/z . Běžnými hmotnostními analyzátory jsou quadrupól lineární (Q), iontová past (IT), analyzátor doby letu (TOF) či magnetický sektorový analyzátor. Méně běžný a výkonnější je orbitrap, nejvýkonnější a také nejnákladnější je pak ioncyklotronová resonance s Fourierovou transformací (FT-ICR). Poměrně časté jsou složené hybridní analyzátory, například trojitý quadrupól (QqQ) či spojení Q a TOF, umožňující tandemovou hmotnostní analýzu (MS/MS) či MS^n . Některé hmotnostní analyzátory, jako je IT či FT-ICR, umožňují MS/MS ze své

podstaty. Tato funkce umožňuje získat velmi cenné informace o struktuře analytu. Hmotnostní analyzátoři i jejich detektory pracují vždy za vysokého vakua [117, 143, 148].

Zdaleka nejběžnějším hmotnostním analyzátořem je lineární Q či QqQ, který pracuje v rozmezí molekulové hmotnosti 10-4000 g/mol, poskytuje dobrou linearitu, rozlišení a přesnost (0,1-0,2 g/mol). Skládá se ze čtyř paralelních kovových tyčí, na které je přivedeno střídavé a stejnosměrné napětí. Ionty jsou separovány na základě jejich stability v elektrickém poli. Samotný Q může pracovat v režimu skenu nebo v režimu SIM (z angl. single ion monitoring). Oproti tomu QqQ nabízí širší možnosti – sken či SIM v prvním Q, fragmentaci iontu v kolizní cele (q) a opětovný sken či SIM v druhém Q [143, 148].

Alternativou je IT, tento analyzátoř se skládá z prstencové elektrody a dvou koncových elektrod. Obdobou je quadrupólová IT, která může pracovat jako IT i jako Q. Mezi těmito elektrodami jsou ionty zachyceny a mohou být dále selektovány změnou střídavého a stejnosměrného napětí. Přidáním plynu do IT je možno docílit fragmentace selektovaných iontů [143, 148]. Zcela odlišnou iontovou pastí, poskytující velmi vysoké rozlišení, je orbitrap skládající se z vnější a středové vřetenové elektrody, mezi těmito elektrodami jsou ionty zachyceny v kruhových orbitách a podobně jako u FT-ICR jsou detekovány na základě frekvencí orbit odpovídajících m/z [117, 149]

Dalším analyzátořem je TOF, který může být spojen s předchozíma dvěma analyzátoři nebo s dalším TOF. Tento analyzátoř separuje ionty na základě rozdílné doby letu, umožňuje analýzu molekul s velmi vysokou hodnotou m/z a v uspořádání s reflektorem poskytuje velmi dobré rozlišení. Jelikož nepracuje kontinuálně, ale pulzně, je kombinován zejména s MALDI [144, 147].

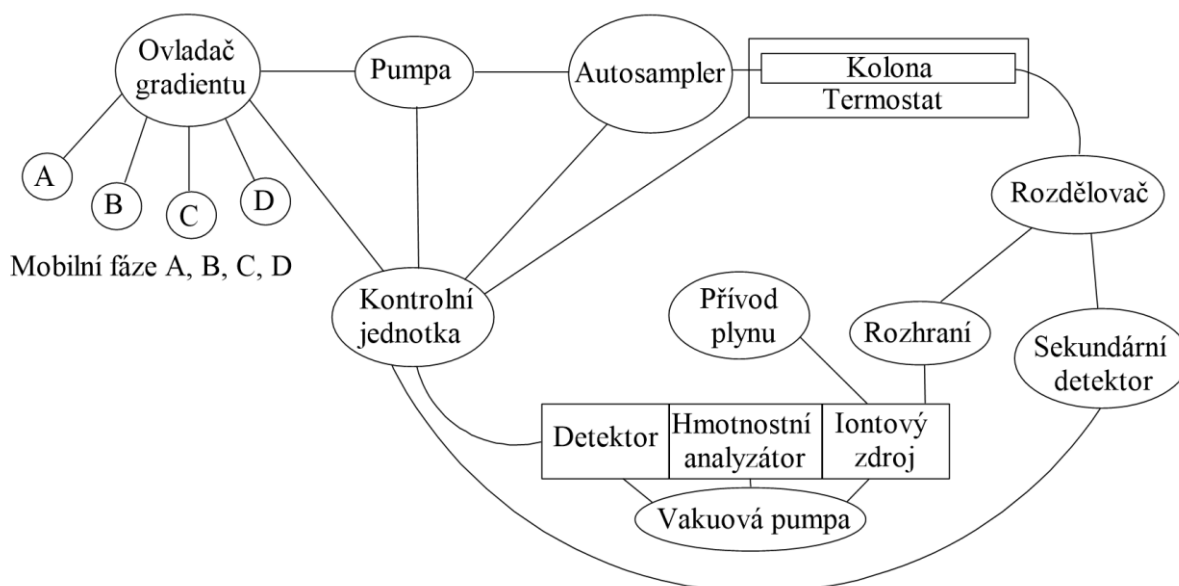
V magnetickém sektorovém analyzátoři jsou ionty akcelerovány a při průchodu magnetickým polem je jejich dráha zakřivena, přičemž ionty s nízkou hodnotou m/z jsou odkloněny více než ionty s vyšší hodnotou m/z. Vylepšenou verzí je magnetický sektorový analyzátoř s dvojitou fokusací, toto uspořádání zahrnuje i elektrostatický sektor, který zakřivuje dráhu iontů v závislosti na jejich kinetické energii [117, 143].

Největší rozlišení, schopnost analyzovat široké rozmezí molekulové hmotnosti a zároveň funkci MS/MS poskytuje FT-ICR, tato technika zachycuje ionty v kruhových orbitách pomocí elektrického a magnetického pole. Aplikací střídavého napětí jsou ionty excitovány, načež v časové závislosti generují proud, který je Fourierovou transformací převeden na orbitální frekvence iontů odpovídající jejich m/z [150, 151].

Separované a selektované ionty z hmotnostního analyzátoru jsou detekovány nejčastěji elektronovými násobiči, které převádí signál dopadajících iontů na elektrony, které jsou dále zesíleny systémem dynod nebo kontinuální zakřivenou dynodou. Fotonásobičové detektory převádí signál dopadajících iontů na fotony, které jsou převedeny na elektrony, které jsou opět zesíleny. Dalším typem detektoru je mikrokanálová deska, která má nejrychlejší odezvu a zároveň velmi vysokou citlivost. Ze starších detektorů je možno zmínit Faradayův pohár, který je málo citlivý, avšak robustní [148].

2.3.4 Metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí

Technika HPLC-MS poskytuje vysokou selektivitu, citlivost a specifitu, která může být ještě zvýšena využitím tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS) měřením fragmentů iontu specifických přímo pro danou molekulu. Dalšími výhodami jsou možnost automatizace a měření vysoce naředěných vzorků, tedy malá spotřeba vzorku [10]. Navíc díky vysoké citlivosti a specifitě MS detekce nevyžaduje derivatizaci. Většina metod HPLC-MS využívá módu RP nebo HILIC a ionizaci elektrosprejem (ESI) při MS či MS/MS detekci [83]. V případě analýz MS/MS probíhá detekce nejčastěji v MRM (z angl. multiple reaction monitoring) módu. Vkládaná napětí na ESI kapiláru jsou nastavena většinou na 5,5 kV a teplota nosného plynu na 600 °C [94, 122, 126]. Obecné schéma HPLC-MS instrumentace je znázorněno na obrázku 8.



Obrázek 8: Schéma HPLC-MS instrumentace

2.3.4.1 Stanovení glutathionu a glutathiondisulfidu

Většina metod je zaměřena pouze na stanovení GSH a GSSG pro monitorování oxidačního stresu, přičemž velký podíl těchto metod zahrnuje derivatizaci. Moore a kol stanovili GSH a GSSG v plné krvi po extrakci a derivatizaci činidlem NEM za využití techniky HPLC-ESI-MS/MS (QqQ) a isotopicky značených standardů. Dosáhli poměrně slušné přesnosti (<5 %) LOD pro GSH a GSSG 0,4 $\mu\text{mol/l}$ a 0,1 $\mu\text{mol/l}$ [123]. Yu a kol. vyvinuli metodu ESI-MS/MS (IT) s velmi vysokou citlivostí, umožňující stanovení GSH v jedné buňce s LOD až 500 amol/l. Využili přitom derivatizace s MBB. Ačkoliv je MBB fluorescenční činidlo, MS detekce tohoto derivátu je nejen mnohonásobně citlivější oproti FL detekci (1-2 pmol/l), ale také poskytuje nesrovnatelně lepší selektivitu a specifitu. Jedná se o nejcitlivější metodu stanovení GSH s MS detekcí [94], vyšší citlivosti dosáhli pouze Zhao a kol. využitím mikročipové kapilární elektroforézy s chemiluminiscenční detekcí (citlivost až 50 zmol/l), nedostatkem této metody oproti výše zmíněné je však nízká selektivita a specifita (interferující thiooly) [152]. Bláhová a kol. vyvinuli HPLC-MS/MS (QqQ) metodu pro stanovení GSH a GSSG v mozku, plicích a játrech s LOD 0,2 nmol/l (0,06 ng/ml) a 10 nmol/l (6 ng/ml). Využili derivatizace DTNB a GSH značený glycinem ($^{13}\text{C}_2$, ^{15}N) jako IS [135]. Podobně Lee a kol. validovali metodu pro stanovení NEM derivátů GSH a GSSG pomocí HPLC-MS/MS (QTOF) [124]. Sun a kol. vyvinuli metodu pro stanovení GSH a GSSG kombinující detekci UV (pro derivát GSH-NEM) a MS/MS detekci nederivatizovaného GSSG, jako důvod uvádějí nedostatečné lineární dynamické rozpětí MS/MS (QTOF) pro simultánní detekci. Uvádějí LOD UV detekce (210 nm) 7,81 $\mu\text{mol/l}$ derivátu GSH-NEM a 0,001 $\mu\text{mol/l}$ GSSG při MS/MS detekci [134].

Pouze několik málo metod derivatizace nevyužívá, například Haberhauer-Troyer a kol. po separaci na ZIC-HILIC stanovili pomocí MS/MS (IT) GSH a GSSG v *Pichia pastoris* bez využití derivatizace, avšak s poměrně velkou nepřesností (až 30 %), nicméně představili také syntézu isotopicky značeného GSSG z komerčně dostupného isotopicky značeného GSH a jejich využití k monitorování oxidace GSH v průběhu extrakce [120]. Squellerio a kol. vyvinuli poměrně spolehlivou a přesnou metodu HPLC-ESI-MS/MS (QqQ) pro stanovení GSH a GSSG v plné krvi bez nutnosti derivatizace se spodním limitem kvantifikace (LLOQ) 0,5 $\mu\text{mol/l}$ (GSH) a 0,625 $\mu\text{mol/l}$ (GSSG), tato metoda dosahuje podobných výsledků jako HPLC-ECD, nicméně ECD má oproti nákladné MS technice kratší životnost a nižší specifitu detekce [115]. Výborné citlivosti využitím HPLC-ESI-MS/MS (IT) dosáhli Robin a kol. po postkolonové reakci GSH a GSSG s AgNO_3 (až $5\times$ vyšší citlivost), LLOQ byl pro GSH 0,4 ng/ml a pro GSSG 0,5 ng/ml, přesnost a správnost byla menší než 10 % [98].

Techniky ultravysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC) s detekcí ESI-MS bylo využito ke kvantitativní metabolomice zahrnující stanovení GSH [153] a k metabolickému profilování zvířecích či lidských tkání [154]. Gil a kol. vyvinuli HPLC-MS/MS metodu pro stanovení GSH a jeho metabolitů v tkáních srdce, ledvin, jater, plazmě a lidské moči myši s infarktem myokardu [132]. Některé MS metody v metabolomických studiích využívají také ředění stabilním izotopem, například orální suplementací $^2\text{H}_2\text{O}$ je možno zavést ^2H do C-H vazeb GSH [129]. Ředění stabilním izotopem využili také Roland Schneider v jejich HPLC-MS/MS (QqQ) metodě pro stanovení GSH v grepech, mošttech a vínech s LOD 45 $\mu\text{g/l}$, využili přitom derivatizace NEM a separace na HPLC čipu [155].

Poměrně zajímavou metodu vyvinuli Shrivasa a kol., využili techniky SALDI-MS (z angl. surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry) a AP-MALDI-MS (z angl. atmospheric pressure-matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry) k přesnému stanovení GSH, cysteinu a homocysteinu v moči po jejich adsorpci na holé stříbrné nanočástice. LOD této metody bylo v rozmezí 7-22 nmol/l, výhodami této metody jsou zejména rychlost, jednoduchost a citlivost, navíc stříbrné nanočástice mohou být přímo použity jako matrice v MALDI-MS [99]. Techniku MALDI-MS využili také Agrawal a kol ke stanovení GSH a homocysteinu v plazmě a moči po reverzní micelární mikroextrakci [100].

2.3.4.2 Simultánní stanovení koncentrace glutathionu a dalších thiolů

Za různými účely bylo vyvinuto také mnoho metod pro simultánní stanovení GSH, jeho metabolitů či jiných thiolů. Tyto metody opět často využívají derivatizace, například Huang a kol. pomocí HPLC-ESI-MS/MS (IT) stanovili deriváty cysteinu, homocysteinu, NAC a GSH s LOD v řádu jednotek nmol/l, využili přitom isotopického páru derivatizačních činidel [156]. Guan a kol. stanovili thioly a jejich disulfidy pomocí HPLC-MS po reakci s Ellmannovým činidlem v mnoha různých biologických matricích. LOD jejich metody se pohybuje v rozmezí jednotek až desítek pmol/l [125]. Seiwert a kol. pomocí LC-MS/MS (IT) a za využití derivatizace stanovili thioly, jako je cystein, NAC, homocystein, cysteinylglycin a GSH v moči s LOD od 30 do 110 nmol/l [127]. Bouligand a kol. pomocí HPLC-MS/MS stanovili karboxymethyl-deriváty GSH, GSSG, GGC, cysteinyl glycin, cystein, homocystein, cystin a homocystin s dostatečnou citlivostí, LLOQ 100 ng/ml [103].

Několik málo metod však derivatizace z principu nevyužívá. Lafaye a kol. stanovili pomocí HPLC-ESI-MS/MS cystein, homocystein, methionin, S-adenosylhomocystein, GGC, GSH a GSSG v *Saccharomyces cerevisiae*, přičemž využili metabolického značení izotopem

¹⁵N, LOD byl v rozmezí 5-25 ng/ml [121]. Jiang a kol. zavedli HPLC-ESI-MS/MS (QqQ) metodu pro přímé simultánní stanovení mnoha thiolů, jako jsou cystein, homocystein, S-adenosylmethionin, S-adenosylhomocystein, cystathionin, methionin, cysteinylglycin a GSH bez derivatizace, LOD v řádu desetin až jednotek ng/ml [128]. Herzog a kol. vyvinuli UHPLC-ESI-MS/MS metodu pro stanovení GSH jako markeru oxidačního stresu v kultivovaných buňkách (primární fibroblasty a *Saccharomyces Cerevisiae*) s LOD v řádu desetin nmol/l [131]. Eckstein a kol. zavedli metodu HPLC-ESI-MS/MS pro stanovení GSH, glutamátu, pyroglutamátu a gama-aminomáselné kyseliny v mozkomíšním moku za účelem monitorování neurotransmiterů, uvádějí LOD 7,8 ng/ml pro všechny analyty [126]. Rellán-Alvaréz a kol. vyvinuli HPLC-ESI-MS (TOF) metodu pro přímé stanovení GSH v pletivech rostlin s LOD 60 pmol/l [133]. Zhang a kol. představili metodu UHPLC-MS/MS (QqQ) pro simultánní stanovení GSH, GSSG, glycinu, cysteinu, glutaminu, glutamátu, cystinu, GGC a cysteinylglycinu, využili při tom izotopicky značené 2,3,3,4,4-d₅ glutamové kyseliny. Uvádějí LLOQ v rozmezí 0,5-100 ng/ml a LOD 0,14-10,07 ng/ml, přesnost a správnost pod 15 % a poměrně krátký čas stanovení (8 min). Tuto metodu následně aplikovali pro monitorování metabolismu GSH v nádorových buňkách plic [122]. Navzdory spojení s UHPLC však jednotlivé analyty prakticky nebyly separovány, metoda spoléhá zejména na vysokou specifitu MS/MS detekce.

2.3.4.3 Trendy v instrumentaci

Analýzou GSH či jeho metabolitů je možno monitorovat oxidační stres a patofyziologické změny metabolismu GSH či endogenních antioxidantů. HPLC je spolehlivá technika, avšak velikost a hmotnost této instrumentace omezuje portabilitu, její využití je tedy limitováno na prostory laboratoře. Tento problém by mohla vyřešit miniaturizace zařízení, což by umožnilo real-time analýzu vzorků, zkrátit čas analýzy, snížit objem vzorku a také spotřebu organických rozpouštědel. Cílem je vyvinout přenosnou, mikrofluidní „lab-on-a-chip“ technologii. Ačkoliv je známo již několik prototypů takových zařízení, výzkum v této oblasti stále probíhá [157-159].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie a pomůcky

3.1.1 Chemikálie

- demineralizovaná voda
- methanol LC-MS čistoty (Sigma-Aldrich s.r.o., St. Louis, Missouri, USA)
- acetonitril LC-MS čistoty (Sigma-Aldrich s.r.o. St., Louis, Missouri, USA)
- kyselina octová LC-MS čistoty (Sigma-Aldrich s.r.o., St. Louis, Missouri, USA)
- octan amonný LC-MS čistoty (Sigma-Aldrich s.r.o., St. Louis, Missouri, USA)
- kyselina mravenčí LC-MS čistoty (Honeywell, Charlotte, Severní Karolína, USA)
- mravenčan amonný LC-MS čistoty (Sigma-Aldrich s.r.o., St. Louis, Missouri, USA)
- hydrogenuhličitan amonný (Honeywell, Charlotte, Severní Karolína, USA)
- kyselina trifluoroctová (Supelco Inc., Bellefonte, USA)
- kyselina difluoroctová (Sigma-Aldrich s.r.o., St. Louis, Missouri, USA)
- thiomčovina, čistota ≥ 99 % (Sigma-Aldrich s.r.o., St. Louis, Missouri, USA)
- acenaften, čistota 99 % (Sigma-Aldrich s.r.o., St. Louis, Missouri, USA)
- L-glutathion redukovaný, čistota ≥ 98 % (Sigma-Aldrich s.r.o., St. Louis, Missouri, USA)
- L-glutathiondisulfid, čistota ≥ 98 % (Sigma-Aldrich s.r.o., St. Louis, Missouri, USA)
- γ -L-glutamyl-L-cystein, čistota ≥ 80 % (Sigma-Aldrich s.r.o., St. Louis, Missouri, USA)
- L-cystein, čistota ≥ 98 % (Sigma-Aldrich s.r.o., St. Louis, Missouri, USA)
- L-cystin, čistota ≥ 98 % (Sigma-Aldrich s.r.o., St. Louis, Missouri, USA)
- glycin, čistota ≥ 99 % (Sigma-Aldrich s.r.o., St. Louis, Missouri, USA)
- kyselina L-glutamová, čistota ≥ 98 % (Sigma-Aldrich s.r.o., St. Louis, Missouri, USA)

3.1.2 Drobné laboratorní přístroje

- analytické váhy (Sartorius AG, Göttingen, Německo)
- vortex (BioTech a.s., Praha, Česká republika)
- ultrazvuková lázeň (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

3.2 Příprava roztoků

3.2.1 Příprava zásobních roztoků standardů

Bylo naváženo 10 mg GSH, GGC, GSSG, cysteinu a glycinu, jednotlivé navážky byly rozpuštěny v 1 ml demineralizované vody, výsledné roztoky standardů o koncentraci 10 mg/ml byly řádně promíchány.

Kyselina glutamová a cystin se v takovém množství ve vodě nerozpouští, u obou látek je uváděna dobrá rozpustnost v 1M HCl. Při použití HCl by však pravděpodobně docházelo k iontové supresi v MS, proto příprava těchto standardů probíhala jinak. Bylo naváženo 10 mg kyseliny glutamové a přidán 1 ml vodného roztoku 10 mmol/l NH_3HCO_3 , dále k navážce 10 mg cysteinu bylo přidáno 0,9 ml demineralizované vody a 0,1 ml TFA. Po řádném promíchání a ultrazvukové lázni byly tyto standardy rozpuštěny, výsledná koncentrace obou standardů byla 10 mg/ml.

3.2.2 Příprava pracovní směsi standardů

Z každého zásobního roztoku GSH, GGC, GSSG, cysteinu, glycinu, cystinu a kyseliny glutamové bylo odebráno 100 μl , směs byla doplněna demineralizovanou vodou na 1 ml a řádně promíchána. Takto byl připraven směsný standard o koncentraci 1 mg/ml.

Z namíchaného pracovního roztoku bylo dále odebráno 100 μl a doplněno acetonitrem na objem 1 ml. Takto naředěný roztok o výsledné koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ byl řádně promíchán.

3.2.3 Příprava roztoků thiomocoviny a acenaftenu

Navážka 1 mg thiomocoviny byla rozpuštěna v 1 ml demineralizované vody, dále navážka 1 mg acenaftenu byla rozpuštěna v 1 ml acetonitrilu, oba roztoky byly řádně promíchány.

Z výše namíchaných roztoků bylo dále odebráno 100 μl a doplněno příslušným rozpouštědlem na objem 1 ml. Takto naředěný roztok o výsledné koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ byl řádně promíchán.

3.2.4 Příprava mobilních fází

- Příprava vodného roztoku 0,1% HCOOH
K 0,5 l demineralizované vody bylo přidáno 0,5 ml HCOOH a promícháno.
- Příprava vodného roztoku 0,2% HCOOH
K 0,5 l demineralizované vody bylo přidáno 1 ml HCOOH a promícháno.
- Příprava vodného roztoku 0,3% HCOOH
K 0,5 l demineralizované vody bylo přidáno 1,5 ml HCOOH a promícháno.
- Příprava roztoku 0,1% HCOOH v acetonitrilu

- K 0,5 l acetonitrilu bylo přidáno 0,5 ml HCOOH a promícháno.
- Příprava roztoku 0,2% HCOOH v acetonitrilu
K 0,5 l acetonitrilu bylo přidáno 1 ml HCOOH a promícháno.
 - Příprava roztoku 0,3% HCOOH v acetonitrilu
K 0,5 l acetonitrilu bylo přidáno 1,5 ml HCOOH a promícháno.
 - Příprava vodného roztoku 0,1% CH₃COOH
K 0,5 l demineralizované vody bylo přidáno 0,5 ml CH₃COOH a promícháno.
 - Příprava vodného roztoku 0,2% CH₃COOH
K 0,5 l demineralizované vody bylo přidáno 1 ml CH₃COOH a promícháno.
 - Příprava vodného roztoku 0,3% CH₃COOH
K 0,5 l demineralizované vody bylo přidáno 1,5 ml CH₃COOH a promícháno.
 - Příprava roztoku 0,1% CH₃COOH v acetonitrilu
K 0,5 l acetonitrilu bylo přidáno 0,5 ml CH₃COOH a promícháno.
 - Příprava roztoku 0,2% CH₃COOH v acetonitrilu
K 0,5 l acetonitrilu bylo přidáno 1 ml CH₃COOH a promícháno.
 - Příprava roztoku 0,3% CH₃COOH v acetonitrilu
K 0,5 l acetonitrilu bylo přidáno 1,5 ml CH₃COOH a promícháno.
 - Příprava pufru 0,1% HCOOH a 5 mmol/l HCOONH₄
Navážka asi 157,7 mg byla rozpuštěna v 0,1% roztoku HCOOH a výsledný roztok řádně promíchán.
 - Příprava pufru 0,1% HCOOH a 10 mmol/l HCOONH₄
Navážka asi 315,3 mg byla rozpuštěna v 0,1% roztoku HCOOH a výsledný roztok řádně promíchán.
 - Příprava pufru 0,2% HCOOH a 5 mmol/l HCOONH₄
Navážka asi 157,7 mg byla rozpuštěna v 0,2% roztoku HCOOH a výsledný roztok řádně promíchán.
 - Příprava pufru 0,1% CH₃COOH a 5 mmol/l CH₃COONH₄
Navážka asi 192,7 mg byla rozpuštěna v 0,1% roztoku CH₃COOH a výsledný roztok řádně promíchán.
 - Příprava vodného roztoku 5 mmol/l NH₄HCO₃
Navážka asi 197,7 mg NH₄HCO₃ byla rozpuštěna v demineralizované vodě a výsledný roztok řádně promíchán.

- Příprava vodného roztoku 10 mmol/l NH_4HCO_3
Navážka asi 395,3 mg NH_4HCO_3 byla rozpuštěna v demineralizované vodě a výsledný roztok řádně promíchán.
- Příprava vodného roztoku 20 mmol/l NH_4HCO_3
Navážka asi 790,6 mg NH_4HCO_3 byla rozpuštěna v demineralizované vodě a výsledný roztok řádně promíchán.
- Příprava vodného roztoku 0,05% TFA
K 0,5 l demineralizované vody bylo přidáno 0,25 ml TFA a řádně promícháno.
- Příprava roztoku 0,05% TFA v acetonitrilu
K 0,5 l acetonitrilu bylo přidáno 0,25 ml TFA a řádně promícháno.
- Příprava vodného roztoku 0,1% DFA
K 0,5 l demineralizované vody bylo přidáno 0,5 ml TFA a řádně promícháno.
- Příprava roztoku 0,1% DFA v acetonitrilu
K 0,5 l acetonitrilu bylo přidáno 0,5 ml DFA a řádně promícháno.
- Příprava roztoku s 60 % vody, 40 % acetonitrilu a 2,5 mmol/l NH_4HCO_3
Navážka asi 197,7 mg NH_4HCO_3 byla rozpuštěna ve směsi 600 ml demineralizované vody a 400 ml acetonitrilu, výsledný roztok byl řádně promíchán.
- Příprava roztoku s 10 % vody, 90 % acetonitrilu a 2,5 mmol/l NH_4HCO_3
Navážka asi 197,7 mg NH_4HCO_3 byla rozpuštěna ve směsi 100 ml demineralizované vody a 900 ml acetonitrilu, výsledný roztok byl řádně promíchán.
- Příprava roztoku s 5 % vody, 95 % acetonitrilu a 5 mmol/l NH_4HCO_3
Navážka asi 197,7 mg NH_4HCO_3 byla rozpuštěna ve směsi 25 ml demineralizované vody a 475 ml acetonitrilu, výsledný roztok byl řádně promíchán.

3.3 Sestava HPLC-MS

Všechny experimenty byly provedeny na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu Agilent 1260 infinity II s kvartérní vysokotlakou pumpou, autosamplerem, integrovaným termostatem kolony a UV detektorem s diodovým polem. Kapalinový chromatograf byl spojen s iQ/MSD detektorem operujícím v ESI módu. Řídící software byl OpenLab CDS 2,5 (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornie, USA).

3.4 Podmínky MS detekce

Detekce pozitivně nabitých iontů probíhala z 50 % módu skenu (rozmezí m/z bylo 50-700) a z 50 % v módu SIM (z angl. single ion monitoring), akviziční frekvence byla 5 Hz.

Monitorovány byly pozitivně nabitě ionty o m/z 251 ± 1 pro GGC; 308 ± 1 pro GSH; 122 ± 1 pro cystein; 76 ± 1 pro glycin; 148 ± 1 pro kyselinu glutamovou; 241 ± 1 pro cystin; 613 ± 1 pro GSSG. Další parametry byly nastaveny automaticky: čas cyklu 201 ms; napětí fragmentoru 90-120 V; teplota plynu 325 °C; průtok plynu 11 l/min; tlak v nebulizéru 50 PSI; vkládané napětí na kapiláru 3,5 kV.

3.5 Optimalizace separace

Za účelem nalezení optimální retence a separace GGC, GSH a následně také Cys, Gly, Glu, cystinu a GSSG bylo otestováno mnoho stacionárních fází (kolon) a mnoho směsí MF s různými aditivy. Jednalo se zejména o separace v módu HILIC. Pro každou kolonu či směs MF byla testována řada isokratických separací, přičemž byl sledován vliv změny podílu polární složky MF na retenci a separaci analytu. Měřeno bylo rozmezí většinou 2-20 % vodné složky, respektive rozsah, ve kterém dochází k signifikantní změně retence analytu. Po nalezení vhodných kolon a mobilních fází následovalo testování gradientových analýz za účelem zvýšení účinnosti separace a zároveň citlivosti detekce. Pro zjištění mrtvého retenčního času byl využit acenaften (pro separace v HILIC módu) či thiomocovina (pro RP). Nastříkovaný objem vzorku byl 5 μ l, teplota kolony 30 °C a průtok 0,4 ml/min.

3.5.1 Testované kolony

- Kinetex C18, 150 \times 3,0 mm, 2,6 μ m (Phenomenex, Torrance, Kalifornie, USA)
- Kinetex Polar C18, 150 \times 3,0 mm, 2,6 μ m (Phenomenex, Torrance, USA)
- Ascentis Hilic, 150 \times 3,0 mm, 2,7 μ m (Supelco, Bellefonte, USA)
- Separon SGX, 150 \times 3,0 mm, 5 μ m (Tessek Ltd., Praha, Česká republika)
- SUPELCOSIL LC-SI, 150 \times 3,0, 5 μ m (Supelco, Bellefonte, USA)
- Chrommolith Performance Si, 100 \times 4,6 mm (Merck, Darmstadt, Německo)
- Ascentis Express RP-Amide, 150 \times 3,0 mm, 2,7 μ m (Supelco, Bellefonte, USA)
- Waters XBridge HILIC 100 \times 3,0 mm, 5 μ m (Waters, Milford, USA)
- Atlantis HILIC Silica, 100 \times 3,0 mm, 5 μ m (Waters, Milford, USA)
- Chrommolith Performance Si, 100 \times 4,6 mm (Merck, Darmstadt, Německo)
- ZIC-HILIC, 150 \times 2,1 mm, 3 μ m (Merck, Darmstadt, Německo)

3.5.2 Testované směsi mobilní fáze

- Voda + methanol
- Voda + acetonitril
- 0,1% HCOOH ve vodě + methanol

- 0,1% HCOOH ve vodě + acetonitril
- 0,1% CH₃COOH ve vodě + acetonitril
- 0,1% HCOOH ve vodě a acetonitrilu
- 0,2% HCOOH ve vodě a acetonitrilu
- 0,3% HCOOH ve vodě a acetonitrilu
- 0,1% CH₃COOH ve vodě a acetonitrilu
- 0,2% CH₃COOH ve vodě a acetonitrilu
- 0,3% CH₃COOH ve vodě a acetonitrilu
- 5 mmol/l CH₃COONH₄ ve vodě + 0,1% CH₃COOH ve vodě a acetonitrilu
- 5 mmol/l HCOONH₄ ve vodě + 0,1% HCOOH ve vodě a acetonitrilu
- 5 mmol/l HCOONH₄ ve vodě + 0,2% HCOOH ve vodě a acetonitrilu
- 5 mmol/l NH₄HCO₃ ve vodě + acetonitril
- 5 mmol/l NH₄HCO₃ ve vodě + 0,1% HCOOH v acetonitrilu
- 5 mmol/l NH₄HCO₃ ve vodě + 0,2% HCOOH v acetonitrilu
- 10 mmol/l NH₄HCO₃ ve vodě + acetonitril
- 10 mmol/l NH₄HCO₃ ve vodě + 0,2% HCOOH v acetonitrilu
- 10 mmol/l NH₄HCO₃ ve vodě + roztok s 5 mmol/l NH₄HCO₃ a 5 % vody v acetonitrilu
- 20 mmol/l NH₄HCO₃ ve vodě + acetonitril
- 0,05% TFA ve vodě a acetonitrilu
- 0,1% DFA ve vodě a acetonitrilu
- Roztok s 60 % vody, 40 % acetonitrilu a 2,5 mmol/l NH₄HCO₃ + roztok s 10 % vody, 90 % acetonitrilu a 2,5 mmol/l NH₄HCO₃
- 10 mmol/l NH₄HCO₃ ve vodě + roztok s 5 mmol/l NH₄HCO₃ 95 % acetonitrilu a 5 % vody

3.6 Zpracování naměřených dat

Experimentálně získaná data byla náležitě zpracována. Pro každou kolonu a MF byl změřen mrtvý čas kolony a retenční čas jednotlivých analytů. Z těchto hodnot byly vypočítány retenční faktory k pro každou isokratickou analýzu dle vzorce

$$k = \frac{(t_R - t_M)}{t_M}, \quad (1)$$

kde t_M je mrtvý čas a t_R je retenční čas analytu.

Vypočtené retenční faktory a procentuální koncentrace vodné fáze v MF byly dále zlogaritmovány a z výsledných hodnot byl sestaven graf zvlášť pro každou kolonu a MF. Z těchto grafů je patrná lineární závislost, kterou znázorňuje obecná rovnice

$$\log k = a - m \cdot \log (\varphi), \quad (2)$$

kde k je retenční faktor, φ je procentuální koncentrace vodné fáze v MF, a je úsek a m je směrnice.

Dále byly vypočítány retenční poměry (separační faktory) r_{ij} dle vzorce

$$r_{i,j} = \frac{k_j}{k_i}, \quad (3)$$

kde k_j je retenční faktor látky eluující později a k_i je retenční faktor látky eluující dříve.

Vypočtena byla také účinnost kolony (počet teoretických pater) n dle vzorce

$$n = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w} \right)^2, \quad (4)$$

kde t_r je retenční čas a w je šířka píku při základně.

Následně bylo vypočteno také rozlišení jednotlivých isokratických analýz R_s dle vztahu

$$R_s = \frac{\sqrt{n}}{4} \left(\frac{r_{i,j} - 1}{r_{i,j}} \right) \left(\frac{k_j}{k_j + 1} \right), \quad (5)$$

kde n je účinnost kolony, r_{ij} je retenční poměr (separační faktor) a k_j je retenční faktor látky eluující později.

Poté byly sestaveny okénkové diagramy znázorňující závislost R_s na φ .

4. VÝSLEDKY

4.1 Testování kolon a mobilních fází

Jak již bylo zmíněno, pro optimální separaci velmi polárních molekul, jako je GGC a GSH, je třeba zvolit jednak vhodnou kolonu a jednak vhodnou MF. V následujících odstavcích budou shrnuty výsledky měření na jednotlivých testovaných kolonách v závislosti na testovaných MF.

Nejprve byla testována retence na konvenčních RP. Na koloně Kinetex C18, 150 × 3,0 mm, 2,6 μm (Phenomenex, Torrance, USA) se však GGC a GSH vzhledem k vysoké polaritě téměř nezadržovaly, MF byla složena z vody a čistého methanolu. Přidáním 0,1 % HCOOH do vodné fáze došlo ke zlepšení retence, která byla však i tak velmi nízká. Měřena byla isokratická řada s obsahem methanolu v MF v rozsahu 50-1 %. V celém testovaném rozmezí isokratických analýz retenční faktory GGC ani GSH nepřekročily hodnotu 1.

Na koloně Kinetex Polar C18, 150 × 3,0 mm, 2,6 μm (Phenomenex, Torrance, USA) nebyl pro GGC ani GSH zaznamenán žádný pík. MF byla složena z vodného roztoku 0,1 % HCOOH a čistého acetonitrilu. Měřena byla isokratická řada s obsahem vodné fáze v MF v rozsahu 20-1 %.

Na koloně Ascentis Hilic, 150 × 3,0 mm, 2,7 μm (Supelco, Bellefonte, USA) byla retence při stejném složení MF (vodný roztok 0,1 % HCOOH a acetonitril) vysoká, ale píky byly velmi rozmyté. Měřena byla opět isokratická řada s obsahem vodné fáze v MF v rozsahu 20-1 %.

Dále byla testována monolitová kolona Chromolith Performance Si, 100 × 4,6 mm (Merck, Darmstadt, Německo). Při použití stejné MF jako na předchozí koloně byla retence vysoká a píky rozmyté, proto byly testovány další MF (vodné roztoky 0,1-0,3 % HCOOH či CH₃COOH a čistý acetonitril). Uvedené MF nevedly ke zlepšení retence ani tvaru píků. Uspokojivé retence a tvaru píků bylo dosaženo přidáním HCOOH do acetonitrilu, tedy při složení MF 0,1 % HCOOH ve vodě i acetonitrilu, k separaci GGC a GSH však nedošlo. Měřena byla isokratická řada s obsahem vodné fáze v MF v rozsahu 20-2 %.

Stejná MF byla testována také na koloně Separon SGX, 150 × 3,0 mm, 5 μm (Tessek Ltd., Praha, Česká republika). Na této koloně nebyl zaznamenán žádný pík. Ke zlepšení nevedlo ani použití CH₃COOH místo HCOOH. Vysoce polární látky, jako je GGC či GSH by se mohly zdržovat v injektovaném objemu vody, proto bylo otestováno také snížení dávkovaného objemu z 5 μl na 1 a 0,1 μl, čímž by se mohla zlepšit distribuce analytu v MF, ke zlepšení však nedošlo. Měřena byla opět isokratická řada s obsahem vodné fáze v MF v rozsahu 20-2 %.

Mobilní fáze složená z 0,1 % HCOOH ve vodě a acetonitrilu byla otestována také na několika dalších potenciálně vhodných kolonách: SUPELCOSIL LC-SI, 150 × 3,0, 5 μm (Supelco, Bellefonte, USA), Ascentis Express RP-Amide, 150 × 3,0 mm, 2,7 μm (Supelco, Bellefonte, USA), Waters XBridge HILIC 100 × 3,0 mm, 5 μm (Waters, Milford, USA), Atlantis HILIC Silica, 100 × 3,0 mm, 5 μm (Waters, Milford, USA). Měřena byla isokratická řada s obsahem vodné fáze v MF v rozsahu 20-10 % a pro kolonu SUPELCOSIL LC-SI v rozsahu 50-20 % vodné fáze v MF. Na kolonách SUPELCOSIL LC-SI a Atlantis HILIC Silica byla retence GGC i GSH vysoká, ale bez separace těchto molekul. Na koloně Waters XBridge HILIC byl zaznamenán největší rozdíl v retenci GGC a GSH, k úplné separaci však také nedošlo. Na koloně Ascentis Express RP-Amide nebyl zaznamenán žádný pík.

Na kolonách Ascentis Express RP-Amide, Atlantis HILIC Silica, Waters XBridge HILIC a Chrommolith Performance Si byly testovány MF skládající se z 5, 10 a 20 mmol/l NH₄HCO₃ ve vodě a čistého acetonitrilu. Měřena byla opět isokratická řada s obsahem vodné fáze v MF v rozsahu 20-10 %. Na kolonách Chrommolith Performance Si a Waters XBridge HILIC bylo dosaženo dobré retence a výrazně lepší selektivity GGC a GSH, přičemž retence se zvyšuje s vyšší koncentrací NH₄HCO₃ ve vodné fázi (viz. obrázek 26 v přílohách), s rostoucí koncentrací MF však také dochází k iontové supresi při nižším podílu vodné fáze. Problémem však byly široké rozmyté píky. Na koloně Atlantis HILIC Silica při koncentraci 5 mmol/l NH₄HCO₃ byly při několika analýzách zaznamenány píky téměř bez retence, pro další testované MF nebyl zaznamenán žádný pík. Na koloně Ascentis Express RP-Amide nebyl zaznamenán žádný pík v celém rozmezí testovaných MF. Na této koloně a také na koloně SUPELCOSIL LC-SI byla otestována také MF skládající se vodného roztoku 5 mmol/l CH₃COONH₄ a 0,1 % CH₃COOH ve vodě a acetonitrilu, avšak ani pro tuto MF nebyl zaznamenán žádný pík ani u jedné z testovaných kolon. Testována byla také MF s 5 mmol/l HCOONH₄ a 0,1 % HCOOH, při které byl na koloně Ascentis Express RP-Amide již zaznamenán signál, ale GGC a GSH se neseperoaly.

Testována byla také kolona ZIC-HILIC, 150 × 2,1 mm, 3 μm (Merck, Darmstadt, Německo) a MF s 0,05 % TFA ve vodě i acetonitrilu, měřena byla isokratická řada s obsahem vodné fáze v rozsahu 20-2 %. Bylo dosaženo velmi dobré retence a selektivity, avšak docházelo k rozmývání píků nebo až ke tvorbě dvou píků pro jednu molekulu, což mohlo být způsobeno částečným zadržením GGC či GSH v injektovaném objemu vody, neboť oba analyty jsou velmi polární a byly rozpuštěny ve vodě, v samotném acetonitrilu nebyly rozpustné. Bylo však otestováno rozpuštění obou analytů ve směsi acetonitrilu a vody v poměrech 1:1 a 9:1 (v/v).

Po rozpuštění standardů v poměru 1:1, acetonitril/voda, (v/v) došlo ke zlepšení, ale píky byly stále rozmyté, avšak po rozpuštění standardů v poměru 9:1, acetonitril/voda, (v/v) došlo ke značnému zlepšení tvaru píků a tím i separace zmíněných polárních analytů, jako je GGC a GSH. Dále byly testovány už jen standardy rozpuštěné v poměru 9:1, acetonitril/voda, (v/v).

Zmíněná MF s 0,05 % TFA ve vodě i acetonitrilu byla otestována také na kolonách Ascentis Express RP-Amide, Atlantis HILIC Silica, Waters XBridge HILIC, Chrommolith Performance Si a SUPELCOSIL LC-SI, na těchto kolonách však zdaleka nebylo dosaženo tak dobrých výsledků. Retence GGC i GSH byla nízká, na koloně Ascentis Express RP-Amide byly tyto analyty eluovány s mrtvým retenčním časem. Pouze na koloně Waters XBridge HILIC byla retence přijatelná, avšak až při velmi nízkém podílu vodné fáze.

Na koloně Chrommolith Performance Si byla testována také MF skládající se z vodného roztoku 5 mmol/l HCOONH_4 a 0,1 % HCOOH ve vodě i acetonitrilu, měřena byla isokratická řada s obsahem vodné fáze v MF v rozsahu 20-2 %. Bylo dosaženo dobré retence, ale bez separace, proto byla otestována MF skládající se z vodného roztoku 5 mmol/l HCOONH_4 a 0,2 % HCOOH ve vodě i acetonitrilu. Při tomto složení MF byla retence vyšší a již docházelo k separaci GGC a GSH, avšak při nižším podílu vodné fáze docházelo k iontové supresi. Stejná MF byla otestována také na kolonách Ascentis Express RP-Amide, Atlantis HILIC Silica, Waters XBridge HILIC, ZIC-HILIC a SUPELCOSIL LC-SI, přičemž nejlepších separací bylo dosaženo na kolonách Chrommolith Performance Si a ZIC-HILIC. Na koloně Atlantis HILIC Silica bylo dosaženo nejvyšší retence, na koloně Ascentis Express RP-Amide byly GGC a GSH eluovány s mrtvým objemem. Na všech kolonách docházelo při nižším podílu vodné fáze k iontové supresi. Na koloně Chrommolith Performance Si byla testována také MF s 10 mmol/l NH_4HCO_3 ve vodě a 0,2 % HCOOH v acetonitrilu, při které byla zaznamenána dobrá retence GGC a GSH a zároveň docházelo i k jejich separaci.

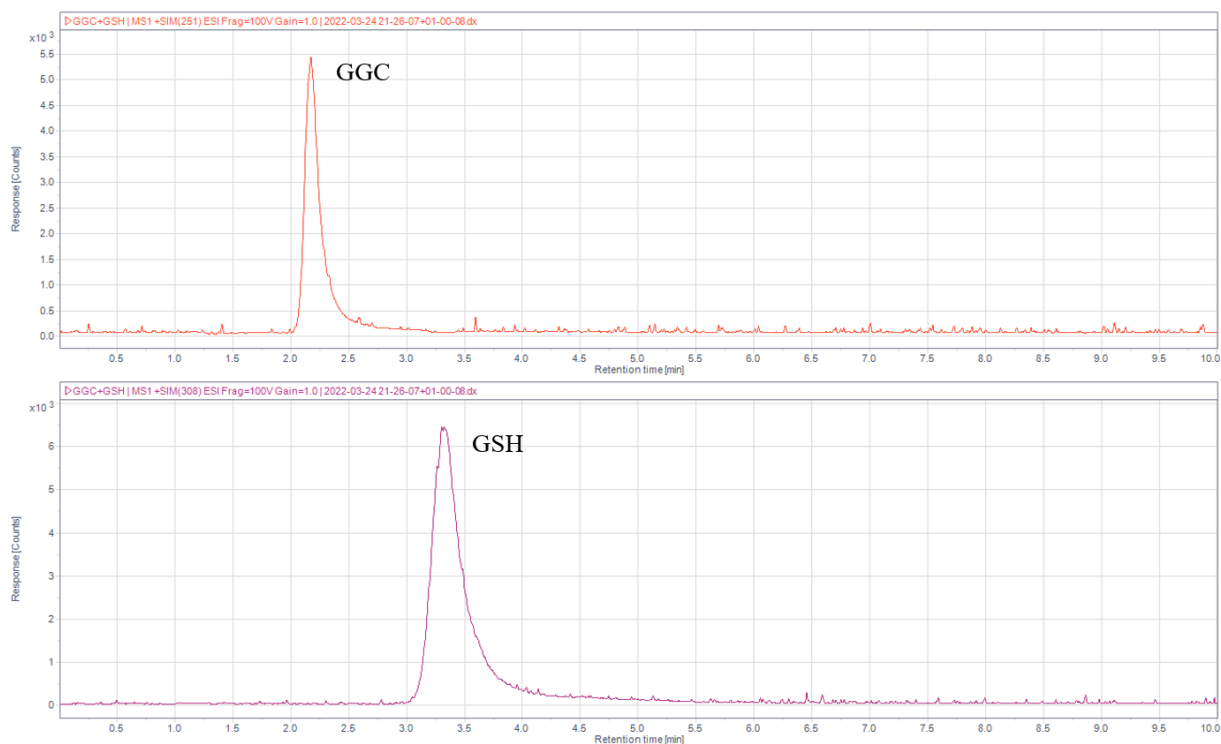
Na kolonách Ascentis Express RP-Amide, Atlantis HILIC Silica, Waters XBridge HILIC, Chrommolith Performance Si, SUPELCOSIL LC-SI a ZIC-HILIC byla otestována již dříve testovaná MF skládající se z vodného roztoku 5 mmol/l NH_4HCO_3 a acetonitrilu. Na většině kolon bylo dosaženo dobré retence, přičemž nejlepší retence byla zaznamenána na koloně ZIC-HILIC a nejhorší na Ascentis Express RP-Amide. Tvar píků byl lepší než u analýz standardů rozpuštěných ve vodě, ale horší než při použití MF 0,05 % TFA ve vodě i acetonitrilu. Na koloně ZIC-HILIC byla otestována také MF s 10 mmol/l NH_4HCO_3 ve vodě a acetonitril,

retence byla podobná jako u 5 mmol/l koncentrace, avšak při nižším podílu vodné fáze byla retence značně vyšší.

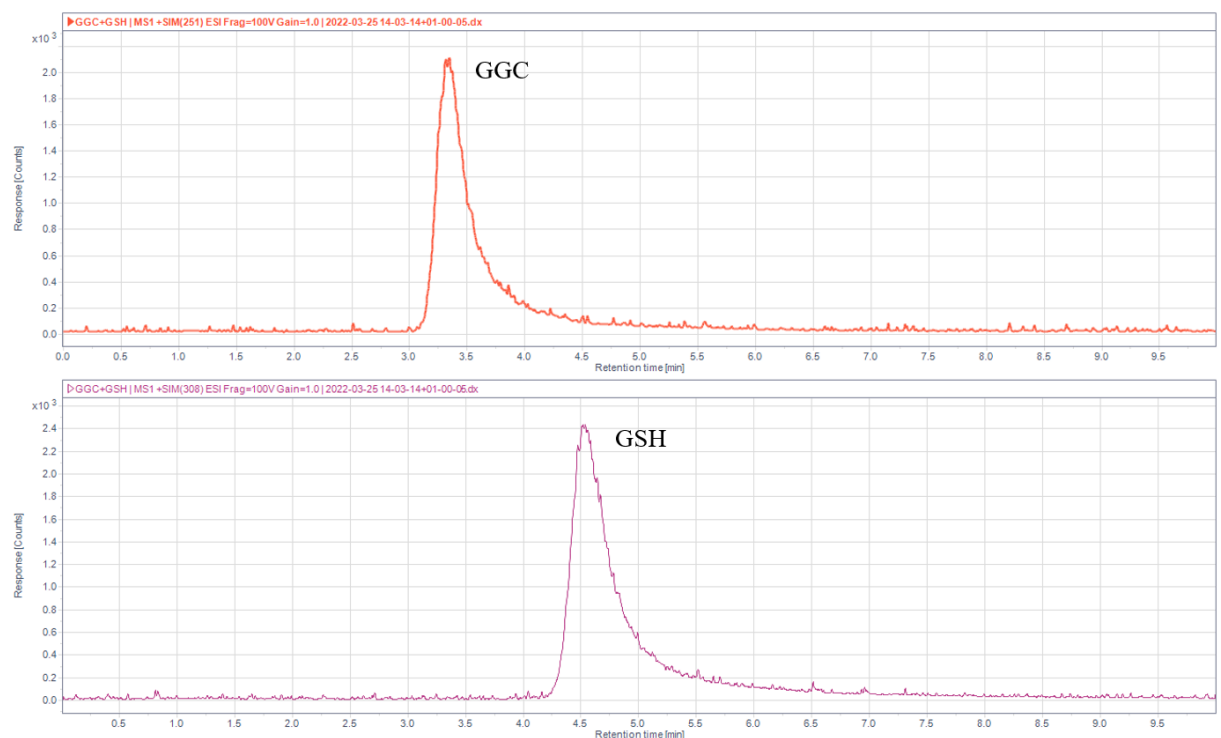
Pro každou isokratickou analýzu byly vypočteny retenční faktory k GGC a GSH podle vzorce (1). Čím vyšší retenční faktor, tím vyšší retence. Retenční faktor analytu by měl být alespoň vyšší než 1, neboť při nižších hodnotách by mohl eluovat spolu se solemi, což by pravděpodobně mělo negativní vliv na detekci hmotnostním spektrometrem. Přehled k pro standardy rozpuštěné ve vodě je uveden pro jednotlivé kolony a MF v přílohách v tabulce 1. Přehled k pro standardy rozpuštěné ve směsi acetonitril/voda, 9:1, (v/v) je uveden pro jednotlivé kolony a MF v přílohách v tabulce 2, pro kolonu SUPELCOSIL LC-SI je přehled k uveden v přílohách v tabulce 3. Dále byly sestaveny grafy závislosti $\log k$ na $\log \varphi$ (%) podle obecné rovnice (2). Tyto závislosti pro standardy rozpuštěné ve vodě jsou uvedeny v přílohách na obrázcích 24 a 25, pro standardy rozpuštěné ve směsi acetonitril/voda, 9:1, (v/v) jsou uvedeny v přílohách na obrázcích 27-29.

4.2 Selektce kolon a mobilních fází

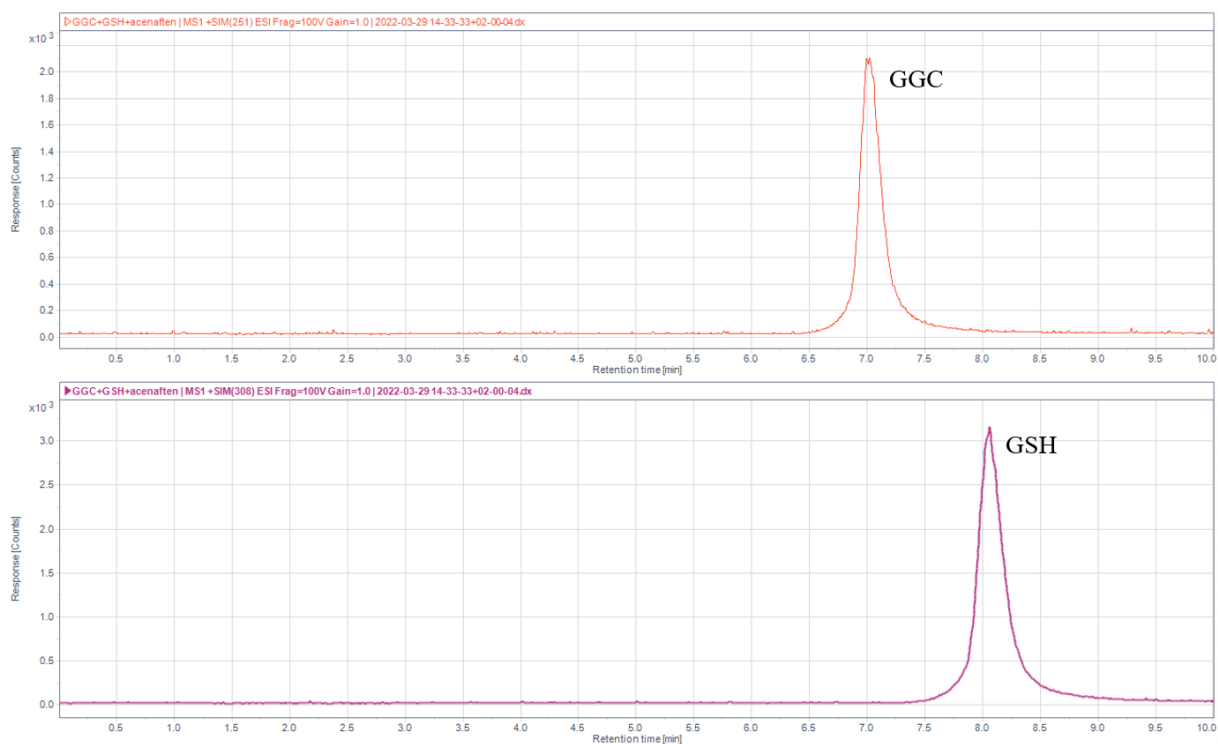
Na základě předchozího testování byly selektovány kolony a MF, při kterých bylo dosaženo nejlepších výsledků separace GGC a GSH. Jedná se o separace na kolonách Chrommolith Performance Si a ZIC-HILIC. Na koloně ZIC-HILIC bylo dosaženo nejlepší separace za využití MF s 0,05 % TFA ve vodě/acetonitrilu (obrázek 9). Na koloně Chrommolith Performance Si bylo dosaženo nejlepší separace za využití MF s 10 mmol/l NH_4HCO_3 ve vodě a 0,2 % HCOOH v acetonitrilu (obrázek 11). Na obou kolonách bylo dosaženo dobré separace za využití MF s 5 mmol/l HCOONH_4 ve vodě a 0,2 % HCOOH ve vodě/acetonitrilu (obrázky 10 a 12). MF s 0,05 % TFA ve vodě/acetonitrilu netlumí tvorbu iontů ani při nízkém podílu vodné fáze, což je výhodou oproti dalším zmíněným MF.



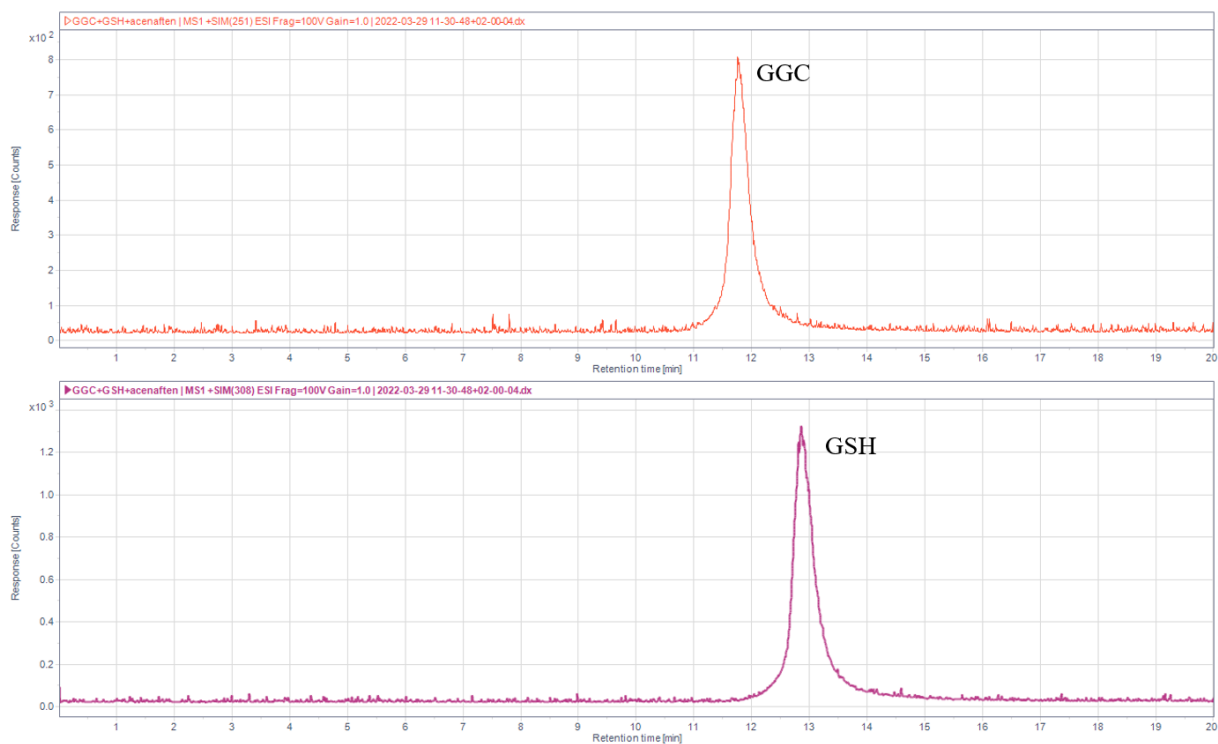
Obrázek 9: Isokratická separace standardů GGC a GSH na koloně ZIC-HILIC ($150 \times 2,1$ mm, $3 \mu\text{m}$), 30°C , detekce MS v módu SIM, průtok $0,4$ ml/min, MF s $0,05$ % TFA ve vodě/acetonitrilu, 10 % vodné fáze



Obrázek 10: Isokratická separace standardů GGC a GSH na koloně ZIC-HILIC ($150 \times 2,1$ mm, $3 \mu\text{m}$), 30°C , detekce MS v módu SIM, průtok $0,4$ ml/min, MF s 5 mmol/l HCOONH_4 ve vodě a $0,2$ % HCOOH ve vodě/acetonitrilu, 16 % vodné fáze



Obrázek 11: Isokratická separace standardů GGC a GSH na koloně Chromolith Performance Si ($100 \times 4,6$ mm), 30°C , detekce MS v módu SIM, průtok $0,4$ ml/min, MF s 10 mmol/l NH_4HCO_3 ve vodě a $0,2\%$ HCOOH v acetonitrilu, 18% vodné fáze



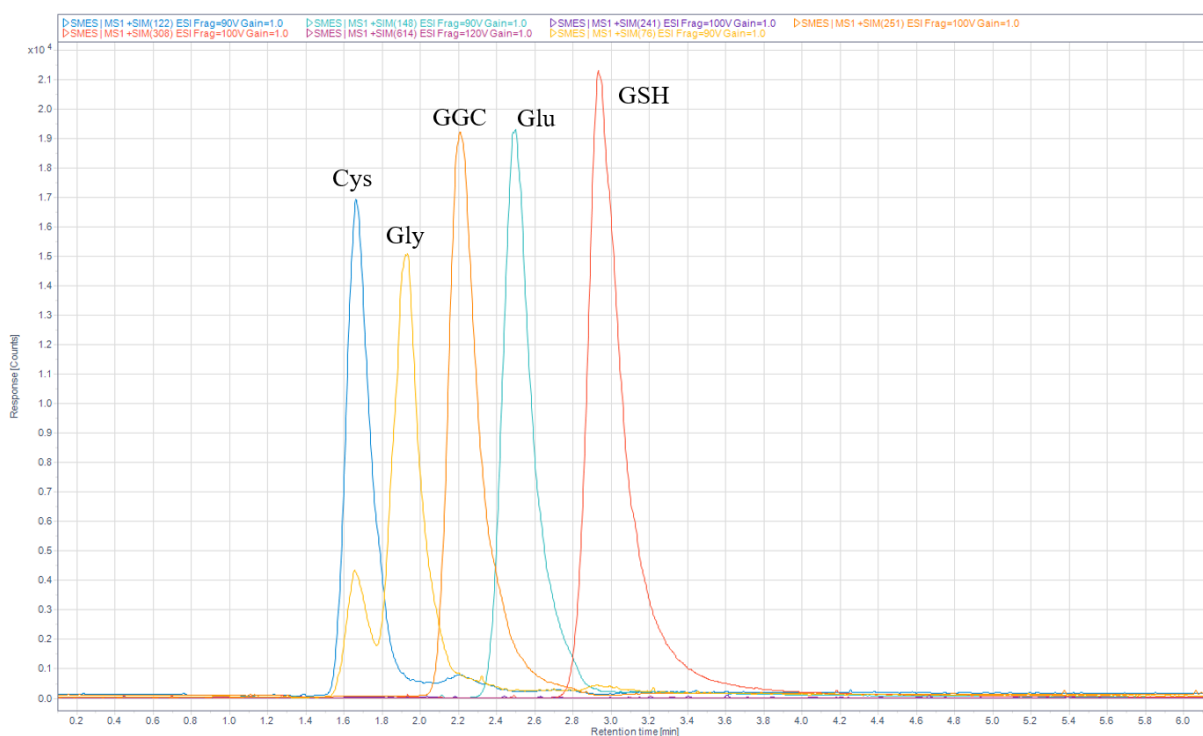
Obrázek 12: Isokratická separace standardů GGC a GSH na koloně Chromolith Performance Si ($100 \times 4,6$ mm), 30°C , detekce MS v módu SIM, průtok $0,4$ ml/min, MF s 5 mmol/l HCOONH_4 ve vodě a $0,2\%$ HCOOH v vodě/acetonitrilu, 16% vodné fáze,

4.3 Optimalizace separace

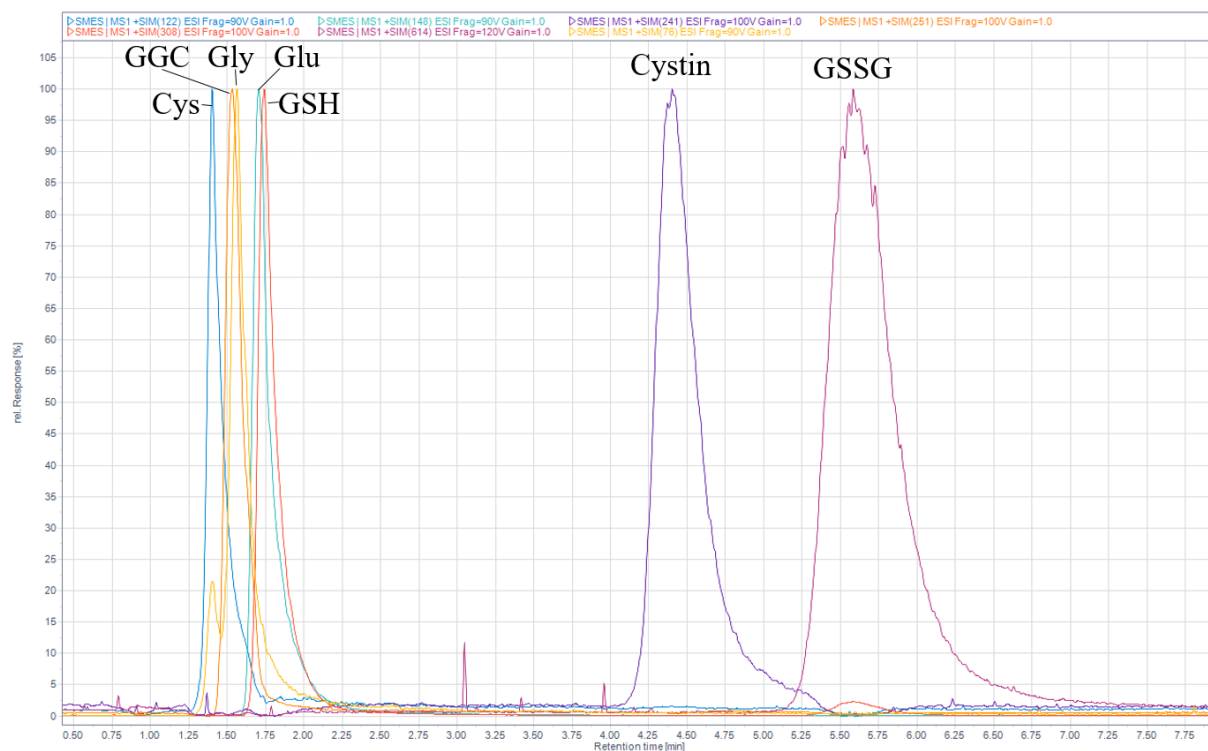
Pro další optimalizaci byly selektovány kolony ZIC-HILIC (150 × 2,1 mm, 3 μm) a Chromolith Performance Si (100 × 4,6 mm). Na těchto kolonách byly dále testovány vybrané MF pro separaci širší směsi látek zahrnující GGC, GSH, GSSG, cystin a aminokyseliny, ze kterých se skládají, tedy kyselina glutamová (Glu), cystein (Cys) a glycin (Gly). Uvedené další látky byly přidány k GGC a GSH, protože se s vysokou pravděpodobností mohou také nacházet v biologických vzorcích a pro správnou kvantitativní analýzu by bylo nutné je úspěšně separovat.

Pro každou isokratickou analýzu byly vypočteny retenční faktory k jednotlivých analytů podle vzorce (1). Čím vyšší retenční faktor, tím vyšší retence. Retenční faktor analytu by měl být alespoň vyšší než 1, neboť při nižších hodnotách by mohl eluovat spolu se solemi, což by pravděpodobně mělo negativní vliv na detekci hmotnostním spektrometrem. Přehled retenčních faktorů k isokratických analýz na koloně ZIC-HILIC je uveden v přílohách v tabulce 5, přehled k isokratických analýz na koloně Chromolith Performance Si je uveden v přílohách v tabulce 6. Dále byly sestaveny grafy závislosti $\log k$ na $\log \phi$ (%) podle obecné rovnice (2). Tyto závislosti jsou uvedeny pro kolonu ZIC-HILIC v přílohách na obrázcích 30 a 32, pro kolonu Chromolith Performance Si jsou uvedeny v přílohách na obrázcích 34, 36, 38, 40, 42. Parametry jednotlivých regresních křivek jsou pro obě kolony uvedeny v přílohách v tabulce 4. Z vypočtených k byly dále podle rovnice (3) vypočítány retenční poměry r_{ij} pro všechny páry analytů. Podle rovnice (4) byla vypočtena účinnost kolony n (teoretický počet pater) zvlášť pro každou MF. Hodnota r_{ij} představuje selektivitu látek i a j , čím je hodnota vyšší než 1, tím lepší selektivita. Z vypočtených hodnot retenčních faktorů, retenčních poměrů a účinnosti kolony bylo vypočteno rozlišení R_s pro všechny páry analytů. R_s rovnající se hodnotě 1 odpovídá 95 % separace látek z hlediska překryvu píků, při optimalizaci metody je považováno za dostatečné. R_s nabývající hodnoty vyšší nebo rovno 1,5 odpovídá 99,7 % separace látek, tedy separaci téměř na základní linii. Z vypočtených hodnot R_s pro měřené isokratické rozmezí ϕ (%) byly sestaveny okénkové diagramy, které umožňují graficky posoudit R_s při různých ϕ (%) dané MF. V okénkových diagramech bylo hledáno takové ϕ (%) dané MF, při kterém dosahují všechny páry analytů hodnoty R_s alespoň 1. Jednotlivé okénkové diagramy budou popsány níže, zvlášť pro kolonu ZIC-HILIC a pro kolonu Chromolith Performance Si.

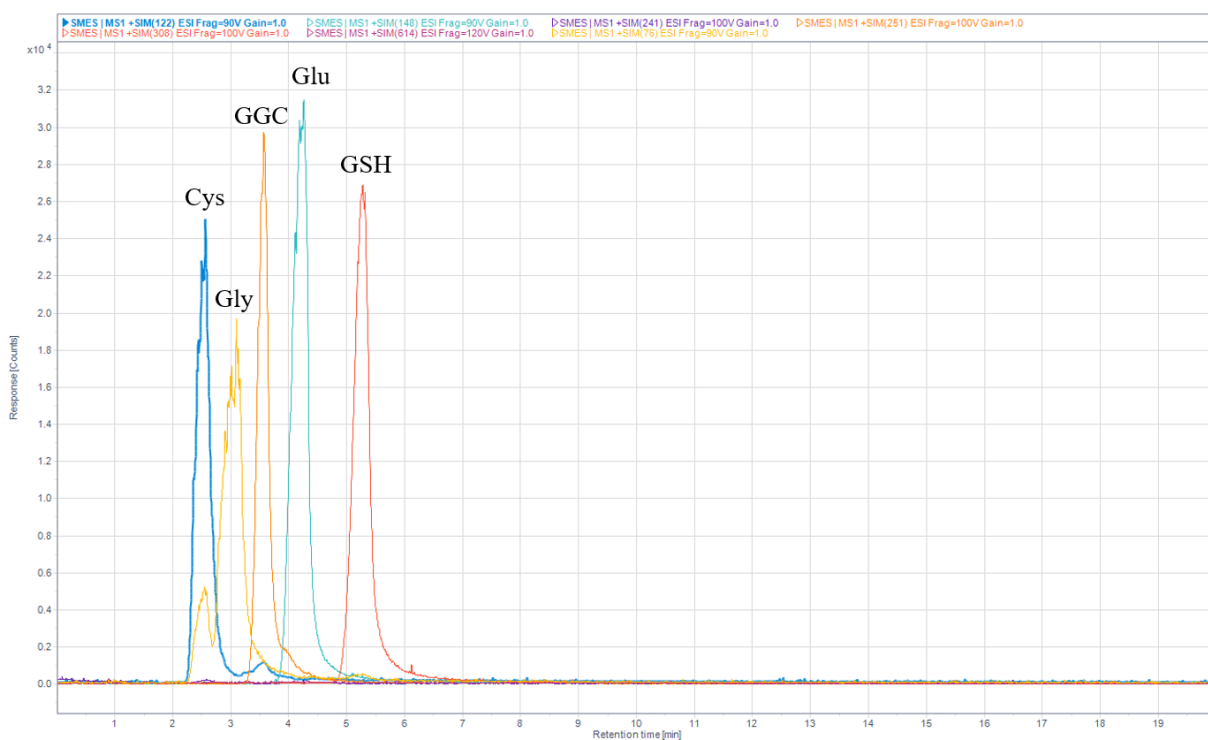
Pro separaci výše zmíněné směsi analytů na koloně ZIC-HILIC byla testována MF s 0,05 % TFA ve vodě a acetonitrilu. Měřena byla isokratická řada v rozmezí 20-2 % vodné fáze v MF. Protože je separace prováděna v HILIC módu, se snižující se koncentrací vodné fáze retence látek obecně roste. Z okénkového diagramu na obrázku 31 v přílohách je zřejmé, že nejlepšího rozlišení GGC, GSH a aminokyselin Glu, Cys a Gly je možno dosáhnout přibližně při 12 % vodné fáze v MF. Obtížně rozlišitelné páry byly zejména Cys/Gly a GGC/Glu a Gly/GGC, což odpovídá také chromatogramu uvedeném na obrázku 13. Při 12 % vodné fáze byla retence cystinu a GSSG vysoká, retenční čas GSSG byl dokonce vyšší než 30 min. Nicméně, již při 18 % vodné fáze v MF byla zaznamenána úspěšná separace GGC, GSH, cystinu a GSSG za poměrně krátký čas (obrázek 14). Podobné separace bylo dosaženo také za využití MF s 0,1 % DFA ve vodě i acetonitrilu. Z okénkového diagramu na obrázku 33 v přílohách je zřejmé, že nejlepšího rozlišení zmíněných látek je možno dosáhnout opět asi při 12 % vodné fáze, což odpovídá chromatogramu uvedeném na obrázku 15. Obtížně rozlišitelné páry byly opět zejména Cys/Gly a GGC/Glu a Gly/GGC. Při použití 0,1 % DFA byla však retence GSSG a cystinu velmi vysoká, obě látky měly retenční čas vyšší než 20 min již při 20 % vodné fáze v MF. Z obrázků 13 a 15 je patrné, že Gly tvoří navíc malý pík eluující společně s Cys.



Obrázek 13: Isokratická separace standardů GGC, GSH, Gly, Cys a Glu na koloně ZIC-HILIC (150 × 2,1 mm, 3 μm), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 0,05 % TFA ve vodě/acetonitrilu, 12 % vodné fáze



Obrázek 14: Isokratická separace standardů GGC, GSH, Gly, Cys, Glu, cystinu a GSSG na koloně ZIC-HILIC (150 × 2,1 mm, 3 μm), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 0,05 % TFA ve vodě/acetonitrilu, 18 % vodné fáze



Obrázek 15: Isokratická separace standardů GGC, GSH, Gly, Cys a Glu na koloně ZIC-HILIC (150 × 2,1 mm, 3 μm), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 0,1 % DFA ve vodě/acetonitrilu, 12 % vodné fáze

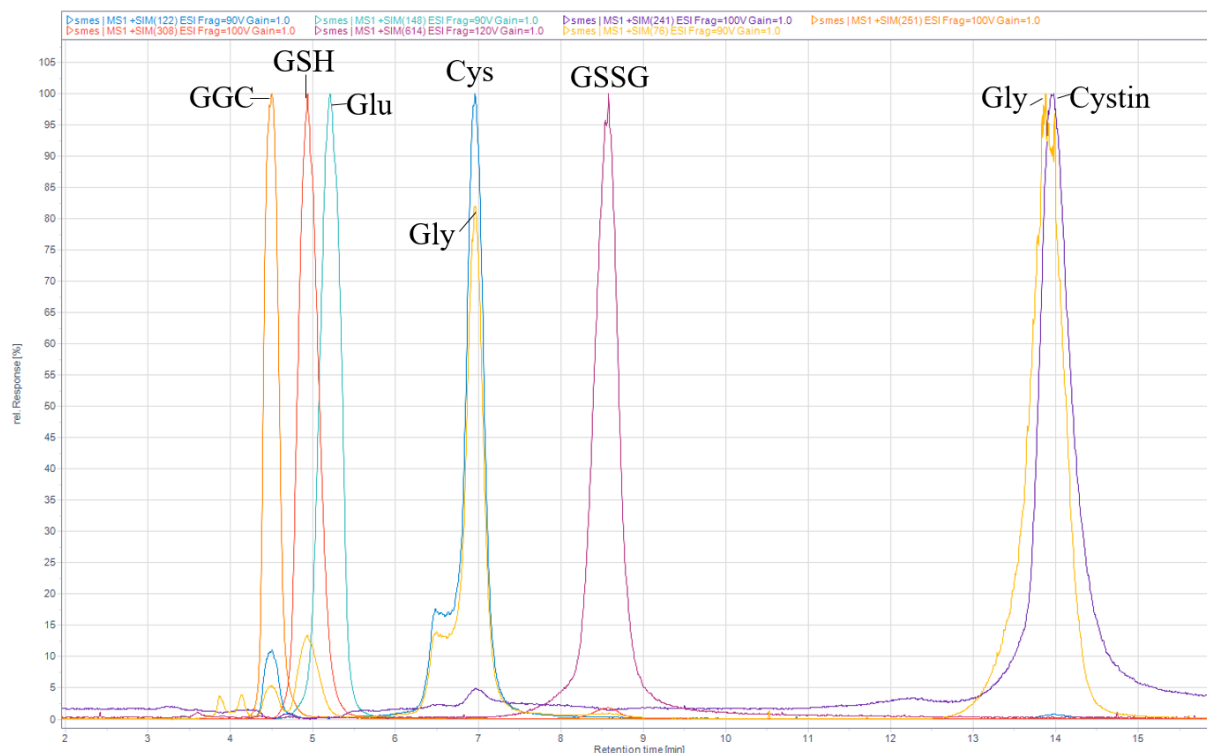
Pro separaci směsi GGC, GSH, Cys, Gly, Glu, cystinu a GSSG na koloně Chromolith Performance Si byla testována MF s 5 mmol/l NH_4HCO_3 ve vodě a acetonitrilu, některé píky však byly poměrně rozmyté nebo se vůbec neseperoaly. Z okénkového diagramu na obrázku 35 je zřejmé, že optimálních hodnot rozlišení nebylo dosaženo, přičemž kritickými páry byly zejména Glu/GSH a GGC/Glu, ale také první pík Gly v páru s Cys. První pík Gly měl prakticky stejnou retenci v celém rozmezí ϕ (%), proto pro větší přehlednost nebyly s tímto píkem vytvářeny v tomto a ani v nadcházejících okénkových diagramech další křivky rozlišení, neboť by byly shodné s křivkami párů s cysteinem.

Dále byly testovány MF s 5 mmol/l NH_4HCO_3 ve vodě a 0,1 % či 0,2 % HCOOH v acetonitrilu, při využití těchto MF byla retence analytů mnohem vyšší, zejména pak retence cystinu a GSSG, jejichž retenční čas byl již při $\phi = 18$ % vyšší než 30 min. Selektivita byla lepší než u MF bez přídavku HCOOH v acetonitrilu, nicméně z obrázků 37 a 39 je zřejmé, že optimálních hodnot rozlišení nebylo dosaženo ani pro jednu ze zmíněných MF s přídavkem HCOOH . Kritickými páry byly GGC/GSH, Cys/Glu a opět první pík Gly v páru s Cys pro obě MF.

Dále byla testována MF s 2,5 mmol/l NH_4HCO_3 ve směsi 60 % vody a 40 % acetonitrilu jako vodná složka a 2,5 mmol/l NH_4HCO_3 ve směsi 90 % acetonitrilu a 10 % vody jako organická složka. Z okénkového diagramu na obrázku 41 je zřejmé, že optimálního rozlišení všech látek nebylo dosaženo ani při tomto složení MF, kritickými páry byly zejména GGC/GSH, Glu/GSH a opět první pík Gly v páru Cys.

Lepší selektivity a tvaru píků bylo dosaženo při využití MF s 10 mmol/l NH_4HCO_3 ve vodě a 5 mmol/l NH_4HCO_3 s 5 % vody v acetonitrilu (obrázek 16). Z okénkového diagramu na obrázku 43 je zřejmé, že optimálního rozlišení všech látek také nebylo dosaženo, kritickými páry byly zejména Glu/GSH, Gly/cystin a opět první pík Gly v páru s Cys.

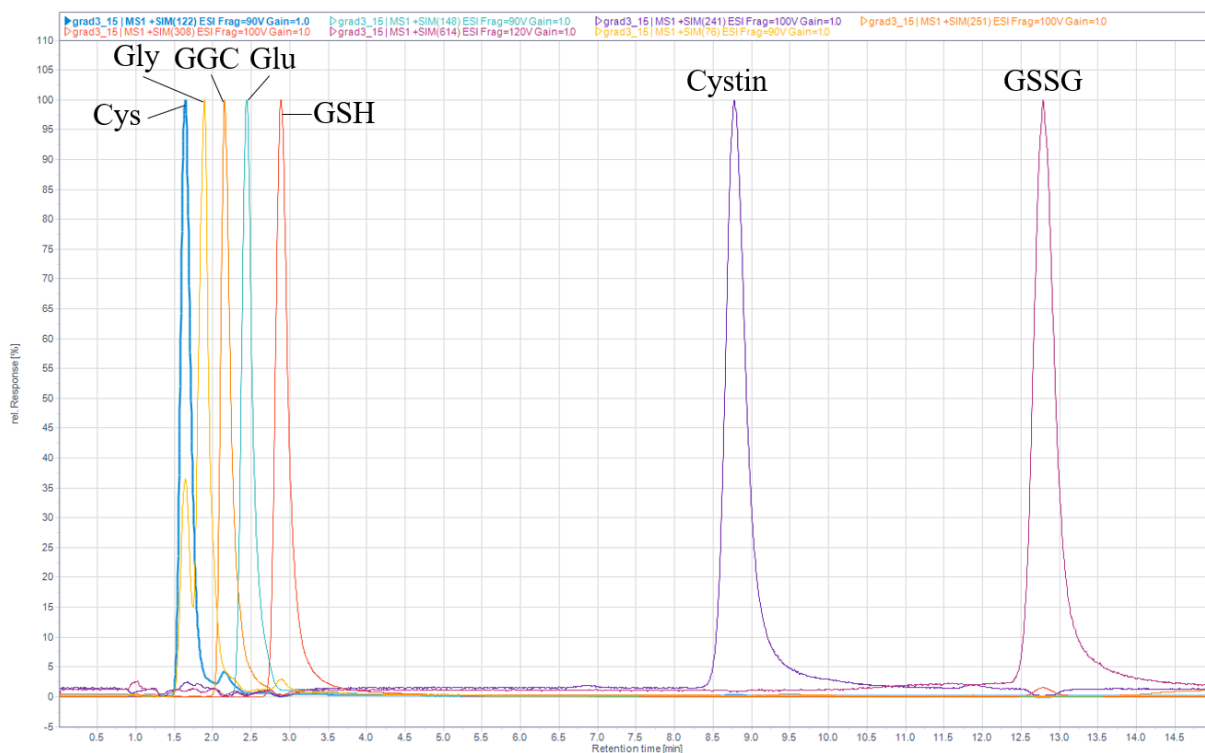
U všech zmíněných MF testovaných na koloně Chromolith Performance Si docházelo k tvorbě dvou píků pro glycin, přičemž jeden eluoval společně s cysteinem, retenční časy cysteinu a prvního píků glycinu se shodovaly prakticky v celém rozmezí ϕ (%) pro každou testovanou MF. Druhý pík glycinu eluoval společně s cystinem, avšak za určitých podmínek docházelo k jejich separaci. Separace glycinu byla tedy hlavním nedostatkem kolony Chromolith Performance Si oproti koloně ZIC-HILIC. Navzdory nedostatkům lze na této koloně poměrně dobře separovat GGC, GSH, Cys, cystin a GSSG při využití MF s 10 mmol/l NH_4HCO_3 ve vodě a 5 mmol/l NH_4HCO_3 s 5 % vody v acetonitrilu (obrázek 16).



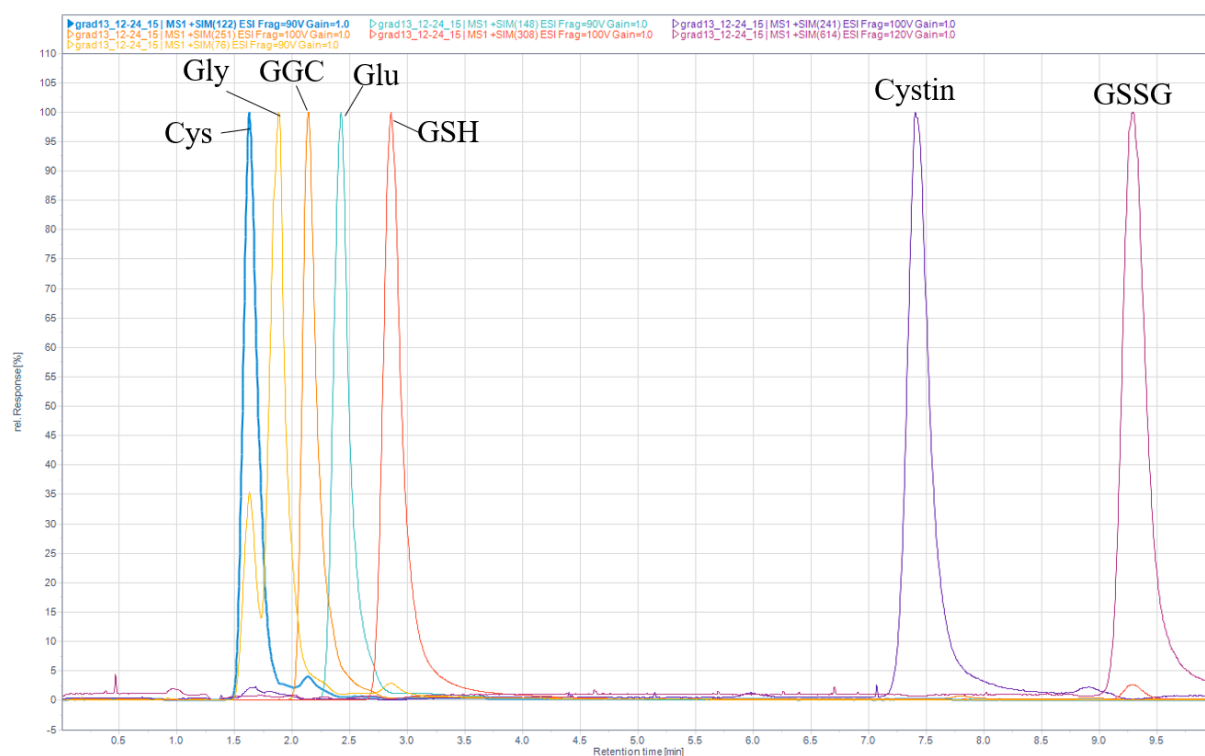
Obrázek 16: Isokratická separace standardů GGC, GSH, Gly, Cys, Glu, cystinu a GSSG na koloně Chromolith Performance Si (100 × 4,6 mm), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 10 mmol/l NH₄HCO₃ ve vodě a 5 mmol/l NH₄HCO₃ s 5 % vody v acetonitrilu, 16 % vodné fáze

Na základě porovnání separace GGC, GSH, Cys, Gly, Glu, cystinu a GSSG na kolonách ZIC-HILIC a Chromolith Performance byla vyhodnocena kolona ZIC-HILIC s MF obsahující 0,05 % TFA ve vodě a acetonitrilu jako nejlepší dosažený výsledek, neboť vykazuje dobré retenční faktory i selektivitu jednotlivých látek, navíc je možno dosáhnout separace poměrně za krátký čas. Na koloně ZIC-HILIC s MF obsahující 0,05 % TFA ve vodě a acetonitrilu byly následně otestovány různé kombinace lineárních gradientových analýz s časem separace 10, 15 a 20 minut. Přehled parametrů gradientových separací je uveden v přílohách v tabulce 7. Přehled retenčních časů jednotlivých analytů při těchto gradientových separacích je uveden v přílohách v tabulce 8, šířky píků jsou uvedeny v tabulce 9.

Ze všech testovaných kombinací gradientových analýz bylo dosaženo nejlepší separace při 12 % vodné fáze na počátku gradientu a 20 % na konci s celkovým časem separace 15 min (obrázek 17). Zvýšením koncového obsahu vodné fáze při gradientu na 24 % lze čas separace zkrátit na 10 minut prakticky bez negativního vlivu na rozlišení (obrázek 18). Z těchto chromatogramů je zřejmé, že ani při využití gradientové analýzy některé píky nejsou separovány zcela, zejména pak páry Cys/Gly a GGC/Glu, nicméně tento nedostatek je kompenzován vysokou specifikou MS detekce.



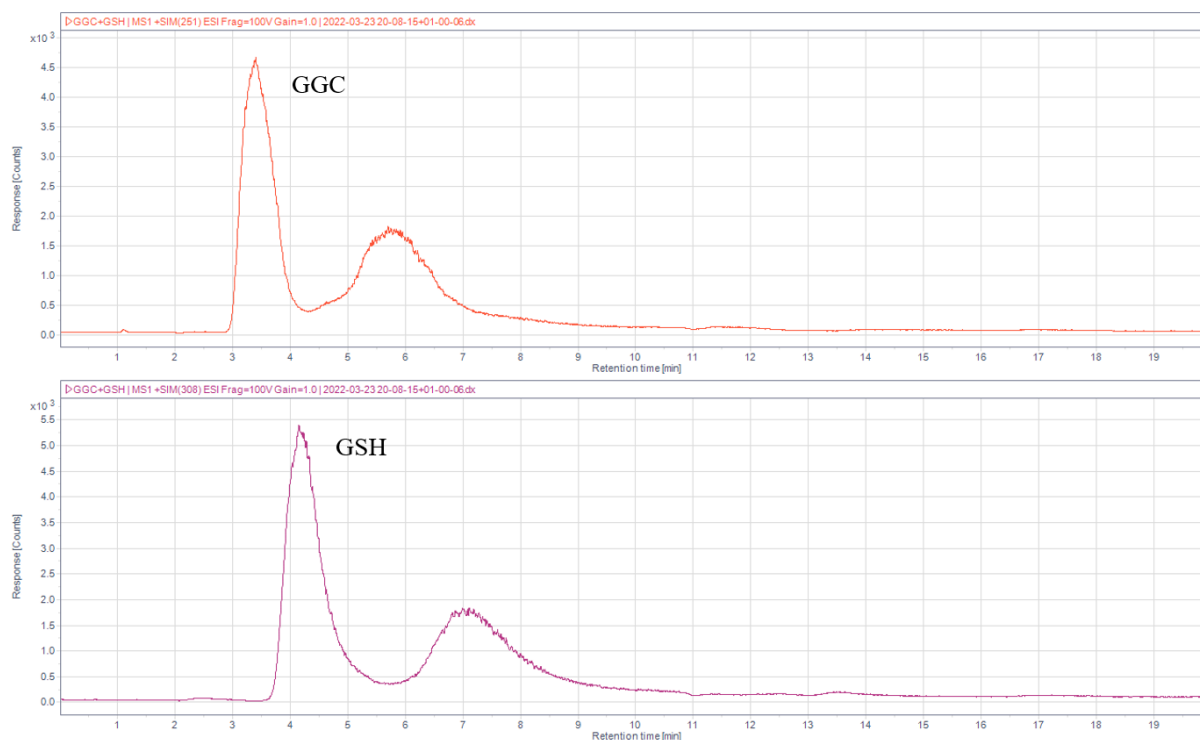
Obrázek 17: Gradientová separace standardů GGC, GSH, Gly, Cys, Glu, cystinu a GSSG na koloně ZIC-HILIC (150 × 2,1 mm, 3 μm), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 0,05 % TFA ve vodě/acetonitrilu, gradient 12-20 % vodné fáze, čas separace 15 min



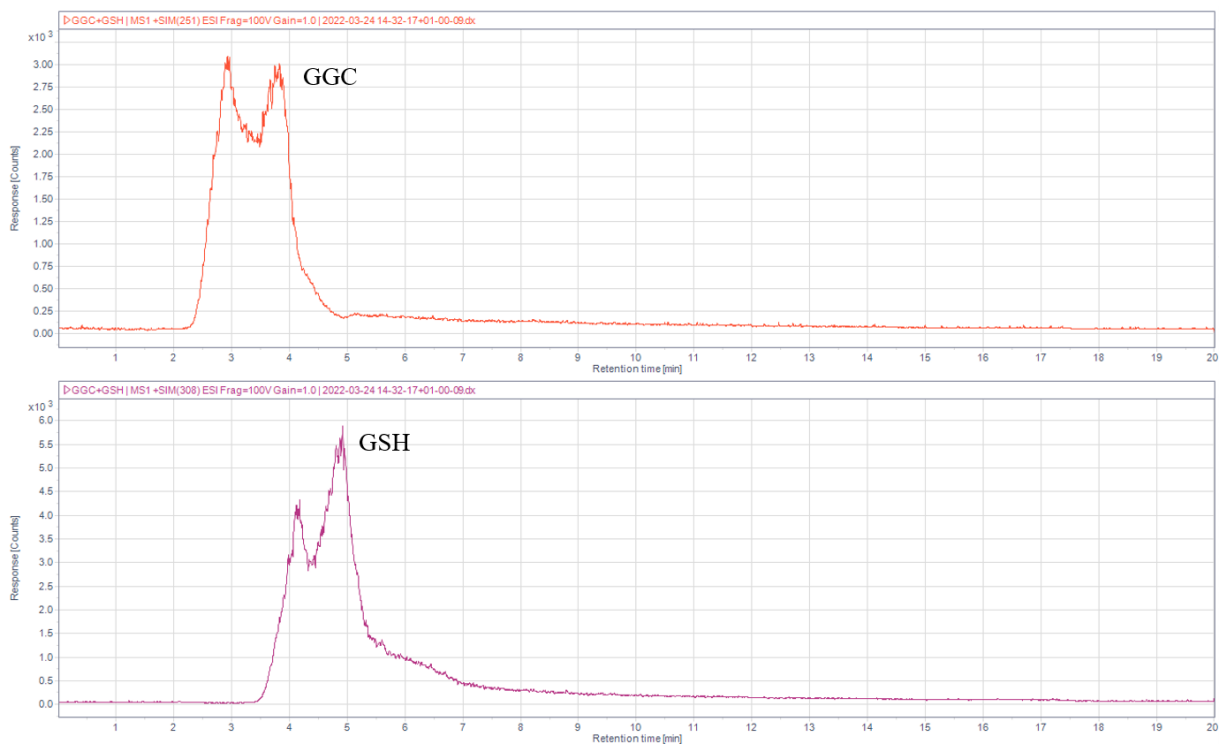
Obrázek 18: Gradientová separace standardů GGC, GSH, Gly, Cys, Glu, cystinu a GSSG na koloně ZIC-HILIC (150 × 2,1 mm, 3 μm), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 0,05 % TFA ve vodě/acetonitrilu, průtok 0,4 ml/min, gradient 12-24 % vodné fáze, čas separace 10 min

5. DISKUSE

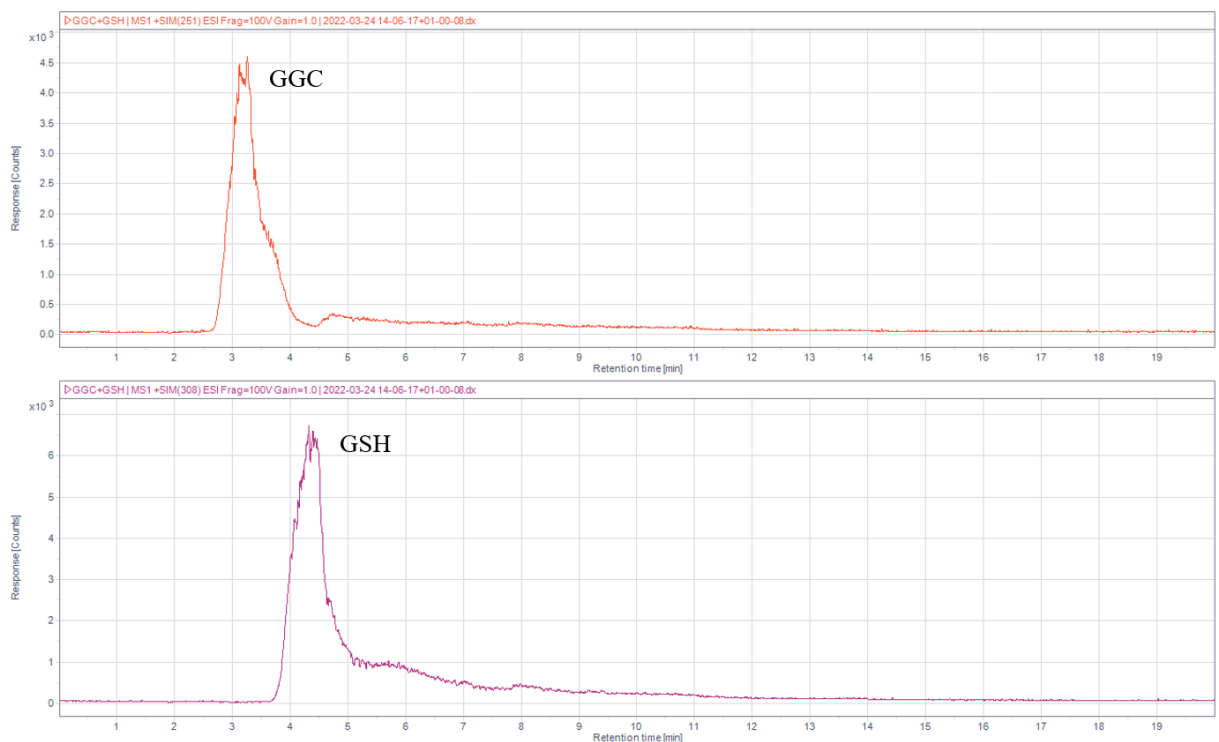
Vývoj této separační metody provázelo několik komplikací, jednou z nich bylo rozmývání píků nebo až tvorba dvou píků pro jednu a tu samou molekulu. Na koloně ZIC-HILIC navíc docházelo k nekorelované závislosti retenčních faktorů isokratické řady. Tyto jevy mohou být obecně způsobeny nedostatečnou kondicionací kolony, v rámci experimentů však byla kondicionace kolony provedena minimálně deseti mrtvými objemy mobilní fáze a lze ji tak považovat za dostatečnou. Další příčinou mohlo být zadržování molekul analytu v injektovaném objemu vody, neboť GGC i GSH jsou velmi polární. Standardy GGC i GSH byly rozpuštěny ve vodě, v samotném acetonitrilu nebyly rozpustné. Proto bylo otestováno rozpuštění těchto standardů ve směsi acetonitrilu a vody v poměrech 1:1 a 9:1 (v/v). Po rozpuštění standardů ve směsi acetonitril/voda, 1:1, (v/v) došlo částečně ke zlepšení, ale píky byly stále poměrně rozmyté. Po rozpuštění standardů ve směsi acetonitril/voda, 9:1, (v/v) došlo ke značnému zlepšení tvaru píků a tím i separace GGC a GSH a na koloně ZIC-HILIC vedl tento krok také k docílení korelace retenčních faktorů isokratické řady. Z obrázků 19-21 a 22-23 je patrný vliv složení rozpouštědla, ve kterém byly standardy GGC a GSH rozpuštěny, na tvar jejich píků a separaci.



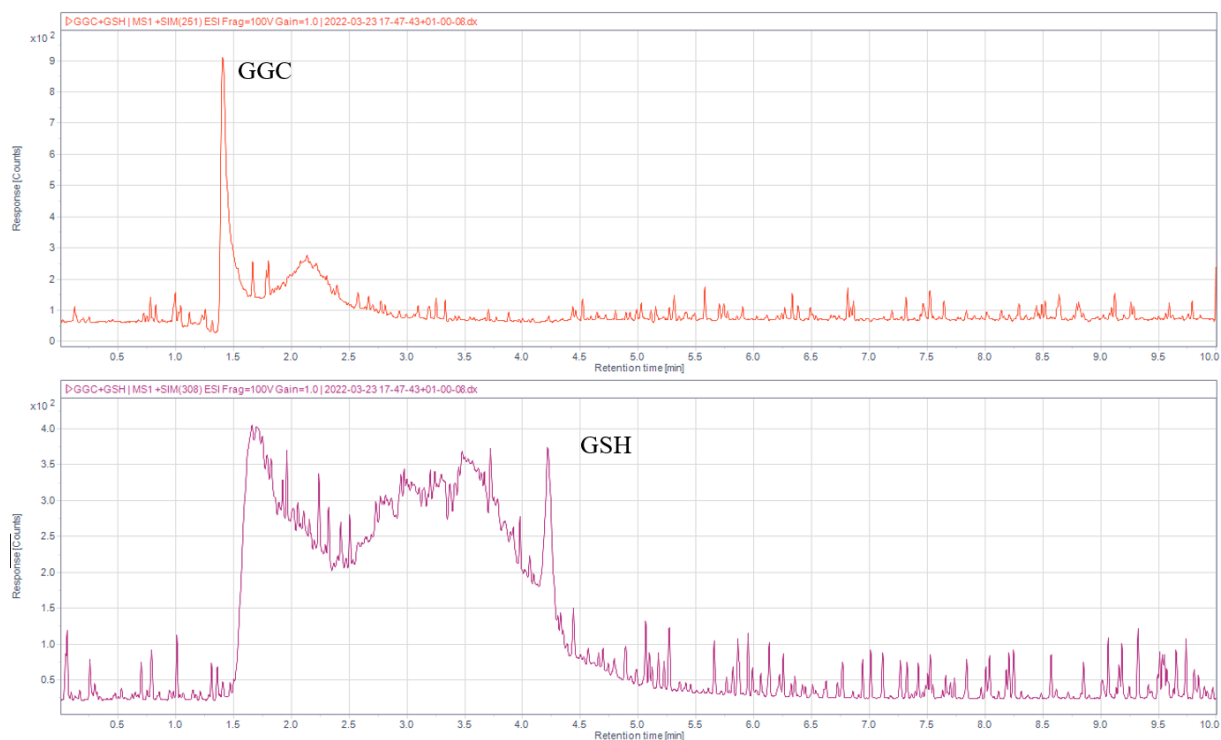
Obrázek 19: Isokratická separace standardů GGC a GSH na koloně ZIC-HILIC ($150 \times 2,1$ mm, $3 \mu\text{m}$), 30°C , detekce MS v módu SIM, průtok $0,4$ ml/min, MF s $0,05\%$ TFA ve vodě/acetonitrilu, 14% vodné fáze, standardy rozpuštěny ve vodě



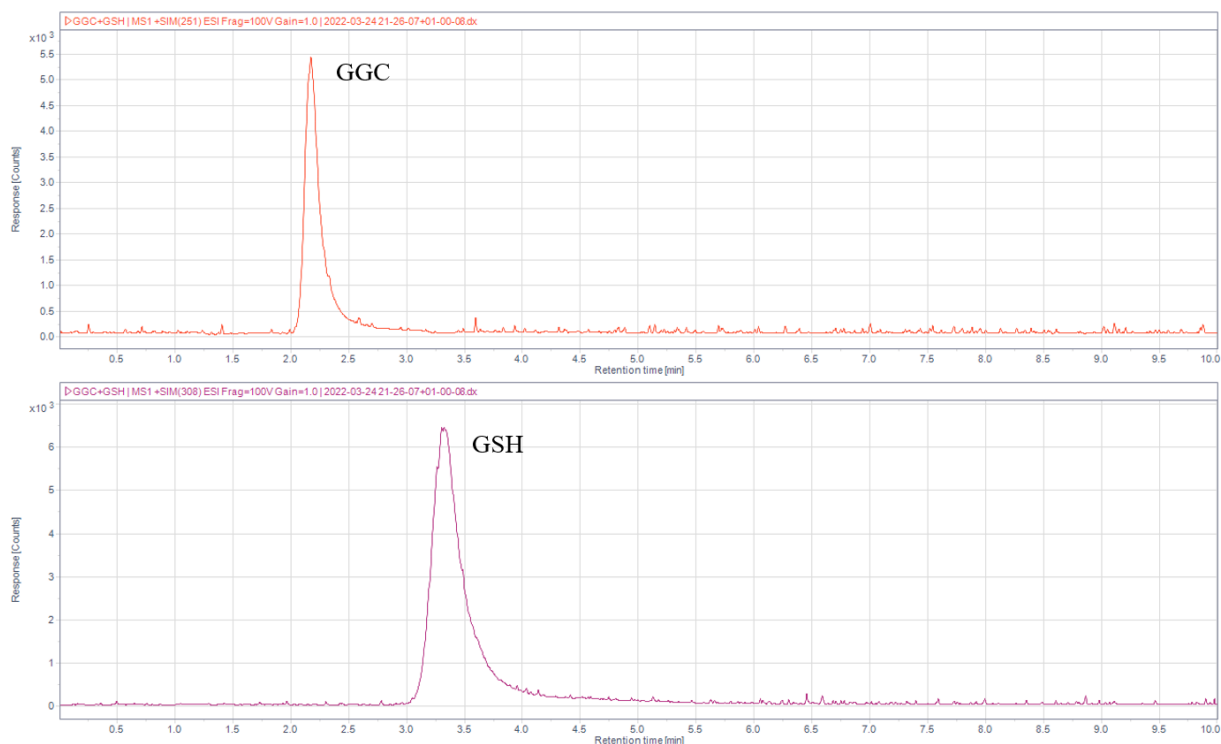
Obrázek 20: Isokratická separace standardů GGC a GSH na koloně ZIC-HILIC ($150 \times 2,1$ mm, $3 \mu\text{m}$), 30°C , detekce MS v módu SIM, průtok $0,4$ ml/min, MF s $0,05\%$ TFA ve vodě/acetonitrilu, 14% vodné fáze, standardy rozpuštěny ve vodě/acetonitril, $1:1$ (v/v)



Obrázek 21: Isokratická separace standardů GGC a GSH na koloně ZIC-HILIC ($150 \times 2,1$ mm, $3 \mu\text{m}$), 30°C , detekce MS v módu SIM, průtok $0,4$ ml/min, MF s $0,05\%$ TFA ve vodě/acetonitrilu, 14% vodné fáze, standardy rozpuštěny ve vodě/acetonitril, $1:9$ (v/v)



Obrázek 22: Isokratická separace standardů GGC a GSH na koloně ZIC-HILIC (150 × 2,1 mm, 3 μm), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 0,05 % TFA ve vodě/acetonitrilu, 10 % vodné fáze, standardy rozpuštěny ve vodě



Obrázek 23: Isokratická separace standardů GGC a GSH na koloně ZIC-HILIC (150 × 2,1 mm, 3 μm), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 0,05 % TFA ve vodě/acetonitrilu, 10 % vodné fáze, standardy rozpuštěny ve vodě/acetonitrilu, 1:9 (v/v)

Na ostatních testovaných kolonách, včetně kolony Chromolith Performance Si, neposkytovala MF s 0,05 % TFA ve vodě a acetonitrilu dobrou retenci. Bylo tedy využíváno jiných aditiv, například HCOOH. Přidání této kyseliny i k organické složce MF (acetonitrilu) vedlo ke zlepšení tvaru píků, nicméně využití samotné HCOOH v MF nevedlo k uspokojivé separaci. Některá aditiva umožňující separaci však nebyla rozpustná v acetonitrilu. Byla tedy přidávána pouze do vodné fáze MF, což však při využití například samotného NH_4HCO_3 ve vodné fázi bylo příčinou horšího tvaru píků a tím i nižšího rozlišení. Navážku NH_4HCO_3 pro přípravu roztoku o koncentraci 5 mmol/l se však podařilo plně rozpustit ve směsi 95 % acetonitrilu a 5 % vody. Využití této organické fáze v MF vedlo ke značnému zlepšení tvaru píků na koloně Chromolith Performance Si a tím i k lepší separaci.

Další komplikací byla rozpustnost standardů, například cystin a Glu nebyly rozpustné ani ve vodě. Sigma-Aldrich uvádí rozpustnost obou molekul v 1 M HCl. Tato kyselina však není vhodná pro MS detekci, neboť tlumí tvorbu iontů. Cystin byl nakonec rozpuštěn v 10 % TFA a Glu v 10 mmol/l NH_4HCO_3 . Další problém se týkal iontové suprese a poklesu intenzity signálu, zejména ve skenovacím módu MS. Toto může být způsobeno přítomností velkého množství aditiv v MF, ale také postupným znečištěním rozhraní ESI-MS. Proto je vhodné využívat mírné koncentrace aditiv v MF a pravidelně čistit rozhraní ESI-MS alespoň jedenkrát do měsíce, v závislosti na pracovním vytížení této instrumentace či typu analyzovaných vzorků.

Po vyřešení výše zmíněných komplikací byla pro separaci GGC, GSH, GSSG, Gly, Glu, Cys a cystinu s gradientovou elucí (na základě porovnání kolon ZIC-HILIC a Chromolith Performance Si) zvolena kolona ZIC-HILIC a MF s 0,05 % TFA ve vodě a acetonitrilu. Hlavní nevýhodou kolony Chromolith Performance Si byla tvorba dvou píků pro glycin (se značně odlišnými retenčními faktory), ale také horší separace ostatních látek. Další nevýhodou (výše popsanou) byla nutnost využití aditiva špatně rozpustného v acetonitrilu, vlivem těchto aditiv také docházelo k iontové supresi při nižším podílu vodné fáze, k čemuž při využití MF s 0,05 % TFA ve vodě a acetonitrilu nedocházelo.

Gradientovou elucí lze obecně dosáhnout užších píků a tím i vyšší citlivosti detekce. Výhodou je také možnost zkrácení doby separace, což je možno vidět na obrázcích 17 a 18 ve výsledkové části. Využitím gradientu s lineární změnou ϕ (%) v rozmezí 12-24 bylo dosaženo dobré separace klíčových látek během 10 min.

6. ZÁVĚR

Glutathion je tripeptid skládající se z aminokyselin glycinu, cysteinu a glutamátu. Zvláštností tohoto tripeptidu je spojení postranní karboxylové skupiny glutamátu (v gama pozici) s aminoskupinou cysteinu, tuto vazbu totiž většina proteáz či peptidáz nedokáže hydrolyzovat. GSH se přirozeně vyskytuje u bakterií, rostlin i živočichů, je syntetizován v cytosolu buněk během dvou enzymaticky katalyzovaných reakcí. GSH plní v buňce mnoho důležitých funkcí, jako jsou detoxifikace toxických elektrofilů, těžkých kovů či neutralizace volných radikálů a reaktivních sloučenin kyslíku. GSH je nejvýznamnější nízkomolekulární antioxidant v těle, mimo jiné se účastní také metabolismu xenobiotik. Výše zmíněné funkce jsou zajišťovány redukčními či konjugacími reakcemi s GSH, tyto reakce jsou zprostředkovány thiolovou skupinou cysteinu a enzymaticky katalyzovány. GSH se vyskytuje také ve formě glutathiondisulfidu (GSSG). Poměr obou forem glutathionu slouží jako významný indikátor oxidačního stresu a může sloužit také jako biomarker mnoha onemocnění či poruch, jako jsou rakovina, diabetes, selhání ledvin, zápal plic, cystická fibróza, neurodegenerativní poruchy, infekce jater a v neposlední řadě také otravy xenobiotiky či těžkými kovy. Během výše zmíněných patologických stavů dochází ke snížení hladin GSH, možnost navýšit hladiny GSH má tedy široký terapeutický potenciál. Jediným dosud prověřeným způsobem umožňujícím navýšit hladiny GSH nad homeostatickou úroveň je suplementace GGC.

Pro spolehlivé simultánní stanovení GGC, GSH a dalších jeho metabolitů, je třeba využít citlivých, selektivních a specifických metod, jako je HPLC-MS. Před samotnou analýzou touto technikou je však nutné vzorek řádně zpracovat. Za účelem umožnění FL detekce, separace na RP či zvýšení citlivosti MS detekce je možné využít derivatizace. Avšak derivatizace širší směsi stanovovaných látek může být poměrně komplikovaná a také časově náročná, z těchto důvodů může být preferováno stanovení bez derivatizace. Separace metabolitů GSH na RP bez využití derivatizace prakticky není možná z důvodu vysoké polaritě těchto látek, proto je vhodné využít separace v módu HILIC.

Hlavním cílem experimentální části této diplomové práce byla separace GSH a GGC bez využití derivatizace. Za účelem této separace bylo otestováno několik kolon a různé kombinace MF, zejména v módu HILIC. Byla porovnávána retence během isokratických analýz na kolonách Ascentis Express RP-Amide, Atlantis HILIC Silica, Waters XBridge HILIC, Chromolith Performance Si, SUPELCOSIL LC-SI a ZIC-HILIC. Optimální separace GGC a GSH bylo dosaženo na kolonách Chromolith Performance Si a ZIC-HILIC, které byly

dále porovnávány z hlediska separace GSH, GSSG, GGC, Gly, Glu, Cys a cystinu. Jednoznačně lepších výsledků bylo dosaženo na koloně ZIC-HILIC $150 \times 2,1$ mm, $3 \mu\text{m}$ (Merck, Darmstadt, Německo) za využití MF s 0,05 % TFA ve vodě/acetonitrilu. Separace GSH, GSSG, GGC, Gly, Glu, Cys a cystinu na koloně ZIC-HILIC byla dále optimalizována využitím lineárního gradientu se změnou ϕ (%) 12-24 vodné fáze s časem separace 10 minut. Tato metoda separace může nalézt využití při stanovení širší směsi metabolitů GSH technikou HPLC-MS s vyššími nároky na selektivitu, neboť jiné HPLC-MS metody, které nevyužívají derivatizace, jsou zaměřeny pouze na separaci a stanovení GSH a GSSG, nebo naopak při stanovení širší směsi postrádají fundamentální separaci.

7. PŘÍLOHY

7.1 Tabulky

Tabulka 1: Porovnání kolon a mobilních fází dle hodnot retenčních faktorů pro standardy GGC a GSH rozpuštěné ve vodě

Mobilní fáze	Kolona							
0,1 % HCOOH ve vodě a acetonitrilu	Atlantis HILIC Silica		Ascentis Express RP-Amide		Waters XBridge		Chromolith Performance Si	
podíl vodné fáze (%)	<i>k</i> GGC	<i>k</i> GSH	<i>k</i> GGC	<i>k</i> GSH	<i>k</i> GGC	<i>k</i> GSH	<i>k</i> GGC	<i>k</i> GSH
20	3,11	3,15	-	-	0,92	0,99	0,83	0,87
18	3,25	3,69	-	-	0,90	1,14	0,99	1,13
16	5,08	5,32	-	-	1,17	1,40	1,35	1,52
14	7,14	7,51	-	-	1,51	2,18	1,91	2,14
12	10,61	11,21	-	-	2,02	3,14	2,87	3,22
10	-	-	-	-	3,05	4,84	-	-
5 mmol/l NH₄HCO₃ ve vodě a acetonitril	Atlantis HILIC Silica		Ascentis Express RP-Amide		Waters XBridge		Chromolith Performance Si	
podíl vodné fáze (%)	<i>k</i> GGC	<i>k</i> GSH	<i>k</i> GGC	<i>k</i> GSH	<i>k</i> GGC	<i>k</i> GSH	<i>k</i> GGC	<i>k</i> GSH
20	0,17	0,28	-	-	0,13	0,14	0,47	0,60
18	0,26	0,31	-	-	0,13	0,15	0,13	0,18
16	-	-	-	-	0,30	0,44	0,16	0,21
14	0,36	0,39	-	-	0,53	0,71	0,68	0,97
12	-	-	-	-	0,76	1,84	0,39	1,20
10	-	-	-	-	2,49	4,72	1,67	3,30
10 mmol/l NH₄HCO₃ ve vodě a acetonitril	Atlantis HILIC Silica		Ascentis Express RP-Amide		Waters XBridge		Chromolith Performance Si	
podíl vodné fáze (%)	<i>k</i> GGC	<i>k</i> GSH	<i>k</i> GGC	<i>k</i> GSH	<i>k</i> GGC	<i>k</i> GSH	<i>k</i> GGC	<i>k</i> GSH
20	-	-	-	-	0,27	0,42	0,13	0,22
18	-	-	-	-	0,28	0,35	0,08	0,20
16	-	-	-	-	0,48	0,67	0,14	0,28
14	-	-	-	-	0,69	1,26	0,33	0,76
12	-	-	-	-	1,42	2,67	0,89	1,69
10	-	-	-	-	3,42	6,03	2,22	4,06
20 mmol/l NH₄HCO₃ ve vodě a acetonitril	Atlantis HILIC Silica		Ascentis Express RP-Amide		Waters XBridge		Chromolith Performance Si	
podíl vodné fáze (%)	<i>k</i> GGC	<i>k</i> GSH	<i>k</i> GGC	<i>k</i> GSH	<i>k</i> GGC	<i>k</i> GSH	<i>k</i> GGC	<i>k</i> GSH
20	-	-	-	-	0,57	0,80	0,09	0,18
18	-	-	-	-	0,56	0,76	0,37	0,61
16	-	-	-	-	0,77	1,24	0,70	1,15
14	-	-	-	-	1,36	2,20	1,22	2,01
12	-	-	-	-	2,55	4,04	2,22	3,71
10	-	-	-	-	5,07	8,60	-	-

Tabulka 2: Porovnání kolon a mobilních fází dle hodnot retenčních faktorů pro standardy GGC a GSH rozpuštěné ve směsi acetonitril/voda, 9:1, (v/v)

Mobilní fáze	Kolona									
5 mmol/l HCOONH ₄ ve vodě a 0,2 % HCOOH ve vodě a acetonitrilu	Atlantis HILIC Silica		Ascentis Express RP-Amide		Waters XBridge		Chromolith Performance Si		ZIC-HILIC	
	<i>k</i> GGC	<i>k</i> GSH	<i>k</i> GGC	<i>k</i> GSH	<i>k</i> GGC	<i>k</i> GSH	<i>k</i> GGC	<i>k</i> GSH	<i>k</i> GGC	<i>k</i> GSH
podíl vodné fáze (%)										
20	2,60	2,85	-0,12	-0,12	1,38	1,51	0,96	1,04	0,87	1,16
18	3,77	4,17	0,07	0,03	1,93	2,12	1,35	1,51	1,00	1,38
16	5,98	6,79	0,58	0,53	2,90	3,08	2,12	2,41	2,74	4,05
14	10,43	12,04	0,97	0,97	4,75	5,10	3,68	4,30	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5 mmol/l NH ₄ HCO ₃ ve vodě a acetonitril	Atlantis HILIC Silica		Ascentis Express RP-Amide		Waters XBridge		Chromolith Performance Si		ZIC-HILIC	
	<i>k</i> GGC	<i>k</i> GSH	<i>k</i> GGC	<i>k</i> GSH	<i>k</i> GGC	<i>k</i> GSH	<i>k</i> GGC	<i>k</i> GSH	<i>k</i> GGC	<i>k</i> GSH
podíl vodné fáze (%)										
20	-0,11	0,11	-0,18	-0,16	0,02	0,05	0,06	0,08	0,99	1,29
18	0,09	0,17	-0,17	-0,10	0,04	0,07	0,13	0,19	0,98	1,27
16	0,17	0,43	-0,18	-0,01	0,07	0,19	0,08	0,16	1,44	2,04
14	0,46	0,98	0,01	0,02	0,22	0,51	0,93	1,24	2,61	3,79
12	1,06	2,10	0,07	0,33	0,62	1,14	0,90	1,41	5,30	7,99
10	3,00	5,83	1,12	2,13	1,63	2,67	1,93	3,65	12,53	19,33
8	-	-	-	-	5,73	9,29	-	-	-	-
0,05 % TFA ve vodě a acetonitrilu	Atlantis HILIC Silica		Ascentis Express RP-Amide		Waters XBridge		Chromolith Performance Si		ZIC-HILIC	
	<i>k</i> GGC	<i>k</i> GSH	<i>k</i> GGC	<i>k</i> GSH	<i>k</i> GGC	<i>k</i> GSH	<i>k</i> GGC	<i>k</i> GSH	<i>k</i> GGC	<i>k</i> GSH
podíl vodné fáze (%)										
20	0,10	0,12	-0,09	-0,09	0,30	0,36	0,11	0,14	0,78	1,06
18	0,11	0,17	-0,10	-0,10	0,33	0,38	0,08	0,11	0,61	0,82
16	0,14	0,21	-0,11	-0,11	0,34	0,42	0,09	0,13	0,64	0,90
14	0,18	0,27	-0,10	-0,10	0,40	0,47	0,10	0,14	0,71	1,06
12	0,24	0,34	-0,10	-0,10	0,50	0,65	0,11	0,15	0,90	1,46
10	0,33	0,45	-0,11	-0,11	0,58	0,77	0,13	0,17	1,24	2,43
8	-	-	-	-	0,75	0,95	0,15	0,20	3,39	6,11
6	-	-	-	-	1,07	1,45	0,17	0,10	5,06	9,90
4	-	-	-	-	1,82	2,33	0,21	0,32	10,04	-
2	-	-	-	-	2,89	3,92	0,31	0,43	15,33	-

Tabulka 3: Retenční faktory pro kolonu SUPELCOSIL, standardy GGC a GSH rozpuštěny ve směsi acetonitril/voda, 9:1, (v/v)

Supelcosil	5 mmol/l HCOONH ₄ ve vodě a 0,2 % HCOOH ve vodě a acetonitrilu		5 mmol/l NH ₄ HCO ₃ ve vodě a acetonitril		0,05 % TFA ve vodě a acetonitrilu	
	<i>k</i> GGC	<i>k</i> GSH	<i>k</i> GGC	<i>k</i> GSH	<i>k</i> GGC	<i>k</i> GSH
50	0,06	0,12	-0,14	-0,10	0,67	0,68
40	0,14	0,25	0,06	0,07	0,81	0,84
30	0,48	0,73	0,17	0,34	1,03	1,11
28	0,60	0,87	0,24	0,44	1,07	1,18
26	0,82	1,10	0,37	0,69	-	-
24	1,11	1,49	0,64	1,09	-	-
22	1,63	2,21	0,95	1,59	-	-
20	2,25	3,12	1,64	2,74	-	-

Tabulka 4: Parametry regresních přímek závislosti logaritmu isokratického retenčního faktoru ($\log k_i$) na logaritmu procentuální koncentrace vodné fáze v mobilní fázi ($\log \phi$) na kolonách ZIC-HILIC a Chromolith Performance Si vypočtené pro GGC, GSH, Cys, Gly, Glu, cystin a GSSG

ZIC-HILIC; MF s 0,05 % TFA ve vodě/acetonitrilu							
	GGC	GSH	Cys	Gly	Glu	Cystin	GSSG
směrnice	-1,5924	-2,1888	-0,8246	-0,8288	-1,3540	-2,6278	-4,1071
úsek	1,8927	2,7346	0,8275	0,9361	1,7090	3,9124	5,9060
R ²	0,9660	0,9963	0,9618	0,9828	0,9686	0,9941	0,9878
ZIC-HILIC; MF s 0,1 % DFA ve vodě/acetonitrilu							
	GGC	GSH	Cys	Gly	Glu	Cystin	GSSG
směrnice	-1,4413	-2,6568	-1,3134	-2,2321	-2,0054	-	-
úsek	1,9194	3,5767	1,6952	2,9309	2,7488	-	-
R ²	0,9759	0,9884	0,9822	0,9853	0,9931	-	-
Chromolith Performance Si; MF s 2,5 mmol/l NH ₄ HCO ₃ ve vodě/acetonitrilu							
	GGC	GSH	Cys	Gly	Glu	Cystin	GSSG
směrnice	-4,8601	-5,0495	-2,0841	-3,0257	-4,1881	-2,3678	-8,4163
úsek	5,2451	5,7062	2,3668	4,2491	4,7066	3,3264	10,2754
R ²	0,9862	0,9963	0,9750	0,9880	0,9929	0,8857	0,9863
Chromolith Performance Si; MF s 5 mmol/l NH ₄ HCO ₃ ve vodě a 0,2 % HCOOH v acetonitrilu							
	GGC	GSH	Cys	Gly	Glu	Cystin	GSSG
směrnice	-2,6490	-2,8703	-2,2364	-2,6757	-2,4785	-	-
úsek	3,3633	3,6615	2,8035	3,5624	3,1052	-	-
R ²	0,9969	0,9919	0,9910	0,9965	0,9909	-	-
Chromolith Performance Si; MF s 5 mmol/l NH ₄ HCO ₃ ve vodě a 0,1 % HCOOH v acetonitrilu							
	GGC	GSH	Cys	Gly	Glu	Cystin	GSSG
směrnice	-2,8563	-2,7922	-2,2425	-2,6587	-2,5113	-	-
úsek	3,6653	3,6191	2,8341	3,5846	3,1836	-	-
R ²	0,9974	0,9992	0,9939	0,9967	0,9933	-	-

Chromolith Performance Si; MF s 5 mmol/l NH ₄ HCO ₃ ve vodě a acetonitril							
	GGC	GSH	Cys	Gly	Glu	Cystin	GSSG
směrnice	-4,7125	-5,3842	-2,3757	-2,8048	-3,8979	-2,9127	-6,3589
úsek	4,8273	5,8087	2,9365	3,9361	4,1965	4,1172	7,4646
R ²	0,9812	0,9730	0,9875	0,9986	0,9841	0,9705	0,9878
Chromolith Performance Si; 10 mmol/l NH ₄ HCO ₃ ve vodě a 5 mmol/l NH ₄ HCO ₃ s 5 % vody v acetonitrilu							
	GGC	GSH	Cys	Gly	Glu	Cystin	GSSG
směrnice	-4,6540	-4,7856	1,2402	-2,1294	-4,0196	-2,5579	-
úsek	4,9558	5,2998	1,4300	3,0043	4,4660	3,5161	-
R ²	0,9715	0,9830	0,9938	0,9978	0,9753	0,9980	-

Tabulka 5: Retenční faktory GGC, GSH, Cys, Gly, Glu, cystinu a GSSG pro různé mobilní fáze na koloně ZIC-HILIC

ZIC-HILIC; MF s 0,05 % TFA ve vodě/acetonitrilu							
% vodné fáze v MF	<i>k</i> GGC	<i>k</i> GSH	<i>k</i> Cys	<i>k</i> Gly	<i>k</i> Glu	<i>k</i> Cystin	<i>k</i> GSSG
20	0,63	0,86	0,57	0,73	0,86	3,39	3,92
18	0,70	0,93	0,62	0,73	0,89	3,88	5,19
16	0,84	1,18	0,62	0,83	1,07	5,39	8,83
14	1,06	1,60	0,71	0,96	1,34	7,77	16,53
12	1,45	2,25	0,84	1,14	1,77	11,93	-
10	2,12	3,58	1,01	1,36	2,43	19,90	-
8	3,32	5,97	1,26	1,62	3,51	-	-
6	6,21	11,95	1,75	2,07	5,79	-	-
4	11,55	24,27	2,69	2,48	9,85	-	-
2	17,11	-	3,05	2,87	14,29	-	-
ZIC-HILIC; MF s 0,1 % DFA ve vodě/acetonitrilu							
% vodné fáze v MF	<i>k</i> GGC	<i>k</i> GSH	<i>k</i> Cys	<i>k</i> Gly	<i>k</i> Glu	<i>k</i> Cystin	<i>k</i> GSSG
20	1,10	1,53	1,00	1,29	1,53	-	-
18	1,13	1,66	1,04	1,32	1,65	-	-
16	1,51	2,19	1,24	1,62	2,01	-	-
14	1,96	3,15	1,60	2,09	2,65	-	-
12	2,44	4,86	1,85	2,97	3,73	-	-
10	3,57	9,31	2,80	5,56	6,18	-	-
8	3,96	15,04	3,24	7,89	8,71	-	-
6	5,73	-	4,38	16,78	15,12	-	-

Tabulka 6: Retenční faktory GGC, GSH, Cys, Gly, Glu, cystinu a GSSG pro různé mobilní fáze na koloně Chromolith Performance Si

Chromolith Performance Si; MF s 2,5 mmol/l NH₄HCO₃ ve vodě/acetonitrilu							
% vodné fáze v MF	k GGC	k GSH	k Cys	k Gly	k Glu	k Cystin	k GSSG
20	-0,01	0,13	0,74	1,90	0,21	2,41	0,17
19	0,10	0,19	0,67	2,52	0,22	1,76	0,36
18	0,18	0,21	0,74	2,93	0,28	2,05	0,61
17	0,19	0,29	0,79	3,41	0,35	2,59	0,86
16	0,21	0,43	0,92	4,06	0,47	2,58	1,39
15	0,30	0,64	1,09	4,88	0,52	3,13	2,33
14	0,43	0,90	1,26	5,89	0,74	3,98	3,97
13	0,66	1,25	1,52	-	1,09	5,15	-
12	1,00	1,87	1,76	-	1,63	6,73	-
11	1,55	2,62	2,07	-	2,30	-	-
10	2,69	4,34	2,85	-	3,44	-	-
Chromolith Performance Si; MF s 5 mmol/l NH₄HCO₃ ve vodě a 0,2 % HCOOH v acetonitrilu							
% vodné fáze v MF	k GGC	k GSH	k Cys	k Gly	k Glu	k Cystin	k GSSG
20	0,85	0,90	0,83	1,25	0,81	3,62	3,67
18	1,03	1,10	0,96	1,57	0,95	5,30	5,99
16	1,47	1,56	1,24	2,12	1,26	-	-
14	2,18	2,26	1,72	3,09	1,82	-	-
12	3,16	3,85	2,54	4,86	2,80	-	-
Chromolith Performance Si; MF s 5 mmol/l NH₄HCO₃ ve vodě a 0,1 % HCOOH v acetonitrilu							
% vodné fáze v MF	k GGC	k GSH	k Cys	k Gly	k Glu	k Cystin	k GSSG
20	0,90	0,96	0,85	1,37	0,85	3,83	3,97
18	1,22	1,32	1,05	1,79	1,09	5,74	6,73
16	1,60	1,77	1,29	2,30	1,36	-	-
14	2,50	2,66	1,80	3,40	1,98	-	-
12	3,86	4,01	2,68	5,34	3,09	-	-
Chromolith Performance Si; MF s 5 mmol/l NH₄HCO₃ ve vodě a acetonitril							
% vodné fáze v MF	k GGC	k GSH	k Cys	k Gly	k Glu	k Cystin	k GSSG
20	-0,04	0,04	0,80	1,91	0,15	2,29	0,18
18	0,01	0,18	0,91	2,66	0,22	2,69	0,29
16	0,18	0,21	1,12	3,62	0,33	3,83	0,51
14	0,22	0,49	1,49	5,23	0,39	6,38	1,61
12	0,46	1,05	2,17	-	0,86	-	4,24
10	1,33	2,61	3,63	-	2,07	-	-
8	4,10	7,87	6,82	-	5,47	-	-
Chromolith Performance Si; MF s 5 mmol/l NH₄HCO₃ ve vodě a acetonitril							
% vodné fáze v MF	k GGC	k GSH	k Cys	k Gly	k Glu	k Cystin	k GSSG
16	-0,04	0,04	0,80	1,91	0,15	2,29	0,18
14	0,01	0,18	0,91	2,66	0,22	2,69	0,29
12	0,18	0,21	1,12	3,62	0,33	3,83	0,51

Tabulka 7: Přehled testovaných gradientových analýz na koloně ZIC-HILIC

Gradient	ϕ_p (%) vodné fáze	ϕ_k (%) vodné fáze	t_g (min)	V_g (ml)	B (ml⁻¹)
1	8	20	10	4	3,33
			15	6	2,22
			20	8	1,67
2	10	20	10	4	2,78
			15	6	1,85
			20	8	1,39
3	12	20	10	4	2,22
			15	6	1,48
			20	8	1,11
4	14	20	10	4	1,67
			15	6	1,11
			20	8	0,83
5	8	18	10	4	2,78
			15	6	1,85
			20	8	1,39
6	8	16	10	4	2,22
			15	6	1,48
			20	8	1,11
7	10	16	10	4	1,67
			15	6	1,11
			20	8	0,83
8	10	14	10	4	1,11
			15	6	0,74
			20	8	0,56
9	12	18	10	4	1,67
			15	6	1,11
			20	8	0,83
10	12	22	10	4	2,78
			15	6	1,85
			20	8	1,39
11	11	22	15	6	2,04
12	13	22	15	6	1,67
13	12	24	15	6	2,22
			10	4	3,33

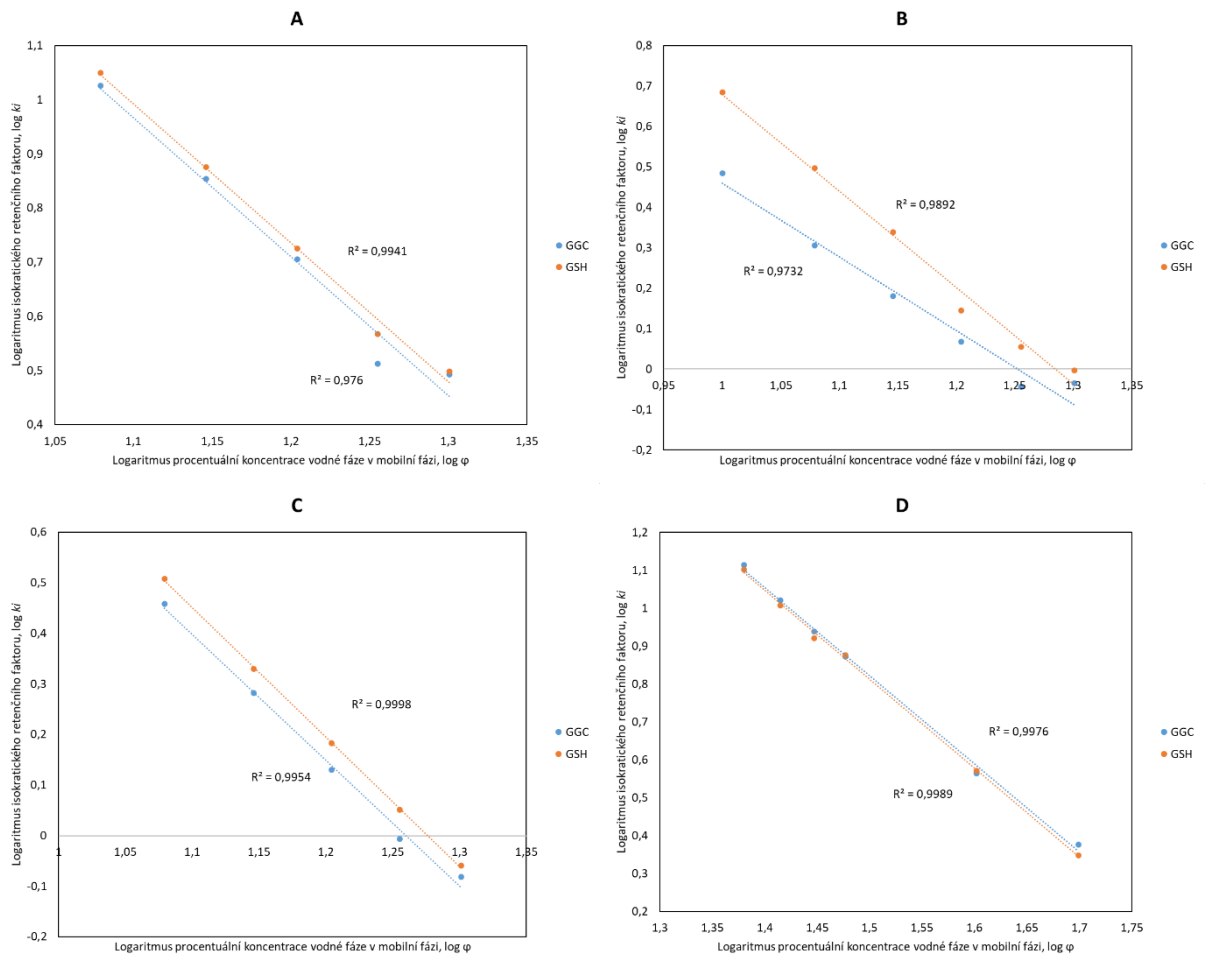
Tabulka 8: Přehled retenčních časů GGC, GSH, Cys, Gly, Glu, cystinu a GSSG u gradientových analýz

Gradient	t_g (min)	t_r Gly	t_r Cys	t_r Glu	t_r Cystin	t_r GGC	t_r GSH	t_r GSSG
1	10	2,35	2,01	3,90	-	3,73	5,17	-
	15	2,36	2,01	3,95	12,35	3,81	5,37	-
	20	2,35	2,02	3,97	13,70	3,81	5,49	18,79
2	10	2,08	1,78	2,99	9,43	2,69	3,86	-
	15	2,08	1,78	2,98	10,62	2,69	3,87	14,64
	20	2,10	1,79	3,02	11,56	2,72	3,93	17,00
3	10	1,90	1,64	2,46	8,20	2,17	2,90	-
	15	1,89	1,65	2,44	8,78	2,15	2,89	12,79
	20	1,90	1,64	2,46	9,20	2,17	2,90	14,25
4	10	1,75	1,53	2,03	6,72	1,83	2,30	9,30
	15	1,75	1,54	2,09	6,96	1,84	2,30	10,31
	20	1,74	1,54	2,09	7,12	1,84	2,30	10,99
5	10	2,35	2,02	3,91	-	3,73	5,24	-
	15	2,36	2,09	3,96	13,09	3,81	5,44	12,41
	20	2,35	2,01	3,94	14,57	3,80	5,52	-
6	10	2,34	2,00	3,92	-	3,73	5,32	-
	15	2,34	1,99	3,92	14,29	3,74	5,47	-
	20	2,35	2,01	3,93	15,69	3,76	5,59	16,56
7	10	2,08	1,77	3,00	-	2,70	3,89	-
	15	2,08	1,78	2,99	12,08	2,69	3,89	12,63
	20	2,08	1,77	3,00	12,84	2,70	3,89	-
8	10	2,07	1,77	2,97	-	2,67	3,84	-
	15	2,07	1,77	2,96	13,01	2,67	3,85	-
	20	2,07	1,77	2,96	13,68	2,67	3,84	15,56
9	10	1,89	1,63	2,44	8,55	2,15	2,87	-
	15	1,89	1,64	2,44	9,22	2,16	2,89	14,14
	20	1,89	1,64	2,43	9,51	2,15	2,87	15,62
10	10	1,88	1,63	2,42	7,68	2,14	2,85	-
	15	1,88	1,63	2,42	8,31	2,14	2,86	11,61
	20	1,89	1,63	2,43	8,77	2,14	2,87	12,96
11	15	1,99	1,70	2,69	9,27	2,41	3,34	12,60
12	15	1,81	1,58	2,24	7,55	1,96	2,55	10,69
13	15	1,88	1,64	2,43	8,09	2,14	2,86	10,87
	10	1,89	1,63	2,43	7,41	2,14	2,86	9,30

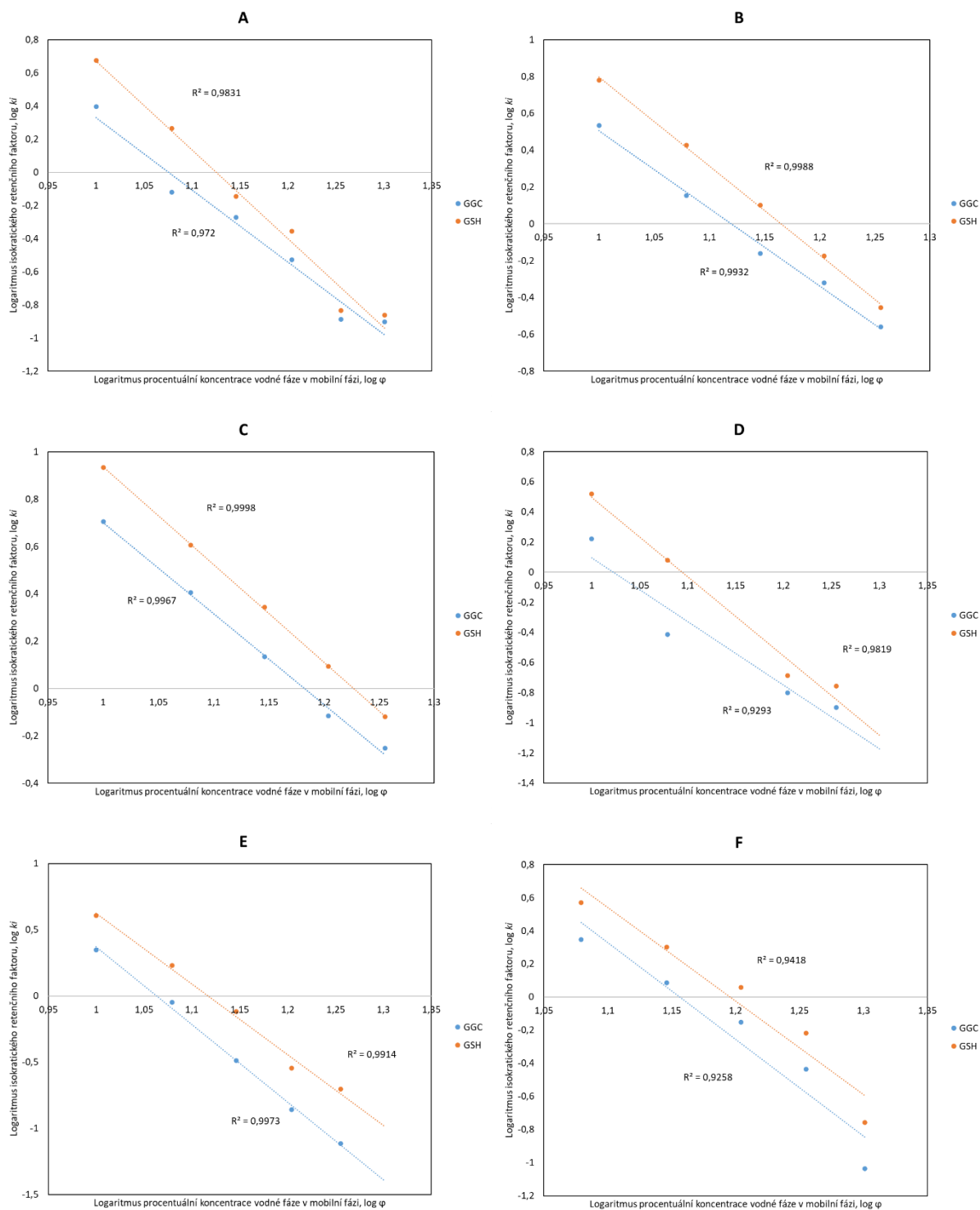
Tabulka 9: Přehled šířek píků GGC, GSH, Cys, Gly, Glu, cystinu a GSSG u gradientových analýz

Gradient	t_g (min)	w Gly	w Cys	w Glu	w Cystin	w GGC	w GSH	w GSSG
1	10	0,97	0,58	0,76	-	0,73	0,81	-
	15	1,00	0,61	0,83	0,86	0,87	0,80	-
	20	0,95	0,73	0,78	1,26	0,81	0,93	1,08
2	10	0,83	0,54	0,62	0,70	0,66	0,79	-
	15	0,83	0,54	0,62	0,70	0,66	0,79	0,78
	20	1,14	0,59	0,75	1,01	0,83	1,01	1,21
3	10	0,74	0,46	0,58	0,94	0,54	0,67	-
	15	0,71	0,52	0,56	1,00	0,60	0,66	0,91
	20	0,78	0,59	0,71	1,17	0,72	0,73	1,31
4	10	0,61	0,34	0,40	0,71	0,46	0,53	0,79
	15	0,61	0,40	0,39	0,92	0,45	0,55	1,00
	20	0,85	0,37	0,54	1,15	0,47	0,64	1,44
5	10	0,66	0,47	0,59	-	0,59	0,62	-
	15	0,78	0,51	0,56	0,78	0,73	0,70	1,79
	20	0,81	0,48	0,76	1,26	0,96	0,96	-
6	10	0,77	0,52	0,74	-	0,69	0,77	-
	15	0,76	0,60	0,73	1,03	0,76	0,77	-
	20	0,91	0,61	0,85	1,20	0,85	0,91	2,04
7	10	0,68	0,38	0,57	-	0,64	0,54	-
	15	0,81	0,47	0,66	0,97	0,57	0,59	1,69
	20	0,86	0,45	0,70	1,20	0,66	0,76	-
8	10	0,73	0,41	0,51	-	0,64	0,54	-
	15	0,72	0,46	0,57	1,10	0,57	0,71	-
	20	0,90	0,42	0,61	1,26	0,63	0,76	2,36
9	10	0,56	0,32	0,47	0,66	0,40	0,48	-
	15	0,61	0,37	0,50	1,08	0,42	0,50	0,93
	20	0,61	0,35	0,53	1,13	0,48	0,55	1,16
10	10	0,58	0,33	0,49	0,61	0,42	0,52	0,32
	15	0,61	0,35	0,49	0,72	0,42	0,55	0,78
	20	0,69	0,35	0,50	0,76	0,51	0,65	0,96
11	15	0,63	0,41	0,61	0,79	0,61	0,64	0,84
12	15	0,59	0,42	0,43	0,74	0,50	0,59	0,90
13	15	0,69	0,39	0,48	0,76	0,54	0,61	0,84
	10	0,61	0,36	0,45	0,62	0,48	0,62	0,64

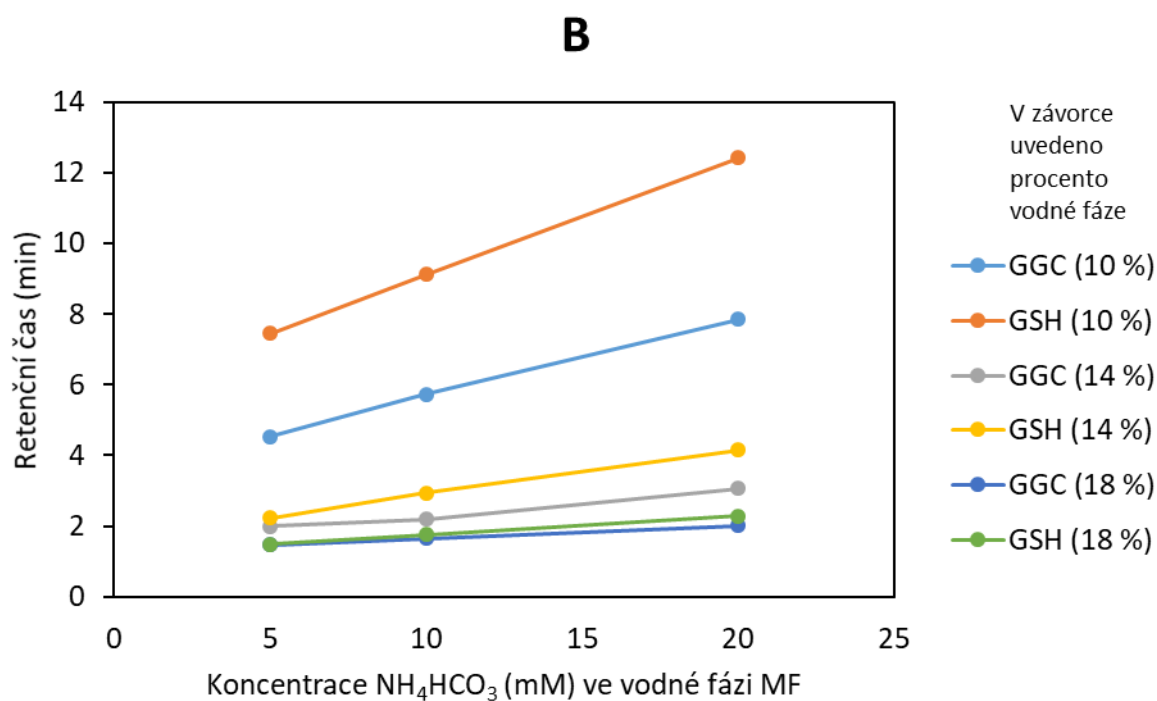
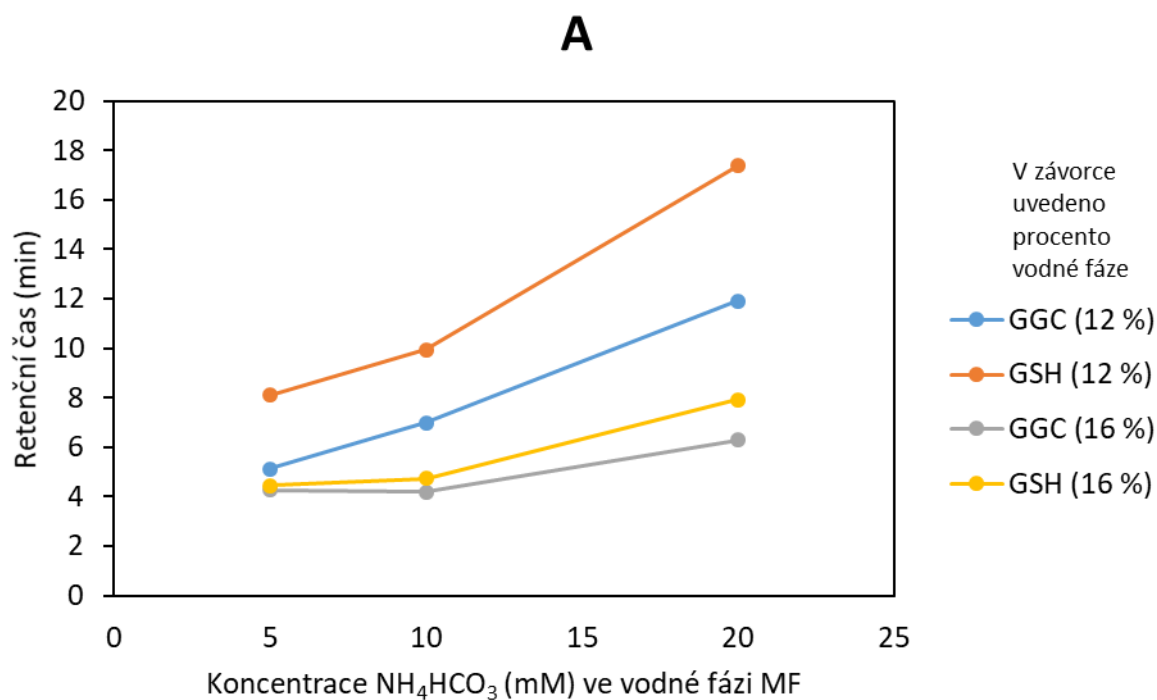
7.2 Obrázky



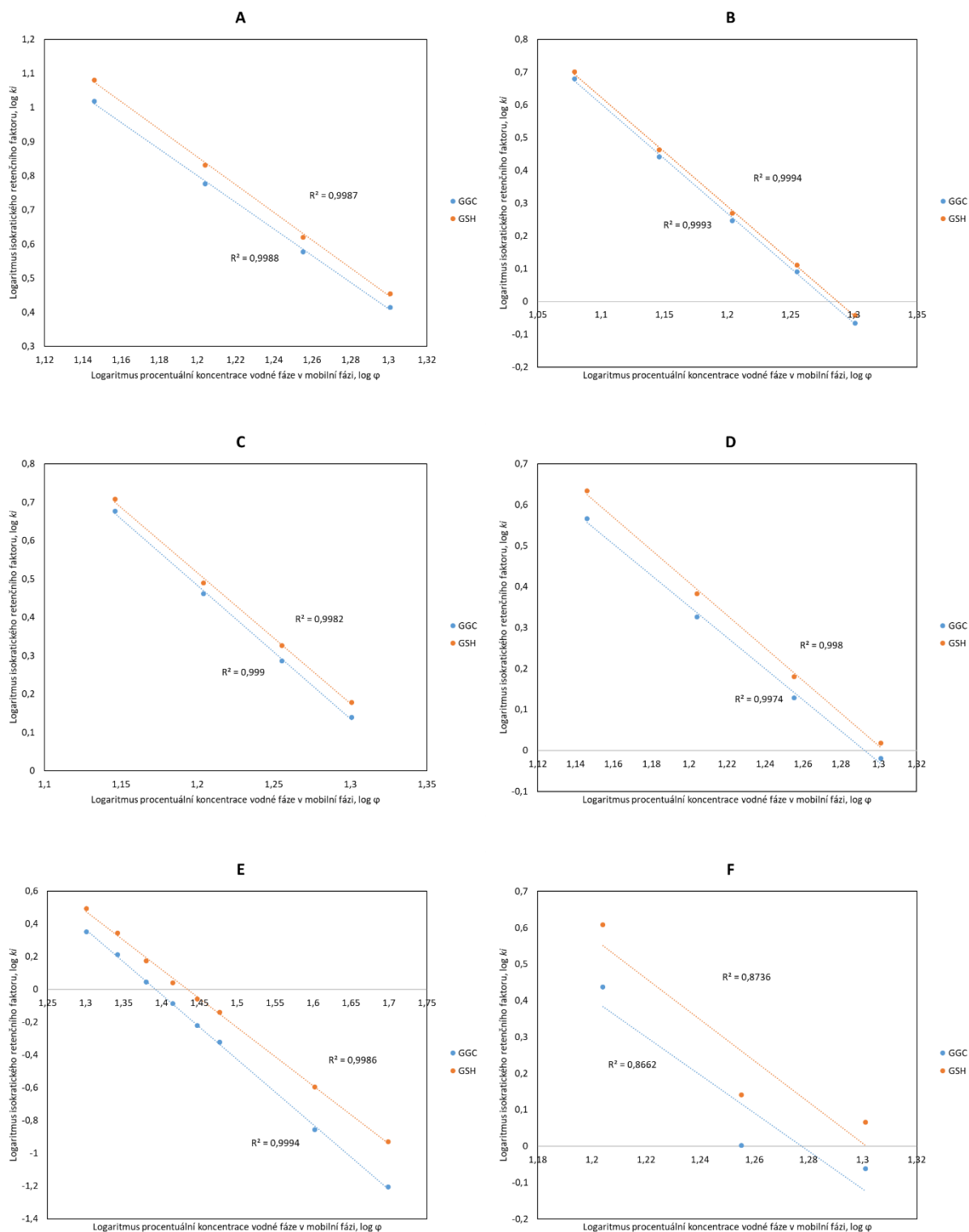
Obrázek 24: Závislost retence ($\log k'$) standardů GGC a GSH na koncentraci vody v MF ($\log \varphi$) během isokratických analýz na kolonách Atlantis HILIC Silica (A), Waters XBridge HILIC (B), Chrommolith Performance Si (C), SUPELCOSIL LC-SI (D); 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 0,1 % HCOOH ve vodě/acetonitrilu, standardy rozpuštěny ve vodě



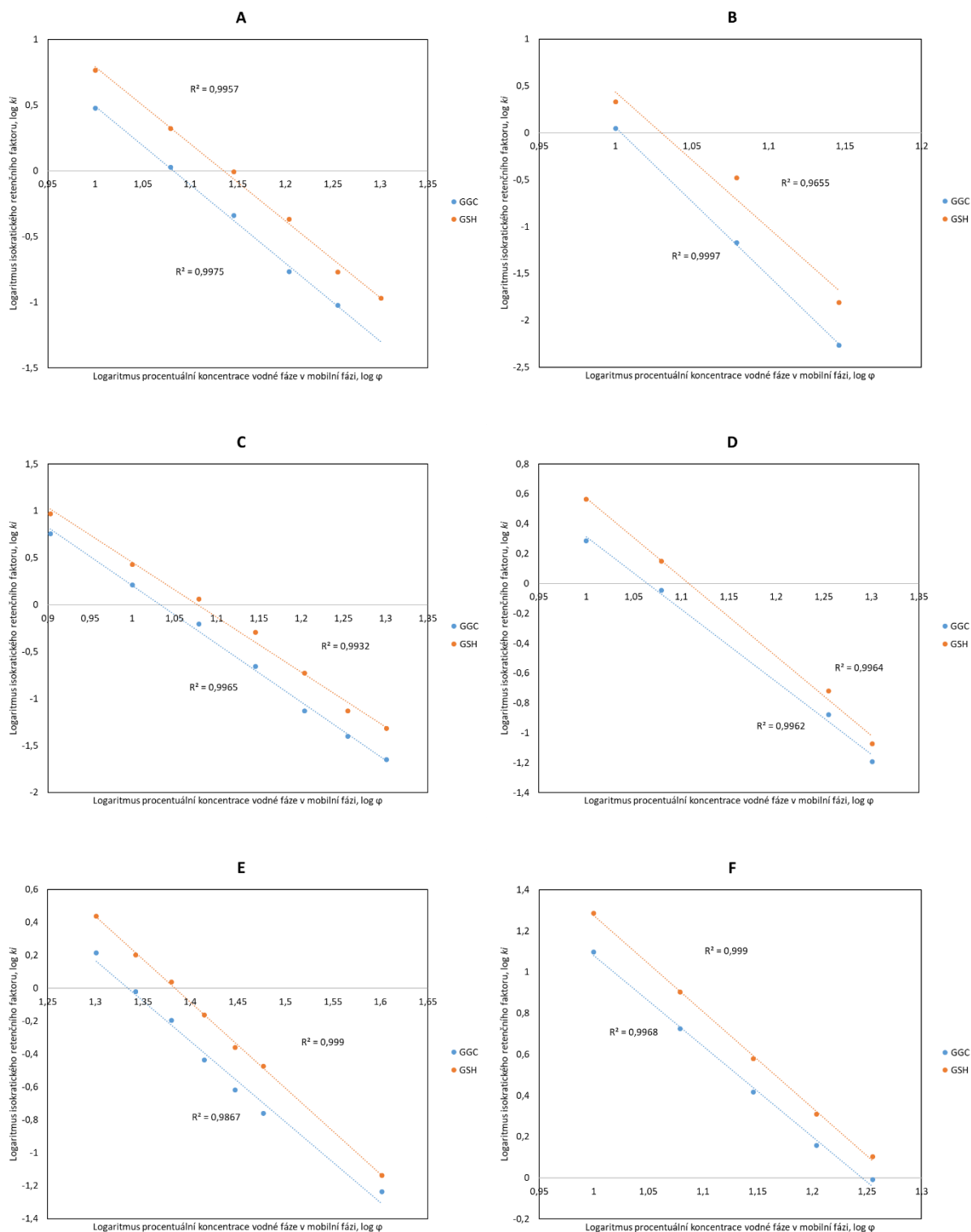
Obrázek 25: Závislost retence ($\log k_i$) standardů GGC a GSH na koncentraci vody v MF ($\log \phi$) během isokratických analýz na kolonách Waters XBridge HILIC (A, B, C) a Chrommolith Performance Si (D, E, F); 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 5 mmol/l (A, D), 10 mmol/l (B, E) a 20 mmol/l (C, F) NH_4HCO_3 ve vodě a acetonitril, standardy rozpuštěny ve vodě



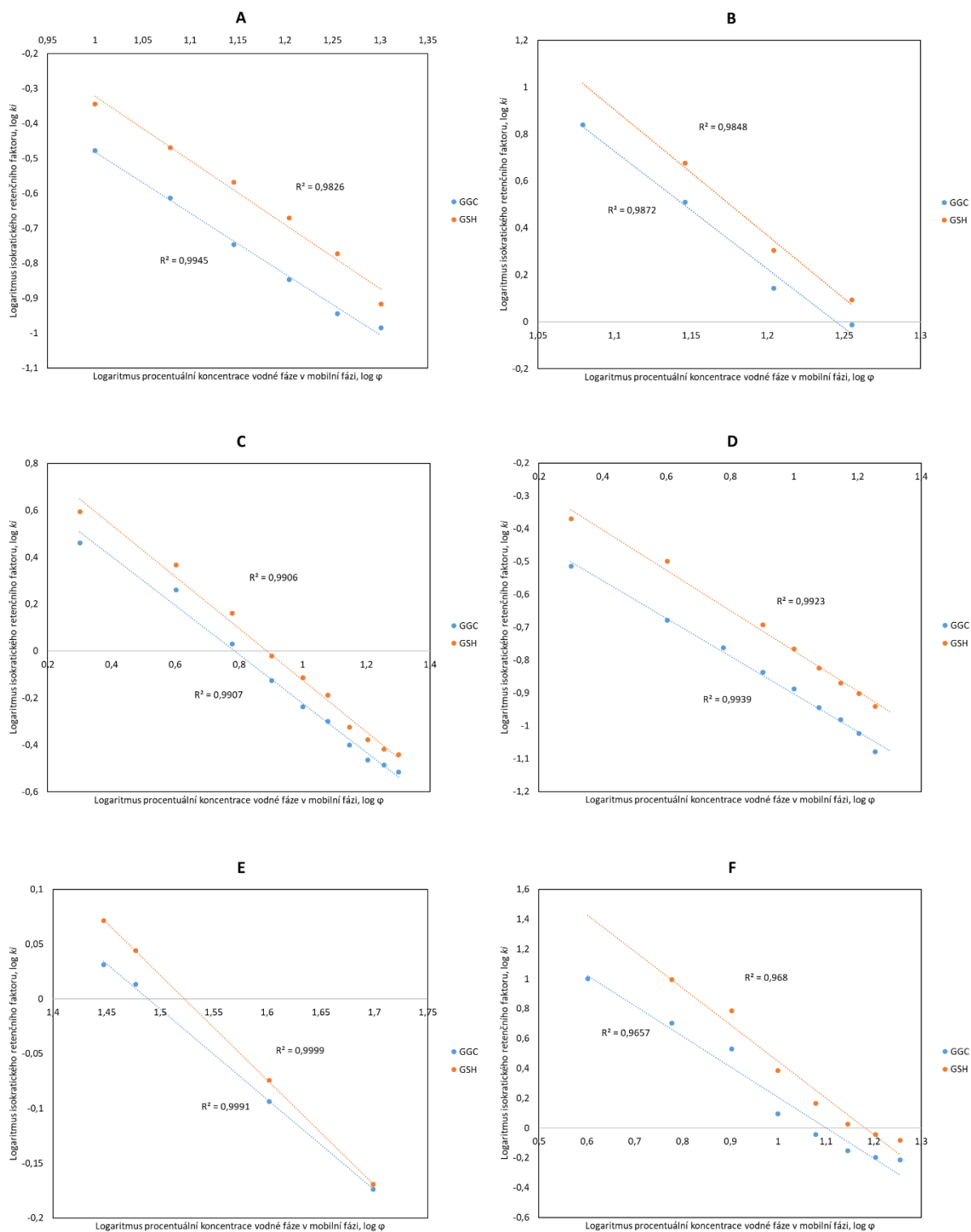
Obrázek 26: Vliv koncentrace NH_4HCO_3 ve vodné fázi MF na retenci standardů GGC a GSH na koloně Chrommolith Performance Si (A) a na koloně Waters XBridge HILIC (B); 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 5 mmol/l NH_4HCO_3 ve vodě a acetonitril, standardy rozpuštěny ve vodě



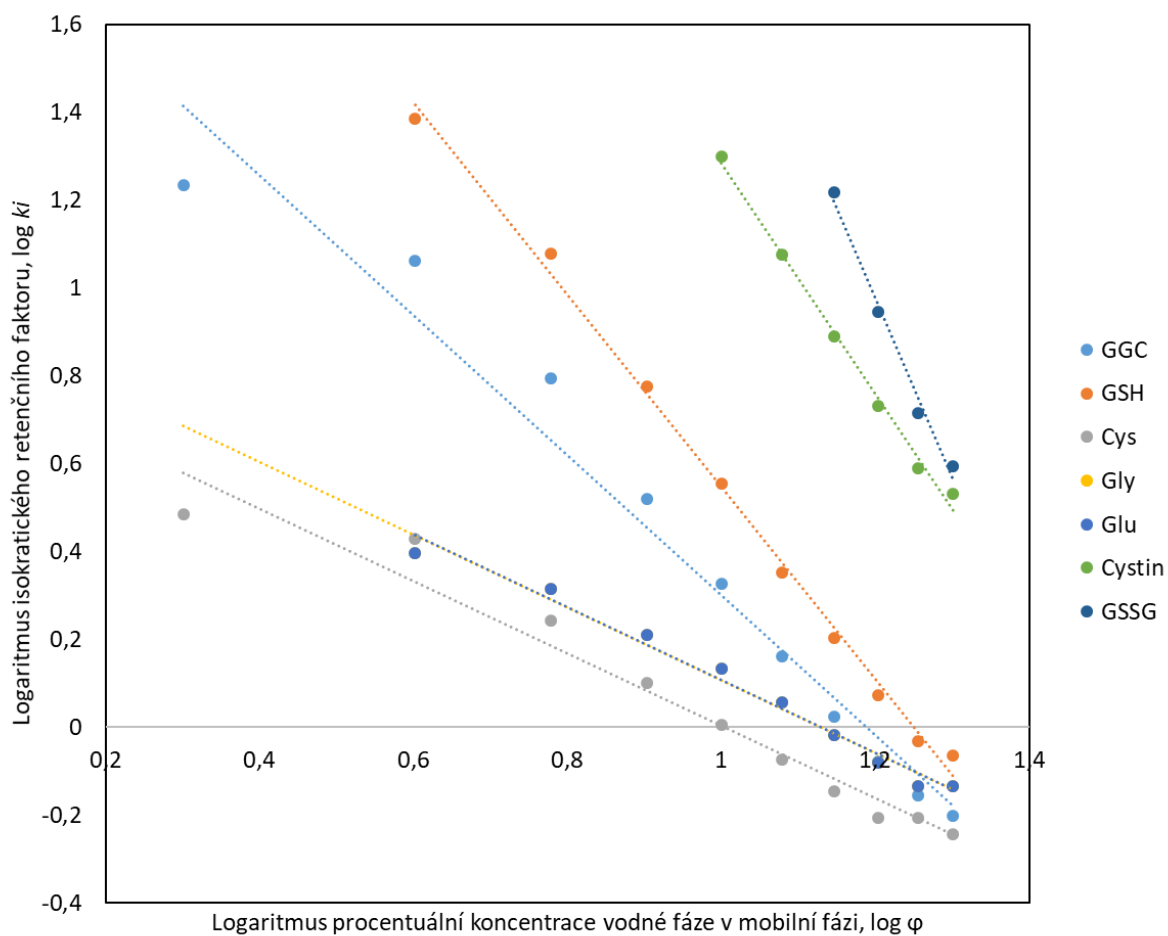
Obrázek 27: Závislost retence ($\log k_i$) standardů GGC a GSH na koncentraci vody v MF ($\log \varphi$) během isokratických analýz na kolonách Atlantis HILIC Silica (A), Chromolith Performance Si (B), Waters XBridge HILIC (C), Chromolith Performance Si (D), SUPELCOSIL LC-SI (E) a ZIC-HILIC (F); 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 5 mmol/l HCOONH₄ ve vodě a 0,2 % HCOOH ve vodě/acetonitrilu (A, C, D, E, F), MF s 5 mmol/l HCOONH₄ ve vodě a 0,1 % HCOOH ve vodě/acetonitrilu (B), standardy rozpuštěny ve směsi voda/acetonitril, 1:9, (v/v)



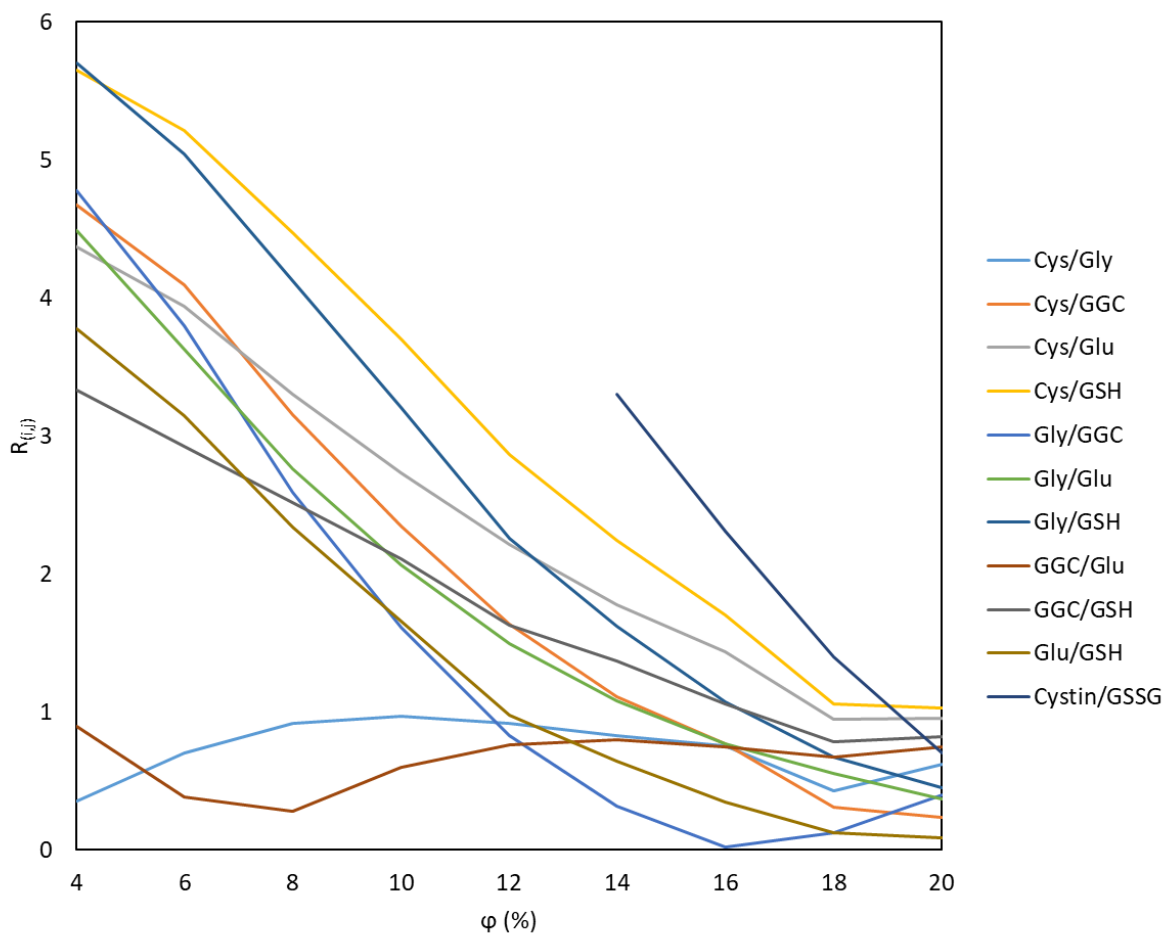
Obrázek 28: Závislost retence ($\log k_i$) standardů GGC a GSH na koncentraci vody v MF ($\log \varphi$) během isokratických analýz na kolonách Atlantis HILIC Silica (A), Ascentis Express RP-Amide (B), Waters XBridge HILIC (C), Chromolith Performance Si (D), SUPELCOSIL LC-SI (E) a ZIC-HILIC (F); 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 5 mmol/l NH_4HCO_3 ve vodě a acetonitril, standardy rozpuštěny ve směsi voda/acetonitril, 1:9, (v/v)



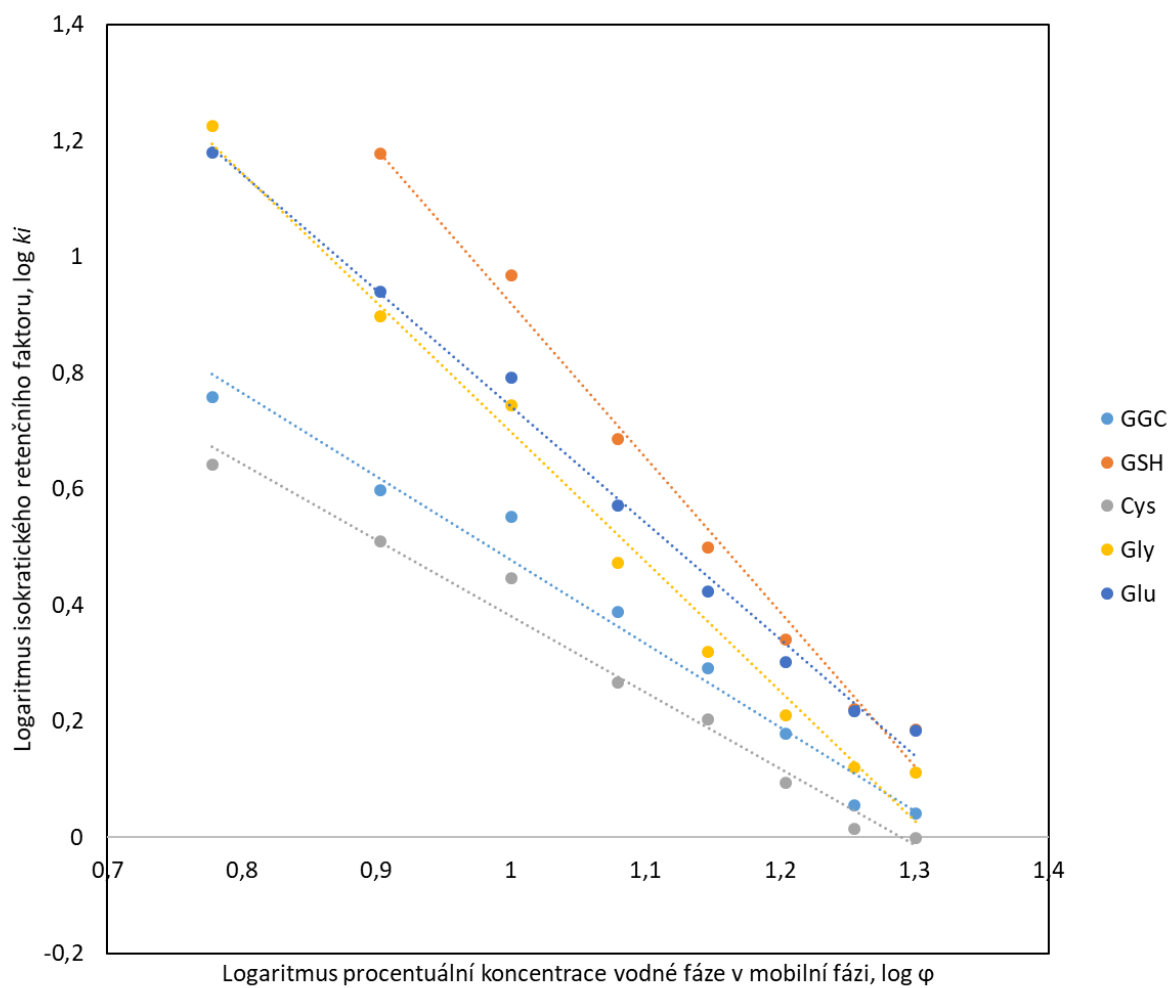
Obrázek 29: Závislost retence ($\log k_i$) standardů GGC a GSH na koncentraci vody v MF ($\log \varphi$) během isokratických analýz na kolonách Atlantis HILIC Silica (A), ZIC-HILIC (B), Waters XBridge HILIC (C), Chromolith Performance Si (D), SUPELCOSIL LC-SI (E) a ZIC-HILIC (F); 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 0,05 % TFA ve vodě/acetonitrilu (A, C, D, E, F), MF s 10 mmol/l NH_4HCO_3 ve vodě a acetonitril (B), standardy rozpuštěny ve směsi voda/acetonitril, 1:9, (v/v)



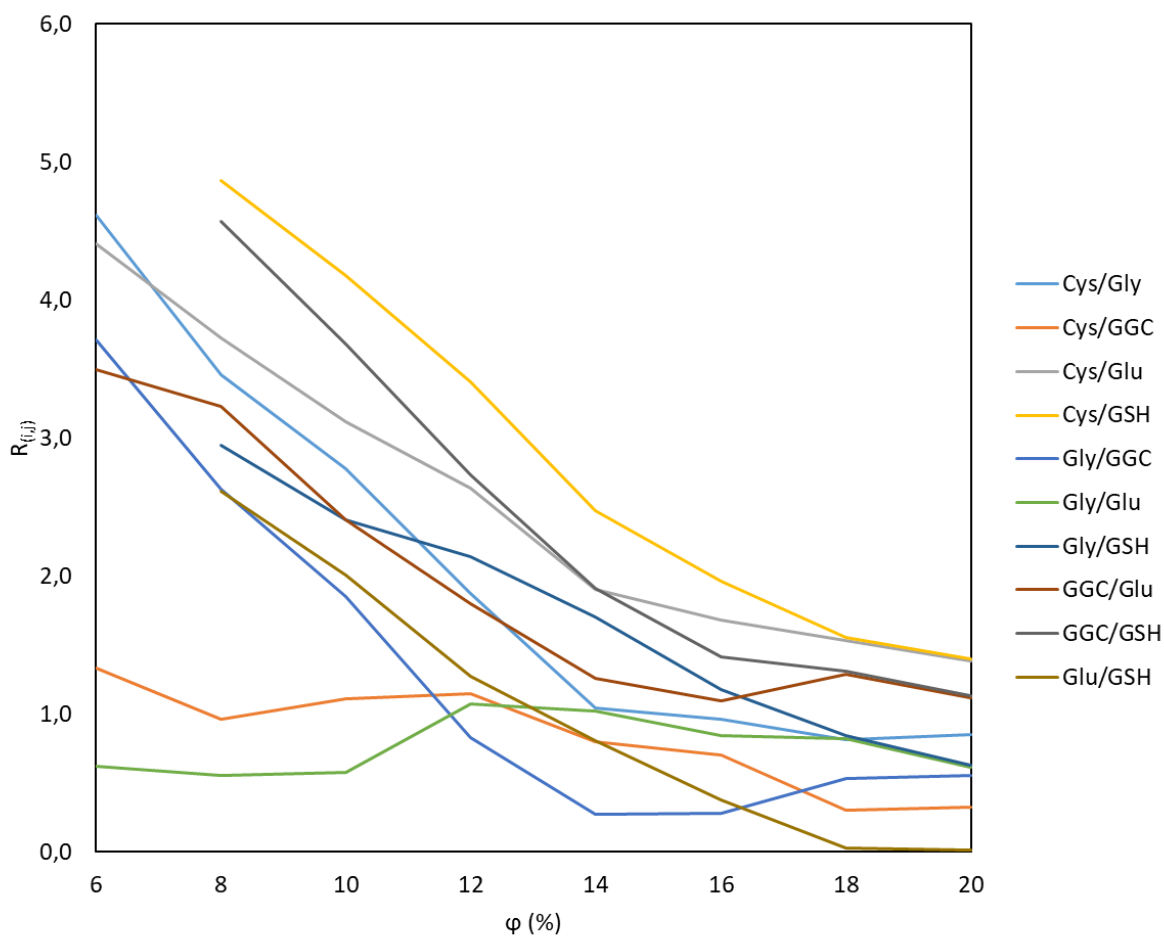
Obrázek 30: Závislost retence ($\log k_i$) standardů GGC, GSH, Cys, Gly, Glu, cystinu a GSSG na koncentraci vody v MF ($\log \phi$) během isokratických analýz na koloně ZIC-HILIC ($150 \times 2,1$ mm, $3 \mu\text{m}$), 30°C , detekce MS v módu SIM, průtok $0,4$ ml/min, MF s $0,05\%$ TFA ve vodě/acetoni-trilu, standardy rozpuštěny ve směsi voda/acetoni-tril, $1:9$, (v/v)



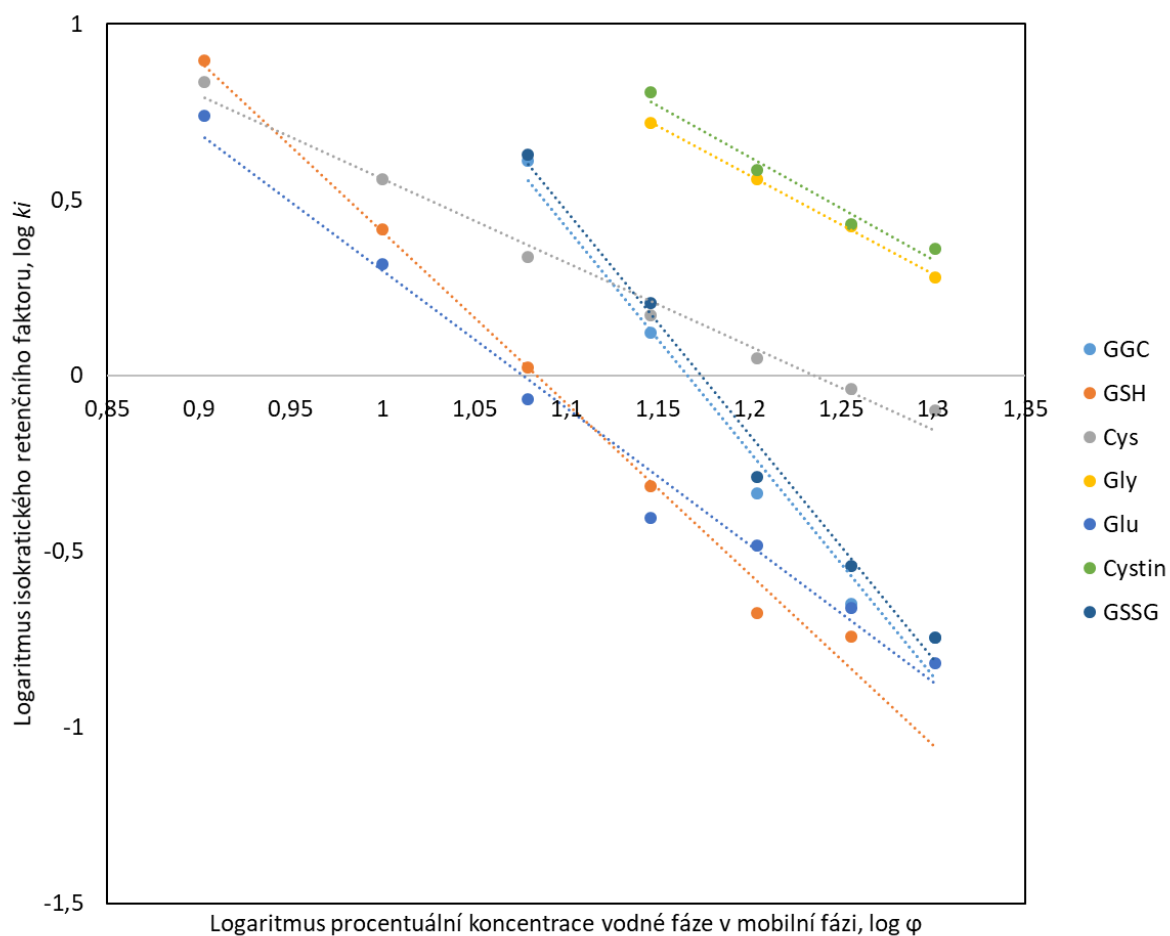
Obrázek 31: Okénkový diagram separace kritických párů GGC, GSH, Cys, Gly, Glu, cystinu a GSSG. Závislost rozlišení (R_{ij}) jednotlivých párů na koncentraci vodné fáze (φ) v MF během isokratických analýz na koloně ZIC-HILIC ($150 \times 2,1$ mm, $3 \mu\text{m}$), 30°C , detekce MS v módu SIM, průtok $0,4$ ml/min, MF s $0,05\%$ TFA ve vodě/acetonitrilu, standardy rozpuštěny ve směsi voda/acetonitril, 1:9, (v/v)



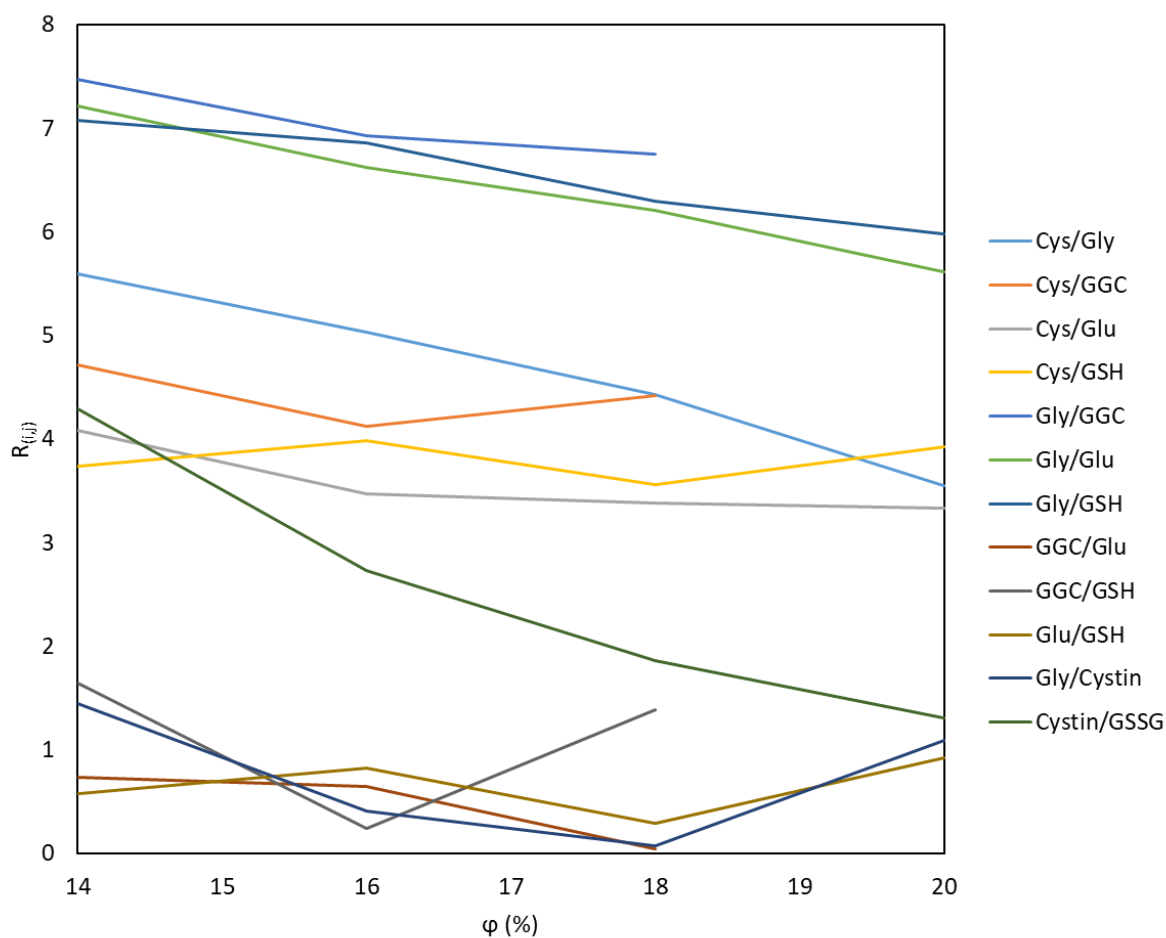
Obrázek 32: Závislost retence ($\log k_i$) standardů GGC, GSH, Cys, Gly a Glu na koncentraci vody v MF ($\log \phi$) během isokratických analýz na koloně ZIC-HILIC ($150 \times 2,1$ mm, $3 \mu\text{m}$), 30°C , detekce MS v módu SIM, průtok $0,4$ ml/min, MF s $0,1\%$ DFA ve vodě/acetonitrilu, standardy rozpuštěny ve směsi voda/acetonitril, $1:9$, (v/v)



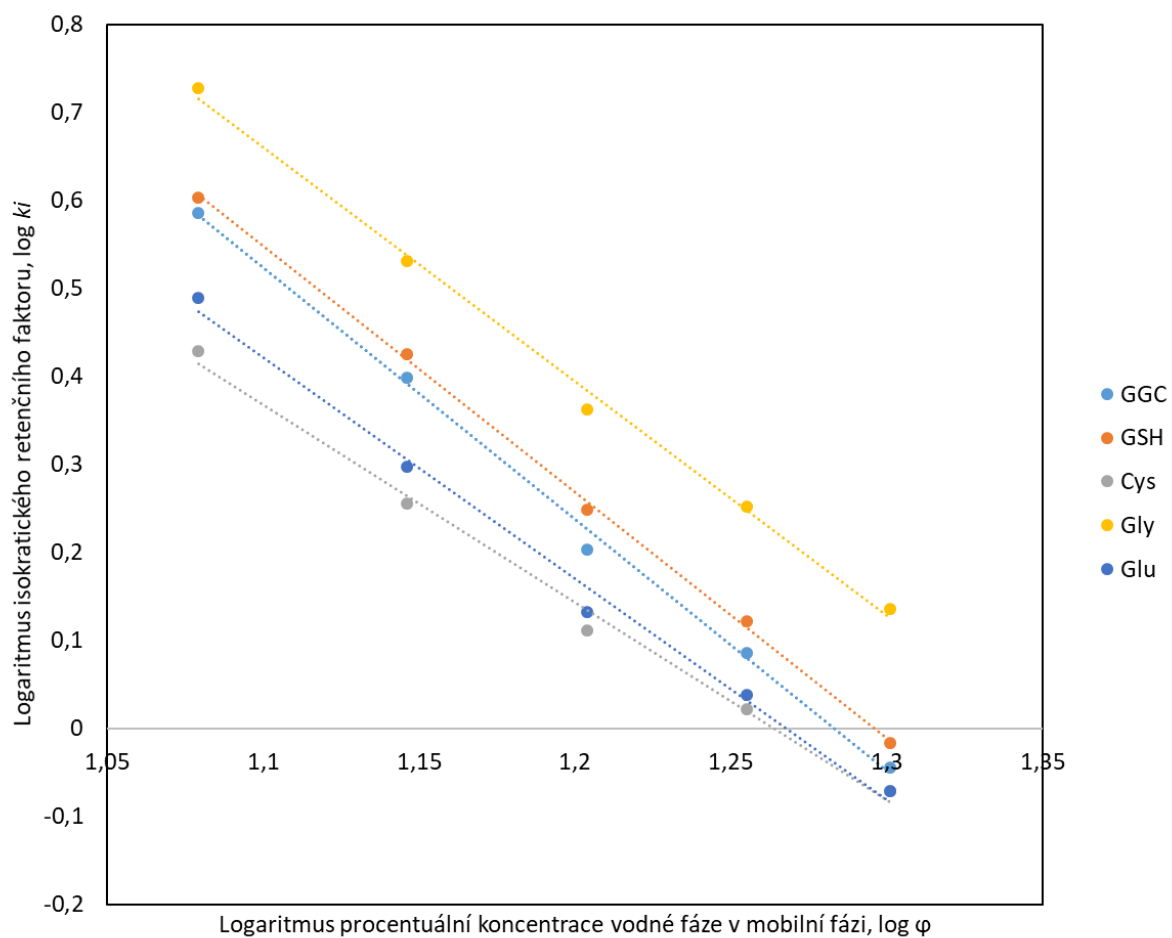
Obrázek 33: Okénkový diagram separace kritických párů GGC, GSH, Cys, Gly a Glu. Závislost rozlišení (R_{ij}) jednotlivých párů na koncentraci vodné fáze (ϕ) v MF během isokratických analýz na koloně ZIC-HILIC ($150 \times 2,1$ mm, $3 \mu\text{m}$), 30°C , detekce MS v módu SIM, průtok $0,4$ ml/min, MF s $0,1$ % DFA ve vodě/acetonitrilu, standardy rozpuštěny ve směsi voda/acetonitril, 1:9, (v/v)



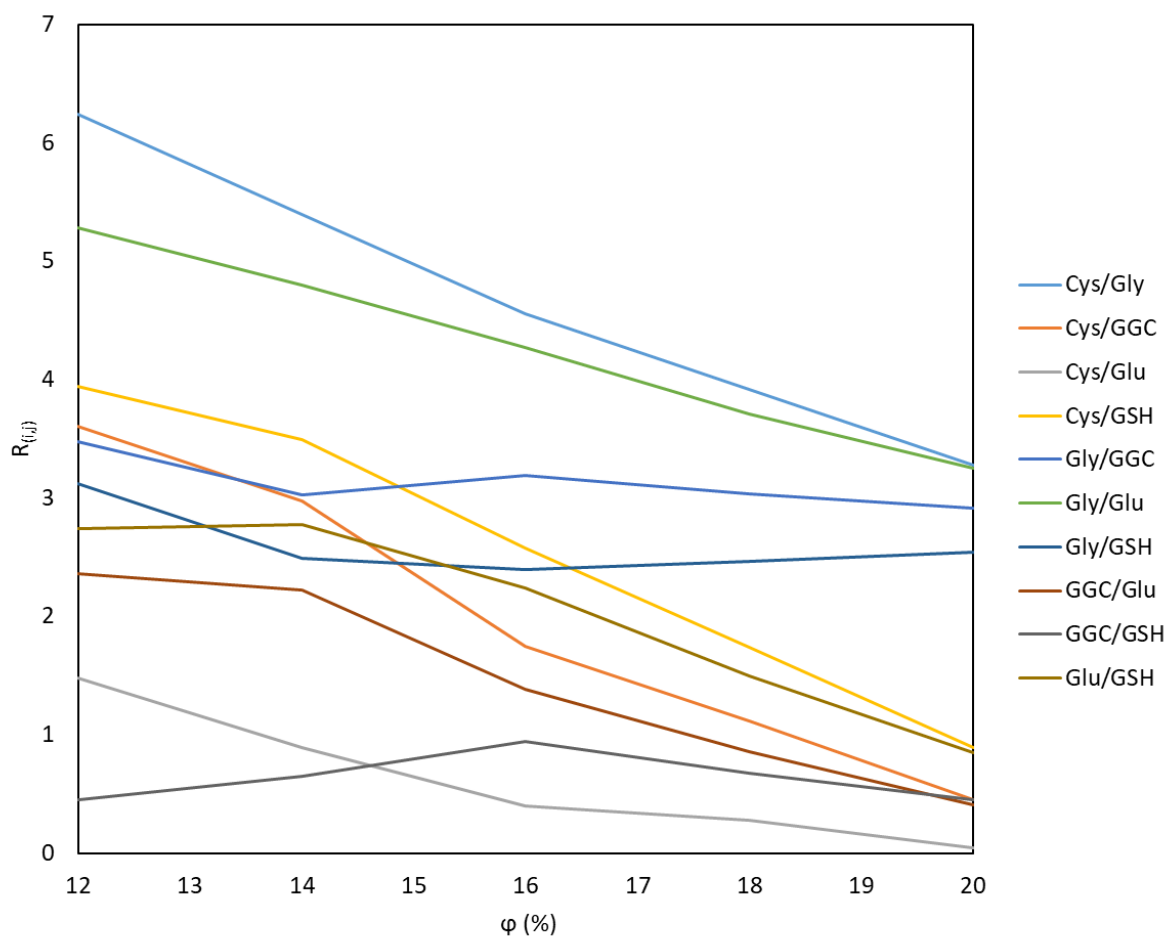
Obrázek 34: Závislost retence ($\log k_i$) standardů GGC, GSH, Cys, Gly, Glu, cystinu a GSSG na koncentraci vody v MF ($\log \varphi$) během isokratických analýz na koloně Chromolith Performance Si ($100 \times 4,6$ mm), 30°C , detekce MS v módu SIM, průtok $0,4$ ml/min, MF s 5 mmol/l NH_4HCO_3 ve vodě a acetonitril, standardy rozpuštěny ve směsi voda/acetonitril, 1:9, (v/v)



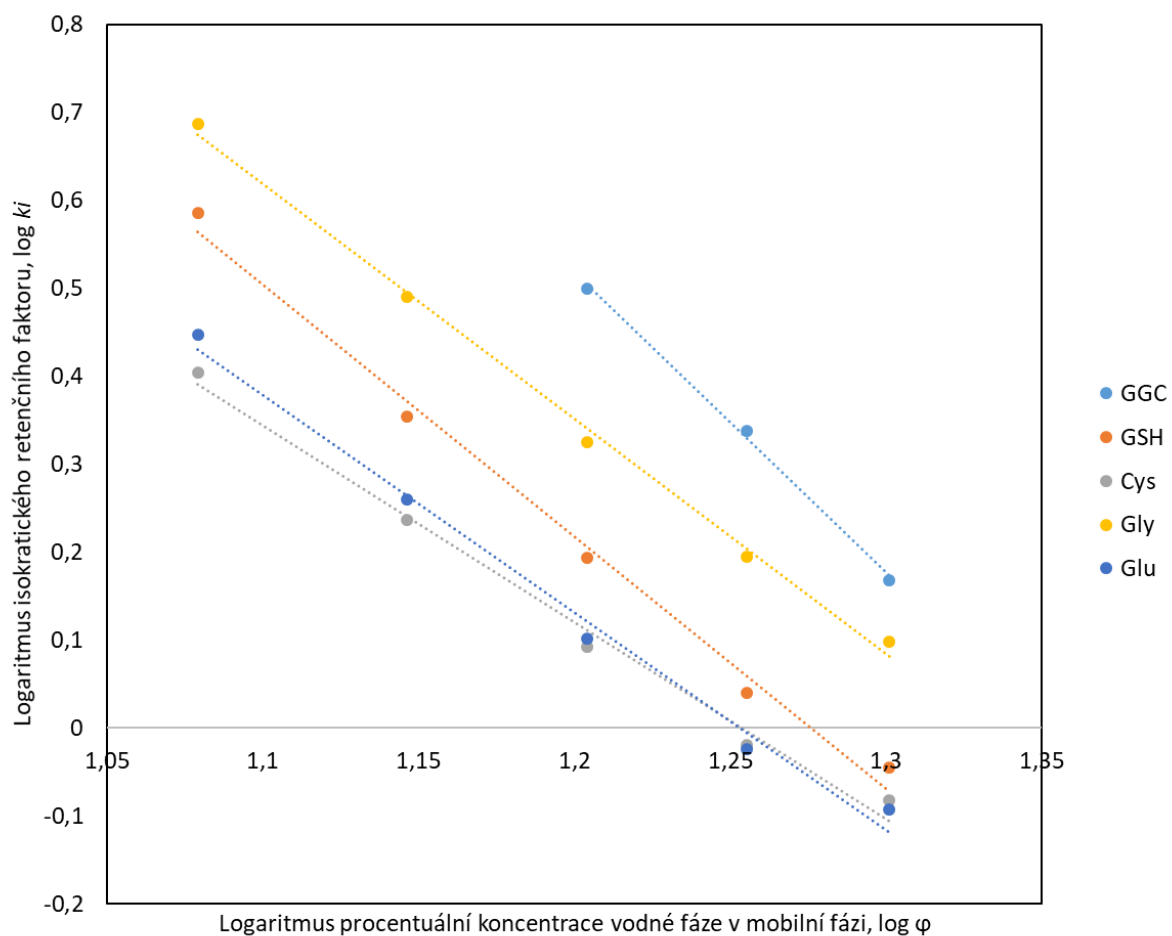
Obrázek 35: Okénkový diagram separace kritických párů GGC, GSH, Cys, Gly, Glu, cystinu a GSSG. Závislost rozlišení (R_{ij}) jednotlivých párů na koncentraci vodné fáze (φ) v MF během isokratických analýz na koloně Chromolith Performance Si ($100 \times 4,6$ mm), 30°C , detekce MS v módu SIM, průtok $0,4$ ml/min, MF s 5 mmol/l NH_4HCO_3 ve vodě a acetonitril, standardy rozpuštěny ve směsi voda/acetonitril, 1:9, (v/v)



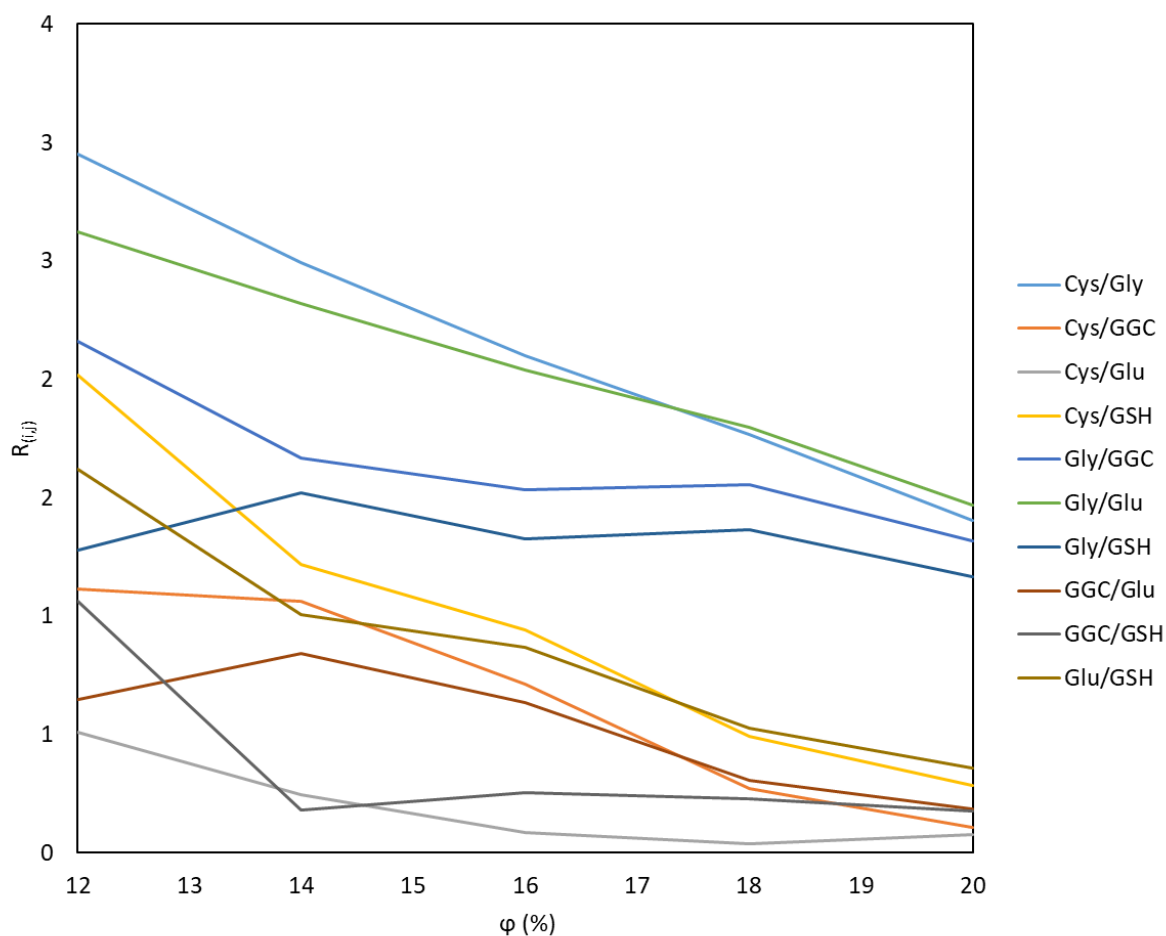
Obrázek 36: Závislost retence ($\log k_i$) standardů GGC, GSH, Cys, Gly, Glu, cystinu a GSSG na koncentraci vody v MF ($\log \varphi$) během isokratických analýz na koloně Chromolith Performance Si ($100 \times 4,6$ mm), 30°C , detekce MS v módu SIM, průtok $0,4$ ml/min, MF s 5 mmol/l NH_4HCO_3 ve vodě a $0,1$ % HCOOH v acetonitrilu, standardy rozpuštěny ve směsi voda/acetonitril, 1:9, (v/v)



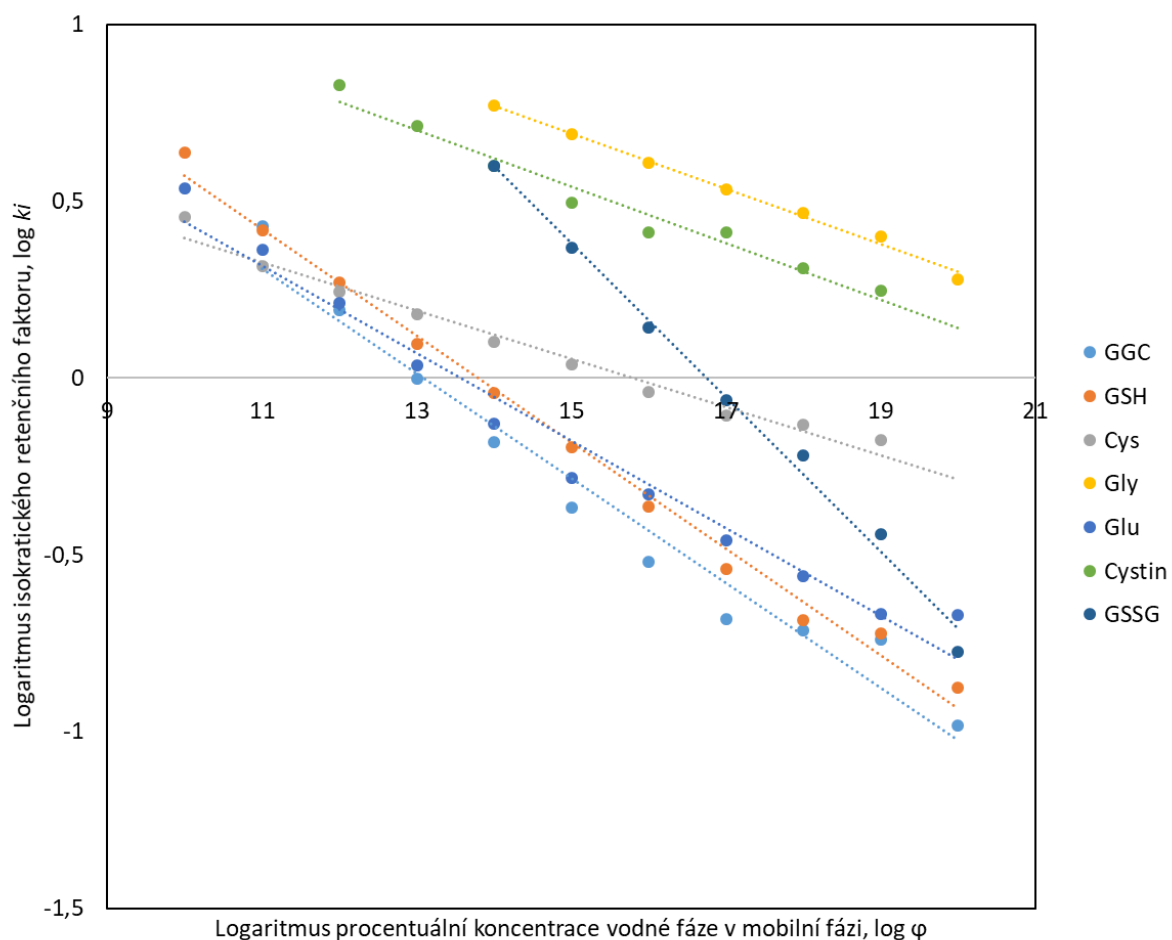
Obrázek 37: Okénkový diagram separace kritických párů GGC, GSH, Cys, Gly, Glu, cystinu a GSSG. Závislost rozlišení (R_{ij}) jednotlivých párů na koncentraci vodné fáze (ϕ) v MF během isokratických analýz na koloně Chromolith Performance Si ($100 \times 4,6$ mm), 30°C , detekce MS v módu SIM, průtok $0,4$ ml/min, MF s 5 mmol/l NH_4HCO_3 ve vodě a $0,1$ % HCOOH v acetonitrilu, standardy rozpuštěny ve směsi voda/acetonitril, 1:9, (v/v)



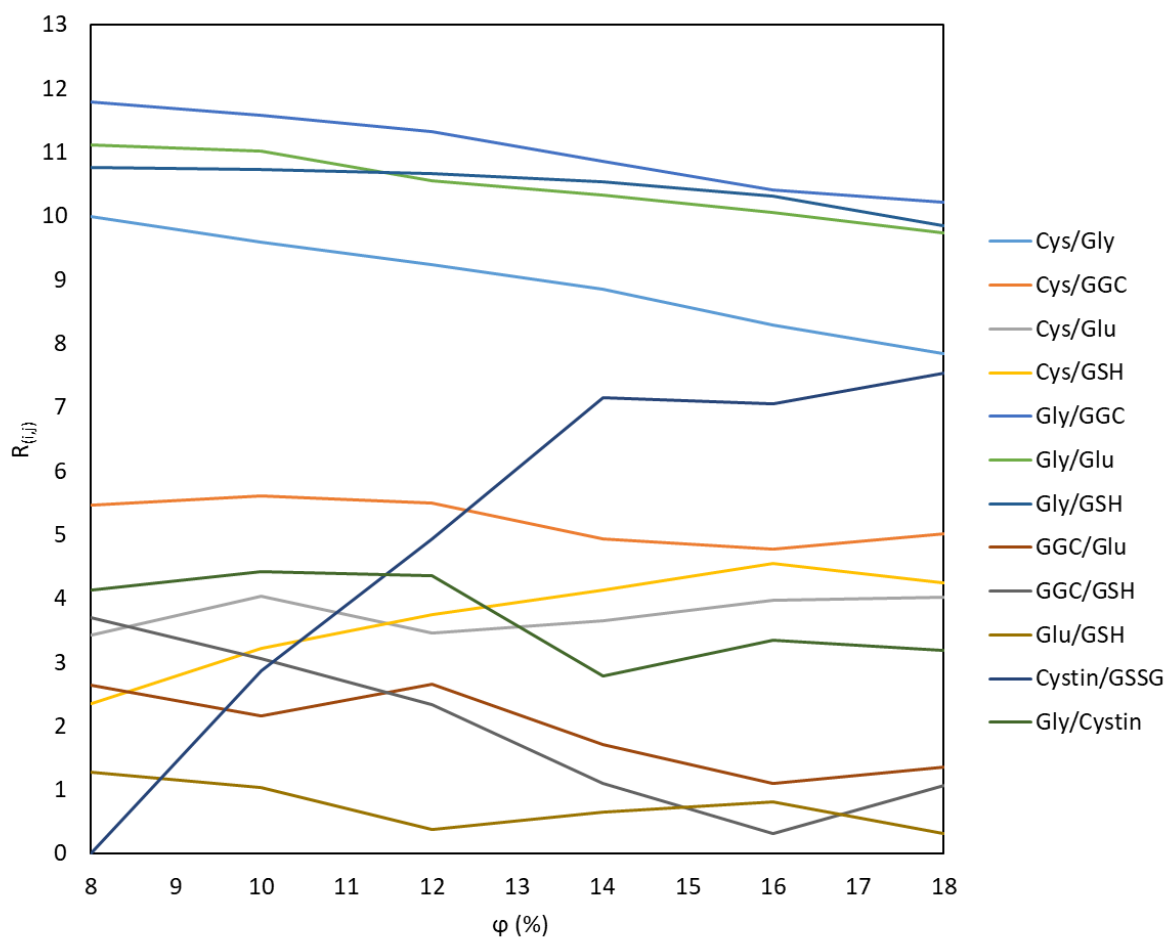
Obrázek 38: Závislost retence ($\log k_i$) standardů GGC, GSH, Cys, Gly, Glu, cystinu a GSSG na koncentraci vody v MF ($\log \varphi$) během isokratických analýz na koloně Chromolith Performance Si ($100 \times 4,6$ mm), 30°C , detekce MS v módu SIM, průtok $0,4$ ml/min, MF s 5 mmol/l NH_4HCO_3 ve vodě a $0,2\%$ HCOOH v acetonitrilu, standardy rozpuštěny ve směsi voda/acetonitril, 1:9, (v/v)



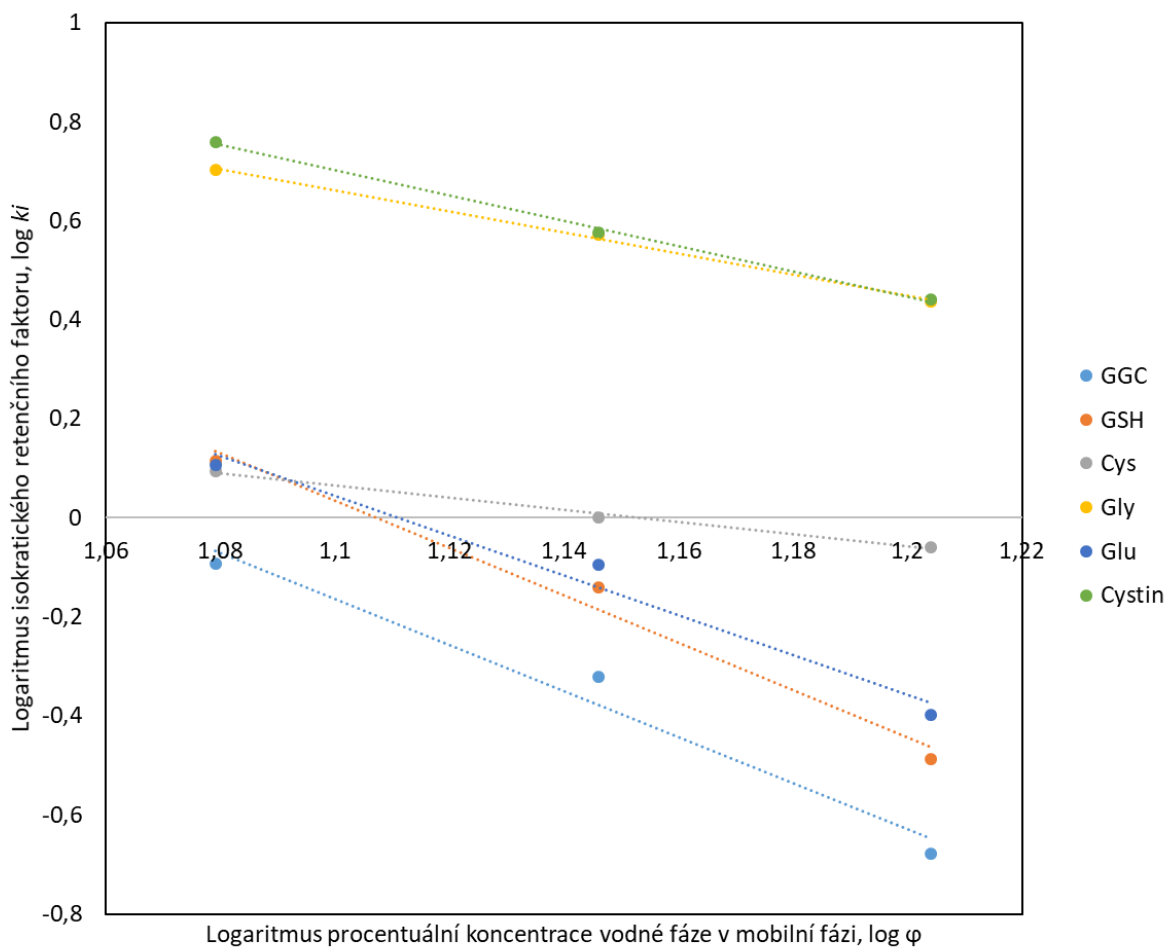
Obrázek 39: Okénkový diagram separace kritických párů GGC, GSH, Cys, Gly, Glu, cystinu a GSSG. Závislost rozlišení (R_{ij}) jednotlivých párů na koncentraci vodné fáze (ϕ) v MF během isokratických analýz na koloně Chromolith Performance Si (100 × 4,6 mm), 30 °C, detekce MS v módu SIM, průtok 0,4 ml/min, MF s 5 mmol/l NH_4HCO_3 ve vodě a 0,2 % HCOOH v acetonitrilu, standardy rozpuštěny ve směsi voda/acetonitril, 1:9, (v/v)



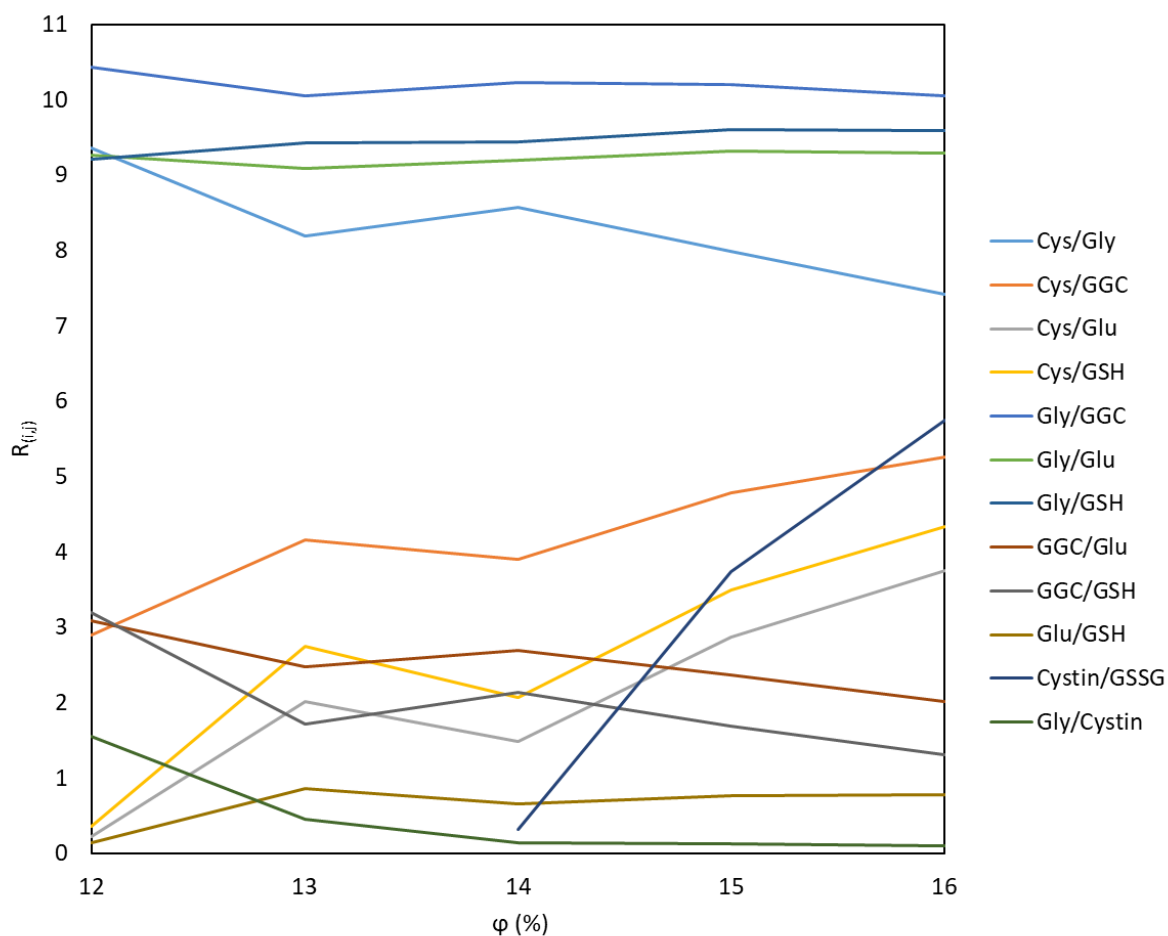
Obrázek 40: Závislost retence ($\log k_i$) standardů GGC, GSH, Cys, Gly, Glu, cystinu a GSSG na koncentraci vody v MF ($\log \phi$) během isokratických analýz na koloně Chromolith Performance Si ($100 \times 4,6$ mm), 30°C , detekce MS v módu SIM, průtok $0,4$ ml/min, MF s $2,5$ mmol/l NH_4HCO_3 ve vodě/acetonitrilu, standardy rozpuštěny ve směsi voda/acetonitril, 1:9, (v/v)



Obrázek 41: Okénkový diagram separace kritických párů GGC, GSH, Cys, Gly, Glu, cystinu a GSSG. Závislost rozlišení (R_{ij}) jednotlivých párů na koncentraci vodné fáze (φ) v MF během isokratických analýz na koloně Chromolith Performance Si ($100 \times 4,6$ mm), 30°C , detekce MS v módu SIM, průtok $0,4$ ml/min, MF s $2,5$ mmol/l NH_4HCO_3 ve vodě/acetonitrilu, standardy rozpuštěny ve směsi voda/acetonitril, 1:9, (v/v)



Obrázek 42: Závislost retence ($\log k_i$) standardů GGC, GSH, Cys, Gly, Glu, cystinu a GSSG na koncentraci vody v MF ($\log \phi$) během isokratických analýz na koloně Chromolith Performance Si ($100 \times 4,6$ mm), 30°C , detekce MS v módu SIM, průtok $0,4$ ml/min, MF s 10 mmol/l NH_4HCO_3 ve vodě a 5 mmol/l NH_4HCO_3 s 5% vody v acetonitrilu, standardy rozpuštěny ve směsi voda/acetonitril, $1:9$, (v/v)



Obrázek 43: Okénkový diagram separace kritických párů GGC, GSH, Cys, Gly, Glu, cystinu a GSSG. Závislost rozlišení (R_{ij}) jednotlivých párů na koncentraci vodné fáze (ϕ) v MF během isokratických analýz na koloně Chromolith Performance Si ($100 \times 4,6$ mm), 30°C , detekce MS v módu SIM, průtok $0,4$ ml/min, MF s 10 mmol/l NH_4HCO_3 ve vodě a 5 mmol/l NH_4HCO_3 s 5% vody v acetonitrilu, standardy rozpuštěny ve směsi voda/acetonitril, $1:9$, (v/v)

8. SEZNAM LITERATURY

1. Meister A. Biosynthesis and functions of glutathione, an essential biofactor. *Journal of nutritional science and vitaminology*. 1992;38(1-6):1881-7742 Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1297717>.
2. Kumar C, Igarria A, D'Autreaux B, Planson AG, Junot C, Godat E, et al. Glutathione revisited: a vital function in iron metabolism and ancillary role in thiol-redox control. *The EMBO journal*. 2011;30(10):2044-56. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21478822>.
3. Yuan L, Kaplowitz N. Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. *Molecular aspects of medicine*. 2009;30(1-2):29-41. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18786561>.
4. Pallardo FV, Markovic J, Garcia JL, Vina J. Role of nuclear glutathione as a key regulator of cell proliferation. *Molecular aspects of medicine*. 2009;30(1-2):77-85. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19232542>.
5. Franco R, Schoneveld OJ, Pappa A, Panayiotidis MI. The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases. *Archives of physiology and biochemistry*. 2007;113(4-5):234-58. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18158646>.
6. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1830(5):3217-66. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23036594>.
7. Broniowska KA, Diers AR, Hogg N. S-nitrosoglutathione. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1830(5):3173-81. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23416062>.
8. Libiad M, Yadav PK, Vitvitsky V, Martinov M, Banerjee R. Organization of the human mitochondrial hydrogen sulfide oxidation pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(45):30901-10. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25225291>.
9. Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular aspects of medicine*. 2009;30(1-2):1-12. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18796312>.
10. Hamad A, Elshahawy M, Negm A, Mansour FR. Analytical methods for determination of glutathione and glutathione disulfide in pharmaceuticals and biological fluids. *Reviews in analytical chemistry*. 2019;38(4). Dostupné z: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/revac-2019-0019/html>.

11. Biswas SK, Rahman I. Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathione. *Molecular aspects of medicine*. 2009;30(1-2):60-76. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18760298>.
12. Maher P. The effects of stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing research reviews*. 2005;4(2):288-314. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15936251>.
13. Lugin J, Rosenblatt-Velin N, Parapanov R, Liaudet L. The role of oxidative stress during inflammatory processes. *Biological chemistry*. 2014;395(2):203-30. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24127541>.
14. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants & redox signaling*. 2014;20(7):1126-67. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23991888>.
15. Brigelius-Flohe R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free radical biology & medicine*. 1999;27(9-10):951-65. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10569628>.
16. Ralat LA, Manevich Y, Fisher AB, Colman RF. Direct evidence for the formation of a complex between 1-cysteine peroxiredoxin and glutathione S-transferase pi with activity changes in both enzymes. *Biochemistry*. 2006;45(2):360-72. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16401067>.
17. Imai H, Nakagawa Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free radical biology & medicine*. 2003;34(2):145-69. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12521597>.
18. Vignais PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2002;59(9):1428-59. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12440767>.
19. Bakkenist AR, de Boer JE, Plat H, Wever R. The halide complexes of myeloperoxidase and the mechanism of the halogenation reactions. *Biochimica et biophysica acta*. 1980;613(2):337-48. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6255998>.
20. Poli G, Albano E, Dianzani MU. The role of lipid peroxidation in liver damage. *Chemistry and physics of lipids*. 1987;45(2-4):117-42. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3319224>.
21. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical biology & medicine*. 1991;11(1):81-128. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1937131>.

22. Boyland E, Chasseaud LF. The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*. 1969;32:173-219. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4892500>.
23. Alary J, Gueraud F, Cravedi JP. Fate of 4-hydroxynonenal in vivo: disposition and metabolic pathways. *Molecular aspects of medicine*. 2003;24(4-5):177-87. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12892995>.
24. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *The Journal of nutrition*. 2004;134(3):489-92. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14988435>.
25. Ostapowicz G, Lee WM. Acute hepatic failure: a Western perspective. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2000;15(5):480-8. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10847432>.
26. Schnackenberg LK, Chen M, Sun J, Holland RD, Dragan Y, Tong W, et al. Evaluations of the trans-sulfuration pathway in multiple liver toxicity studies. *Toxicology and applied pharmacology*. 2009;235(1):25-32. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19103213>.
27. Waly MI, Kharbanda KK, Deth RC. Ethanol lowers glutathione in rat liver and brain and inhibits methionine synthase in a cobalamin-dependent manner. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2011;35(2):277-83. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21121936>.
28. Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification. *The Journal of biological chemistry*. 1988;263(33):17205-8. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3053703>.
29. Sies H, Graf P. Hepatic thiol and glutathione efflux under the influence of vasopressin, phenylephrine and adrenaline. *The Biochemical journal*. 1985;226(2):545-9. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3994671>.
30. Sutherland MW, Glass M, Nelson J, Lyen Y, Forman HJ. Oxygen toxicity: loss of lung macrophage function without metabolite depletion. *Journal of free radicals in biology & medicine*. 1985;1(3):209-14. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3013977>.
31. Venglarik CJ, Giron-Calle J, Wigley AF, Malle E, Watanabe N, Forman HJ. Hypochlorous acid alters bronchial epithelial cell membrane properties and prevention by extracellular glutathione. *Journal of applied physiology*. 2003;95(6):2444-52. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14514700>.

32. Meister A, Anderson ME. Glutathione. Annual review of biochemistry. 1983;52:711-60. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6137189>.
33. Huang CS, Chang LS, Anderson ME, Meister A. Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. The Journal of biological chemistry. 1993;268(26):19675-80. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8103521>.
34. Maughan SC, Pasternak M, Cairns N, Kiddle G, Brach T, Jarvis R, et al. Plant homologs of the Plasmodium falciparum chloroquine-resistance transporter, PfCRT, are required for glutathione homeostasis and stress responses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2010;107(5):2331-6. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20080670>.
35. Wachter A, Wolf S, Steininger H, Bogs J, Rausch T. Differential targeting of GSH1 and GSH2 is achieved by multiple transcription initiation: implications for the compartmentation of glutathione biosynthesis in the Brassicaceae. The Plant journal : for cell and molecular biology. 2005;41(1):15-30. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15610346>.
36. Huang CS, Anderson ME, Meister A. Amino acid sequence and function of the light subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. The Journal of biological chemistry. 1993;268(27):20578-83. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8104188>.
37. Sun WM, Huang ZZ, Lu SC. Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase by protein phosphorylation. The Biochemical journal. 1996;320(1):321-8. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8947504>.
38. McKone EF, Shao J, Frangolias DD, Keener CL, Shephard CA, Farin FM, et al. Variants in the glutamate-cysteine-ligase gene are associated with cystic fibrosis lung disease. American journal of respiratory and critical care medicine. 2006;174(4):415-9. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16690975>.
39. Roum JH, Buhl R, McElvaney NG, Borok Z, Crystal RG. Systemic deficiency of glutathione in cystic fibrosis. Journal of applied physiology. 1993;75(6):2419-24. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8125859>.
40. Lu SC. Glutathione synthesis. Biochimica et biophysica acta. 2013;1830(5):3143-53. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22995213>.
41. Dalton TP, Chen Y, Schneider SN, Nebert DW, Shertzer HG. Genetically altered mice to evaluate glutathione homeostasis in health and disease. Free radical biology & medicine. 2004;37(10):1511-26. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15477003>.

42. Grant CM, MacIver FH, Dawes IW. Glutathione synthetase is dispensable for growth under both normal and oxidative stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* due to an accumulation of the dipeptide gamma-glutamylcysteine. *Molecular biology of the cell*. 1997;8(9):1699-707. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9307967>.
43. Richman PG, Meister A. Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *The Journal of biological chemistry*. 1975;250(4):1422-6. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1112810>.
44. Bannai S, Tateishi N. Role of membrane transport in metabolism and function of glutathione in mammals. *The Journal of membrane biology*. 1986;89(1):1-8. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2870192>.
45. Zarka MH, Bridge WJ. Oral administration of gamma-glutamylcysteine increases intracellular glutathione levels above homeostasis in a randomised human trial pilot study. *Redox biology*. 2017;11:631-6. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28131081>.
46. Allen J, Bradley RD. Effects of oral glutathione supplementation on systemic oxidative stress biomarkers in human volunteers. *Journal of alternative and complementary medicine*. 2011;17(9):827-33. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21875351>.
47. Witschi A, Reddy S, Stofer B, Lauterburg BH. The systemic availability of oral glutathione. *European journal of clinical pharmacology*. 1992;43(6):667-9. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1362956>.
48. Meister A. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy. *Pharmacology & therapeutics*. 1991;51(2):155-94. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1784629>.
49. Perricone C, De Carolis C, Perricone R. Glutathione: a key player in autoimmunity. *Autoimmunity reviews*. 2009;8(8):697-701. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19393193>.
50. Droge W, Breitkreutz R. Glutathione and immune function. *The Proceedings of the nutrition society*. 2000;59(4):595-600. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11115795>.
51. Johnson WM, Wilson-Delfosse AL, Mieyal JJ. Dysregulation of glutathione homeostasis in neurodegenerative diseases. *Nutrients*. 2012;4(10):1399-440. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23201762>.
52. Du K, Ramachandran A, Jaeschke H. Oxidative stress during acetaminophen hepatotoxicity: Sources, pathophysiological role and therapeutic potential. *Redox biology*. 2016;10:148-56. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27744120>.

53. Rushworth GF, Megson IL. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacology & therapeutics*. 2014;141(2):150-9. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24080471>.
54. Schapira AH. Mitochondrial disease. *Lancet*. 2006;368(9529):70-82. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16815381>.
55. Jones M, Fosbery R, Gregory J, Taylor D. Cambridge International AS and A level biology coursebook. Fourth edition. ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2014.
56. Biswas SK, Rahman I. Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathione. *Molecular aspects of medicine*. 2009;30(1-2):60-76. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18760298>.
57. Anderson ME, Meister A. Transport and direct utilization of gamma-glutamylcyst(e)ine for glutathione synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1983;80(3):707-11. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6572362>.
58. Quintana-Cabrera R, Bolanos JP. Glutathione and gamma-glutamylcysteine in the antioxidant and survival functions of mitochondria. *Biochemical Society transactions*. 2013;41(1):106-10. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23356267>.
59. Quintana-Cabrera R, Fernandez-Fernandez S, Bobo-Jimenez V, Escobar J, Sastre J, Almeida A, et al. gamma-Glutamylcysteine detoxifies reactive oxygen species by acting as glutathione peroxidase-1 cofactor. *Nature communications*. 2012;3:718. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22395609>.
60. Martensson J. Method for determination of free and total glutathione and gamma-glutamylcysteine concentrations in human leukocytes and plasma. *Journal of chromatography*. 1987;420(1):152-7. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3667817>.
61. Le TM, Jiang HY, Cunningham GR, Magarik JA, Barge WS, Cato MC, et al. gamma-Glutamylcysteine ameliorates oxidative injury in neurons and astrocytes in vitro and increases brain glutathione in vivo. *Neurotoxicology*. 2011;32(5):518-25. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21159318/>
62. Drake J, Sultana R, Aksenova M, Calabrese V, Butterfield DA. Elevation of mitochondrial glutathione by gamma-glutamylcysteine ethyl ester protects mitochondria against peroxynitrite-induced oxidative stress. *Journal of neuroscience research*. 2003;74(6):917-27. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14648597>.
63. Hayashi H, Iimuro M, Matsumoto Y, Kaneko M. Effects of gamma-glutamylcysteine ethyl ester on heart mitochondrial creatine kinase activity: involvement of sulfhydryl groups.

- European journal of pharmacology. 1998;349(1):133-6. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9669507>.
64. Kobayashi H, Kurokawa T, Kitahara S, Nonami T, Harada A, Nakao A, et al. The effects of gamma-glutamylcysteine ethyl ester, a prodrug of glutathione, on ischemia-reperfusion-induced liver injury in rats. *Transplantation*. 1992;54(3):414-8. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1412719>.
65. McIntyre TM, Curthoys NP. The interorgan metabolism of glutathione. *The International journal of biochemistry*. 1980;12(4):545-51. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6107251>.
66. Chandler SD, Zarka MH, Vinaya Babu SN, Suhas YS, Raghunatha Reddy KR, Bridge WJ. Safety assessment of gamma-glutamylcysteine sodium salt. *Regulatory toxicology and pharmacology* : RTP. 2012;64(1):17-25. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22698997>.
67. Anderson ME. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chemico-biological interactions*. 1998;111-112:1-14. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9679538>.
68. Ferguson G, Bridge W. Glutamate cysteine ligase and the age-related decline in cellular glutathione: The therapeutic potential of gamma-glutamylcysteine. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2016;593:12-23. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26845022>.
69. Cao P, Braidy N, Zarka M, Welch J, Bridge W. Therapeutic approaches to modulating glutathione levels as a pharmacological strategy in Alzheimer's disease (vol 12, pg 298, 2015). *Current Alzheimer research*. 2016;13(10):1198-. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/article/65580>.
70. Yang Y, Li L, Hang Q, Fang Y, Dong X, Cao P, et al. gamma-glutamylcysteine exhibits anti-inflammatory effects by increasing cellular glutathione level. *Redox biology*. 2019;20:157-66. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30326393>.
71. Peter C, Braidy N, Zarka M, Welch J, Bridge W. Therapeutic approaches to modulating glutathione levels as a pharmacological strategy in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer research*. 2015;12(4):298-313. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25731620>.
72. Nakamura YK, Dubick MA, Omaye ST. gamma-Glutamylcysteine inhibits oxidative stress in human endothelial cells. *Life sciences*. 2012;90(3-4):116-21. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22075492>.

73. Kerksick C, Willoughby D. The antioxidant role of glutathione and N-acetyl-cysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 2005;2:38-44. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18500954>.
74. Paschalis V, Theodorou AA, Margaritelis NV, Kyparos A, Nikolaidis MG. N-acetylcysteine supplementation increases exercise performance and reduces oxidative stress only in individuals with low levels of glutathione. *Free radical biology & medicine*. 2018;115:288-97. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29233792>.
75. Ferreira LF, Campbell KS, Reid MB. N-acetylcysteine in handgrip exercise: plasma thiols and adverse reactions. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism*. 2011;21(2):146-54. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21558576>.
76. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical biochemistry*. 1969;27(3):502-22. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4388022>.
77. Wang H, Wang WS, Zhang HS. A spectrofluorimetric method for cysteine and glutathione using the fluorescence system of Zn(II)-8-hydroxyquinoline-5-sulphonic acid complex. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*. 2001;57(12):2403-7. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11767834>.
78. Mourad T, Min KL, Steghens JP. Measurement of oxidized glutathione by enzymatic recycling coupled to bioluminescent detection. *Analytical biochemistry*. 2000;283(2):146-52. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10906234>.
79. Trabesinger AH, Weber OM, Duc CO, Boesiger P. Detection of glutathione in the human brain in vivo by means of double quantum coherence filtering. *Magnetic resonance in medicine*. 1999;42(2):283-9. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10440953>.
80. Salimi A, Hallaj R. Catalytic oxidation of thiols at preheated glassy carbon electrode modified with abrasive immobilization of multiwall carbon nanotubes: applications to amperometric detection of thiocytosine, L-cysteine and glutathione. *Talanta*. 2005;66(4):967-75. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18970079>.
81. Iwasaki Y, Saito Y, Nakano Y, Mochizuki K, Sakata O, Ito R, et al. Chromatographic and mass spectrometric analysis of glutathione in biological samples. *Journal of chromatography B*. 2009;877(28):3309-17. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19620027>.
82. Huang KJ, Jing QS, Wei CY, Wu YY. Spectrofluorimetric determination of glutathione in human plasma by solid-phase extraction using graphene as adsorbent. *Spectrochimica acta*.

Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy. 2011;79(5):1860-5. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21684195>.

83. Camera E, Picardo M. Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes. *Journal of chromatography B*. 2002;781(1-2):181-206. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12450659>.

84. Rossi R, Milzani A, Dalle-Donne I, Giustarini D, Lusini L, Colombo R, et al. Blood glutathione disulfide: in vivo factor or in vitro artifact? *Clinical chemistry*. 2002;48(5):742-53. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11978601>.

85. Causse E, Issac C, Malatray P, Bayle C, Valdiguie P, Salvayre R, et al. Assays for total homocysteine and other thiols by capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence detection. I. Preanalytical condition studies. *Journal of chromatography A*. 2000;895(1-2):173-8. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11105859>.

86. Truong DH, Eghbal MA, Hindmarsh W, Roth SH, O'Brien PJ. Molecular mechanisms of hydrogen sulfide toxicity. *Drug metabolism reviews*. 2006;38(4):733-44. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17145698>.

87. Steghens JP, Flourie F, Arab K, Collombel C. Fast liquid chromatography-mass spectrometry glutathione measurement in whole blood: micromolar GSSG is a sample preparation artifact. *Journal of chromatography B*. 2003;798(2):343-9. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14643515>.

88. Kand'ar R, Zakova P, Lotkova H, Kucera O, Cervinkova Z. Determination of reduced and oxidized glutathione in biological samples using liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2007;43(4):1382-7. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17182211>.

89. Tipple TE, Rogers LK. Methods for the determination of plasma or tissue glutathione levels. *Methods in molecular biology*. 2012;889:315-24. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22669674>.

90. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2003;333(1):19-39. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12809732>.

91. Giustarini D, Tsikas D, Colombo G, Milzani A, Dalle-Donne I, Fanti P, et al. Pitfalls in the analysis of the physiological antioxidant glutathione (GSH) and its disulfide (GSSG) in biological samples: An elephant in the room. *Journal of chromatography B*. 2016;1019:21-8. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26905452>.

92. Krijt J, Vackova M, Kozich V. Measurement of homocysteine and other aminothiols in plasma: advantages of using tris(2-carboxyethyl)phosphine as reductant compared with tri-n-butylphosphine. *Clinical chemistry*. 2001;47(10):1821-8. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11568092>.
93. Cline DJ, Redding SE, Brohawn SG, Psathas JN, Schneider JP, Thorpe C. New water-soluble phosphines as reductants of peptide and protein disulfide bonds: reactivity and membrane permeability. *Biochemistry*. 2004;43(48):15195-203. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15568811>.
94. Yu J, Li C, Shen S, Liu X, Peng Y, Zheng J. Mass spectrometry based detection of glutathione with sensitivity for single-cell analysis. *Rapid communications in mass spectrometry*. 2015;29(7):681-9. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26212287>.
95. Stempak D, Dallas S, Klein J, Bendayan R, Koren G, Baruchel S. Glutathione stability in whole blood: effects of various deproteinizing acids. *Therapeutic drug monitoring*. 2001;23(5):542-9. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11591901>.
96. Carru C, Zinellu A, Sotgia S, Marongiu G, Farina MG, Usai MF, et al. Optimization of the principal parameters for the ultrarapid electrophoretic separation of reduced and oxidized glutathione by capillary electrophoresis. *Journal of chromatography A*. 2003;1017(1-2):233-8. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14584708>.
97. Muscari C, Pappagallo M, Ferrari D, Giordano E, Capanni C, Caldarera CM, et al. Simultaneous detection of reduced and oxidized glutathione in tissues and mitochondria by capillary electrophoresis. *Journal of chromatography B*. 1998;707(1-2):301-7. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9613963>.
98. Robin S, Leveque N, Courderot-Masuyer C, Humbert P. LC-MS determination of oxidized and reduced glutathione in human dermis: a microdialysis study. *Journal of chromatography B*. 2011;879(30):3599-606. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22019294>.
99. Shrivastava K, Wu HF. Applications of silver nanoparticles capped with different functional groups as the matrix and affinity probes in surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight and atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization ion trap mass spectrometry for rapid analysis of sulfur drugs and biothiols in human urine. *Rapid communications in mass spectrometry*. 2008;22(18):2863-72. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18720468>.
100. Agrawal K, Wu HF, Shrivastava K. Reverse micellar microextraction for rapid analysis of thiol-containing peptides and amino acids by atmospheric-pressure matrix-assisted laser

desorption/ionization ion trap and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*. 2008;22(9):1437-44. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18395891>.

101. Monostori P, Wittmann G, Karg E, Turi S. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: an in-depth review. *Journal of chromatography B*. 2009;877(28):3331-46. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19560987>.

102. Griffith OW. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical biochemistry*. 1980;106(1):207-12. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7416462>.

103. Bouligand J, Deroussent A, Paci A, Morizet J, Vassal G. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay of reduced and oxidized glutathione and main precursors in mice liver. *Journal of chromatography B*. 2006;832(1):67-74. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16434243>.

104. Yang Z, Attygalle AB. LC/MS characterization of undesired products formed during iodoacetamide derivatization of sulfhydryl groups of peptides. *Journal of mass spectrometry : JMS*. 2007;42(2):233-43. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17206739>.

105. Ates B, Ercal BC, Manda K, Abraham L, Ercal N. Determination of glutathione disulfide levels in biological samples using thiol-disulfide exchanging agent, dithiothreitol. *Biomedical chromatography : BMC*. 2009;23(2):119-23. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18646192>.

106. Kaminska A, Olejarz P, Borowczyk K, Glowacki R, Chwatko G. Simultaneous determination of total homocysteine, cysteine, glutathione, and N-acetylcysteine in brain homogenates by HPLC. *Journal of separation science*. 2018;41(16):3241-9. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30014601>.

107. Glowacki R, Bald E. Fully automated method for simultaneous determination of total cysteine, cysteinylglycine, glutathione and homocysteine in plasma by HPLC with UV absorbance detection. *Journal of chromatography B*. 2009;877(28):3400-4. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19559659>.

108. Neuschwander-Tetri BA, Roll FJ. Glutathione measurement by high-performance liquid chromatography separation and fluorometric detection of the glutathione-orthophthalaldehyde adduct. *Analytical biochemistry*. 1989;179(2):236-41. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2774172>.

109. Sakhi AK, Blomhoff R, Gundersen TE. Simultaneous and trace determination of reduced and oxidized glutathione in minute plasma samples using dual mode fluorescence

- detection and column switching high performance liquid chromatography. *Journal of chromatography A*. 2007;1142(2):178-84. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17208244>.
110. Liang SC, Wang H, Zhang ZM, Zhang HS. Determination of thiol by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection with 5-methyl-(2-(m-iodoacetylaminophenyl)benzoxazole). *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2005;381(5):1095-100. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15744519>.
111. Ercal N, Yang P, Aykin N. Determination of biological thiols by high-performance liquid chromatography following derivatization by ThioGlo maleimide reagents. *Journal of chromatography B*. 2001;753(2):287-92. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11334342>.
112. Pullela PK, Chiku T, Carvan MJ, 3rd, Sem DS. Fluorescence-based detection of thiols in vitro and in vivo using dithiol probes. *Analytical biochemistry*. 2006;352(2):265-73. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16527239>.
113. Bouffard J, Kim Y, Swager TM, Weissleder R, Hilderbrand SA. A highly selective fluorescent probe for thiol bioimaging. *Organic letters*. 2008;10(1):37-40. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18062694>.
114. Huang KJ, Xie WZ, Wang H, Zhang HS. Sensitive determination of S-nitrosothiols in human blood by spectrofluorimetry using a fluorescent probe: 1,3,5,7-tetramethyl-8-(3',4'-diaminophenyl)-difluoroboradiaza-s-indacene. *Talanta*. 2007;73(1):62-7. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19071850>.
115. Squellerio I, Caruso D, Porro B, Veglia F, Tremoli E, Cavalca V. Direct glutathione quantification in human blood by LC-MS/MS: comparison with HPLC with electrochemical detection. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2012;71:111-8. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22947504>.
116. Meyer V. *Practical high-performance liquid chromatography*. 4th ed. Chichester. New York: John Wiley. 2004.
117. Dass C. *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, USA. 2007.
118. Kono Y, Iizuka H, Isokawa M, Tsunoda M, Ichiba H, Sadamoto K, et al. HPLC-fluorescence determination of thiol compounds in the serum of human male and female subjects using HILIC-mode column. *Biomedical chromatography : BMC*. 2014;28(5):589-93. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24500895>.

119. Isokawa M, Shimosawa T, Funatsu T, Tsunoda M. Determination and characterization of total thiols in mouse serum samples using hydrophilic interaction liquid chromatography with fluorescence detection and mass spectrometry. *Journal of chromatography B*. 2016;1019:59-65. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26691842>.
120. Haberhauer-Troyer C, Delic M, Gasser B, Mattanovich D, Hann S, Koellensperger G. Accurate quantification of the redox-sensitive GSH/GSSG ratios in the yeast *Pichia pastoris* by HILIC-MS/MS. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2013;405(6):2031-9. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23263514>.
121. Lafaye A, Labarre J, Tabet JC, Ezan E, Junot C. Liquid chromatography-mass spectrometry and ¹⁵N metabolic labeling for quantitative metabolic profiling. *Analytical chemistry*. 2005;77(7):2026-33. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15801734>.
122. Zhang YF, Wang Y, Zhang KR, Lei HM, Tang YB, Zhu L. Development and validation of a rapid, robust and sensitive UPLC-QQQ-MS/MS method for simultaneous quantification of GSH metabolism in lung cancer cells. *Journal of chromatography B*. 2020;1148:122145. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32434102>.
123. Moore T, Le A, Niemi AK, Kwan T, Cusmano-Ozog K, Enns GM, et al. A new LC-MS/MS method for the clinical determination of reduced and oxidized glutathione from whole blood. *Journal of chromatography B*. 2013;929:51-5. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23660247>.
124. Lee SG, Yim J, Lim Y, Kim JH. Validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method to measure oxidized and reduced forms of glutathione in whole blood and verification in a mouse model as an indicator of oxidative stress. *Journal of chromatography B*. 2016;1019:45-50. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26575459>.
125. Guan X, Hoffman B, Dwivedi C, Matthees DP. A simultaneous liquid chromatography/mass spectrometric assay of glutathione, cysteine, homocysteine and their disulfides in biological samples. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2003;31(2):251-61. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12609664>.
126. Eckstein JA, Ammerman GM, Reveles JM, Ackermann BL. Analysis of glutamine, glutamate, pyroglutamate, and GABA in cerebrospinal fluid using ion pairing HPLC with positive electrospray LC/MS/MS. *Journal of neuroscience methods*. 2008;171(2):190-6. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18433876>.
127. Seiwert B, Karst U. Simultaneous LC/MS/MS determination of thiols and disulfides in urine samples based on differential labeling with ferrocene-based maleimides. *Analytical chemistry*. 2007;79(18):7131-8. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17705399>.

128. Jiang Z, Liang Q, Luo G, Hu P, Li P, Wang Y. HPLC-electrospray tandem mass spectrometry for simultaneous quantitation of eight plasma amino thiols: application to studies of diabetic nephropathy. *Talanta*. 2009;77(4):1279-84. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19084635>.
129. Cabral CB, Bullock KH, Bischoff DJ, Tompkins RG, Yu YM, Kelleher JK. Estimating glutathione synthesis with deuterated water: a model for peptide biosynthesis. *Analytical biochemistry*. 2008;379(1):40-4. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18486587>.
130. Norris RL, Eaglesham GK, Shaw GR, Smith MJ, Chiswell RK, Seawright AA, et al. A sensitive and specific assay for glutathione with potential application to glutathione disulphide, using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography B*. 2001;762(1):17-23. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11589454>.
131. Herzog K, L IJ, van Cruchten AG, van Roermund CWT, Kulik W, Wanders RJA, et al. An UPLC-MS/MS Assay to measure glutathione as marker for oxidative stress in cultured cells. *Metabolites*. 2019;9(3). Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30841653>.
132. Gil A, van der Pol A, van der Meer P, Bischoff R. LC-MS analysis of key components of the glutathione cycle in tissues and body fluids from mice with myocardial infarction. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2018;160:289-96. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30114606>.
133. Rellan-Alvarez R, Hernandez LE, Abadia J, Alvarez-Fernandez A. Direct and simultaneous determination of reduced and oxidized glutathione and homogluthathione by liquid chromatography-electrospray/mass spectrometry in plant tissue extracts. *Analytical biochemistry*. 2006;356(2):254-64. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16828049>.
134. Weinmann W, Vogt S, Goerke R, Muller C, Bromberger A. Simultaneous determination of THC-COOH and THC-COOH-glucuronide in urine samples by LC/MS/MS. *Forensic science international*. 2000;113(1-3):381-7. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10978652>.
135. Blahova L, Kohoutek J, Lebedova J, Blaha L, Vecera Z, Buchtova M, et al. Simultaneous determination of reduced and oxidized glutathione in tissues by a novel liquid chromatography-mass spectrometry method: application in an inhalation study of Cd nanoparticles. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2014;406(24):5867-76. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25069883>.

136. Bramanti E, Lomonte C, Onor M, Zamboni R, D'Ulivo A, Raspi G. Mercury speciation by liquid chromatography coupled with on-line chemical vapour generation and atomic fluorescence spectrometric detection (LC-CVGAFS). *Talanta*. 2005;66(3):762-8. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18970050>.
137. Vignaud C, Rakotozafy L, Falguieres A, Potus J, Nicolas J. Separation and identification by gel filtration and high-performance liquid chromatography with UV or electrochemical detection of the disulphides produced from cysteine and glutathione oxidation. *Journal of chromatography A*. 2004;1031(1-2):125-33. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15058576>.
138. Giustarini D, Dalle-Donne I, Colombo R, Milzani A, Rossi R. An improved HPLC measurement for GSH and GSSG in human blood. *Free radical biology & medicine*. 2003;35(11):1365-72. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14642384>.
139. Vovk T, Bogataj M, Roskar R, Kmetec V, Mrhar A. Determination of main low molecular weight antioxidants in urinary bladder wall using HPLC with electrochemical detector. *International journal of pharmaceutics*. 2005;291(1-2):161-9. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15707743>.
140. Wang X, Chi D, Song D, Su G, Li L, Shao L. Quantification of glutathione in plasma samples by HPLC using 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan as a fluorescent labeling reagent. *Journal of chromatographic science*. 2012;50(2):119-22. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22298761>.
141. Kominkova M, Horky P, Cernei N, Tmejova K, Ruttkay-Nedecky B, Guran R, et al. Optimization of the glutathione detection by high performance liquid chromatography with electrochemical detection in the brain and liver of rats fed with taurine. *International Journal of electrochemical science*. 2015;10(2):1716-27. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/273001556_Optimization_of_the_Glutathione_Detection_by_High_Performance_Liquid_Chromatography_with_Electrochemical_Detection_in_the_Brain_and_Liver_of_Rats_Fed_with_Taurine
142. Bayram B, Runbach G, Frank J, Esatbeyoglu T. Rapid Method for glutathione quantitation using high-performance liquid chromatography with coulometric electrochemical detection. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2014;62(2):402-8. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf403857h>.
143. Gross JH. *Mass spectrometry : A Textbook*. Second Edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany. 2011.

144. Cole RB. Electrospray and MALDI mass spectrometry : fundamentals, instrumentation, practicalities, and biological applications. Second Edition, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, USA. 2010.
145. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. Principles of instrumental analysis. Sixth Edition. Thomson Brooks/Cole, Belmont, USA. 2007.
146. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. 1989;246(4926):64-71. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2675315>.
147. Calderaro A, Arcangeletti MC, Rodighiero I, Buttrini M, Gorrini C, Motta F, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry applied to virus identification. *Scientific reports*. 2014;4:6803. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25354905>.
148. De Hoffman E, Stoorbant V. Mass spectrometry: principles and applications. Third Edition. John Wiley & Sons Ltd, England. 2008.
149. Scigelova M, Makarov A. Orbitrap mass analyzer--overview and applications in proteomics. *Proteomics*. 2006;6(2):16-21. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17031791>.
150. Marshall AG, Hendrickson CL, Jackson GS. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer. *Mass spectrometry reviews*. 1998;17(1):1-35. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9768511>.
151. Sakhi AK, Russnes KM, Smeland S, Blomhoff R, Gundersen TE. Simultaneous quantification of reduced and oxidized glutathione in plasma using a two-dimensional chromatographic system with parallel porous graphitized carbon columns coupled with fluorescence and coulometric electrochemical detection. *Journal of chromatography A*. 2006;1104(1-2):179-89. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16376913>.
152. Zhao S, Li X, Liu YM. Integrated microfluidic system with chemiluminescence detection for single cell analysis after intracellular labeling. *Analytical chemistry*. 2009;81(10):3873-8. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19382810>.
153. Patterson AD, Li H, Eichler GS, Krausz KW, Weinstein JN, Fornace AJ, Jr., et al. UPLC-ESI-TOFMS-based metabolomics and gene expression dynamics inspector self-organizing metabolomic maps as tools for understanding the cellular response to ionizing radiation. *Analytical chemistry*. 2008;80(3):665-74. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18173289>.

154. Want EJ, Masson P, Michopoulos F, Wilson ID, Theodoridis G, Plumb RS, et al. Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS. *Nature protocols*. 2013;8(1):17-32. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23222455>.
155. Roland A, Schneider R. Development and validation of a high-throughput analysis of glutathione in grapes, musts and wines by stable isotope dilution assay and LC-MS/MS. *Food chemistry*. 2015;177:152-7. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25660871>.
156. Huang YQ, Ruan GD, Liu JQ, Gao Q, Feng YQ. Use of isotope differential derivatization for simultaneous determination of thiols and oxidized thiols by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical biochemistry*. 2011;416(2):159-66. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21672511>.
157. Eijkel J. Chip-based HPLC: the quest for the perfect column. *Lab on a chip*. 2007;7(7):815-7. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17593998>.
158. Piendl SK, Schonfelder T, Polack M, Weigelt L, van der Zwaag T, Teutenberg T, et al. Integration of segmented microflow chemistry and online HPLC/MS analysis on a microfluidic chip system enabling enantioselective analyses at the nanoliter scale. *Lab on a chip*. 2021;21(13):2614-24. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34008641>.
159. Wang X, Huang M, Li X, Dai W, Liang J. Rapid screening of illegal additives in functional food using atmospheric pressure solids analysis probe coupled to a portable mass spectrometer. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2022;214:114722. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35325799>.