

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Porovnání metod a postupů přípravy vzorku pro stanovení hladiny glutathionu
v lidské krvi získané technikou suché kapky

Diplomová práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Iveta Kulhánková**
Osobní číslo: **C23232**
Studijní program: **N0512A130006 Analýza biologických materiálů**
Téma práce: **Porovnání metod a postupů přípravy vzorku pro stanovení hladiny glutathionu v lidské krvi získané technikou suché kapky**
Téma práce anglicky: **Comparison of Methods and Sample Preparation Procedures for Determining Glutathione Levels in Human Blood Obtained by the Dried Blood Spot Techniques**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část: Metody stanovení hladiny glutathionu v lidské krvi. Technika suché kapky krve.

Experimentální část: Technika suché kapky krve, vliv parametrů ovlivňující kvantitativní výsledky. Příprava vzorku před vlastní analýzou. Postupy, jak zabránit oxidaci glutathionu při přípravě vzorku.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **20. prosince 2024**

Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2025**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

prof. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem Porovnání metod a postupů přípravy vzorku pro stanovení hladiny glutathionu v lidské krvi získané technikou suché kapky jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena 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 07. 05. 2025

Bc. Iveta Kulhánková

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce prof. Mgr. Romanu Kand'árovi, Ph.D, za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a také čas věnovaný této práci. Dále paní laborantce Gabriele Šefčíkové za veškerou pomoc v laboratoři a Mgr. Šárce Štěpánkové, PhD. za měření vzorků na destičkovém readru. Také bych chtěla poděkovat odběrovému centru MeDiLa spol. s.r.o. za zprostředkování odběrů krve a všem dobrovolníkům, kteří krev poskytli.

ANOTACE

Tato práce se zabývá porovnáním metod a postupů přípravy vzorku pro stanovení hladiny glutathionu v krvi získané technikou suché kapky. Teoretická část je věnována možnostem přípravy vzorku před vlastní analýzou, popisu techniky suché kapky krve a metodám stanovení glutathionu v biologických vzorcích. Experimentální část se zabývá testováním vlivu parametrů, které ovlivňují kvantitativní výsledky a porovnáním metod stanovení.

KLÍČOVÁ SLOVA

Glutathion, *o*-ftaldialdehyd, kapalinová chromatografie, fluorescenční detekce, suchá kapka krve

TITLE

Comparison of methods and sample preparation procedures for determining glutathione levels in human blood obtained by the dried blood spot techniques

ANNOTATION

This paper deals with the comparison of sample preparation methods and procedures for determining blood glutathione levels obtained by the dried spot technique. The theoretical part is devoted to the possibilities of sample preparation before analysis, a description of the dried spot technique and methods of determining glutathione in biological samples. The experimental part deals with testing the influence of parameters that affect quantitative results and comparing determination methods.

KEYWORDS

Glutathione, *o*-phthaldialdehyde, liquid chromatography, fluorescence detection, dried blood spot

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK, GRAFŮ A ROVNIC	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	12
ÚVOD	14
1 TEORETICKÁ ČÁST	15
1.1 Glutathion	15
1.1.1 Výskyt glutathionu	15
1.1.2 Funkce glutathionu	16
1.2 Příprava vzorku před analýzou	17
1.2.1 Odběr vzorku	17
1.2.2 Deproteinace	17
1.2.3 Redukce disulfidické vazby	17
1.2.4 Derivatizace	18
1.3 Metoda suché kapky krve	20
1.3.1 Odběr a transport vzorku suché kapky krve	20
1.3.2 Typy odběrových karet	21
1.3.3 Příprava vzorku	21
1.3.4 Výhody techniky suché kapky krve	21
1.3.5 Nevýhody techniky suché kapky krve	22
1.3.6 Praktické využití techniky suché kapky krve	22
1.4 Vnitřní standardy používané při stanovení hladiny glutathionu	22
1.5 Metody stanovení hladiny glutathionu v biologických vzorcích	23
1.5.1 Enzymatické metody	23
1.5.2 Elektrochemické metody	23
1.5.3 Chemiluminiscenční metody	24
1.5.4 Fluorescenční metody	24
1.5.5 Spektrofotometrické metody	25
1.5.6 Separální metody	25
1.5.7 Ramanova spektroskopie	28
1.5.8 Magnetická rezonanční spektroskopie	28
2 CÍL PRÁCE	29

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
3.1 Chemikálie	30
3.2 Pomůcky a přístroje	30
3.3 Pracovní roztoky	32
3.4 Vzorky krve	35
3.4.1 Odběr krve	35
3.4.2 Odběr krve na odběrovou kartu	36
3.5 Pracovní postupy stanovení hladiny glutathionu ve vzorcích suché kapky krve metodou kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí	36
3.5.1 Zpracování vzorků suché kapky krve	36
3.5.2 Příprava kalibrátorů pro konstrukci kalibrační křivky	36
3.5.3 Vliv hodnoty hematokritu na koncentraci glutathionu	37
3.5.4 Vliv nanášeného objemu a homogenity na koncentraci glutathionu	37
3.5.4 Výtěžnost metody	37
3.5.5 Přesnost v sérii a mezi sériemi	37
3.5.6 Linearita, mez detekce a stanovitelnosti	37
3.5.7 Příprava vzorků pro stanovení koncentrace hemoglobinu	38
3.5.8 Příprava vzorků krve se standardními přídávky	38
3.5.9 Příprava vzorků suché kapky krve získaných od dárců	40
3.6 Podmínky metody kapalinové chromatografie ve spojení s fluorescenční detekcí pro stanovení glutathionu ve vzorcích suché kapky krve	40
3.7 Zpracování výsledků	40
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	41
4.1 Testování vlivu hematokritu na koncentraci glutathionu	42
4.1.1 Stanovení hladiny hemoglobinu ve vzorcích suché kapky krve	44
4.2 Testování vlivu nanášeného objemu na koncentraci glutathionu ve vzorcích suché kapky krve	45
4.3 Testování vlivu homogenity na koncentraci glutathionu ve vzorcích suché kapky krve	45
4.4 Určení výtěžnosti metody stanovení glutathionu ve vzorcích suché kapky krve	46

4.5 Určení přesnosti v sérii a mezi sériemi metody stanovení glutathionu ve vzorcích suché kapky krve.....	46
4.6 Určení linearitu, meze detekce a stanovitelnosti metody stanovení glutathionu ve vzorcích suché kapky krve.....	47
4.7 Porovnání koncentrací glutathionu ve vzorcích suché kapky krve dvěma metodami	48
5 ZÁVĚR.....	52
POUŽITÁ LITERATURA	53
SEZNAM PŘÍLOH.....	67

SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK, GRAFŮ A ROVNIC

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Strukturní vzorec glutathionu	15
Obrázek 2 Redukce disulfidů fosfiny [27]	18
Obrázek 3 Reakce mezi Ellmanovým činidlem a thiolem za vzniku Ellmanova derivátu a 5-thio-2-nitrobenzoátu (TNB) [35]	19
Obrázek 4 Reakce o-ftaldialdehydu (OPA) s glutathionem (GSH) za vzniku derivátu OPA-GSH [39].....	20
Obrázek 5 Možný mechanismus reakce vzniku 3-[(karboxymethyl)karbamoyl]-5-oxo-2,3-dihydro-5H[1,3]thiazolo[3,2-a]pyridin-7-karboxylové kyseliny (CTPC) [82]	24

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Porovnání detektorů využívaných v kapalinové chromatografii při stanovení hladin glutathionu	27
Tabulka 2 Příprava standardů glutathionu pro konstrukci kalibrační křivky	34
Tabulka 3 Příprava roztoků glutathionu pro standardní přídavky	34
Tabulka 4 Příprava kalibračních standardů	36
Tabulka 5 Příprava krve s různou hodnotou hematokritu	37
Tabulka 6 Příprava vzorků krve se standardními přídavky	38
Tabulka 7 Koncentrace glutathionu vztažená na hladinu hemoglobinu pro různou hodnotu hematokritu a velikost nanášeného objemu krve na filtrační papír kontrolního vzorku QC1 ..	42
Tabulka 8 Koncentrace glutathionu vztažená na hladinu hemoglobinu pro různou hodnotu hematokritu a velikost nanášeného objemu krve na filtrační papír kontrolního vzorku QC2 ..	42
Tabulka 9 Koncentrace glutathionu vztažená na hladinu hemoglobinu pro různou hodnotu hematokritu a velikost nanášeného objemu krve na filtrační papír kontrolního vzorku QC3 ..	43
Tabulka 10 Koncentrace hemoglobinu ve vzorcích suché kapky krve pro testování vlivu vybraných parametrů na kvantitativní výsledky (QC1).....	44
Tabulka 11 Koncentrace hemoglobinu ve vzorcích suché kapky krve pro testování vlivu vybraných parametrů na kvantitativní výsledky (QC2).....	44
Tabulka 12 Koncentrace hemoglobinu ve vzorcích suché kapky krve pro testování vlivu vybraných parametrů na kvantitativní výsledky (QC3).....	45

Tabulka 13 Výsledky výtěžnosti metody stanovení glutathionu ve vzorcích suché kapky krve metodou kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí.....	46
Tabulka 14 Výsledky přesnosti v sérii a mezi sériemi metody stanovení glutathionu ve vzorcích suché kapky krve metodou kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí.....	46
Tabulka 15 Parametry získané z 9 kalibračních křivek.....	47

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Vliv hematokritu (Hct) a nanášeného objemu na koncentraci glutathionu (QC1).....	43
Graf 2 Vliv hematokritu (Hct) a nanášeného objemu na koncentraci glutathionu (QC2).....	43
Graf 3 Vliv hematokritu (Hct) a nanášeného objemu na koncentraci glutathionu (QC3).....	44
Graf 4 Porovnání koncentrace glutathionu v discích vyražených ze středu a periferie krevní skvrny.....	45
Graf 5 Kalibrační křivka pro stanovení glutathionu (GSH) ve vzorcích suché kapky krve	48
Graf 6 Upravená kalibrační křivka pro stanovení glutathionu (GSH) ve vzorcích suché kapky krve (vyloučení kalibračních standardů s nízkou koncentrací, těch, které jsou v intervalu chyby měření).....	48
Graf 7 Porovnání koncentrace glutathionu (GSH) stanovené dvěma metodami.....	49
Graf 8 Korelace metody kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí a fluorimetrické metody	49
Graf 9 Porovnání koncentrace glutathionu (GSH) stanovené dvěma metodami (vzorky suché kapky krve dárců)	50
Graf 10 Korelace metody kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí a fluorimetrické metody (vzorky suché kapky krve dárců).....	50

SEZNAM ROVNIC

Rovnice 1 Výpočet LOD.....	38
Rovnice 2 Výpočet LOQ.....	38
Rovnice 3 Výpočet variačního koeficientu	46
Rovnice 4 Pearsonův korelační koeficient	51
Rovnice 5 Spearmanův korelační koeficient.....	51

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

2-VP	2-vinylpyridin
ABD-F	4-aminosulfonyl-7-fluor-2,1,3-benzoxadiazol
ATP	adenosintrifosfát (z angl. <i>adenosine triphosphate</i>)
CE	kapilární elektroforéza (z angl. <i>capillary electrophoresis</i>)
CE-ECL	kapilární elektroforéza ve spojení s elektrochemiluminiscencí (z angl. <i>capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection</i>)
CTPC	3-[(karboxymethyl)karbamoyl]-5-oxo-2,3-dihydro-5H[1,3]thiazolo[3,2-a]pyridin-7-karboxylová kyselina
CV	variační koeficient (z angl. <i>coefficient of variation</i>)
Dansyl-Cl	1-dimethylaminonaftalen-5-sulfonylchlorid
DBS	suchá kapka krve (z angl. <i>dried blood spot</i>)
DMSO	dimethylsulfoxid
DTNB	5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoová kyselina
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FDNB	2,4-dinitrofluorbenzen
GPx	glutathionperoxidáza
GSH	glutathion
GSH-EE	glutathionethylester
GSSG	glutathiondisulfid
GSSG-EE	glutathiondisulfidethylester
HILIC	hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (z angl. <i>hydrophylic interaction liquid chromatography</i>)
Hct	hematokrit (z angl. <i>hematocrit</i>)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (z angl. <i>high-performance liquid chromatography</i>)
HPLC-FLD	vysokoučinná kapalinová chromatografie ve spojení s fluorescenčním detektorem (z angl. <i>high-performance liquid chromatography with fluorescence detector</i>)
IQR	mezikvartilové rozpětí (z angl. <i>interquartile range</i>)
IS	vnitřní standard (z angl. <i>internal standard</i>)

NADPH	redukovaný nikotinamidadenin dinukleotidfosfát (z angl. <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
LIF	laserem indukovaná fluorescence (z angl. <i>laser induced fluorescence</i>)
LOD	mez detekce (z angl. <i>limit of detection</i>)
LOQ	mez stanovitelnosti (z angl. <i>limit of quantification</i>)
mBBr	monobromobiman
mBCl	monochlorobiman
NBD-Cl	4-chlor-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol
NDA	naftalendikarboxaldehyd
NEM	<i>N</i> -ethylmaleimid
NMR	nukleární magnetická rezonance (z angl. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
NPM	<i>N</i> -(1-pyrenyl)maleimid
OPA	<i>o</i> -ftaldialdehyd
PP	polypropylen
ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. <i>reactive oxygen species</i>)
SBD-F	7-fluor-2,1,3-benzoxadiazol-4-sulfonát amonný
SERS	povrchem zesílený Ramanův rozptyl (z angl. <i>surface enhanced Raman scattering</i>)
TCEP	tris(2-karboxyethyl)fosfin
tGSH	celkový glutathion (z angl. <i>total glutathione</i>)
ThioGlo 3	(9-acetoxy-2-(4-(2,5-dihydro-2,5-dioxo-1H-pyrrol-1-yl)fenyl)-3-oxo-3 <i>H</i> -nafto[2,1- <i>b</i>]pyran)
TNB	5-thio-2-nitrobenzoát
UV	ultrafialová (z angl. <i>ultraviolet</i>)
Vis	viditelná (z angl. <i>visible</i>)

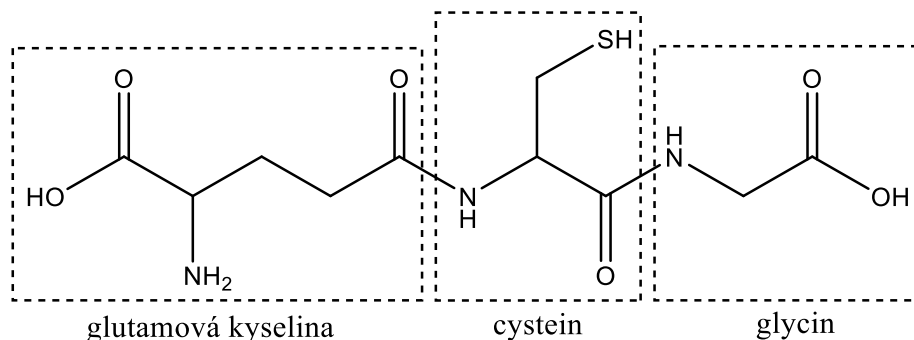
ÚVOD

Glutathion je velmi důležitá látka, která má celou řadu funkcí, mezi které se řadí antioxidační účinky a konjugace s xenobiotiky. Glutathion rychle a snadno podléhá autooxidaci, proto je nutné při zpracování vzorku před vlastní analýzou zabránit jeho oxidaci alkylačními činidly. Nejčastěji je stanovován v krvi, plazmě a moči. Jednou z možností zisku krve je využití techniky suché kapky (DBS; z angl. dried blood spot). Tato technika je neinvazivní, vyžaduje malé množství krve a vzorky je možné jednoduše skladovat. Vzorky DBS jsou kompatibilní s celou řadou analytických metod, ale vzhledem k malému množství krve je nutné volit metody s vyšší citlivostí. V této práci je hladina glutathionu ve vzorcích DBS stanovována kapalinovou chromatografií s fluorescenční detekcí (HPLC-FLD) a je studován vliv nejvýznamnějších parametrů na kvantitativní výsledky. Nakonec byly porovnány hladiny GSH ve vzorcích DBS dvěma metodami, metodou HPLC-FLD a spektrofluorimetrickou metodou.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Glutathion

Glutathion (GSH) je tripeptid skládající se z aminokyselin glycinu, cysteinu a kyseliny glutamové (Obrázek 1) [1]. Je syntetizován ve dvou enzymaticky katalyzovaných reakcích závislých na ATP. Nejprve γ -glutamylcysteinsyntetáza katalyzuje tvorbu peptidové vazby mezi aminoskupinou cysteinu a γ -karboxylátovou skupinou glutamátu za tvorby γ -glutamylcysteinu. Následně je tvořena peptidová vazba mezi karboxylátovou skupinou cysteinu v γ -glutamylcysteinu a aminoskupinou glycinového zbytku. GSH se primárně vyskytuje ve dvou formách, jako redukovaný GSH a jako oxidovaný GSH, glutathiondisulfid (GSSG), kde jsou dvě molekuly GSH spojeny disulfidovou vazbou [2,3].



Obrázek 1 Strukturální vzorec glutathionu

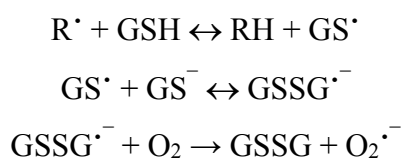
1.1.1 Výskyt glutathionu

Glutathion je široce distribuován v rostlinách, tkáních živočichů a mikroorganismech, a to v rozmezí 0,1–10 mmol/l [4]. Jedná se o nejhojnější nízkomolekulární peptid a zároveň také nejrozšířenější thiol buněk. Je to všudypřítomná molekula, je produkována ve všech orgánech, zejména v játrech, přičemž většina je přítomna v cytosolu. V buňkách se může GSH vyskytovat volně nebo vázaný na proteiny. Volný GSH je přítomen zejména ve své redukované formě, která se může během oxidačního stresu přeměnit na oxidovanou formu (GSSG). Redoxní stav pak závisí na poměru GSH/GSSG, který je ukazatelem oxidačního stresu, GSH a GSSG jsou tak jedním z nejdůležitějších redoxních párů [4–6].

1.1.2 Funkce glutathionu

Glutathion je životně důležitý při detoxikaci xenobiotik, reguluje proliferaci buněk, funkce imunitního systému a fibrogenezi. Je to multifunkční molekula s různými a stále se nově objevujícími funkcemi, které ovlivňují kritické procesy v buňkách. Dále se také uplatňuje při oxidačním stresu. Antioxidační funkce GSH je zprostředkována převážně reakcemi katalyzovanými glutathionperoxidázou (GPx), které vedou ke snížení množství peroxidu vodíku a lipoperoxidů, kdy je GSH oxidován na GSSG. GSSG je redukován zpět na GSH za katalýzy glutathionreduktázy, redukčním činidlem je NADPH [7].

Oxidační stres vzniká v důsledku poruchy rovnováhy produkce reaktivních forem kyslíku (ROS). Mezi ROS jsou řazeny superoxid ($O_2^{\cdot-}$), peroxid vodíku (H_2O_2), hydroxylový radikál (HO^{\cdot}), alkoxylové a peroxylové radikály. ROS poškozují lipidy procesem lipoperoxidace nebo modifikují proteiny. GSH reaguje s celou řadou radikálů [8,9].



Vrozené poruchy metabolismu GSH vedou ke snížení hladiny GSH v buňkách. Mezi tyto poruchy se řadí například deficit γ -glutamylcysteinsyntetázy a deficit glutathionsyntetázy, které se mohou projevovat jako chronická hemolytická anémie způsobená neschopností bojovat s oxidačním stresem. Při silném oxidačním stresu je převýšena schopnost buňky redukovat GSSG za katalýzy glutathionreduktázou, což vede k akumulaci GSSG v cytosolu. K ochraně buňky před posunem v redoxní rovnováze je GSSG aktivně transportován do extracelulárního prostoru [10,11].

Celá řada xenobiotik je konjugována s GSH za vzniku aduktu, který je přes transportér uvolněn do extracelulárního prostoru [1,10].

Protože samotný GSH nemá klinické využití, byla vytvořena řada chemicky modifikovaných analogů. Některé mají zvýšit antioxidační ochranu, jiné zase inhibovat enzymy, se kterými GSH interaguje. U mnoha byla prokázána protinádorová aktivita či útlum krvetvorby. Řada analogů je již v klinickém testování [12].

1.2 Příprava vzorku před analýzou

Příprava vzorku bývá nejdůležitějším a nejpracnější krokem při analýze vzhledem ke složité matici biologických vzorků a nízké koncentraci analytů [13]. Během odběru vzorku může dojít k celé řadě chyb, u vzorků krve a plazmy zejména k hemolýze červených krvinek. Hlavním problémem při stanovení GSH je snadná autooxidace a hydrolýza katalyzována γ -glutamyltransferázou. GSH je neenzymaticky oxidován při hodnotě pH vyšší než 7. K zabránění oxidace GSH je vzorek často okyselen [14,15].

1.2.1 Odběr vzorku

Nejčastěji používanými biologickými materiály pro stanovení hladiny GSH jsou krev, plazma a moč. Vzhledem k tomu, že GSH je snadno oxidován a degradován, je důležité dodržet specifické podmínky při odběru, skladování a transportu vzorků. Odběrové zkumavky obsahují heparin nebo EDTA, někdy se používají zkumavky ošetřené alkylačními činidly, např. *N*-ethylmaleimidem. Při stanovení hladiny GSH v plazmě, je nutné ji co nejdříve oddělit od červených krvinek. Pro dlouhodobé skladování je nutné vzorky uchovávat při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ [16,17].

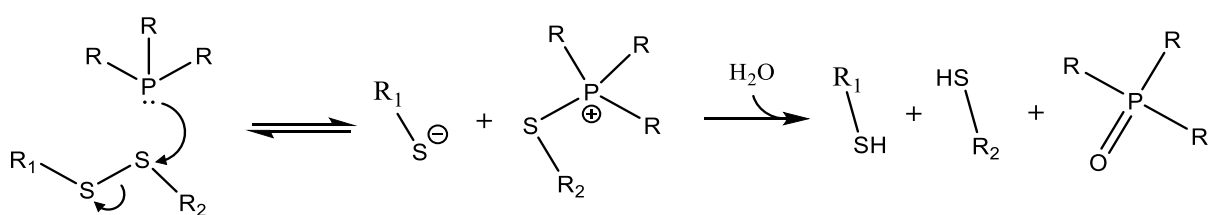
1.2.2 Deproteinace

Důležitým krokem před vlastní analýzou je odstranění proteinů, které by mohly narušovat analýzu [18]. Ke vzorku jsou obvykle přidávány kyseliny, jako kyselina metafosforečná [19], trichloroctová, chloristá či sulfosalicylová. Po centrifugaci je získán supernatant zbavený proteinů [20]. Deproteinaci je také možné provést přidáním organického rozpouštědla, jako je acetonitril, aceton nebo methanol. Užitečnou metodou je ultrafiltrace, která nevyžaduje přidání kyselin ani organických rozpouštědel, které mohou ovlivnit detekci. Volba vhodného deproteinačního činidla se odvíjí od zvolené metody, např. při analýze hmotnostním spektrometrem je výhodnější použití organických rozpouštědel. Pouze několik metod, například nukleární magnetická rezonance (NMR), nevyžaduje deproteinaci [21].

1.2.3 Redukce disulfidické vazby

Při stanovení GSH v plazmě a krvi je důležitá redukce disulfidické vazby mezi GSH a jinými thioley či proteiny. Volba redukčního činidla se odvíjí od zvoleného separačního a detekčního systému [6]. Dříve byl často využíván borohydrid sodný, který je však nestabilní ve vodě. Z tohoto důvodu byl připravován v hydroxidu sodném, ve kterém byl stabilní po dobu několika dní. K reakční směsi byl také přidáván dimethylsulfoxid (DMSO) [22,23].

Dalšími používanými redukčními činidly jsou 2-merkptoethanol a dithiothreitol (DTT). Jedním z problémů při použití DTT je, že oxidace je katalyzována všudypřítomnými ionty kovů, jako Fe^{3+} a Ni^{2+} . DTT je tedy v redukované formě nestabilní. Tento problém lze vyřešit použitím trialkylfosfinů [24]. Mezi trialkylfosfiny se řadí trifenyfosfin, který je vysoce reaktivní [25], a široce používaný tris(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP), který velmi rychle redukuje disulfidy ve vodném prostředí při pH 4,5 a pokojové teplotě [26]. Modelové studie ukázaly, že prvním krokem redukce disulfidů fosfiny je vznik thiofosfinové soli. Následnou hydrolyzou pak vzniká druhý thiolový fragment a fosfinoxid (Obrázek 2) [27].



Obrázek 2 Redukce disulfidů fosfiny [27]

1.2.4 Derivatizace

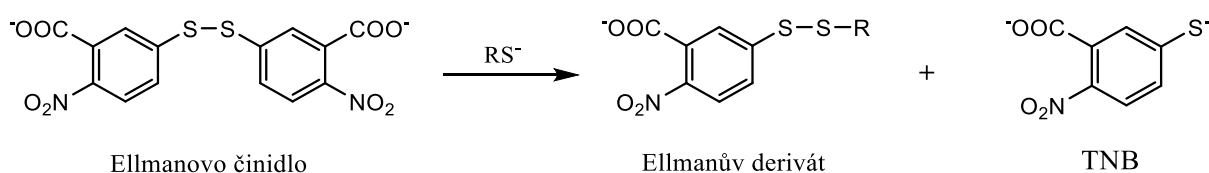
Derivatizace GSH, GSSG a jejich analogů vhodným derivatizačním činidlem je důležitá pro zvýšení citlivosti stanovení a prevenci autooxidace. Pro derivatizaci GSH může být využita karboxylová, aminová a thiolová funkční skupina, zatímco pro derivatizaci GSSG pouze aminová a karboxylová funkční skupina [28].

Specifickým činidlem pro thiolovou skupinu je například monobromobiman (mBBr), který reaguje s thioley v alkalickém prostředí při pokojové teplotě. Je citlivý na světlo, proto musí být reakční směs před světlem chráněna [29]. Nevýhodou je, že rychle reaguje s mnoha thioley a není specifický pro GSH. Proto byl v některých pracích použit monochlorobiman (mBCl), lipofilní činidlo specifické pro GSH. Nenavázaný mBCl nevykazuje žádnou fluorescenci. Rychle reaguje s GSH v reakci katalyzované glutathion-*S*-transferázou za vzniku konjugátu, který fluoreskuje [30].

Dalšími běžně používanými činidly jsou 2-vinylpyridin (2-VP) a *N*-ethylmaleimid (NEM). Nevýhoda 2-VP je, že obtížně prostupuje přes buněčnou membránu a s GSH reaguje pomalu. NEM naopak prostupuje přes membránu snadno a rychle reaguje s GSH. Jeho nevýhodou je, že je silným inhibítorem glutathionreduktázy, a proto musí být před analýzou odstraněn

poměrně složitým a časově náročným postupem. V důsledku toho byl v průběhu let nahrazen jinými thiolovými činidly [31–34].

Dalším často využívaným derivatizačním činidlem je Ellmanovo činidlo neboli 5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoová kyselina (DTNB), symetrický disulfid, který reaguje s thiolem za vzniku směsného disulfidu (Ellmanův derivát) a 5-thio-2-nitrobenzoátu (TNB) (Obrázek 3). Derivát lze separovat chromatografickou metodou. Produkt je stabilní po dobu 2 měsíců při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ [35].

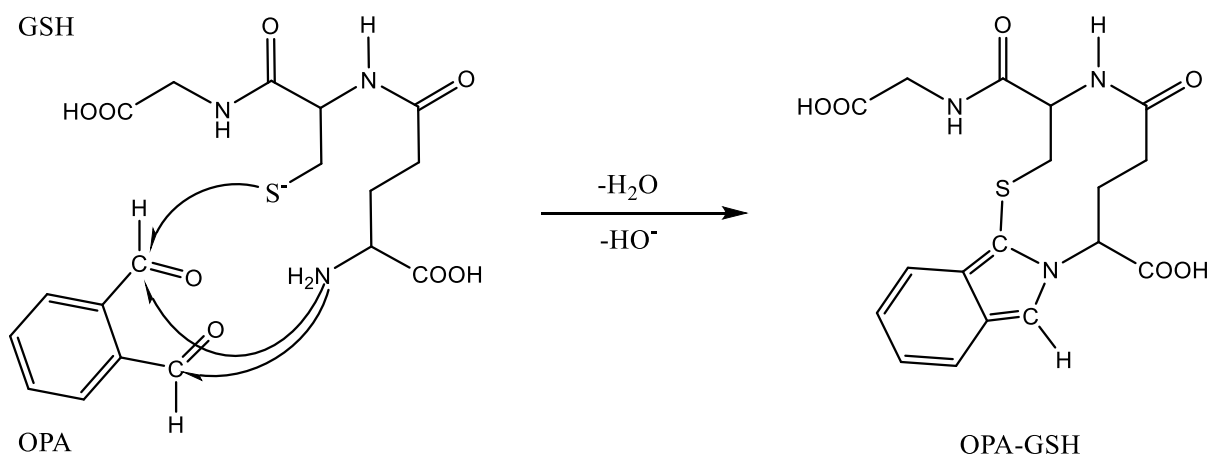


Obrázek 3 Reakce mezi Ellmanovým činidlem a thiolem za vzniku Ellmanova derivátu a 5-thio-2-nitrobenzoátu (TNB) [35]

N-(1-pyrenyl)maleimid (NPM) reaguje s thiolovými skupinami za vzniku fluoreskujících derivátů. NPM se používá při postkolonové derivatizaci, při předkolonové derivatizaci vznikají nestabilní deriváty. Reakce maleimidů s GSH poskytuje diastereomery, které mohou být separovány vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC). Reakce NPM s GSH je v neutrálním až slabě alkalickém prostředí relativně rychlá. Deriváty NPM jsou stabilní po dobu 2 měsíců při skladování při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ [36].

Derivatizační činidlo ThioGlo 3 (9-acetoxy-2-(4-(2,5-dihydro-2,5-dioxo-1*H*-pyrrol-1-yl)fenyl)-3-oxo-3*H*-nafto[2,1-*b*]pyran) má vysokou afinitu k thiolovým skupinám a vzniklý produkt fluoreskuje. Využívá se při předkolonové derivatizaci [37].

o-Ftaldialdehyd (OPA) reaguje s GSH v mírně alkalickém prostředí za vzniku stabilního a vysoce fluoreskujícího tricyklického derivátu (Obrázek 4) [38]. Vzniklý derivát je stabilní při pokojové teplotě i několik dní, pokud je chráněn před světlem [39].



Obrázek 4 Reakce *o*-ftaldialdehydu (OPA) s glutathionem (GSH) za vzniku derivátu OPA-GSH [39]

Halogen-benzofurazany, jako 4-aminosulfonyl-7-fluor-2,1,3-benzoxadiazol (ABD-F) a 7-fluor-2,1,3-benzoxadiazol-4-sulfonát amonný (SBD-F) jsou často používanými derivatizačními činidly. Reagují selektivně s thioley za vzniku fluoreskujících derivátů, zatímco sama činidla ani vedlejší produkty nefluoreskují. SBD-F je oproti jiným činidlům (OPA, mBBBr) specifický pro thiolovou skupinu a nereaguje s alkoholy, fenoly nebo aminoskupinami. Je také selektivnější než ABD-F, zatímco ABD-F reaguje s thioley za mírných podmínek mnohem rychleji než SBD-F. Adukty thiol-SBD jsou stabilní a nevyskytují se žádné interferenční píky [40–42].

1.3 Metoda suché kapky krve

Metoda suché kapky krve je minimálně invazivní metoda pro odběr malého množství krve, a to z prstu nebo paty, na speciální filtrační papír. Stabilita vzorku DBS je ovlivněna typem filtračního papíru, teplotou, vlhkostí a dobou skladování. Tato metoda je široce využívána pro novorozenecký screening především k detekci metabolických poruch, dále pro diagnostiku HIV, monitorování hladin léčiv a klinickou biochemii. Vzorky DBS jsou kompatibilní s celou řadou bioanalytických metod, kterými jsou chromatografie, hmotnostní spektrometrie a imunitesty. Nejčastěji se technika DBS používá ve spojení s kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií (LC-MS) [43,44].

1.3.1 Odběr a transport vzorku suché kapky krve

Krev je odebírána punkcí paty nebo prstu jednorázovým odběrovým zařízením. Vybrané místo vpichu je dezinfikováno alkoholem a poté je sterilní jednorázovou lancetou s hrotem 2,0 mm provedena punkce. Pokud je odběr prováděn z paty, je vhodné ji držet v dolní poloze na úrovni

nebo pod úroveň srdce. První kapka je setřena a teprve druhá kapka je nanesena na povrch předtištěného kruhu filtračního papíru (odběrovou kartu), přičemž je důležité se před odběrem i po něm kruhu nedotýkat. Odebraný vzorek kapky krve je následně sušen ve vodorovné poloze a při pokojové teplotě po dobu 3–4 hodin [45]. Po zaschnutí jsou vzorky skladovány v uzavíratelných plastových sáčcích nebo nádobách s vysoušedlem, což přispívá ke stabilitě analytu. Požadavky na transport jsou minimální, pokud není známo, že vzorky obsahují infekční agens [46].

1.3.2 Typy odběrových karet

V roce 1963 Dr. Guthrie popsal ve své studii použití silného a velmi savého filtračního papíru z vysoce čisté bavlny, později známého jako Whatman 903, k měření hladiny fenylalaninu pro diagnostiku fenylketonurie u novorozenců. Odběrová karta Whatman 903 poskytuje správnou a reprodukovatelnou absorpci vzorků krve. Vyrábí se několik typů DBS karet, a to jak nepotažených, tak potažených patentovanými reagensy. Například FTA karty (z angl. Flinders Technology Associates) navrženy pro analýzu nukleových kyselin obsahují činidla, která podporují lýzu buněk a denaturaci bílkovin, což vede k uvolnění nukleových kyselin. Ty jsou následně zachyceny v matici odběrové karty [47,48].

1.3.3 Příprava vzorku

Z odběrové karty jsou vyraženy disky o průměru 2–8 mm. Analyt je ze vzorku DBS extrahován. Běžně používanými extrakčními činidly jsou fosfátový pufr, často s přidanými detergenty, či chelatačními činidly a organická rozpouštědla jako methanol, acetonitril nebo ethanol [49]. Příprava vzorku může zahrnovat také precipitaci proteinů, extrakci kapalina–kapalina, extrakci na pevné fázi nebo derivatizaci [50].

1.3.4 Výhody techniky suché kapky krve

Největší předností techniky DBS je minimálně invazivní odběr malého množství krve. Z tohoto důvodu nachází své uplatnění především u novorozeneckého screeningu, ale může být využita u osob všech věkových kategorií. S nízkým objemem krve se pojí i efektivní sběr, přeprava a skladování [51]. Odběr krve je relativně bezbolestný. Může být proveden doma a mohou jej provádět i osoby bez odborného vzdělání [52]. V klinické praxi je odběr krve technikou DBS výhodnější než odběr vzorků venózní krve, protože vysušení krve snižuje riziko infekce. Technika DBS také umožňuje analyzovat širokou škálu biomarkerů, a to z jediného vzorku [53].

1.3.5 Nevýhody techniky suché kapky krve

Technika DBS má také celou řadu nevýhod. Nejpodstatnějším problémem je vliv hodnoty hematokritu, což je poměr objemu červených krvinek k celkovému objemu krve. Vysoká hodnota hematokritu vede k vyšší viskozitě krve, čímž je ovlivněno šíření krve na odběrové kartě [54]. Další komplikace představuje chromatografický účinek, k němuž dochází při nanášení krve na filtrační papír, kde papír působí jako stacionární fáze a krev jako mobilní fáze. Chromatografický účinek ovlivňuje způsob, jakým se analyt pohybuje na filtračním papíře [55]. Přestože je malý objem krve nejvýraznější výhodou techniky DBS, zároveň také představuje omezení, protože technika DBS vyžaduje použití vysoce citlivých analytických technik. Na rozdíl od vzorků plazmy nebo séra nejsou vzorky DBS tak snadno použitelné s běžnými analytickými nástroji, jako je HPLC v kombinaci s UV-Vis (UV, ultrafialová oblast; Vis, viditelná oblast) detektorem [56].

1.3.6 Praktické využití techniky suché kapky krve

Nejrozšířenější aplikací techniky DBS je, jak již bylo zmíněno, novorozenecký screening. Jedná se zejména o diagnostiku vrozených poruch metabolismu. Z jednoho vzorku DBS je možné provést diagnostiku více než 50 onemocnění. Techniku DBS lze také využít pro monitorování hladin léčiv [44,47]. Mnoho léčiv a jejich metabolity, ale také protilátky či nukleové kyseliny, jsou ve vzorcích DBS mnohem stabilnější než v plazmě nebo séru [57].

1.4 Vnitřní standardy používané při stanovení hladiny glutathionu

Při stanovení hladiny GSH v biologických vzorcích se často používají stabilní izotopově značené vnitřní standardy (IS) ($[^{13}\text{C}_3,^{15}\text{N}]$ glutathion, $[^{13}\text{C}_4,^{15}\text{N}_2]$ glutathiondisulfid, [glycin- $^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}]$ -glutathion, deuterovaný GSH) [58–60]. Použití vnitřních standardů snižuje odchylky ve výsledcích měření, zlepšuje správnost a přesnost analýzy a také redukuje účinky matrice. Navzdory použití vnitřních standardů v analytických aplikacích se některé studie stále potýkají s problémy účinku matrice. Používání izotopově značených vnitřních standardů má značné výhody i nevýhody a jsou první volbou pro kvantitativní analýzu metodami LC-MS.

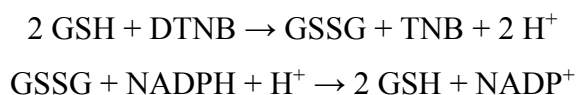
Nevýhodou je především jejich menší dostupnost a vysoká cena, proto jsou v některých studiích alternativou strukturní analoga jako glutathionethylester, či jiné vnitřní standardy, jako *N*-acetylcystein a γ -glutamylglutamát [61–64].

1.5 Metody stanovení hladiny glutathionu v biologických vzorcích

Glutathion má díky své důležité funkci v antioxidační ochraně buněk a při konjugaci léčiv a xenobiotik zásadní význam ve farmakologii a toxikologii. Je tedy důležité zvolit vhodné metody pro stanovení jeho hladiny v biologických tekutinách a buňkách. V mnohých případech je hladina GSH (GSSG) stanovována v tkáních, jako jsou játra, svaly nebo mozek. Jelikož jsou tyto vzorky obtížně dostupné, jsou preferovány vzorky krve a plazmy. K měření hladiny GSH je k dispozici celá řada spektrofotometrických, elektrochemických, chromatografických a dalších metod [65,66].

1.5.1 Enzymatické metody

Nejrozšířenější enzymatická metoda pro stanovení hladiny GSH je založena na reakci s DTNB. V této metodě je GSH oxidován DTNB za vzniku TNB a GSSG, který je následně redukován NADPH za katalýzy glutathionreduktázou zpět na GSH. TNB je monitorován spektrofotometricky při 412 nm a jeho množství je úměrné součtu koncentrace GSH a GSSG. Metoda je dostatečně citlivá a specifická [67].



Jedním z problémů této metody je, že DTNB je nestabilní. Je relativně stabilní při hodnotě pH pod 8, v alkalickém prostředí se rozkládá, čímž dochází ke zvýšení absorpce pozadí. Alkalické prostředí je však nutné pro optimální rychlost reakce, a proto se jako alternativní činidla používají *n*-oktyldithionitrobenzoát a 5-(2-aminoethyl)dithio-2-nitrobenzoát, která jsou stabilnější a vykazují tak nižší pozadí než DTNB [68].

Metoda založená na reakci katalyzované γ -glutamyltransferázou umožňuje stanovení jak GSH, tak i GSSG. Enzym γ -glutamyltransferáza katalyzuje přenos γ -glutamylové skupiny z GSH na akceptor za vzniku γ -glutamylového derivátu a cysteinylglycinu. Leucylaminopeptidáza katalyzuje hydrolýzu dipeptidu cysteinylglycinu na glycin a cystein, který lze měřit spektrofotometricky [69]. Byly popsány také metody využívající biosenzory, například biosenzor s glutathionperoxidázou [70] a glutathion-S-transferázou [71].

1.5.2 Elektrochemické metody

Elektrochemické měření hladin GSH je oblíbené pro jeho jednoduchost, avšak v praxi naráží na mnoho překážek, zejména na komplexní matici biologických vzorků, která vede k zanášení elektrod. Důležitá je také selektivita a citlivost, aby bylo možné správně oddělit signál GSH od

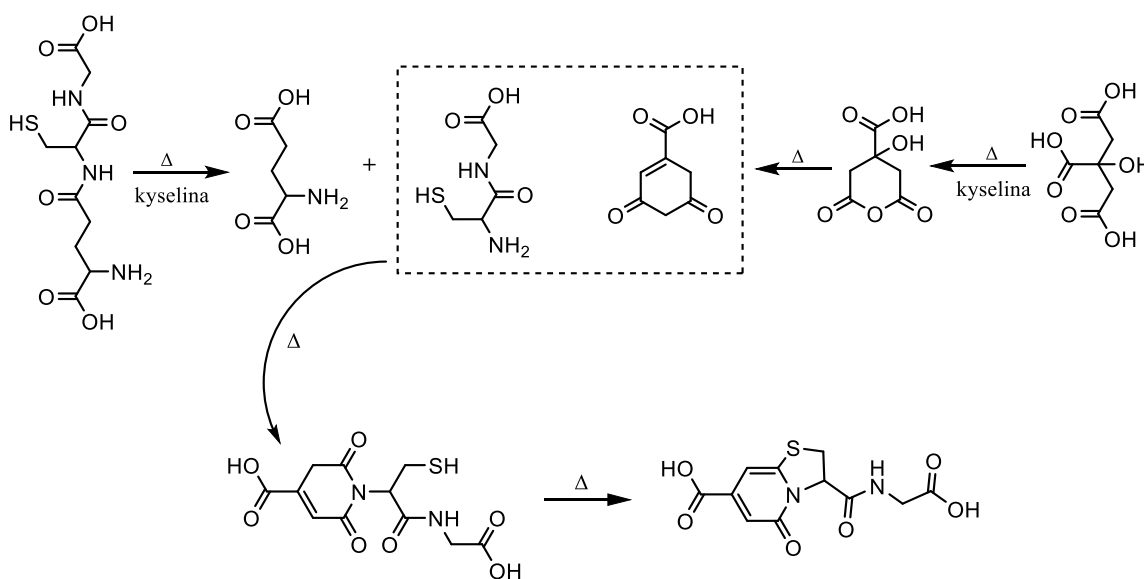
signálu interferujících látek v komplexních matricích. Ve snaze zlepšit citlivost měření byla vyvinuta řada modifikací elektrod [72].

1.5.3 Chemiluminiscenční metody

Chemiluminiscenční metody mají ve srovnání s jinými technikami výhodu v jednoduchosti, nízkém detekčním limitu, širokém lineárním dynamickém rozsahu, nízké ceně a vysoké citlivosti. Pro stanovení hladin GSH v biologických vzorcích bylo navrženo několik metod [73–78].

1.5.4 Fluorescenční metody

Hladiny GSH lze stanovit při použití nanovrstev MnO_2 . GSH redukuje MnO_2 na Mn^{2+} , v důsledku toho dojde k ovlivnění vlastností nanovrstev a změně fluorescenčního signálu [79]. Nanovrstvy lze použít v kombinaci s uhlíkovými nanotečkami, které slouží jako fluorofor [80]. Kromě uhlíkových nanoteček lze použít sírné nanotečky (S-nanotečky), které jsou příznivé kvůli své biokompatibilitě, vysoké stabilitě a antibakteriálním vlastnostem. Používají se v kombinaci s nanočásticemi Cu_2O , které jsou levné a netoxické. Fluorescence S-nanoteček je zhasána po vytvoření komplexu s nanočásticemi Cu_2O , zavedení GSH může způsobit rozklad nanočástic, což vede k částečnému obnovení fluorescence [81]. Pro stanovení GSH lze také použít jako derivatizační činidlo kyselinu citrónovou. Sama nefluoreskuje, avšak po reakci s GSH vzniká vysoce fluoreskující sloučenina (Obrázek 5) 3-[(karboxymethyl)karbamoyl]-5-oxo-2,3-dihydro-5H[1,3]thiazolo[3,2-a]pyridin-7-karboxylová kyselina (CTPC) [82].



Obrázek 5 Možný mechanismus reakce vzniku 3-[(karboxymethyl)karbamoyl]-5-oxo-2,3-dihydro-5H[1,3]thiazolo[3,2-a]pyridin-7-karboxylové kyseliny (CTPC) [82]

1.5.5 Spektrofotometrické metody

Vzhledem k jednoduché obsluze, vysoké rychlosti detekce a levnosti přístrojů je UV-Vis spektrofotometrie široce používána v oblastech chemické a biochemické detekce. Avšak thiolová skupina cysteinu významně interferuje s analýzou GSH. Toto rušení lze eliminovat například použitím alloxanu, který reaguje s GSH [83]. Další možností stanovení je použití tetrachlorpalladátu amonného, který reaguje s GSH za vzniku dvou stechiometricky různých žlutých komplexů [84].

1.5.6 Separční metody

1.5.6.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je méně využívanou metodou pro stanovení hladiny GSH v biologických vzorcích. GSH je derivatizován ethylchlorformiátem, případně anhydridem kyseliny trifluoroctové na těkavý derivát [85–87].

1.5.6.2 Kapalinová chromatografie

Derivatizace v kapalinové chromatografii

Téměř všechny metody kapalinové chromatografie pro stanovení thiolů, s výjimkou těch ve spojení s odpařovacím detektorem rozptylu světla či hmotnostním detektorem, jsou závislé na derivatizačním kroku. Derivatizace je provedena buď před separací nebo po ní. Volba vhodného derivatizačního činidla je důležitá jak pro detekci, tak stabilizaci thiolů a zlepšení separace. Předkolonová derivatizace je doporučována proto, že hrozí riziko oxidace thiolů během separace [88]. Postkolonová derivatizace je jednodušší a minimalizuje interference související s maticí [89]. Reakce musí být dostatečně rychlá, produkt musí být stabilní jen do doby, než vstoupí do detektoru [90].

Během let byla vyvinuta řada derivatizačních postupů. Jedním z nich je derivatizace s 2,4-dinitrofluorbenzenem (FDNB), vhodná pro simultánní stanovení hladiny GSH a GSSG. Derivatizace 1-dimethylaminonafthalen-5-sulfonylchloridem (dansyl-Cl) poskytuje deriváty s vysokou intenzitou fluorescence [91]. Dansyl-Cl lze také použít v kombinaci s kyselinou jodoctovou jako alkylačním činidlem. Tato metoda je vhodná pro malé objemy vzorků, nevýhodou je však časová náročnost a pomalá reakce jodoctové kyseliny s volnými thiolů [92].

Módy separace

Často využívaným módem separace je ta na reverzních fázích, která je založená na interakci mezi nepolárním analytem a nepolární stacionární fází. Tento mód není vhodný pro separaci vysoce polárního GSH, proto je derivatizován na méně polární derivát. Nejčastěji používanými stacionárními fázemi jsou s vázanými alkyly (oktadecyl, oktyl, fenyl, bifenyl) [88,93].

Polární sloučeniny jsou dobře zadržovány a separovány při použití módu HILIC (z angl. Hydrophilic Interaction LIquid Chromatography), proto je tento typ separace také často používán [94].

Kapalinová chromatografie ve spojení s UV detekcí

HPLC ve spojení s UV detekcí vyžaduje derivatizaci GSH [95]. UV detektory jsou levné a při správném nastavení metody lze dosáhnout přijatelnou selektivitu a přesnost [96].

Kapalinová chromatografie ve spojení s fluorescenční detekcí

HPLC ve spojení s fluorescenční detekcí je jednoduchá, selektivní a dostatečně citlivá. Vzhledem k tomu, že GSH nefluoreskuje, musí být převeden na vhodný fluoreskující derivát [97,98]. GSH je nejčastěji derivatizován OPA [99], NBD-F [100] nebo ABD-F [101]. Derivatizace s OPA neumožňuje simultánní stanovení GSH a GSSG. Jednou z možností je blokování thiolové skupiny GSH *N*-ethylmaleimidem po níž následuje redukce GSSG dithiothreitem a derivatizace s OPA. Další možností je stanovení hladiny celkového GSH (tGSH) a redukovaného GSH. Rozdíl mezi hladinami tGSH a redukovaného GSH odpovídá hladině GSSG. Tento přístup však nezajišťuje správné stanovení hladiny GSH a GSSG [102].

Kapalinová chromatografie ve spojení s elektrochemickou detekcí

Metodou kapalinové chromatografie ve spojení s elektrochemickou detekcí (ECD) lze stanovit hladiny GSH s vysokou specifitou a citlivostí bez nutnosti derivatizace [103]. Použití uhlíkových elektrod je spojeno s potížemi, kterými jsou nestabilní odezva při vysokém napětí, vysoký šum pozadí vznikající oxidací látek v mobilní fázi a pokles citlivosti způsobený adsorpcí materiálu na povrch elektrody. K překonání těchto problémů je vhodnější využít borem dopovanou diamantovou elektrodu [104]. Hlavním omezením ECD je ztráta signálu po několika provedených analýzách [105].

Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí

Kapalinovou chromatografií ve spojení s tandemovou hmotnostní spektroskopií lze simultánně měřit hladiny GSH a GSSG bez předchozí derivatizace. Díky snadné oxidaci GSH je však vhodné blokovat thiolovou skupinu, tedy i zde je derivatizace vyžadována [106,107]. Thiolová skupina GSH je nejčastěji blokována alkylačním činidlem, například NEM, pak jsou simultánně měřeny hladiny GSH-NEM a GSSG [108].

Souhrnné porovnání výše zmíněných detektorů je uvedeno v Tabulce 1.

Tabulka 1 Porovnání detektorů využívaných v kapalinové chromatografii při stanovení hladin glutathionu

	UV	Fluorescenční	Elektrochemický	Hmotnostní
Citlivost	nízká [96]	vysoká [98]	vysoká [103]	vysoká [107]
Selektivita	střední [96]	vysoká [98]	vysoká [104]	vysoká [107]
Nutnost derivatizace	ano [95]	ano [97]	ne/ano [103]	ne/ano [107]

1.5.6.3 Kapilární elektroforéza

Předností kapilární elektroforézy (CE) oproti HPLC je její menší složitost a také to, že nevyžaduje derivatizaci. Přesto je derivatizace GSH vhodná, protože spolehlivě chrání GSH před oxidací. NEM je v tomto případě jedním z nejvhodnějších činidel, protože reaguje rychle a specificky. Tvoří deriváty, které jsou stabilní při pH <7 a neinterferují s analýzou. Ke stabilizaci krve je vhodné použít K₃EDTA. I přes jednoduchost stanovení CE, vykazuje metoda řadu problémů jako stabilitu analytů, jejich extrakci z erytrocytů a reprodukovatelnost [109]. Účinnost a rychlost stanovení ovlivňuje hned několik faktorů. Mezi nejdůležitější faktory ovlivňující separaci patří teplota, délka kapilár, pH a iontová síla roztoku elektrolytu [110].

CE je možné využít ve spojení s elektrochemiluminiscencí (CE-ECL). Ji a kol. popsali postup stanovení GSH metodou CE-ECL využívající platinovou elektrodu a tris(2,20-bipyridin)ruthenium(II) (Ru(bpy)₃²⁺) [111]. CE ve spojení s UV detekcí vykazuje nízkou citlivost, proto byla testována celá řada fluorescenčních činidel. Jako nejúčinnější se ukázal OPA a naftalendikarboxaldehyd (NDA) [112]. Oproti CE-UV vykazuje CE ve spojení s laserem indukovanou fluorescenční (LIF) detekcí vyšší citlivost. Jako derivatizační činidlo lze použít eosin-5-maleimid nebo 4-chlor-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl), jehož předností je krátká doba derivatizace a stabilita aminových derivátů při pokojové teplotě [113,114].

1.5.7 Ramanova spektroskopie

Detekce založená na povrchově zesíleném Ramanově rozptylu (SERS, z angl. Surface Enhanced Raman Scattering) může být použita pro stanovení hladin GSH a GSSG v buňkách. SERS poskytuje informace na molekulové úrovni, tato technika má však neuspokojivou citlivost. Tento problém řeší plasmonické nanočástice, které citlivost zvyšují [115]. Například imobilizované nanočástice stříbra na povrchu magnetitu ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$) [116].

1.5.8 Magnetická rezonanční spektroskopie

Magnetická rezonanční spektroskopie je nedestruktivní metoda pro stanovení hladiny GSH v mozku. Koncentrace GSH v mozku se u zdravých jedinců pohybuje v rozmezí 1–2 mmol/l. Vzhledem k tomu, že jsou rezonanční signály GSH překrývány jinými metabolity vyskytujícími se v mozku (kreatin, aspartát, glutamát, glutamin, *N*-acetylaspartát, kyselina γ -aminomáselná), je jeho detekce nejednoznačná [117–119].

2 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo porovnat postupy přípravy vzorku pro stanovení hladiny GSH v lidské krvi získané technikou suché kapky, studovat nejvýznamnější parametry ovlivňující kvantitativní výsledky a porovnat hladiny GSH ve vzorcích DBS stanovených separační metodou, tedy HPLC-FLD a neseparační metodou, spektrofluorimetrickou.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

Deionizovaná voda (H_2O), Mr 18,00

Dithiothreitol ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$), Mr 154,25 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), Mr 46,07 (Merck, Darmstadt, Německo)

Ferrikyanid draselný ($\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_3$), Mr 329,24 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Glutathion ($\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$), Mr 307,33 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Glutathiondisulfid ($\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_{12}\text{S}_2$), Mr 612,15 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Glutathionethylester ($\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$), Mr 335,38 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Hydrogenfosforečnan draselný hexahydrát ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), Mr 228,23 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Hydrogenfosforečnan sodný (Na_2HPO_4), Mr 141,96 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Hydroxid sodný (NaOH), Mr 39,99 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Chlorid železitý hexahydrát ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), Mr 270,29 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Kyanid draselný (KCN), Mr 65,12 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Kyselina ethylendiamintetraoctová; EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Mr 372,2 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

o-Ftaldialdehyd ($\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_2$), Mr 134,14 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

3.2 Pomůcky a přístroje

Analytické váhy AdventurerTM Pro AV114C (Ohaus, Nänikon, Švýcarsko)

Automatické pipety (Biohit PLC, Helsinky, Finsko)

Centrifuga Sorvall TC6 (Sorvall Instruments, Newtown, CT, USA)

Děrovací kleště, pinzeta

Hlubokomrazičící box MDF-U 3086S (Sanyo Electric, Ósaka, Japonsko)

Kapalinový chromatograf Nexera XR (Shimadzu, Kjóto, Japonsko)

- Analytická čerpadla LC40B XR
- Odplyňovací zařízení DGU-403
- Autosampler SIL-40C XR
- Termostat kolon CTO-40C
- Fluorescenční detektor RF-10A XL
- Software LabSolutions, verze 5.97 SP1

Kolona LichroCART[®] 125 × 4 Purospher[®] STAR RP-18e, 5 μm, opatřená ochrannou kolonou LichroCART[®] 4 × 4 Purospher[®] STAR RP-18e, 5 μm (Merck, Darmstadt, Německo)

Kombinovaná chladnička s mrazákem (AEG, Frankfurt nad Mohanem, Německo)

Laboratorní sklo – kádinky, Erlenmeyerovy baňky, odměrné válce, lodička na vážení, zkumavky

Magnetické míchadlo Heidolph (Heidolph Instruments, Schwabach, Německo)

Mikrotitrační destička s víčkem

Nylonové filtry pro filtrování mobilní fáze o porozitě 0,2 μm (Supelco, Bellefonte, PA, USA)

Odběrová karta Whatman 903[™] (GE Healthcare Ltd., Cardiff, UK)

Odběrové zkumavky s K₃EDTA (9 ml) Vacuette (Greiner Bio-one, Kremsmünster, Rakousko)

Odstředivka FC5706 (Ohaus, Parsippany, USA)

Skleněné vialky se šroubovacím uzávěrem (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)

Spektrometr Synergy H1 microplate reader (Agilent, Snta Clara, CA, USA)

Třepačka Reax Multi (Heidolph, Frankfurt nad Mohanem, Německo)

pH-metr inoLab, level 2, (WTW, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim, Německo)

Polypropylenové (PP) mikrozkušavky s víčkem typu Eppendorf 1,5 a 2 ml (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)

Předvážky Adventurer™ Pro AV212C (Ohaus, Nänikon, Švýcarsko)

Vortex Reax top (Heidolph, Schwabach, Německo)

Zařízení na úpravu vody Smart2pure (TKA, Niederelbert, Německo)

3.3 Pracovní roztoky

Příprava deionizované vody

Deionizovaná voda ($G = 0,055 \mu\text{S}$) byla vyrobena zařízením na úpravu vody Smart2pure.

Příprava zásobního roztoku glutathionu

Navážka 0,1541 g byla rozpuštěna v 10 ml deionizované vody. Roztok byl pipetován po 1 ml alikvótech do 1,5 ml polypropylenových (PP) zkumavek a uchováván při $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

Příprava zásobního roztoku glutathionethylesteru ve vodě

Navážka 0,0104 g byla rozpuštěna ve 25 ml deionizované vody. Roztok byl pipetován po 1 ml alikvótech do 1,5 ml PP zkumavek a uchováván při $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

Příprava fyziologického roztoku (asi 0,9%)

Navážka 0,18 g chloridu sodného byla rozpuštěna v 20 ml deionizované vody. Roztok byl uchováván při $4 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu maximálně 1 týdne.

Příprava mobilní fáze A (ethanol – 25 mmol/l Na_2HPO_4 (15:85, v/v), pH 6,0)

Navážka 1,78 g Na_2HPO_4 byla rozpuštěna v 425 ml deionizované vody, po rozpuštění Na_2HPO_4 bylo k roztoku přidáno 75 ml ethanolu a pH upraveno 6 mol/l kyselinou chlorovodíkovou na hodnotu 6,0. Mobilní fáze byla přefiltrována skrz nylonový filtr o porozitě $0,2 \mu\text{m}$ a odvzdušněna v ultrazvukové lázni.

Příprava mobilní fáze B (ethanol – 25 mmol/l Na_2HPO_4 (50:50, v/v), pH 6,0)

Navážka 1,78 g Na_2HPO_4 byla rozpuštěna v 250 ml deionizované vody, po rozpuštění Na_2HPO_4 bylo k roztoku přidáno 250 ml ethanolu a pH upraveno 6 mol/l kyselinou chlorovodíkovou na hodnotu 6,0. Mobilní fáze byla přefiltrována skrz nylonový filtr o porozitě $0,2 \mu\text{m}$ a odvzdušněna v ultrazvukové lázni.

Příprava roztoku EDTA v 0,1 mol/l Na₂HPO₄ (asi 0,1%, pH 8,0)

Navážky 0,05 g EDTA a 0,71 g Na₂HPO₄ byly rozpuštěny v 50 ml deionizované vody a pH upraveno 6 mol/l kyselinou chlorovodíkovou (hydroxidem sodným) na hodnotu 8,0. Roztok byl přefiltrován skrz nylonový filtr o porozitě 0,2 µm a uchováván při 4 °C po dobu maximálně 1 týdne.

Příprava roztoku *o*-ftaldialdehydu v ethanolu (asi 0,1%)

Navážka 0,0040 g OPA byla rozpuštěna ve 4 ml ethanolu. Roztok byl pipetován po 500 µl alikvótech do 1,5 ml PP zkumavek a uchováván při –80 °C maximálně po dobu jednoho měsíce.

Příprava roztoku dithiothreitolu (asi 1 mmol/l)

Navážka 0,0042 g DTT byla rozpuštěna v 25 ml deionizované vody. Roztok byl pipetován po 1 ml alikvótech do 1,5 ml PP zkumavek a uchováván při –80 °C maximálně po dobu 1 měsíce.

Příprava Drabkinova činidla

Navážky 0,05 g kyanidu draselného, 0,20 g ferrikyanidu draselného, hexahydrátu, a 0,14 g hydrogenfosforečnanu draselného, hexahydrátu, byly rozpuštěny v 1 l deionizované vody. Činidlo bylo uchováváno při 4 °C maximálně po dobu 1 týdne.

Příprava pufru pro eluci hemoglobinu ze zaschlé krve

Navážka 0,0084 g hydrogenfosforečnanu draselného, hexahydrátu, byla rozpuštěna v 60 ml deionizované vody a pH upraveno na pH Drabkinova činidla (7,75). Roztok byl uchováván při 4 °C po dobu maximálně 1 týdne.

Příprava standardů glutathionu pro konstrukci kalibrační křivky

Standards byly připraveny smícháním zásobního roztoku glutathionu s fyziologickým roztokem (Tabulka 2).

Tabulka 2 Příprava standardů glutathionu pro konstrukci kalibrační křivky

	Koncentrace [$\mu\text{mol/l}$]	Zásobní roztok [μl]	Fyziologický roztok [μl]
S0	0,0	0	200
S1	501,4	10	990
S2	1002,9	10	490
S3	2507,2	10	190
S4	5014,3	100	900
S5	10028,6	20	80
S6	20057,2	400	600
S7	50143,0	100	0

Příprava roztoků glutathionu pro standardní přídavky

Roztoky GSH o různé koncentraci byly připraveny ředěním zásobního roztoku GSH fyziologickým roztokem (Tabulka 3).

Tabulka 3 Příprava roztoků glutathionu pro standardní přídavky

	Koncentrace [$\mu\text{mol/l}$]	Zásobní roztok glutathionu [μl]	Fyziologický roztok [μl]
S0	0,0	0	40
S1	501,4	10	990
S2	1002,9	10	490
S3	1519,5	10	320
S4	2005,7	10	240
S5	2507,2	10	190
S6	3039,0	10	155
S7	3581,6	10	130
S8	4011,4	10	115
S9	4558,5	10	100
S10	5014,3	10	90
S11	5571,4	10	80
S12	5899,2	10	75
S13	6267,9	10	70
S14	7163,3	10	60
S15	7714,3	10	55
S16	8357,2	10	50
S17	4775,5	10	95
S18	5014,3	10	90
S19	5278,2	10	85
S20	5571,4	10	80
S21	5899,2	10	75

Tabulka 3 Pokračování

	Koncentrace [$\mu\text{mol/l}$]	Zásobní roztok glutathionu [μl]	Fyziologický roztok [μl]
S22	6267,9	10	70
S23	6685,7	10	65
S24	7163,3	10	60
S25	13080,8	30	85
S26	13675,4	30	80
S27	14326,6	30	75
S28	15042,9	30	70
S29	15428,6	40	90
S30	16045,8	40	85
S31	16714,3	40	80
S32	17441,0	40	75
S33	18233,8	40	70
S34	18571,5	50	85
S35	19285,8	50	80
S36	20057,2	50	75
S37	20892,9	50	70
S38	21801,3	50	65
S39	22792,3	50	60
S40	23877,6	50	55
S41	25071,5	50	50
S42	26391,1	50	45
S43	27857,2	50	40
S44	29495,9	50	35
S45	31339,4	50	30
S46	33428,7	50	25
S47	35816,4	50	20
S48	36467,6	80	30
S49	38204,2	80	25
S50	40114,4	80	20
S51	50143,0	20	0

3.4 Vzorky krve

3.4.1 Odběr krve

Krev byla odebírána z kubitální žíly dárce oprávněnou osobou do zkumavek obsahujících K_3EDTA . Krev byla po odběru ihned zpracována a po zpracování pipetována na filtrační papír předem ošetřený DTT. Vzorky krve byly následně ponechány zaschnout po dobu

minimálně 3 hodin při laboratorní teplotě a chráněny před přímým slunečním světlem. Po zaschnutí byly ze vzorků DBS vyraženy disky (6 mm) a uchovávány do doby analýzy v 2,0ml PP zkumavkách při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dárci před odběrem poskytli informovaný souhlas.

3.4.2 Odběr krve na odběrovou kartu

Prst dárce byl napíchnut sterilní lancetou. První kapka byla setřena buničinou a druhá nanesena na odběrovou kartu předem ošetřenou DTT. Vzorky krve byly ponechány zaschnout po dobu minimálně 3 hodin při laboratorní teplotě a chráněny před přímým slunečním světlem. Po zaschnutí byly ze vzorků DBS vyraženy disky (6 mm) a uchovávány do doby analýzy v 2,0ml PP zkumavkách při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dárci před odběrem poskytli informovaný souhlas.

3.5 Pracovní postupy stanovení hladiny glutathionu ve vzorcích suché kapky krve metodou kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí

3.5.1 Zpracování vzorků suché kapky krve

K vyraženému disku (6 mm) v 2,0ml PP zkumavce bylo přidáno 250 μl roztoku DTT. Po 30minutové inkubaci bylo odebráno 50 μl eluátu a přeneseno do 1,5ml PP zkumavky. K eluátu byl přidán 1,0 ml vychlazeného ethanolu ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), směs inkubována 5 minut při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, odstředěna (laboratorní teplota, $6000 \times g$, 2 min), 100 μl supernatantu přeneseno do vialky, přidáno 500 μl 0,1 mol/l fosfátového pufru (pH 8,0) a 20 μl OPA. Směs byla inkubována 15 minut při laboratorní teplotě a chráněna před přímým slunečním světlem.

3.5.2 Příprava kalibrátorů pro konstrukci kalibrační křivky

Kalibrátory byly připraveny smícháním standardů glutathionu připravených v kapitole 3.3 s krví v poměru 19:1 (Tabulka 4). Po 30minutové inkubaci za mírného třepání byly jednotlivé kalibrátory pipetovány (25 μl) na filtrační papír předem ošetřený DTT. Po zaschnutí byly vyražené disky zpracovány podle postupu uvedeném v kapitole 3.5.1.

Tabulka 4 Příprava kalibračních standardů

	Koncentrace [$\mu\text{mol/l}$]	Standard S0–S7 [μl]	Krev [μl]
S0	0,0	100	1900
S1	25,1	50	950
S2	50,1	50	950
S3	125,4	50	950
S4	250,7	100	1900
S5	501,4	50	950
S6	1002,9	100	1900
S7	2507,2	50	950

3.5.3 Vliv hodnoty hematokritu na koncentraci glutathionu

Pro zjišťování vlivu hodnoty Hct na koncentraci GSH ve vzorcích DBS bylo smícháno 9,5 ml krve a 500 μ l standardu (připravené viz kapitola 3.3, použity byly standardy o třech různých koncentracích). Takto připravené vzorky krve byly odstředěny ($1700 \times g$, 15 min, laboratorní teplota) a plazma přenesena do čisté zkumavky. Erytrocyty a plazma byly smíchány v poměrech uvedených v Tabulce 5 a to pro každou hladinu GSH. Krev byla pipetována v různých objemech v triplikátu na filtrační papír předem ošetřený DTT. Po zaschnutí byly vyražené disky zpracovány podle postupu uvedeném v kapitole 3.5.1.

Tabulka 5 Příprava krve s různou hodnotou hematokritu

Hematokrit [%]	V _{ERY} [μ l]	V _{PLAZMA} [μ l]
30	720	1680
45	1080	1320
60	1440	960

3.5.4 Vliv nanášeného objemu a homogenity na koncentraci glutathionu

Pro zjišťování vlivu nanášeného objemu na koncentraci GSH byly použity stejné vzorky DBS jako při studování vlivu Hct (kapitola 3.5.3). Pipetovaný objem byl 30, 50, 70 a 100 μ l. U vzorku DBS, kdy byl nanášen objem 100 μ l byl pro určení homogenity disk vyražen jak ze středu, tak z periferie.

3.5.4 Výtěžnost metody

Pro určení výtěžnosti metody byla krev smíchána v poměru 19:1 se standardy připravených v kapitole 3.3. Po 30minutové inkubaci za mírného třepání byla krev pipetována v triplikátu na filtrační papír předem ošetřený DTT. Po zaschnutí byly vyražené disky zpracovány podle postupu uvedeném v kapitole 3.5.1.

3.5.5 Přesnost v sérii a mezi sériemi

Pro určení přesnosti v sérii a mezi sériemi byla krev od tří dárců smíchána v poměru 19:1 se standardy připravených v kapitole 3.3. Po 30minutové inkubaci za mírného třepání byla krev pipetována na filtrační papír předem ošetřený DTT. Po zaschnutí byly vyražené disky zpracovány podle postupu uvedeném v kapitole 3.5.1.

3.5.6 Linearita, mez detekce a stanovitelnosti

Tyto parametry byly vypočteny z parametrů několika kalibračních křivek. Mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ) byly vypočítány podle vztahů:

$$LOD = \frac{3,3 \cdot S_a}{b}$$

Rovnice 1 Výpočet LOD

$$LOQ = \frac{10 \cdot S_a}{b}$$

Rovnice 2 Výpočet LOQ

kde S_a je směrodatná odchylka úseku a b průměr směrnice

3.5.7 Příprava vzorků pro stanovení koncentrace hemoglobinu

Pro stanovení koncentrace hemoglobinu byly použity krve připravené v kapitole 3.5.3. Krev byla pipetována v triplikátech na filtrační papír, tentokrát neošetřený DTT. Krve byly také pipetovány po 30, 50, 70 a 100 μ l. U skvrny o objemu 100 μ l byl opět vyražen disk jak ze středu, tak z periferie. Po zaschnutí krve byl ze vzorku DBS vyražen disk, vložen do 1,5ml PP zkumavky a přidáno 400 μ l fosfátového pufru. Po 30minutové inkubaci za mírného třepání bylo 40 μ l extraktu přeneseno do mikrotitrační destičky a přidáno 160 μ l Drabkinova činidla. Po 20minutové inkubaci byla proměřena absorbance při 540 nm.

3.5.8 Příprava vzorků krve se standardními přídávky

Vzorky krve byly připraveny smícháním standardů (připravených v kapitole 3.3) s krví (Tabulka 6). Po 30minutové inkubaci za mírného třepání bylo 50 μ l takto připravené krve pipetováno na odběrovou kartu předem ošetřenou DTT. Po zaschnutí krve byly vyražené disky zpracovány podle postupu uvedeném v kapitole 3.5.1.

Tabulka 6 Příprava vzorků krve se standardními přídávky

	Koncentrace [μ mol/l]	Standard S0–S51 [μ l]	Krev [μ l]
P0	0,0	20	380
P1	25,1	10	190
P2	50,1	10	190
P3	76,0	10	190
P4	100,3	10	190
P5	125,4	20	380
P6	152,0	10	190
P7	179,1	10	190
P8	200,6	10	190
P9	227,9	10	190
P10	250,7	20	380
P11	278,6	10	190
P12	295,0	10	190

Tabulka 6 Pokračování

	Koncentrace [$\mu\text{mol/l}$]	Standard S0–S51 [μl]	Krev [μl]
P13	313,4	10	190
P14	358,2	10	190
P15	385,7	10	190
P16	417,9	10	190
P17	238,8	10	190
P18	250,7	10	190
P19	263,9	10	190
P20	278,6	20	380
P21	295,0	10	190
P22	313,4	10	190
P23	334,3	10	190
P24	358,2	10	190
P25	654,0	10	190
P26	683,8	10	190
P27	716,3	10	190
P28	733,8	20	390
P29	771,4	10	190
P30	802,3	10	190
P31	835,7	10	190
P32	872,1	10	190
P33	911,7	10	190
P34	928,6	10	190
P35	964,3	10	190
P36	1002,9	20	380
P37	1044,7	10	190
P38	1090,1	10	190
P39	1139,6	10	190
P40	1193,9	10	190
P41	1253,6	10	190
P42	1319,6	10	190
P43	1392,9	10	190
P44	1474,8	10	190
P45	1567,0	20	380
P46	1671,4	10	190
P47	1790,8	10	190
P48	1823,4	10	190
P49	1910,2	10	190
P50	2005,7	10	190
P51	2507,2	20	380

3.5.9 Příprava vzorků suché kapky krve získaných od dárců

Disky byly po zaschnutí vyraženy a zpracovány podle postupu uvedeném v kapitole 3.5.1.

3.6 Podmínky metody kapalinové chromatografie ve spojení s fluorescenční detekcí pro stanovení glutathionu ve vzorcích suché kapky krve

Kolona: LichroCART[®] 125 × 4 mm, Purospher[®] Star RP-18e, 5 μm, opatřená ochrannou kolonou LichroCART[®] 4 × 4 mm, Purospher[®] Star RP-18e, 5 μm

Mobilní fáze: ethanol – 25 mmol/l Na₂HPO₄ (15:85, v/v), pH 6,0

Průtok mobilní fáze: 0,5 ml/min

Termostat kolon: 37 °C

Detekce: λ_{EX}= 350 nm, λ_{EM}= 420 nm

Dávkovaný objem: 5 μl

Doba analýzy: 5 minut

3.7 Zpracování výsledků

Pro vyhodnocení a zpracování výsledků byly použity programy LabSolutions a MS Excel.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Glutathion je významný antioxidant a má důležitou funkci při detoxikaci xenobiotik. Nejčastěji je hladina GSH stanovována v krvi, protože se vyskytuje převážně v erytrocytech [4,7]. Problémem při stanovení GSH je jeho snadná a rychlá oxidace, proto je nutné odběrové karty ošetřit vhodným stabilizačním činidlem, nejčastěji alkylačním činidlem nebo jiným derivatizačním činidlem, případně redukčním činidlem, kdy stanovujeme tzv. celkový GSH [16,17].

Technika DBS je široce využívána pro novorozenecký screening. Je oblíbená pro snadný odběr, transport a skladování. Vyžaduje odběr malého množství krve a je minimálně invazivní [51]. Nevýhodami této techniky jsou zejména vliv hematokritu a chromatografický účinek [54,55].

Hladinu GSH v biologických vzorcích lze měřit celou řadou metod. Každá metoda má své výhody i nevýhody [66,120,121].

Na našem pracovišti byla v minulosti zavedena metoda HPLC-MS/MS pro simultánní stanovení hladiny GSH a GSSG ve vzorku DBS. Odběrové karty byly ošetřeny alkylačním činidlem NEM, a jako IS byl použit glutathionethylester (GSH-EE).

V této diplomové práci byla pro měření hladiny celkového GSH ve vzorcích DBS použita metoda HPLC-FLD. Také tato metoda byla před několika lety na tomto pracovišti zavedena. Cílem této práce bylo určit vybrané analytické parametry a zejména parametry, které výrazně ovlivňují kvantitativní výsledky u techniky DBS, což v minulosti nebylo studováno. Byla testována možnost použití GSH-EE jako IS. Protože GSH-EE je méně polární než GSH, byly oba analyty separovány gradientovou elucí, aby se zkrátila doba analýzy. Mobilní fázi A byla směs ethanolu a 25 mmol/l Na_2HPO_4 (15:85, v/v), o pH 6,0, mobilní fázi B byla směs ethanolu a 25 mmol/l Na_2HPO_4 (50:50, v/v), o pH 6,0. Byly získány podobné výsledky jako s metodou nepoužívající IS (výsledky neprezentovány). Metoda bez IS byla mnohem rychlejší (doba analýzy 5 minut v isokratickém módu oproti 12minutové analýze s IS používající gradientovou eluci). Touto metodou je možné stanovit také hladinu GSSG, ale separátně. Při stanovení hladiny GSSG je ke vzorku přidán NEM, který vytvoří komplex s GSH, poté následuje derivatizace OPA v silně alkalickém prostředí, GSSG je tak hydrolyzován na 2 molekuly GSH, které s OPA reagují za vzniku fluoreskujícího derivátu, komplex GSH-NEM nereaguje. Proto jsme se pokusili připravit IS pro stanovení hladiny GSSG, ethylesterglutathiondisulfid (GSSG-EE), a to oxidací GSH-EE chloridem železitým. To se podařilo, ale dle očekávání došlo

při derivatizaci OPA v alkalickém prostředí nejen k hydrolyze GSSG na GSH, ale také k hydrolyze esterové skupiny.

4.1 Testování vlivu hematokritu na koncentraci glutathionu

Vliv Hct byl testován na třech hladinách koncentrací. Postup přípravy je popsán v kapitole 3.5.3. Protože GSH se vyskytuje především v erythrocytech, je vhodné vztáhnout koncentraci GSH na počet erythrocytů, což technikou DBS nelze. Proto byla koncentrace GSH vztažena na množství hemoglobinu, což technikou DBS lze. Výsledné hodnoty koncentrace GSH pro různé hodnoty Hct jsou uvedeny v Tabulkách 7–9 a Grafech 1–3. U většiny výsledků se koncentrace GSH zvyšuje se zvyšující se hodnotou Hct. Při stanovení hladiny GSH ve vzorcích DBS s hodnotou Hct 60 % nebyly získány spolehlivé výsledky. Hct ovlivňuje viskozitu krve a tím i její rozšíření na filtračním papíře, čím vyšší byla hodnota Hct, tím významnější byl vliv na koncentraci GSH. Hodnota Hct má také vliv na výtěžnost metody. Na šíření krve má vliv i typ filtračního papíru (odběrové karty) [122].

Tabulka 7 Koncentrace glutathionu vztažená na hladinu hemoglobinu pro různou hodnotu hematokritu a velikost nanášeného objemu krve na filtrační papír kontrolního vzorku QC1

QC1	Koncentrace GSH [$\mu\text{mol/g}$ hemoglobinu]					
Nanášený objem [μl]	30	50	70	100 S	100 P	SD
Hct 30 %	5,2	5,7	5,3	5,6	5,1	0,2
Hct 45 %	6,4	8,5	8,7	8,0	8,0	0,8
Hct 60 %	7,3	7,6	9,2	7,8	7,5	0,7

S, střed krevní skvrny; P, periferie krevní skvrny; Hct, hematokrit; GSH, glutathion

Tabulka 8 Koncentrace glutathionu vztažená na hladinu hemoglobinu pro různou hodnotu hematokritu a velikost nanášeného objemu krve na filtrační papír kontrolního vzorku QC2

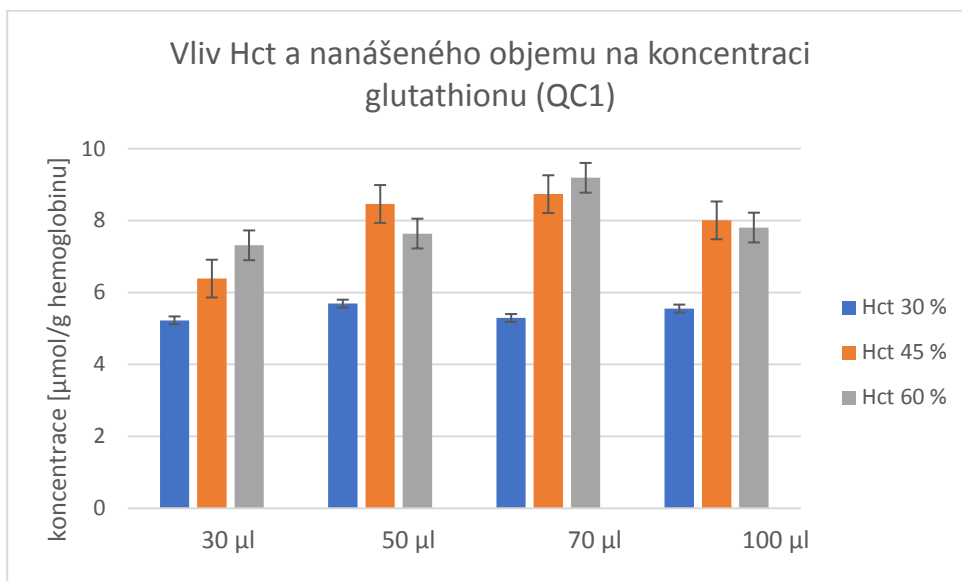
QC2	Koncentrace GSH [$\mu\text{mol/g}$ hemoglobinu]					
Nanášený objem [μl]	30	50	70	100 S	100 P	SD
Hct 30 %	6,1	6,9	6,8	7,7	7,2	0,5
Hct 45 %	8,5	9,8	9,8	9,3	10,5	0,7
Hct 60 %	10,0	9,1	10,2	9,1	7,8	0,8

S, střed krevní skvrny; P, periferie krevní skvrny; Hct, hematokrit; GSH, glutathion

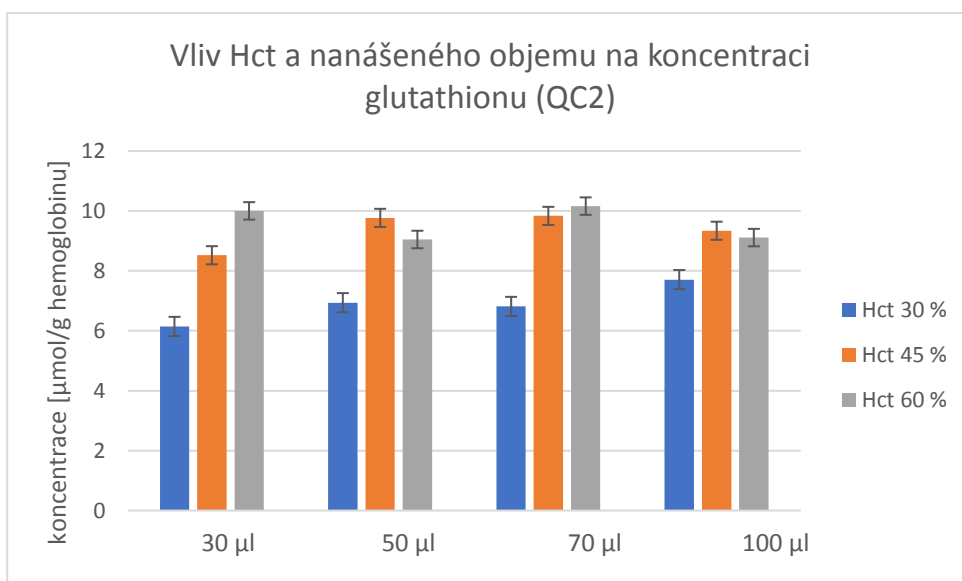
Tabulka 9 Koncentrace glutathionu vztažená na hladinu hemoglobinu pro různou hodnotu hematokritu a velikost nanášeného objemu krve na filtrační papír kontrolního vzorku QC3

QC3	Koncentrace GSH [$\mu\text{mol/g}$ hemoglobinu]					
Nanášený objem [μl]	30	50	70	100 S	100 P	SD
Hct 30 %	11,9	14,6	14,8	14,5	15,8	1,3
Hct 45 %	12,2	12,7	11,9	14,2	15,0	1,2
Hct 60 %	14,1	13,7	13,2	14,9	13,7	0,6

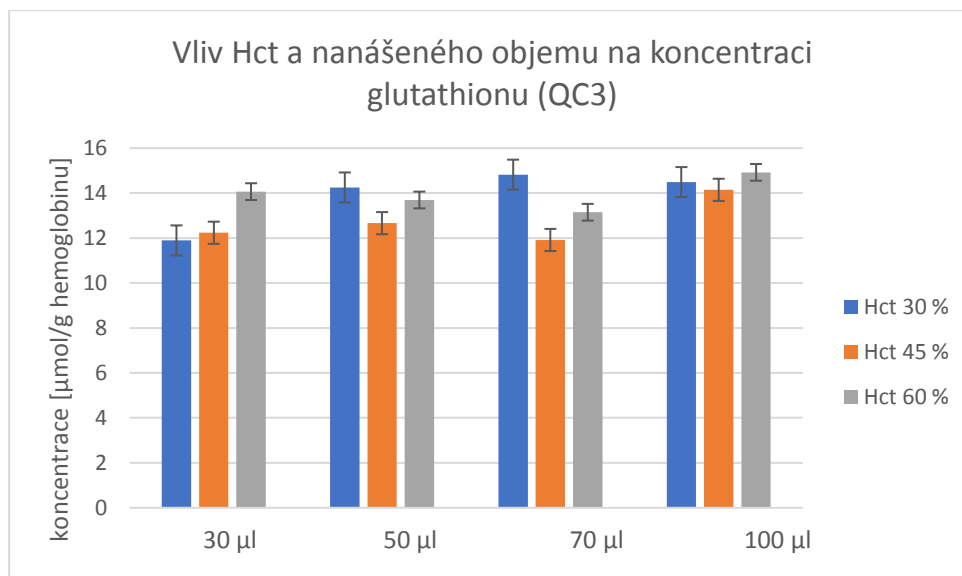
S, střed krevní skvrny; P, periferie krevní skvrny; Hct, hematokrit; GSH, glutathion



Graf 1 Vliv hematokritu (Hct) a nanášeného objemu na koncentraci glutathionu (QC1)



Graf 2 Vliv hematokritu (Hct) a nanášeného objemu na koncentraci glutathionu (QC2)



Graf 3 Vliv hematokritu (Hct) a nanášeného objemu na koncentraci glutathionu (QC3)

4.1.1 Stanovení hladiny hemoglobinu ve vzorcích suché kapky krve

Hladina hemoglobinu byla stanovena u všech vzorků studie vlivu hematokritu a velikosti nanášeného objemu krve na kvantitativní výsledky. Postup přípravy je popsán v kapitole 3.5.7. Výsledky koncentrace hemoglobinu ve vzorcích DBS jsou uvedeny v Tabulkách 10–12.

Tabulka 10 Koncentrace hemoglobinu ve vzorcích suché kapky krve pro testování vlivu vybraných parametrů na kvantitativní výsledky (QC1)

QC1	Koncentrace hemoglobinu [g/l]					
Nanášený objem [μl]	30	50	70	100 S	100 P	SD
Hct 30 %	107	112	111	115	116	3
Hct 45 %	143	157	157	179	185	15
Hct 60 %	183	200	235	214	231	19

S, střed krevní skvrny; P, periferie krevní skvrny; Hct, hematokrit

Tabulka 11 Koncentrace hemoglobinu ve vzorcích suché kapky krve pro testování vlivu vybraných parametrů na kvantitativní výsledky (QC2)

QC2	Koncentrace hemoglobinu [g/l]					
Nanášený objem [μl]	30	50	70	100 S	100 P	SD
Hct 30 %	109	111	114	111	117	9
Hct 45 %	129	148	163	159	158	12
Hct 60 %	204	249	238	247	245	17

S, střed krevní skvrny; P, periferie krevní skvrny; Hct, hematokrit

Tabulka 12 Koncentrace hemoglobinu ve vzorcích suché kapky krve pro testování vlivu vybraných parametrů na kvantitativní výsledky (QC3)

QC3	Koncentrace hemoglobinu [g/l]					
	30	50	70	100 S	100 P	SD
Nanášený objem [μl]	30	50	70	100 S	100 P	SD
Hct 30 %	108	107	105	115	117	5
Hct 45 %	141	147	162	162	154	8
Hct 60 %	194	207	251	219	243	21

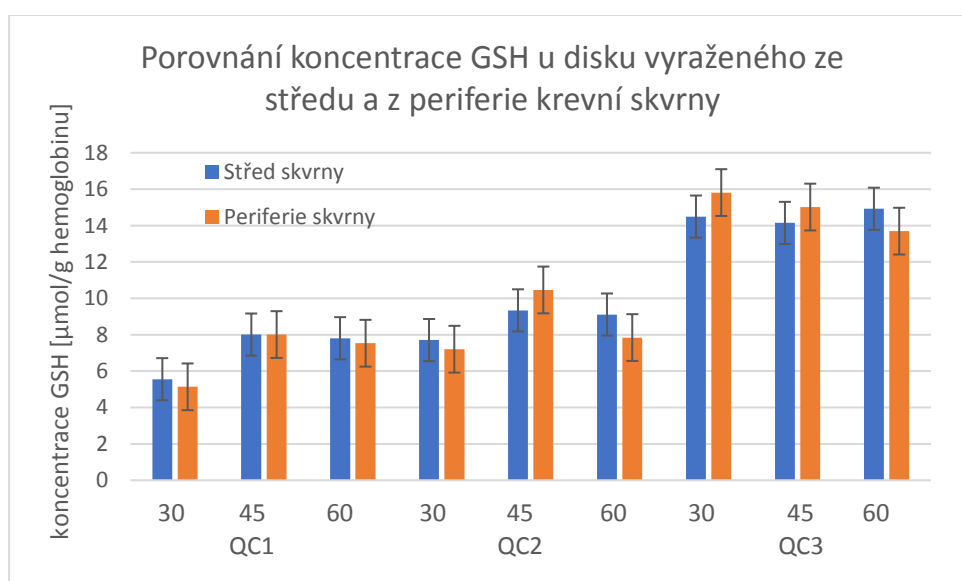
S, střed krevní skvrny; P, periferie krevní skvrny; Hct, hematokrit

4.2 Testování vlivu nanášeného objemu na koncentraci glutathionu ve vzorcích suché kapky krve

Vliv nanášeného objemu na filtrační papír byl testován na třech hladinách koncentrací pro různé hodnoty hematokritu. Výsledky jsou uvedeny v Grafech 1–3. Z výsledků je patrné, že koncentrace GSH ve vzorcích DBS závisí na velikosti nanášeného objemu na filtrační papír. U většiny výsledků byl pozorován nárůst hladiny glutathionu. Vliv velikosti nanášeného objemu krve na filtrační papír by měl být testován alespoň se třemi různými hodnotami Hct se třemi velikostmi nanášeného objemu [123].

4.3 Testování vlivu homogenity na koncentraci glutathionu ve vzorcích suché kapky krve

Homogenita byla testována na třech hladinách koncentrace GSH s různou hodnotou hematokritu. Disk byl vyražen ze středu a z periferie krevní skvrny. Z grafu je patrné (Graf 4), že se hladina GSH v discích vyražených ze středu a periferie výrazným způsobem nelišila.



Graf 4 Porovnání koncentrace glutathionu v discích vyražených ze středu a periferie krevní skvrny

4.4 Určení výtěžnosti metody stanovení glutathionu ve vzorcích suché kapky krve

Výtěžnost byla určena metodou standardního přídávku na 4 úrovních koncentrací GSH. Postup přípravy vzorků je uveden v kapitole 3.5.4. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 13. Oproti výsledkům jiných autorů byla námi určená výtěžnost výrazně nižší [124].

Tabulka 13 Výsledky výtěžnosti metody stanovení glutathionu ve vzorcích suché kapky krve metodou kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí

	Koncentrace teoretická [μmol/l]	Koncentrace naměřená [μmol/l]	Výtěžnost [%]
V1	0	–	–
V2	250,7	211,5	84,4
V3	501,4	353,8	70,6
V4	1002,9	675,5	67,4

4.5 Určení přesnosti v sérii a mezi sériemi metody stanovení glutathionu ve vzorcích suché kapky krve

Přesnost metody byla testována na 3 různých hladinách koncentrací GSH. Vzorky byly připraveny v 6 opakováních podle postupu uvedeném v kapitole 3.5.5 a byly měřeny v rozmezí dvou dnů. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 14. Variační koeficient byl vypočítán podle Rovnice 3. Nepřesnost metody je v porovnání s jinými autory velká [124].

Tabulka 14 Výsledky přesnosti v sérii a mezi sériemi metody stanovení glutathionu ve vzorcích suché kapky krve metodou kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí

	Den 1			Den 2			Oba dny		
	AVG	SD	CV	AVG	SD	CV	AVG	SD	CV
QC1	687,9	61,4	8,9	988,2	53,2	5,4	838,1	160,8	19,2
QC2	808,6	56,5	7,0	1140,5	43,1	3,8	974,6	173,4	17,8
QC3	1625,4	131,5	8,1	1969,3	128,1	6,5	1797,4	215,5	12,0

QC1, vzorek kontroly kvality s nízkou koncentrací; QC2, vzorek kontroly kvality se střední koncentrací; QC3, vzorek kontroly kvality s vysokou koncentrací; AVG, aritmetický průměr (koncentrace [μmol/l]); SD, směrodatná odchylka (koncentrace [μmol/l]); CV, variační koeficient, uveden v procentech (vypočítaný podle Rovnice 3)

$$CV = \frac{SD}{AVG} \cdot 100$$

Rovnice 3 Výpočet variačního koeficientu

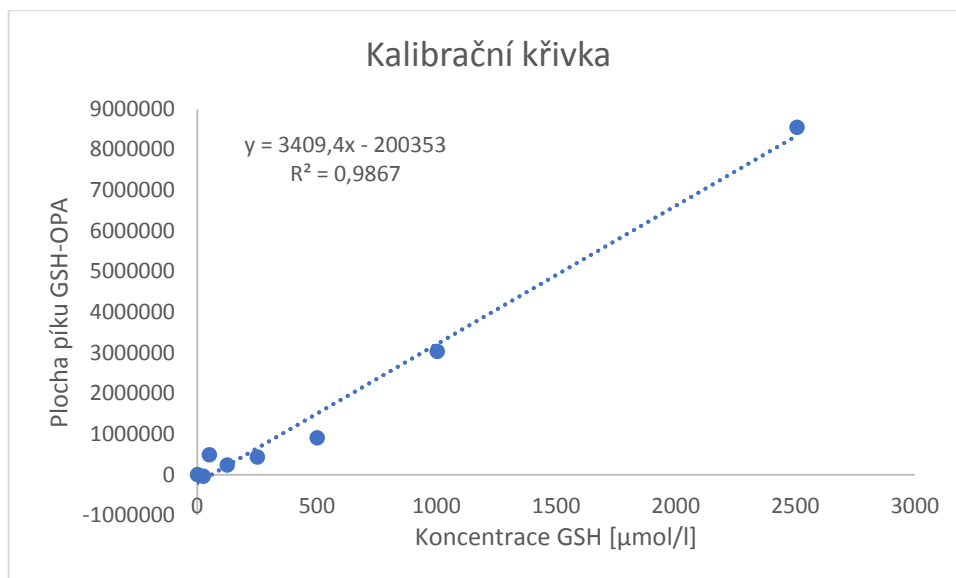
4.6 Určení linearity, meze detekce a stanovitelnosti metody stanovení glutathionu ve vzorcích suché kapky krve

Příprava kalibračních standardů je popsána v kapitole 3.5.2. Linearita metody byla testována v rozsahu koncentrací 0–2500 $\mu\text{mol/l}$. Průměrné hodnoty směrnice a směrodatné odchylky úseku získané z celkem 9 kalibračních křivek jsou uvedeny v Tabulce 15. Hodnoty LOD a LOQ byly vypočítány podle Rovnic 1 a 2. Hlavním problémem u techniky DBS je, že kalibrační křivka musí být konstruována z kalibračních standardů připravených v krvi, a to metodou standardních přídavek, minimálně v poměru 19:1 (v/v), aby nedošlo k ovlivnění matrice a významnému snížení hodnoty Hct. Standard GSH je obvykle přidáván k venózní krvi dárce, kde hladina GSH může být v rozmezí 1–2 mmol/l. Pokud přesnost dané metody je například s CV= 10 % a hladina GSH v krvi pro přípravu kalibračních standardů je 1000 $\mu\text{mol/l}$, pak přídavek standardu, který povede ke zvýšení koncentrace o 100 $\mu\text{mol/l}$ nemusí být správně určen. Proto, jak jsme správně předpokládali, přídávky standardu ke krvi vedoucí ke zvýšení koncentrace o hodnotu, která je v intervalu chyby měření, nemohou být s danou přesností a správností detekovány. Ideální by bylo získat krev neobsahující GSH, což je v současné době technicky nemožné. Porovnání kalibrační křivky se všemi kalibračními standardy a kalibrační křivky s vyloučenými kalibračními standardy je uvedeno v Grafech 5 a 6. Byly publikovány kalibrační křivky s kalibračními standardy o koncentraci nižší než je chyba měření a s dobrou linearitou [105].

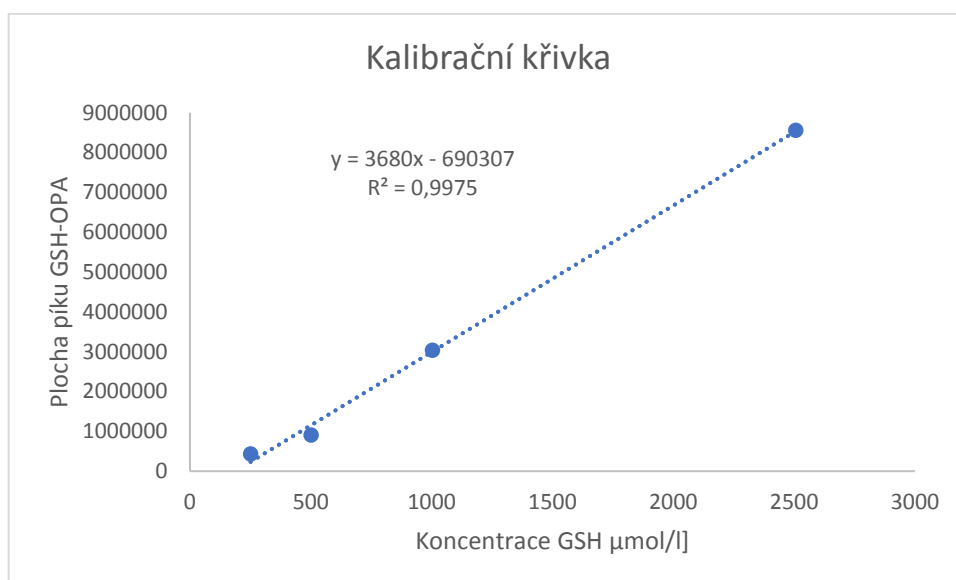
Tabulka 15 Parametry získané z 9 kalibračních křivek

S_a (SD)	b (AVG)	R² (AVG)	LOD [$\mu\text{mol/l}$]	LOQ [$\mu\text{mol/l}$]
90546,9	3460,5	0,9929	86,4	261,7

S_a, směrodatná odchylka úseku; b, směrnice; R², korelační koeficient



Graf 5 Kalibrační křivka pro stanovení glutathionu (GSH) ve vzorcích suché kapky krve

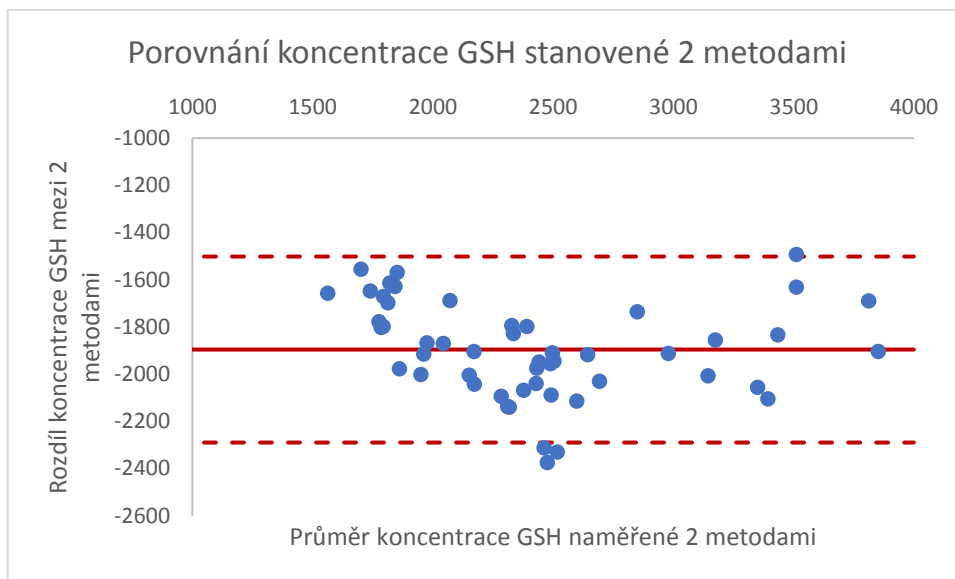


Graf 6 Upravená kalibrační křivka pro stanovení glutathionu (GSH) ve vzorcích suché kapky krve (vyloučení kalibračních standardů s nízkou koncentrací, těch, které jsou v intervalu chyby měření)

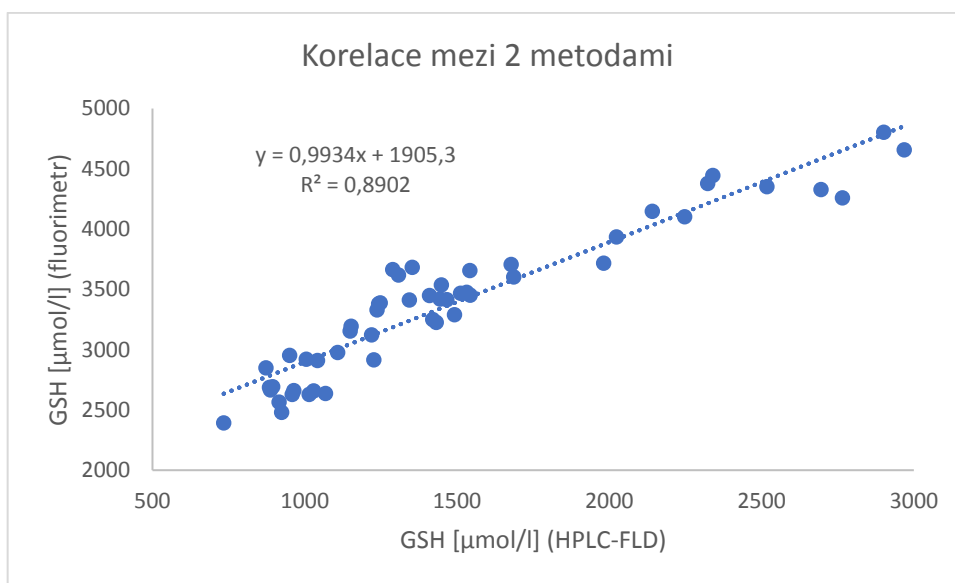
4.7 Porovnání koncentrací glutathionu ve vzorcích suché kapky krve dvěma metodami

Vzorky DBS byly připraveny podle postupu uvedeném v kapitole 3.5.8 a zpracovány podle postupu uvedeném v kapitole 3.5.1. Hladiny GSH ve vzorcích DBS byly nejprve měřeny metodou HPLC-FLD a následně fluorimetricky na destičkovém readeru. Stejným způsobem byly měřeny hladiny GSH ve vzorcích DBS dárců. Pro srovnání naměřených koncentrací GSH ve vzorcích DBS získaných těmito 2 metodami byl použit Bland-Altmanův rozdílový graf

(Graf 7). Dále byl podle Rovnice 4 vypočítán korelační koeficient ($R = 0,94$), který ukazuje na dobrou korelaci mezi metodami (Graf 8).



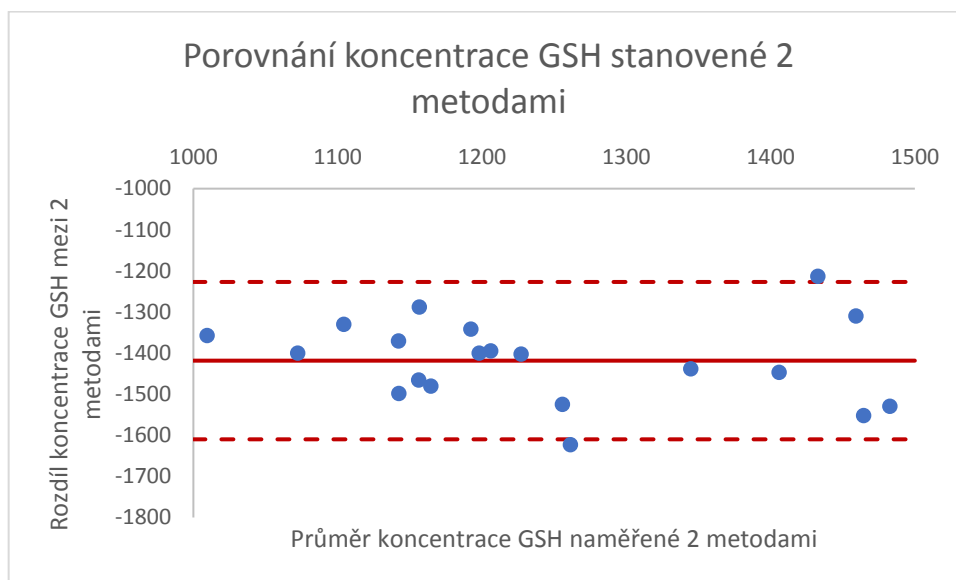
Graf 7 Porovnání koncentrace glutathionu (GSH) stanovené dvěma metodami



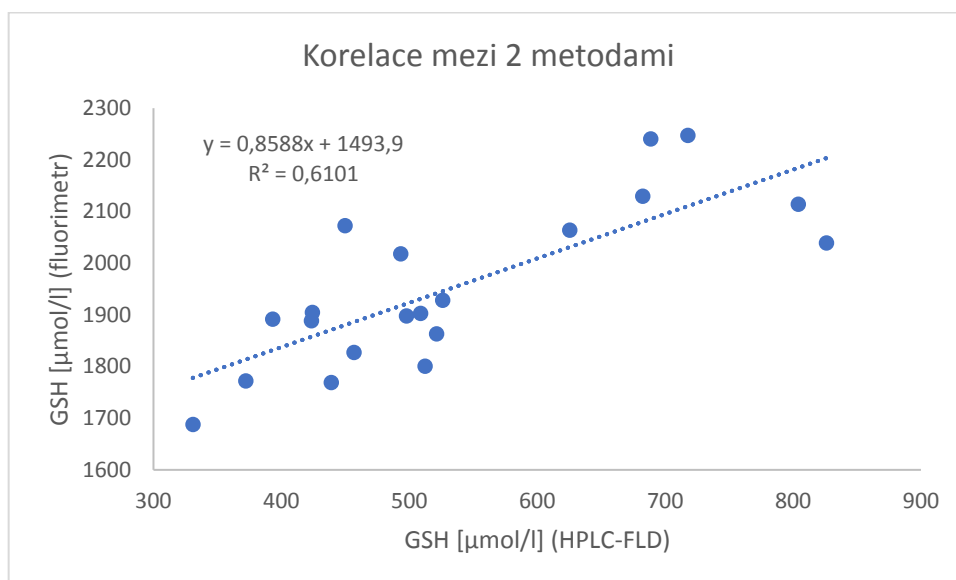
Graf 8 Korelace metody kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí a fluorimetrické metody

Porovnání koncentrací GSH ve vzorcích DBS dárců naměřených metodou HPLC-FLD a fluorimetrickou metodou bylo provedeno Bland-Altmanovým rozdílovým grafem (Graf 9) a korelačním grafem (Graf 10). Korelační koeficient ($R = 0,73$) byl vypočítán podle Rovnice 5. Dle očekávání je hodnota korelačního koeficientu nižší, jelikož se jedná o 20 různých vzorků. Závěr je, že pro stanovení GSH ve vzorcích DBS je nutná separace derivátu GSH-OPA od

interferujících látek. Čekali jsme vyšší koncentraci GSH ve vzorcích DBS stanovených fluorimetrickou metodou, ale ne s takovým rozdílem. Bude nutné měření opakovat s jiným fluorimetrem než je destičkový reader, nabízí se také fluorescenční detektor v HPLC sestavě a provedení analýz bez kolony. Naměřené koncentrace GSH metodou HPLC-FLD ve vzorcích DBS dárců odpovídají referenčním hodnotám uváděných v literatuře [6,125–127].



Graf 9 Porovnání koncentrace glutathionu (GSH) stanovené dvěma metodami (vzorky suché kapky krve dárců)



Graf 10 Korelace metody kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí a fluorimetrické metody (vzorky suché kapky krve dárců)

$$R = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \cdot \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

Rovnice 4 Pearsonův korelační koeficient

$$R = 1 - \frac{6 \sum_{i=1}^n (x_i - y_i)^2}{n(n^2 - 1)}$$

Rovnice 5 Spearmanův korelační koeficient

kde definujeme x_i jako pořadí hodnoty x a y_i jako pořadí hodnoty y v rámci vzestupně uspořádaných hodnot

5 ZÁVĚR

Cílem práce bylo u již zavedené metody stanovení GSH ve vzorcích DBS studovat vliv vybraných parametrů na koncentraci GSH, testovat postupy přípravy vzorku zamezující oxidaci GSH a porovnat stávající metodu HPLC-FLD s metodou fluorimetrickou, nevyžadující separační krok. K tomu nás vedl fakt, že při stanovení hladiny GSH ve vzorcích DBS je v chromatogramu patrný pouze 1 pík odpovídající derivátu GSH-OPA. Výsledky však ukázaly, že krok separace je nutný, a že fluorimetrická metoda značně nadhodnocuje hladinu GSH ve vzorcích DBS. Testovanými parametry ovlivňující kvantitativní výsledky byly hodnota hematokritu, velikost nanášeného objemu na filtrační papír a homogenita krevní skvrny. Z analytických parametrů byla určena výtěžnost, přesnost, LOD a LOQ metody. Bylo zjištěno, že se zvyšujícím objemem nanášeným na filtrační papír se mírně zvyšuje koncentrace GSH. Nehomogenita nebyla prokázána, protože koncentrace GSH v discích vyražených ze středu a periferie krevní skvrny se prakticky neliší. Orientační hodnoty koncentrace GSH ve vzorcích DBS dvaceti dárců jsou v referenčním rozmezí.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] H.J. Forman, H. Zhang, A. Rinna, Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis, *Molecular Aspects of Medicine* 30 (2009) 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>.
- [2] J. Oestreicher, B. Morgan, Glutathione: subcellular distribution and membrane transport, *Biochem. Cell Biol.* 97 (2019) 270–289. <https://doi.org/10.1139/bcb-2018-0189>.
- [3] S.K. Biswas, I. Rahman, Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: The role of glutathione, *Molecular Aspects of Medicine* 30 (2009) 60–76. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.07.001>.
- [4] A. Meister, Glutathione metabolism and its selective modification., *Journal of Biological Chemistry* 263 (1988) 17205–17208. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)77815-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)77815-6).
- [5] G. Wu, J.R. Lupton, N.D. Turner, Y.-Z. Fang, S. Yang, Glutathione Metabolism and Its Implications for Health, *The Journal of Nutrition* 134 (2004) 489–492. <https://doi.org/10.1093/jn/134.3.489>.
- [6] A. Pastore, G. Federici, E. Bertini, F. Piemonte, Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification, *Clinica Chimica Acta* 333 (2003) 19–39. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00200-6](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00200-6).
- [7] S.C. Lu, Regulation of glutathione synthesis, *Molecular Aspects of Medicine* 30 (2009) 42–59. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.05.005>.
- [8] R. Dringen, Metabolism and functions of glutathione in brain, *Progress in Neurobiology* 62 (2000) 649–671. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(99\)00060-x](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(99)00060-x).
- [9] C.C. Winterbourn, D. Metodiewa, The Reaction of Superoxide with Reduced Glutathione, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 314 (1994) 284–290. <https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1444>.
- [10] S.C. Lu, Glutathione synthesis, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1830 (2013) 3143–3153. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.008>.
- [11] L.D. DeLeve, N. Kaplowitz, Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity, *Pharmacology & Therapeutics* 52 (1991) 287–305. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(91\)90029-L](https://doi.org/10.1016/0163-7258(91)90029-L).
- [12] J.H. Wu, G. Batist, Glutathione and glutathione analogues; Therapeutic potentials, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1830 (2013) 3350–3353. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.016>.

- [13] K.-J. Huang, Q.-S. Jing, C.-Y. Wei, Y.-Y. Wu, Spectrofluorimetric determination of glutathione in human plasma by solid-phase extraction using graphene as adsorbent, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 79 (2011) 1860–1865. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.05.076>.
- [14] J.C. Roberts, D.J. Francetic, The Importance of Sample Preparation and Storage in Glutathione Analysis, *Analytical Biochemistry* 211 (1993) 183–187. <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1254>.
- [15] E. Camera, M. Picardo, Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes, *Journal of Chromatography B* 781 (2002) 181–206. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00618-9](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00618-9).
- [16] K.M. Coden, D.K.K. Nguyen, R. Moorhead, B.E. Stix-Brunell, J.N. Baker, K.J. Parker, J.P. Garner, Making bloodwork work: the impact of sample collection, processing, and storage on plasma glutathione measurement, and implications for translation, *Translational Psychiatry* 14 (2024) 385. <https://doi.org/10.1038/s41398-024-03086-5>.
- [17] T. Tomin, N. Bordag, E. Zügner, A. Al-Baghdadi, M. Schinagl, R. Birner-Gruenberger, M. Schittmayer, Blood Plasma Quality Control by Plasma Glutathione Status, *Antioxidants* 10 (2021) 864. <https://doi.org/10.3390/antiox10060864>.
- [18] D. Stempak, S. Dallas, J. Klein, R. Bendayan, G. Koren, S. Baruchel, Glutathione Stability in Whole Blood: Effects of Various Deproteinizing Acids, *Therapeutic Drug Monitoring* 23 (2001) 542–549. <https://doi.org/10.1097/00007691-200110000-00008>.
- [19] K. Kowalska, M. Zalewska, H. Milnerowicz, The Application of Capillary Electrophoresis in the Determination of Glutathione in Healthy Women's Blood, *Journal of Chromatographic Science* 53 (2015) 353–359. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmu035>.
- [20] Y. Iwasaki, Y. Saito, Y. Nakano, K. Mochizuki, O. Sakata, R. Ito, K. Saito, H. Nakazawa, Chromatographic and mass spectrometric analysis of glutathione in biological samples, *Journal of Chromatography B* 877 (2009) 3309–3317. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.07.001>.
- [21] E. Błońska-Sikora, J. Oszczudlowski, Z. Witkiewicz, D. Widel, Glutathione: Methods of sample preparation for chromatography and capillary electrophoresis, *Chemik* 66 (2012) 929–942.
- [22] H. Refsum, P.M. Ueland, A.M. Svoldal, Fully automated fluorescence assay for determining total homocysteine in plasma, *Clin Chem* 35 (1989) 1921–1927.

- [23] I. Fermo, C. Arcelloni, E. De Vecchi, S. Viganò, R. Paroni, High-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the determination of total homocyst(e)ine in plasma, *J Chromatogr* 593 (1992) 171–176. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)80283-z](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)80283-z).
- [24] E.B. Getz, M. Xiao, T. Chakrabarty, R. Cooke, P.R. Selvin, A Comparison between the Sulfhydryl Reductants Tris(2-carboxyethyl)phosphine and Dithiothreitol for Use in Protein Biochemistry, *Analytical Biochemistry* 273 (1999) 73–80. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4203>.
- [25] A.R. Ivanov, I.V. Nazimov, L.A. Baratova, Qualitative and quantitative determination of biologically active low-molecular-mass thiols in human blood by reversed-phase high-performance liquid chromatography with photometry and fluorescence detection, *Journal of Chromatography A* 870 (2000) 433–442. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00947-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00947-4).
- [26] J.A. Burns, J.C. Butler, J. Moran, G.M. Whitesides, Selective reduction of disulfides by tris(2-carboxyethyl)phosphine, *J. Org. Chem.* 56 (1991) 2648–2650. <https://doi.org/10.1021/jo00008a014>.
- [27] D.J. Cline, S.E. Redding, S.G. Brohawn, J.N. Psathas, J.P. Schneider, C. Thorpe, New Water-Soluble Phosphines as Reductants of Peptide and Protein Disulfide Bonds: Reactivity and Membrane Permeability, *Biochemistry* 43 (2004) 15195–15203. <https://doi.org/10.1021/bi048329a>.
- [28] P. Monostori, G. Wittmann, E. Karg, S. Túri, Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: An in-depth review, *Journal of Chromatography B* 877 (2009) 3331–3346. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.06.016>.
- [29] K. Kurpet, R. Głowacki, G. Chwatko, Simultaneous Determination of Human Serum Albumin and Low-Molecular-Weight Thiols after Derivatization with Monobromobimane, *Molecules* 26 (2021) 3321. <https://doi.org/10.3390/molecules26113321>.
- [30] D. Stevenson, D. Wokosin, J. Girkin, M.H. Grant, Measurement of the intracellular distribution of reduced glutathione in cultured rat hepatocytes using monochlorobimane and confocal laser scanning microscopy, *Toxicology in Vitro* 16 (2002) 609–619. [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(02\)00042-5](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(02)00042-5).
- [31] X. Sun, R.S. Berger, P. Heinrich, I. Marchiq, J. Pouyssegur, K. Renner, P.J. Oefner, K. Dettmer, Optimized Protocol for the In Situ Derivatization of Glutathione with N-Ethylmaleimide in Cultured Cells and the Simultaneous Determination of

- Glutathione/Glutathione Disulfide Ratio by HPLC-UV-QTOF-MS, *Metabolites* 10 (2020) 292. <https://doi.org/10.3390/metabo10070292>.
- [32] D. Giustarini, I. Dalle-Donne, A. Milzani, P. Fanti, R. Rossi, Analysis of GSH and GSSG after derivatization with N-ethylmaleimide, *Nat Protoc* 8 (2013) 1660–1669. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.095>.
- [33] J.-L. Luo, F. Hammarqvist, I.A. Cotgreave, C. Lind, K. Andersson, J. Wernerman, Determination of intracellular glutathione in human skeletal muscle by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 670 (1995) 29–36. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(95\)00137-8](https://doi.org/10.1016/0378-4347(95)00137-8).
- [34] A.R. Ivanov, I.V. Nazimov, L. Baratova, Determination of biologically active low-molecular-mass thiols in human blood. I. Fast qualitative and quantitative, gradient and isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography with photometric and fluorescence detection, *J Chromatogr A* 895 (2000) 157–166. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00713-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00713-5).
- [35] S.C. Garcia, K. Schott, M. Charão, A. Moro, R. Bulcão, D. Grotto, J. Valentini, D. Bohrer, S. Cardoso, V. Pomblum, Quantification of reduced glutathione by HPLC-UV in erythrocytes of hemodialysis patients, *Biomedical Chromatography* 22 (2008) 460–468. <https://doi.org/10.1002/bmc.954>.
- [36] R.A. Winters, J. Zukowski, N. Ercal, R.H. Matthews, D.R. Spitz, Analysis of Glutathione, Glutathione Disulfide, Cysteine, Homocysteine, and Other Biological Thiols by High-Performance Liquid Chromatography Following Derivatization by N-(1-Pyrenyl)maleimide, *Analytical Biochemistry* 227 (1995) 14–21. <https://doi.org/10.1006/abio.1995.1246>.
- [37] N. Ercal, P. Yang, N. Aykin, Determination of biological thiols by high-performance liquid chromatography following derivatization by ThioGlo maleimide reagents, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 753 (2001) 287–292. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00560-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00560-0).
- [38] M. Tarara, P.D. Tzanavaras, G.Z. Tsogas, O-Phthalaldehyde Derivatization for the Paper-Based Fluorometric Determination of Glutathione in Nutritional Supplements, *Molecules* 29 (2024) 2550. <https://doi.org/10.3390/molecules29112550>.
- [39] J.T. Michaelsen, S. Dehnert, D. Giustarini, B. Beckmann, D. Tsikas, HPLC analysis of human erythrocytic glutathione forms using OPA and N-acetyl-cysteine ethyl ester:

- Evidence for nitrite-induced GSH oxidation to GSSG, *Journal of Chromatography B* 877 (2009) 3405–3417. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.06.043>.
- [40] M. Isokawa, T. Funatsu, M. Tsunoda, Fast and simultaneous analysis of biothiols by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection under hydrophilic interaction chromatography conditions, *Analyst* 138 (2013) 3802–3808. <https://doi.org/10.1039/C3AN00527E>.
- [41] D. Tang, L.-S. Wen, P.H. Santschi, Analysis of biogenic thiols in natural water samples by high-performance liquid chromatographic separation and fluorescence detection with ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonate (SBD-F), *Analytica Chimica Acta* 408 (2000) 299–307. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(99\)00880-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00880-6).
- [42] S.H. Kang, W. Wei, E.S. Yeung, On-column derivatization for the analysis of homocysteine and other thiols by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 744 (2000) 149–156. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00241-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00241-3).
- [43] J.D. Freeman, L.M. Rosman, J.D. Ratcliff, P.T. Strickland, D.R. Graham, E.K. Silbergeld, State of the Science in Dried Blood Spots, *Clinical Chemistry* 64 (2018) 656–679. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2017.275966>.
- [44] P.A. Demirev, Dried Blood Spots: Analysis and Applications, *Anal. Chem.* 85 (2013) 779–789. <https://doi.org/10.1021/ac303205m>.
- [45] J.V. Mei, J.R. Alexander, B.W. Adam, W.H. Hannon, Use of Filter Paper for the Collection and Analysis of Human Whole Blood Specimens, *The Journal of Nutrition* 131 (2001) 1631S-1636S. <https://doi.org/10.1093/jn/131.5.1631S>.
- [46] T.W. McDade, S. Williams, J.J. Snodgrass, What a drop can do: dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research, *Demography* 44 (2007) 899–925. <https://doi.org/10.1353/dem.2007.0038>.
- [47] T.K. Majumdar, D.R. Howard, The Use of Dried Blood Spots for Concentration Assessment in Pharmacokinetic Evaluations, in: P.L. Bonate, D.R. Howard (Eds.), *Pharmacokinetics in Drug Development*, Springer US, Boston, MA, 2011: pp. 91–114. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7937-7_4.
- [48] G. Da Cunha Santos, FTA Cards for Preservation of Nucleic Acids for Molecular Assays: A Review on the Use of Cytologic/Tissue Samples, *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 142 (2018) 308–312. <https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0303-RA>.

- [49] S. Lehmann, C. Delaby, J. Vialaret, J. Ducos, C. Hirtz, Current and future use of “dried blood spot” analyses in clinical chemistry, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 51 (2013) 1897–1909. <https://doi.org/10.1515/cclm-2013-0228>.
- [50] R. Zakaria, K.J. Allen, J.J. Koplin, P. Roche, R.F. Greaves, Advantages and challenges of dried blood spot analysis by mass spectrometry across the total testing process, (n.d.).
- [51] B. McClendon-Weary, D.L. Putnick, S. Robinson, E. Yeung, Little to give, much to gain – what can you do with a dried blood spot?, *Curr Environ Health Rep* 7 (2020) 211–221. <https://doi.org/10.1007/s40572-020-00289-y>.
- [52] A.M. Calafat, K. Kato, Applications of Dried Blood Spots in Environmental Population Studies, in: W. Li, M.S. Lee (Eds.), *Dried Blood Spots*, 1st ed., Wiley, 2014: pp. 130–139. <https://doi.org/10.1002/9781118890837.ch10>.
- [53] K. Malsagova, A. Kopylov, A. Stepanov, T. Butkova, A. Izotov, A. Kaysheva, Dried Blood Spot in Laboratory: Directions and Prospects, *Diagnostics* 10 (2020) 248. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10040248>.
- [54] C. Daousani, V. Karalis, A. Malenović, Y. Dotsikas, Hematocrit effect on dried blood spots in adults: a computational study and theoretical considerations, *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 79 (2019) 325–333. <https://doi.org/10.1080/00365513.2019.1622033>.
- [55] L. Fan, J.A. Lee, Managing The Effect of Hematocrit on Dbs Analysis in A Regulated Environment, *Bioanalysis* 4 (2012) 345–347. <https://doi.org/10.4155/bio.11.337>.
- [56] A. Sharma, S. Jaiswal, M. Shukla, J. Lal, Dried blood spots: Concepts, present status, and future perspectives in bioanalysis, *Drug Testing and Analysis* 6 (2014) 399–414. <https://doi.org/10.1002/dta.1646>.
- [57] R.S. Ross, O. Stambouli, N. Grüner, U. Marcus, W. Cai, W. Zhang, R. Zimmermann, M. Roggendorf, Detection of infections with hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus by analyses of dried blood spots - performance characteristics of the ARCHITECT system and two commercial assays for nucleic acid amplification, *Virology* 10 (2013) 72. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-72>.
- [58] J. Reinbold, P. Koehler, M. Rychlik, Quantitation of glutathione and its oxidation products in erythrocytes by multiple-label stable-isotope dilution, *Analytical Biochemistry* 445 (2014) 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.09.029>.
- [59] Å. Florholmen-Kjær, R.A. Lyså, O.-M. Fuskevåg, R. Goll, A. Revhaug, K.E. Mortensen, A sensitive method for the analysis of glutathione in porcine hepatocytes,

- Scandinavian Journal of Gastroenterology 49 (2014) 1359–1366.
<https://doi.org/10.3109/00365521.2014.964757>.
- [60] A. Bollenbach, D. Tsikas, Measurement of the tripeptides glutathione and ophthalmic acid by gas chromatography-mass spectrometry, *Analytical Biochemistry* 644 (2022) 113841. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113841>.
- [61] N.R. Reddy, Stable Labeled Isotopes as Internal Standards: A Critical Review, *MAPP* 1 (2017). <https://doi.org/10.31031/MAPP.2017.01.000508>.
- [62] S. Robin, N. Leveque, C. Courderot-Masuyer, P. Humbert, LC–MS determination of oxidized and reduced glutathione in human dermis: A microdialysis study, *Journal of Chromatography B* 879 (2011) 3599–3606. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.09.052>.
- [63] Y. Wang, Y. Xie, M. Bernier, I.W. Wainer, Determination of free and protein-bound glutathione in HepG2 cells using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection, *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 3533–3537. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.06.027>.
- [64] J.-P. Steghens, F. Flourié, K. Arab, C. Collombel, Fast liquid chromatography–mass spectrometry glutathione measurement in whole blood: micromolar GSSG is a sample preparation artifact, *Journal of Chromatography B* 798 (2003) 343–349. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.10.007>.
- [65] M. Asensi, J. Sastre, F.V. Pallardo, J.M. Estrela, J. Viña, [35] Determination of oxidized glutathione in blood: High-performance liquid chromatography, in: *Methods in Enzymology*, Elsevier, 1994: pp. 367–371. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)34106-0](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)34106-0).
- [66] T. Lőrincz, A. Szarka, The determination of hepatic glutathione at tissue and subcellular level, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 88 (2017) 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2017.05.004>.
- [67] M. Reid, F. Jahoor, Methods for measuring glutathione concentration and rate of synthesis:, *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 3 (2000) 385–390. <https://doi.org/10.1097/00075197-200009000-00010>.
- [68] H. Peng, W. Chen, Y. Cheng, L. Hakuna, R. Strongin, B. Wang, Thiol Reactive Probes and Chemosensors, *Sensors* 12 (2012) 15907–15946. <https://doi.org/10.3390/s121115907>.
- [69] M. Cappiello, E. Peroni, A. Lepore, R. Moschini, A. Del Corso, F. Balestri, U. Mura, Rapid colorimetric determination of reduced and oxidized glutathione using an end point coupled enzymatic assay, *Anal Bioanal Chem* 405 (2013) 1779–1785. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6577-3>.

- [70] S. Cheraghi, M.A. Taher, H. Karimi-Maleh, F. Karimi, M. Shabani-Nooshabadi, M. Alizadeh, A. Al-Othman, N. Erk, P.K. Yegya Raman, C. Karaman, Novel enzymatic graphene oxide based biosensor for the detection of glutathione in biological body fluids, *Chemosphere* 287 (2022) 132187. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132187>.
- [71] P. Martinkova, I. Vobornikova, M. Pohanka, Colorimetric sol gel based biosensor platform for determination of reduced glutathione, *Sensors and Actuators B: Chemical* 236 (2016) 442–449. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.06.012>.
- [72] J.C. Harfield, C. Batchelor-McAuley, R.G. Compton, Electrochemical determination of glutathione: a review, *Analyst* 137 (2012) 2285. <https://doi.org/10.1039/c2an35090d>.
- [73] A.A. Ensafi, T. Khayamian, F. Hasanpour, Determination of glutathione in hemolysed erythrocyte by flow injection analysis with chemiluminescence detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 48 (2008) 140–144. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.04.028>.
- [74] W. Chen, L. Hong, A.-L. Liu, J.-Q. Liu, X.-H. Lin, X.-H. Xia, Enhanced chemiluminescence of the luminol-hydrogen peroxide system by colloidal cupric oxide nanoparticles as peroxidase mimic, *Talanta* 99 (2012) 643–648. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.06.061>.
- [75] J. Du, Y. Li, J. Lu, Investigation on the chemiluminescence reaction of luminol–H₂O₂–S₂–R–SH system, *Analytica Chimica Acta* 448 (2001) 79–83. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01242-9](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01242-9).
- [76] H. Yang, J. Liu, L. Wang, L. Ma, F. Nie, G. Yang, Metal-organic framework as a mimetic enzyme with excellent adaptability for sensitive chemiluminescence detection of glutathione in cell lysate, *Talanta* 238 (2022) 123041. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.123041>.
- [77] X. Ji, W. Wang, X. Li, Y. Chen, C. Ding, Enhanced chemiluminescence detection of glutathione based on isoluminol-PSM nanoparticles probe, *Talanta* 150 (2016) 666–670. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.01.004>.
- [78] Q. Zhao, Y. Zhang, Z. Guo, D. Liu, G. Zuo, A sensitive chemiluminescence sensor for glutathione detection based on Au supported carbon nitride catalyst, *Microchemical Journal* 159 (2020) 105435. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105435>.
- [79] Z. Ma, T. Wu, P. Li, M. Liu, S. Huang, H. Li, Y. Zhang, S. Yao, A dual (colorimetric and fluorometric) detection scheme for glutathione and silver (I) based on the oxidase mimicking activity of MnO₂ nanosheets, *Microchim Acta* 186 (2019) 498. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3613-4>.

- [80] M. He, N. Shang, B. Zheng, G. Yue, An ultrasensitive colorimetric and fluorescence dual-readout assay for glutathione with a carbon dot–MnO₂ nanosheet platform based on the inner filter effect, *RSC Adv.* 11 (2021) 21137–21144. <https://doi.org/10.1039/D1RA02411F>.
- [81] S. Liu, J. Wang, Y. Shi, Y. Zhai, Y. Lv, P. Zhang, Z. Wang, Glutathione modulated fluorescence quenching of sulfur quantum dots by Cu₂O nanoparticles for sensitive assay, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 265 (2022) 120365. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120365>.
- [82] W. Kasprzyk, F. Koper, A. Flis, D. Szreder, E. Pamuła, D. Bogdał, S. Wybraniec, J. Ortyl, T. Swiergosz, Fluorescence assay for the determination of glutathione based on a ring-fused 2-pyridone derivative in dietary supplements, *Analyst* 146 (2021) 1897–1906. <https://doi.org/10.1039/d0an02245d>.
- [83] X. Zheng, C. Duan, J. Shen, X. Duan, Determination of reduced glutathione by spectrophotometry coupled with anti-interference compensation, *Anal. Methods* 7 (2015) 5006–5011. <https://doi.org/10.1039/C5AY00825E>.
- [84] M.A. Raggi, L. Nobile, A.G. Giovannini, Spectrophotometric determination of glutathione and of its oxidation product in pharmaceutical dosage forms, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 9 (1991) 1037–1040. [https://doi.org/10.1016/0731-7085\(91\)80041-7](https://doi.org/10.1016/0731-7085(91)80041-7).
- [85] A. Küster, I. Tea, S. Sweeten, J.-C. Rozé, R.J. Robins, D. Darmaun, Simultaneous determination of glutathione and cysteine concentrations and 2H enrichments in microvolumes of neonatal blood using gas chromatography–mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem* 390 (2008) 1403–1412. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1799-5>.
- [86] A. Mika, E. Skorkowski, P. Stepnowski, The Use of Different MS Techniques to Determine Glutathione Levels in Marine Tissues, *Food Anal. Methods* 6 (2013) 789–802. <https://doi.org/10.1007/s12161-012-9487-2>.
- [87] J. Lyons, A. Rauh-Pfeiffer, Y.M. Yu, X.-M. Lu, D. Zurakowski, R.G. Tompkins, A.M. Ajami, V.R. Young, L. Castillo, Blood glutathione synthesis rates in healthy adults receiving a sulfur amino acid-free diet, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (2000) 5071–5076. <https://doi.org/10.1073/pnas.090083297>.
- [88] K. Kuśmierk, G. Chwatko, R. Głowacki, P. Kubalczyk, E. Bald, Ultraviolet derivatization of low-molecular-mass thiols for high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis analysis, *Journal of Chromatography B* 879 (2011) 1290–1307. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.10.035>.

- [89] A. Tsiasioti, A.-S. Zotou, P.D. Tzanavaras, Single run analysis of glutathione and its disulfide in food samples by liquid chromatography coupled to on-line post-column derivatization, *Food Chem* 361 (2021) 130173. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130173>.
- [90] A. Tsiasioti, P.D. Tzanavaras, High performance liquid chromatography coupled with post – Column derivatization methods in food analysis: Chemistries and applications in the last two decades, *Food Chemistry* 443 (2024) 138577. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.138577>.
- [91] O. Yilmaz, S. Keser, M. Tuzcu, M. Güvenç, B. Erzen, S. Irtegün, H. Taştan, K. Sahin, A practical HPLC method to measure reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione concentrations in animal tissues, *Journal of Animal and Veterinary Advances* 8 (2009) 343–347.
- [92] T.E. Tipple, L.K. Rogers, Methods for the Determination of Plasma or Tissue Glutathione Levels, in: C. Harris, J.M. Hansen (Eds.), *Developmental Toxicology*, Humana Press, Totowa, NJ, 2012: pp. 315–324. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-867-2_20.
- [93] M. Kubát, E. Roušarová, T. Roušar, P. Česla, Recent advances in separation methods for characterization of glutathione metabolism and dietary supplementation, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 176 (2024) 117751. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2024.117751>.
- [94] M. Isokawa, T. Shimosawa, T. Funatsu, M. Tsunoda, 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* 1019 (2016) 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.11.038>.
- [95] F. Nuhu, A. Gordon, R. Sturmey, A.-M. Seymour, S. Bhandari, Measurement of Glutathione as a Tool for Oxidative Stress Studies by High Performance Liquid Chromatography, *Molecules* 25 (2020) 4196. <https://doi.org/10.3390/molecules25184196>.
- [96] V. Sutariya, D. Wehrung, W.J. Geldenhuys, Development and Validation of a Novel RP-HPLC Method for the Analysis of Reduced Glutathione, *Journal of Chromatographic Science* 50 (2012) 271–276. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmr055>.
- [97] G. Cevasco, A.M. Piątek, C. Scapolla, S. Thea, An improved method for simultaneous analysis of aminothiols in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 2158–2162. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.02.012>.
- [98] J. Šesták, A. Guttman, J. Lavická, Fluorescence detection setups in capillary electrophoresis and microscale liquid chromatography: Developments over the past decade,

- TrAC Trends in Analytical Chemistry 181 (2024) 118001.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2024.118001>.
- [99] A. Tsiasioti, P.D. Tzanavaras, Determination of glutathione and glutathione disulfide using liquid chromatography: A review on recent applications, *Microchemical Journal* 193 (2023) 109157. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.109157>.
- [100] X. Wang, D. Chi, D. Song, G. Su, L. Li, L. Shao, Quantification of Glutathione in Plasma Samples by HPLC Using 4-Fluoro-7-nitrobenzofurazan as a Fluorescent Labeling Reagent, *Journal of Chromatographic Science* 50 (2012) 119–122. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmr039>.
- [101] M. Rudar, A. Gachman, M. Boersma, Technical note: simultaneous determination of amino thiols in pig tissue by ultra-high performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J Anim Sci* 101 (2023) skad017. <https://doi.org/10.1093/jas/skad017>.
- [102] M. Gawlik, W. Krzyżanowska, M.B. Gawlik, M. Filip, Optimization of determination of reduced and oxidized glutathione in rat striatum by HPLC method with fluorescence detection and pre-column derivatization, (2014). <https://doi.org/10.1556/achrom.26.2014.2.10>.
- [103] B. Bayram, G. Rimbach, J. Frank, T. Esatbeyoglu, Rapid Method for Glutathione Quantitation Using High-Performance Liquid Chromatography with Coulometric Electrochemical Detection, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 402–408. <https://doi.org/10.1021/jf403857h>.
- [104] S. Childs, N. Haroune, L. Williams, M. Gronow, Determination of cellular glutathione:glutathione disulfide ratio in prostate cancer cells by high performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Journal of Chromatography A* 1437 (2016) 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.01.050>.
- [105] I. Squellerio, D. Caruso, B. Porro, F. Veglia, E. Tremoli, V. Cavalca, Direct glutathione quantification in human blood by LC–MS/MS: comparison with HPLC with electrochemical detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 71 (2012) 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.08.013>.
- [106] W.M. Winnik, K.T. Kitchin, Measurement of oxidative stress parameters using liquid chromatography–tandem mass spectroscopy (LC–MS/MS), *Toxicology and Applied Pharmacology* 233 (2008) 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.05.003>.
- [107] A. Forgacsova, J. Galba, J. Mojzisova, P. Mikus, J. Piestansky, A. Kovac, Ultra-high performance hydrophilic interaction liquid chromatography – Triple quadrupole tandem

- mass spectrometry method for determination of cysteine, homocysteine, cysteinyl-glycine and glutathione in rat plasma, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 164 (2019) 442–451. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.10.053>.
- [108] I. Ten-Doménech, Á. Solaz-García, I. Lara-Cantón, A. Pinilla-Gonzalez, A. Parra-Llorca, M. Vento, G. Quintás, J. Kuligowski, Direct Derivatization in Dried Blood Spots for Oxidized and Reduced Glutathione Quantification in Newborns, *Antioxidants* 11 (2022). <https://doi.org/10.3390/antiox11061165>.
- [109] A.V. Ivanov, M.A. Popov, V.V. Aleksandrin, L.M. Kozhevnikova, A.A. Moskovtsev, M.P. Kruglova, S.E. Vladimirovna, S.V. Aleksandrovich, A.A. Kubatiev, Determination of glutathione in blood via capillary electrophoresis with pH-mediated stacking, *ELECTROPHORESIS* 43 (2022) 1859–1870. <https://doi.org/10.1002/elps.202200119>.
- [110] C. Carru, A. Zinellu, S. Sotgia, G. Marongiu, M.G. Farina, M.F. Usai, G.M. Pes, B. Tadolini, L. Deiana, Optimization of the principal parameters for the ultrarapid electrophoretic separation of reduced and oxidized glutathione by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A* 1017 (2003) 233–238. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.08.020>.
- [111] Y. Ji, Y. Ma, X. Sun, Determination of glutathione in individual Ramos cells by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection, *Anal. Methods* 5 (2013) 1542. <https://doi.org/10.1039/c2ay26356d>.
- [112] L.-Y. Zhang, M.-X. Sun, Fast determination of glutathione by capillary electrophoresis with fluorescence detection using β -cyclodextrin as modifier, *Journal of Chromatography B* 877 (2009) 4051–4054. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.10.001>.
- [113] J. Zhang, Z. Hu, X. Chen, Quantification of glutathione and glutathione disulfide in human plasma and tobacco leaves by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection, *Talanta* 65 (2005) 986–990. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.08.030>.
- [114] J. Hodáková, J. Preisler, F. Foret, P. Kubáň, Sensitive determination of glutathione in biological samples by capillary electrophoresis with green (515nm) laser-induced fluorescence detection, *Journal of Chromatography A* 1391 (2015) 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.062>.
- [115] A. Saha, N.R. Jana, Detection of Cellular Glutathione and Oxidized Glutathione Using Magnetic–Plasmonic Nanocomposite-Based “Turn-Off” Surface Enhanced Raman Scattering, *Anal. Chem.* 85 (2013) 9221–9228. <https://doi.org/10.1021/ac4019457>.

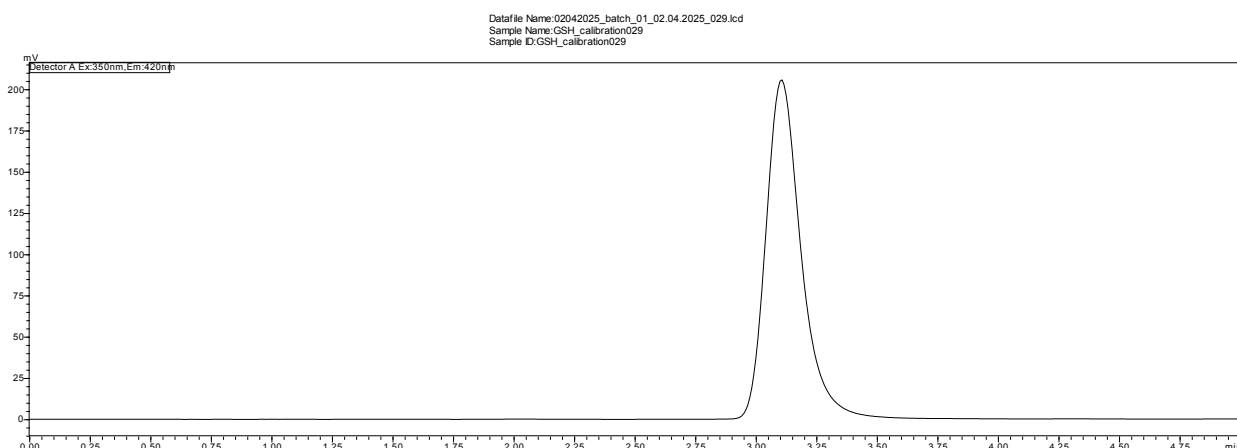
- [116] L. Ouyang, L. Zhu, J. Jiang, H. Tang, A surface-enhanced Raman scattering method for detection of trace glutathione on the basis of immobilized silver nanoparticles and crystal violet probe, *Analytica Chimica Acta* 816 (2014) 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.01.046>.
- [117] P.K. Mandal, M. Tripathi, S. Sugunan, Brain oxidative stress: Detection and mapping of anti-oxidant marker ‘Glutathione’ in different brain regions of healthy male/female, MCI and Alzheimer patients using non-invasive magnetic resonance spectroscopy, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 417 (2012) 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.11.047>.
- [118] F. Nezhad, A. Anton, L. Parkes, B. Deakin, S. Williams, Quantification of glutathione in the human brain by MR spectroscopy at 3 Tesla: Comparison of PRESS and MEGA-PRESS, *Magnetic Resonance in Medicine* 78 (2016). <https://doi.org/10.1002/mrm.26532>.
- [119] C.D. Rae, S.R. Williams, Glutathione in the human brain: Review of its roles and measurement by magnetic resonance spectroscopy, *Analytical Biochemistry* 529 (2017) 127–143. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.12.022>.
- [120] M.L. Steele, L. Ooi, G. Münch, Development of a high-performance liquid chromatography method for the simultaneous quantitation of glutathione and related thiols, *Analytical Biochemistry* 429 (2012) 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.06.023>.
- [121] H. Khani, S. Abbasi, M. Tavakkoli Yarak, M.B. Gholivand, Colorimetric detection and determination of glutathione based on superoxide radical-assisted etching approach, *Microchemical Journal* 173 (2022) 107006. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.107006>.
- [122] P.M. De Kesel, S. Capiou, W.E. Lambert, C.P. Stove, Current Strategies for Coping with The Hematocrit Problem in Dried Blood Spot Analysis, *Bioanalysis* 6 (2014) 1871–1874. <https://doi.org/10.4155/bio.14.151>.
- [123] S. Capiou, H. Veenhof, R.A. Koster, Y. Bergqvist, M. Boettcher, O. Halmingh, B.G. Keevil, B.C.P. Koch, R. Linden, C. Pistos, L.M. Stolk, D.J. Touw, C.P. Stove, J.-W.C. Alffenaar, Official International Association for Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology Guideline: Development and Validation of Dried Blood Spot–Based Methods for Therapeutic Drug Monitoring, *Therapeutic Drug Monitoring* 41 (2019) 409–430. <https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000000643>.
- [124] R. Kan ar, X. Tramova, P. Drabkova, M. Brandtnerova, Determination of Total Glutathione in Dried Blood Spot Samples Using a High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Chromatographic Science* 53 (2015) 879–885. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmu135>.

- [125] S.A. Wring, J.P. Hart, B.J. Birch, Determination of reduced glutathione in human whole blood by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection by a graphite-epoxy resin electrode chemically modified with cobalt phthalocyanine, *Talanta* 38 (1991) 1257–1260. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(91\)80102-6](https://doi.org/10.1016/0039-9140(91)80102-6).
- [126] R. Kand'ár, P. Žáková, H. Lotková, O. Kučera, Z. Červinková, Determination of reduced and oxidized glutathione in biological samples using liquid chromatography with fluorimetric detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43 (2007) 1382–1387. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.11.028>.
- [127] V. Angeli, H. Chen, Z. Mester, Y. Rao, A. D'Ulivo, E. Bramanti, Derivatization of GSSG by pHMB in alkaline media. Determination of oxidized glutathione in blood, *Talanta* 82 (2010) 815–820. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.05.065>.

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 Chromatografický záznam stanovení glutathionu v krvi získaný technikou suché kapky metodou kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí	68
Příloha 2 Koncentrace glutathionu ve vzorcích suché kapky krve dobrovolných dárců stanovené metodou kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí (HPLC-FLD) a spektrofluorimetrie.....	68
Příloha 3 Medián a mezikvartilové rozpětí koncentrace glutathionu ve vzorcích suché kapky krve dobrovolných dárců	69

Příloha 1 Chromatografický záznam stanovení glutathionu v krvi získaný technikou suché kapky metodou kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí



HPLC podmínky:

kolona: LichroCART® 125 × 4 mm, Purospher® Star RP-18e, 5 µm, opatřená ochrannou kolonou LichroCART® 4 × 4 mm, Purospher® Star RP-18e, 5 µm; mobilní fáze: ethanol – 25 mmol Na₂HPO₄ (15:85, v/v), pH 6,0; průtok mobilní fáze: 0,5 ml/min; isokratická eluce při 37 °C; detekce: λ_{EX}= 350 nm, λ_{EM}= 420 nm; dávkovaný objem: 5 µl

Příloha 2 Koncentrace glutathionu ve vzorcích suché kapky krve dobrovolných dárců stanovené metodou kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí (HPLC-FLD) a spektrofluorimetrie

	HPLC-FLD	Spektrofluorimetr
	c [µmol/l]	c [µmol/l]
D1	497,7	1898,1
D2	826,0	2039,5
D3	423,3	1888,7
D4	372,1	1772,3
D5	682,4	2129,5
D6	717,8	2247,6
D7	512,4	1800,8
D8	439,0	1769,3
D9	424,1	1904,8
D10	804,0	2114,2
D11	521,3	1863,2
D12	625,5	2063,8
D13	393,1	1891,7
D14	493,2	2018,1
D15	449,6	2072,7
D16	508,7	1903,2
D17	330,7	1688,0
D18	456,8	1827,4
D19	526,0	1928,2
D20	688,6	2240,3

Příloha 3 Medián a mezikvartilové rozpětí koncentrace glutathionu ve vzorcích suché kapky krve dobrovolných dárců

	Medián [$\mu\text{mol/l}$]	Q1 [$\mu\text{mol/l}$]	Q3 [$\mu\text{mol/l}$]	IQR [$\mu\text{mol/l}$]
HPLC-FLD	503,2	435,2	639,7	204,5
Spektrofluorimetr	1904,0	1854,3	2066,0	211,8

Q1, 25. kvartil; Q3, 75. kvartil; IQR, mezikvartilové rozpětí (rozdíl mezi 75. a 25. kvartilem)