

УДК 543.64

ПОЛУЧЕНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО  
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕРСУЛЬФИДА ГЛУТАТИОНА© 2024 г. Р. А. Ишкаева<sup>a, b, \*</sup>, Л. В. Лопухов<sup>a</sup>, И. С. Низамов<sup>c</sup>, Т. И. Абдуллин<sup>a, b</sup><sup>a</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии  
ул. Кремлевская, 18, Казань, 420008, Россия<sup>b</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Научно-образовательный центр фармацевтики  
ул. Кремлевская, 18, Казань, 420008, Россия<sup>c</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Химический институт им. А.М. Бутлерова  
ул. Кремлевская, 18, Казань, 420008, Россия

\*E-mail: r.a.ishkaeva@gmail.com

Поступила в редакцию 27.04.2024 г.

После доработки 03.07.2024 г.

Принята к публикации 03.07.2024 г.

Персульфид глутатиона (**GSSH**) является важным метаболитом клетки, участвующим в редокс-регуляции, и потенциальным терапевтическим агентом. Вследствие нестабильности и отсутствия коммерческих стандартов **GSSH**, актуальной задачей является разработка методик его генерации *in situ* и количественного определения в различных тест-системах. В работе оптимизированы условия получения **GSSH** в реакции окисленного глутатиона с сульфидом натрия при флуоресцентном мониторинге высвобождающегося сероводорода. Для дериватизации генерируемых **GSSH** и восстановленного глутатиона (**GSH**) с образованием близких по величине количеств обоих производных реакцию проводили в присутствии избытка N-этилmaleимид. Описана методика определения **GSSH** по уровню **GSH** в модельной реакции методом ВЭЖХ-масс-спектрометрии в режиме мониторинга множественных реакций. Установлен вклад примеси **GSH** в растворе окисленного глутатиона в определяемое количество **GSSH** и предел обнаружения **GSSH** в реакционной смеси. Результаты представляют интерес для получения и масс-спектрометрического анализа биологически значимых персульфидов с использованием различных дериватизирующих агентов.

**Ключевые слова:** персульфид глутатиона, глутатион, сероводород, N-этилmaleимид, ВЭЖХ-масс-спектрометрия.

**DOI:** 10.31857/S0044450224110101, **EDN:** swobts

Глутатион (**GSH**) является преобладающим антиоксидантом и низкомолекулярным тиолом в клетках животных, который выполняет жизненно важные функции, связанные с защитой от окислительного стресса и токсикантов, а также редокс-регуляцией метаболических процессов [1]. **GSH**-опосредованная регуляция осуществляется во взаимосвязи с другими редокс-активными метаболитами, и она проявляется, в частности, в изменении соотношения пула тиольных и дисульфидных групп цистеинсодержащих биомолекул и в модификации цистеиновых остатков различных функциональных белков, что сопровождается изменением их структуры и активности [2]. К настоящему времени накопилось множество свидетельств о том, что наряду с производными цистеина в форме

тиолов и дисульфидов важную физиологическую роль выполняют персульфиды и полисульфиды, включая персульфид глутатиона (**GSSH**) [3]. Одним из основных путей образования подобных лабильных метаболитов в клетках являются обратимые реакции с участием газотрансмиттера сероводорода ( $H_2S$ ), выполняющего важные сигнальные функции [4].

Известно, что благодаря повышенной нуклеофильности, персульфидная группа по сравнению с тиольной сильнее ионизирована при физиологических значениях pH, быстрее реагирует с активными формами кислорода (**АФК**) и при этом менее подвержена необратимому окислению в эндогенных условиях [3, 5]. С другой стороны, вследствие выраженной двойственной природы персульфидная группа способна реагировать

с тиольной группой с образованием дисульфидов/полисульфидов и высвобождением  $H_2S$ . Вследствие реакционной способности и относительно высокой внутриклеточной концентрации (до 100 мкМ [6]) GSSH является важным показателем редокс-гомеостаза клеток в норме и при патологии [5, 7], поэтому его определение представляет собой актуальную биоаналитическую задачу.

Нестабильность GSSH и отсутствие коммерчески доступных доноров затрудняют разработку способов определения этого метаболита [8]. Учитывая это, важной проблемой остается создание эффективной методики получения стандарта для определения GSSH в химических и биологических системах. В современных метаболомных исследованиях незаменимым аналитическим инструментом является тандемная ВЭЖХ-масс-спектрометрия с электрораспылительной ионизацией (ВЭЖХ-МС/МС), характеризующаяся широким спектром определяемых аналитов, высокой селективностью и чувствительностью [9]. Детектирование GSSH с помощью ВЭЖХ-МС/МС требует предварительной дериватизации SH-группы подходящим агентом [10–12]. Описаны способы получения дериватизированных стандартов персульфидов и полисульфидов, выделенных с использованием препаративной хроматографии [10], однако они являются трудоемкими для рутинных задач. Для нецелевого анализа подобные стандарты могут применяться в сложной смеси без разделения, однако они не обеспечивают возможность количественного определения метаболитов.

В настоящей работе описана методика *in situ* генерации GSSH с сопутствующей дериватизацией N-этилмалеимидом (NEM), образующим стабильные аддукты с тиольной [12] и персульфидной [13] группами, и оптимизацией ВЭЖХ-МС/МС-определения этих аддуктов. Полученные результаты могут быть распространены на получение и ВЭЖХ-МС/МС-анализ образцов сравнения других биологически значимых персульфидов и в сочетании с другими дериватизирующими агентами.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Реагенты и материалы.** Использовали восстановленный и окисленный L-глутатион (98%, Acros Organics, США), безводный сульфид натрия (98%, Sigma-Aldrich, США), N-этилмалеимид (99%, BLDpharm, Китай), sulfidefluor-7 AM (TargetMol, США), трис-HCl (Suzhou Yacoo Science, Китай), диметилсульфоксид х. ч. (Татхим-продукт, Россия). Для ВЭЖХ-МС/МС использовали растворители чистоты категории “для ВЭЖХ-МС” (Biosolve, Франция).

**Аппаратура.** Детектирование сероводорода в растворе сульфида натрия ( $Na_2S$ ) проводили с помощью флуоресцентного зонда sulfidefluor-7 AM (SF7-AM) на микропланшетном анализаторе Infinite M200 PRO (Tecan, Швейцария). Графики строили в программе GraphPad Prism 5.0.

Детектирование GSH и GSSH проводили методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) с использованием ВЭЖХ-системы Infinity 1290 (Agilent, США) в сочетании с гибридным масс-спектрометром QTRAP 6500 с ионизацией электрораспылением (AB Sciex, США), используемым в режимах тройного квадрупольа и квадрупольа – линейной ионной ловушки. Для управления анализатором и обработки данных использовали программу Analyst 1.6.2. Хроматографическое разделение проводили на ВЭЖХ-колонке Discovery C18 (5 мкм, 5 см × 2.1 мм, Supelco, США) с подвижными фазами, состоящими из А (99.7% вода, 0.3% муравьиная кислота) и Б (100% ацетонитрил), при скорости потока 0.4 мл/мин и объеме вводимого образца 10 мкл. Аналиты в образцах определяли с использованием программы MultiQuant 3.0.2 (ABSciex, США) по площади пиков специфичных MRM-переходов.

Навески исследуемых соединений взвешивали на весах Pioneer PX84 (OHAUS Corporation, США) с точностью 0.0001 г. Реакционные смеси инкубировали в термостате TDB-120 (Biosan, Латвия).

**Приготовление растворов.** Для оценки зависимости сигнала SF7-AM от концентрации  $Na_2S$  готовили стоковый 2 мМ раствор SF7-AM в диметилсульфоксиде (ДМСО) и 0.1 М раствор  $Na_2S$  в ультрачистой воде Milli-Q (Milli-Q® Advantage A10, Merck Millipore, США). Готовили растворы  $Na_2S$  в серии разведений в диапазоне концентраций от 20.0 до 0.4 мМ в 0.1 М трис-HCl буферном растворе (pH 7.4). Полученные растворы  $Na_2S$  смешивали с 0.01 мМ раствором SF7-AM в соотношении 1 : 1 (по объему) и инкубировали смесь в течение 15 мин при 37°C. Флуоресцентный сигнал SF7-AM регистрировали при  $\lambda_{ex} = 490$  нм и  $\lambda_{em} = 530$  нм (фактор усиления 87%, время интеграции 20 мкс, количество вспышек 25). Анализ проводили в 384-луночном полистироловом планшете для культивирования клеток (Wuxi NEST Biotechnology, Китай) в трех повторностях.

Для масс-спектрометрического анализа готовили свежеприготовленные 0.1 М растворы GSH, окисленного глутатиона, NEM и  $Na_2S$  в воде Milli-Q. Смесь инкубировали 30 мин при 37°C.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Генерация  $H_2S$ , персульфида глутатиона и аддуктов N-этилмалеимида.** Для генерации  $H_2S$  различные количества сульфида натрия ( $Na_2S$ )

растворяли в 0.1 М трис-НСl буферном растворе (рН 7.4). Высвобождение  $\text{H}_2\text{S}$  в растворенной форме оценивали в начальный период времени с помощью флуоресцентного индикатора SF7-AM [14]. Установили, что интенсивность флуоресценции 5 мкМ SF7-AM линейно зависит от концентрации  $\text{Na}_2\text{S}$  в диапазоне 0.2–5 мМ, где верхняя граница концентрации близка к насыщающей (рис. 1). Полученные результаты демонстрируют дозозависимую генерацию  $\text{H}_2\text{S}$  в растворе  $\text{Na}_2\text{S}$  в условиях эксперимента. Несмотря на частичное превращение сульфид-иона в  $\text{H}_2\text{S}$  и улетучивание последнего [15], концентрация генерируемого в реакции  $\text{H}_2\text{S}$ , по-видимому, находится в некотором избытке по отношению к индикатору SF7-AM.

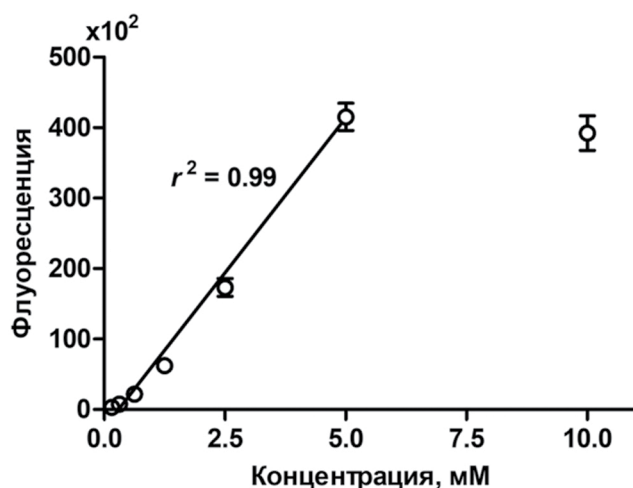


Рис. 1. Зависимость флуоресцентного сигнала SF7-AM ( $\lambda_{\text{ex}} = 490$  нм) от концентрации  $\text{Na}_2\text{S}$ . Условия: трис-НСl буферный раствор (рН 7.4), 5 мкМ SF7-AM, инкубация 15 мин при 37°C.

В дальнейшем в подобных условиях генерировали GSSH посредством соинкубации окисленного глутатиона (GSSG) с 5 мМ раствором  $\text{Na}_2\text{S}$ . Поскольку восстановление GSSG сероводородом сопровождается образованием GSH и GSSH исходно в эквимольных количествах [16–18], в присутствии избытка NEM следует ожидать образования соответствующих аддуктов GS–NEM и GSS–NEM (схема 1) в соотношении, близком к 1 : 1.

Согласно данным [17] в отсутствие дериватизирующего агента в равновесных условиях в системе GSSG +  $\text{H}_2\text{S}$  обнаруживаемая концентрация генерируемого GSSH заметно ниже по сравнению с GSH, что объясняется побочной реакцией GSSH с GSSG с образованием GSSH и GSH. При изначальном присутствии в системе эффективного дериватизирующего агента вклад побочной реакции ожидаемо уменьшается, так что содержания аддуктов GSSH и GSH становятся близкими [16, 18].

Для получения GSS–NEM в трис-НСl буферном растворе при 37°C смешивали GSSG и  $\text{Na}_2\text{S}$  (здесь и далее конечная концентрация 1 и 5 мМ соответственно), инкубировали раствор 15 мин с последующим добавлением NEM (4 мМ) и дополнительной инкубацией смеси 30 мин. Таким образом получали реакционную смесь, содержащую GS–NEM и GSS–NEM в неизвестных концентрациях. В аналогичных условиях получали образец сравнения GS–NEM посредством реакции GSH в известной концентрации с избытком NEM [19].

#### Детектирование GS–NEM и GSS–NEM.

Реакционную смесь с генерированным GSSH (GSS–NEM) и GS–NEM развели в 10 и 100 раз соответственно, анализировали

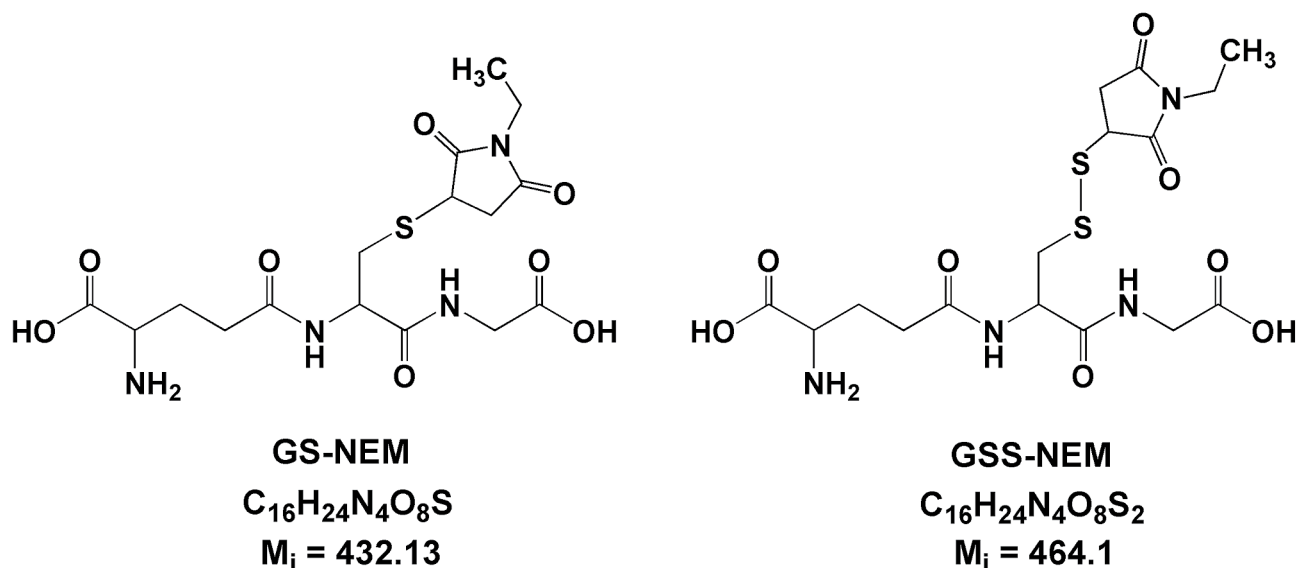


Схема 1. Структуры аддуктов N-этилмалеимида с восстановленным глутатионом (GS–NEM) и его перисульфидом (GSS–NEM) ( $M_i$  – моноизотопная молекулярная масса).

масс-спектрометрически в однократном (МС), tandemном (МС/МС) и трехкратном (МС/МС/МС) режимах при прямом вводе образца в источник ионизации (7 мкл/мин). Детектировали отрицательно заряженные ионы, полученные с помощью электрораспылительной ионизации в источнике Turbo Spray IonDrive при следующих параметрах: напряжение на капилляре – 4500 В, давление газа завесы  $2.41 \times 10^5$  Па, давление газа-распылителя и вспомогательного газа  $1.03 \times 10^5$  Па, без нагревания.

Масс-спектр GS–NEM содержал сигнал с  $m/z$  431.01, соответствующий основному иону [GS–NEM]<sup>–</sup> (рис. 2а). В режиме МС/МС он фрагментировался с образованием иона с  $m/z$  306.01, соответствующего фрагменту [GS]<sup>–</sup> (рис. 2б), а также ионов, характерных

для спектра фрагментации [GS]<sup>–</sup> в режиме отрицательной ионизации [20].

В масс-спектре реакционной смеси, содержащей GS–NEM и GSS–NEM, наряду с сигналами [GS–NEM]<sup>–</sup> дополнительно детектировали сигнал с  $m/z$  463.07, соответствующий основному иону [GSS–NEM]<sup>–</sup> (рис. 3а). В режиме МС/МС он фрагментировался с образованием иона с  $m/z$  306.07, соответствующего фрагменту [GS]<sup>–</sup>, а также ионов, характерных для спектра фрагментации [GS]<sup>–</sup> (рис. 3б). Дополнительно провели измерение в режиме МС/МС/МС для ионов с  $m/z$  463.07–306.07, которое показало совпадение спектра фрагментации [GS]<sup>–</sup> (рис. 3в). Это подтверждает, что фрагмент с  $m/z$  306.07 в спектре МС/МС (рис. 3б) относится к иону [GS]<sup>–</sup>, образуемому после отрыва фрагмента NEM

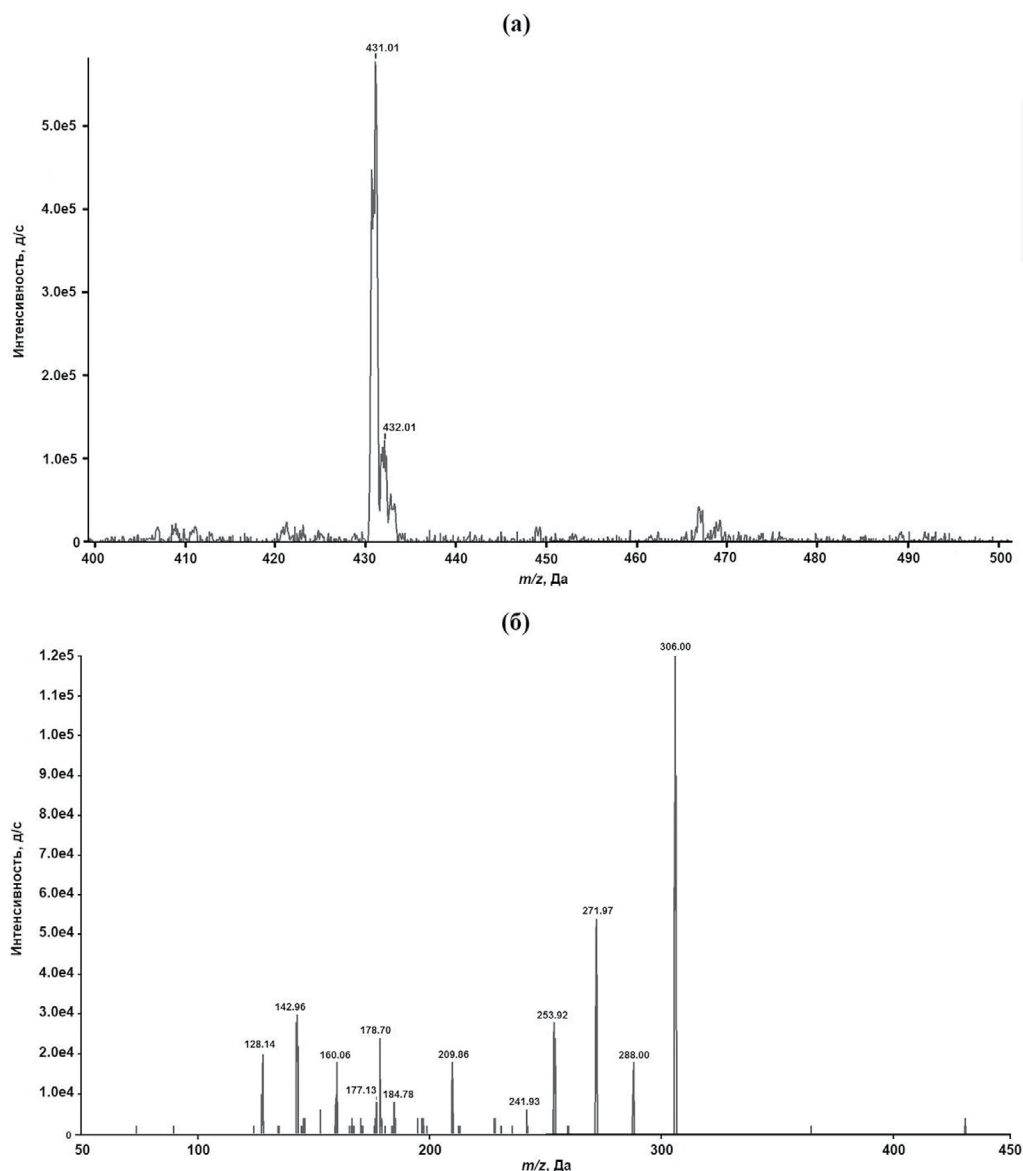
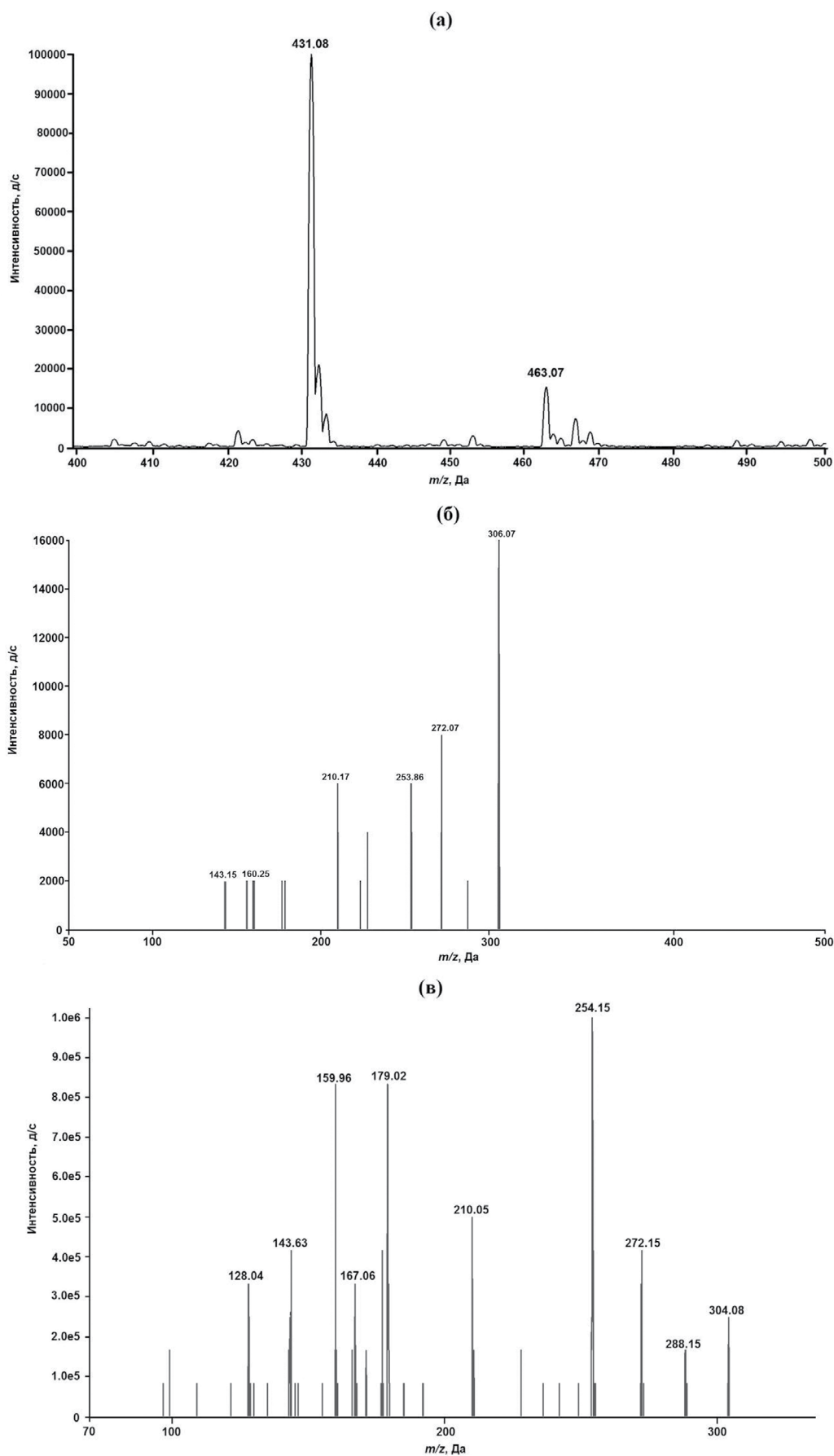


Рис. 2. МС- (а) и МС/МС-спектры (б) отрицательных ионов в растворе GS–NEM (д/с – количество детектированных ионов в секунду). (а) Масса основного пика совпадает с расчетной. (б) Фрагментация иона с  $m/z$  431.01.



**Рис. 3.** MS- (а), MS/MS-спектры для иона с  $m/z$  463.07 (б); MS/MS/MS-спектр для ионов  $m/z$  463.07–306.07 (в) продуктов реакционной смеси GSSG + H<sub>2</sub>S + NEM при отрицательной полярности ионизации.

и одного атома серы от основного иона [GSS–NEM]<sup>–</sup>.

С помощью программы Analyst 1.6.2 провели автоматическую оптимизацию MRM-переходов при отрицательной ионизации для аддуктов GS–NEM и GSS–NEM; результаты обобщены в табл. 1.

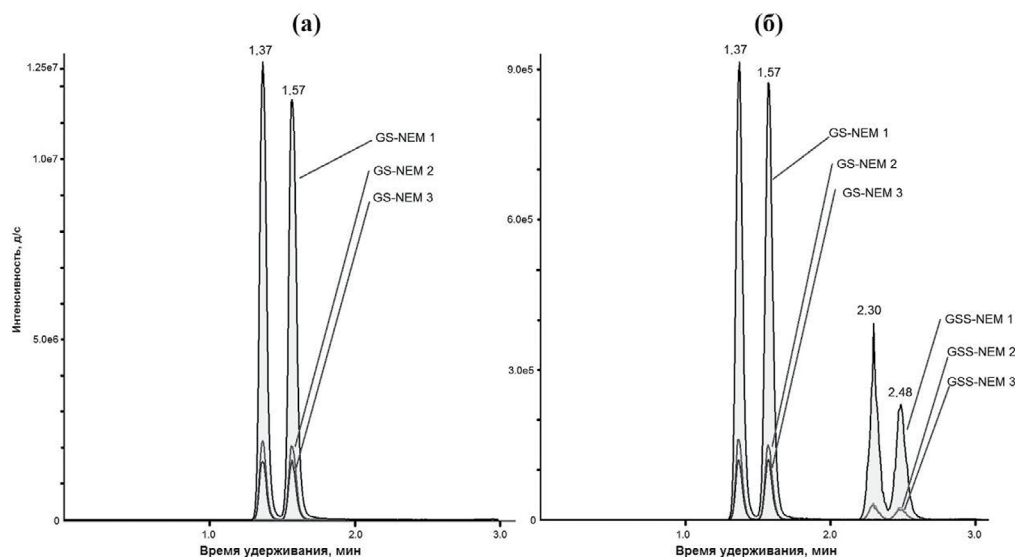
С использованием выбранных MRM-переходов разработали ВЭЖХ-МС/МС-методику. Использовали подвижную фазу, состоящую из 0.3% муравьиной кислоты в воде (А) и ацетонитрила (Б). Оптимизировали градиентный режим элюирования (фаза Б): 0–2.0 мин – 5%, 2.0–4.0 мин – 5–90%; 4.0–4.5 мин – 90%; 4.5–4.6 мин – 90–5%, 4.6–6.5 мин – 95% со скоростью потока 0.4 мл/мин и температурой термостата колонок 40°C. Определили параметры ионизации: напряжение на капилляре – 4500 В, давление газа завесы  $2.41 \times 10^5$  Па, давление

газа-распылителя и вспомогательного газа  $3.1 \times 10^5$  Па, температура 450°C. Установленное время накопления для регистрации всех MRM-переходов составило 40 мс.

Результаты хроматографического разделения образца сравнения GS–NEM и реакционной смеси, содержащей GS–NEM и GSS–NEM, при детектировании в режиме MRM представлены на рис. 4. В случае GS–NEM обнаружили два пика с временами удерживания 1.37 и 1.57 мин (рис. 4а), соответствующие образующейся смеси диастереомеров аддукта GS–NEM [19]. В случае реакционной смеси наблюдались как указанные пики GS–NEM, так и два пика с временами удерживания 2.30 и 2.48 мин с характерными для GSS–NEM переходами, что также указывает на образование диастереомеров (рис. 4б). Большее время удерживания GSS–NEM по сравнению с GS–NEM объясняется некоторым

**Таблица 1.** Параметры переходов в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) для соединений GS–NEM и GSS–NEM

| Аддукт  | Обозначение перехода MRM | Переход ( $m/z$ ) | Энергия столкновений, В |
|---------|--------------------------|-------------------|-------------------------|
| GS–NEM  | GS–NEM 1                 | 431.13 → 306.08   | –18.0                   |
| GS–NEM  | GS–NEM 2                 | 431.13 → 272.00   | –24.0                   |
| GS–NEM  | GS–NEM 3                 | 431.13 → 142.96   | –30.0                   |
| GSS–NEM | GSS–NEM 1                | 463.10 → 306.08   | –16.0                   |
| GSS–NEM | GSS–NEM 2                | 463.10 → 272.00   | –26.0                   |
| GSS–NEM | GSS–NEM 3                | 463.10 → 142.96   | –40.0                   |



**Рис. 4.** Хроматограммы по выбранным MRM-переходам образца сравнения GS–NEM (10 мкМ) (а) и реакционной смеси GSSG + H<sub>2</sub>S + NEM (фактор разведения 1 : 100) (б).

повышением гидрофобности аддукта вследствие присутствия дополнительного атома серы.

Разработанную методику применили для определения содержания в реакционной смеси GSSH (аддукта GSS–NEM) по содержанию GSH (аддукта GS–NEM). Для количественной оценки использовали MRM-переходы  $431.13 \rightarrow 306.08$  и  $463.10 \rightarrow 306.08$  соответственно, тогда как остальные переходы (табл. 1) служили для дополнительной идентификации пиков. Для этого получали градуировочный график аддукта GS–NEM посредством разведения 1 мМ стандарта в диапазоне концентраций от 0.1 до 100 мкМ, т.е. в пределах ожидаемых концентраций аналитов в реакционной смеси. Градуировочный график линейен ( $y = 8988.2x + 4619.4$ ;  $r^2 = 0.9999$ ) в указанных условиях. По данным дериватизации исходного раствора GSSG обнаружено наличие в GSSG небольшой примеси GSH (0.13 мас. %).

Установили, что в условиях проводимой реакции GSSG (1 мМ) с  $\text{Na}_2\text{S}$  (5 мМ) концентрация образующегося в реакции GS–NEM с поправкой на уровень примеси GSH и, следовательно, концентрация GSS–NEM составляет  $66.93 \pm 2.75$  мкМ. Это значение, по-видимому, сопоставимо с концентрацией генерируемого в жидкой фазе  $\text{H}_2\text{S}$ , который в присутствии избытка GSSG превращается в GSSH. Несмотря на относительно низкое фоновое содержание GSH (GS–NEM) в GSSG (не более 3.5% от общего обнаруженного GS–NEM после проведения реакции), это содержание необходимо учитывать при получении стандартов вследствие его возможной вариабельности в различных препаратах и растворах.

Для оценки диапазонов линейности и постоянства соотношения MRM-сигналов GS–NEM и GSS–NEM проанализировали серию разведений реакционной смеси. В исследуемом диапазоне разведений от 1/10 до 1/20 000 зависимость MRM-сигнала от разведения линейна как для GS–NEM ( $r^2 = 0.9988$ ), так и для GSS–NEM ( $r^2 = 0.9979$ ), а соотношение MRM-сигналов GSS–NEM/GS–NEM постоянно и составило 0.4, что свидетельствует о возможности опосредованного определения GSS–NEM в исследованном диапазоне разведений реакционной смеси. С учетом установленной концентрации GSS–NEM предел количественного определения этого аналита (по выполнению условия сигнал/шум  $> 10$ ) и, следовательно, GSSH в тестируемом растворе составил 6.69 нМ.

Согласно данным дополнительного ВЭЖХ-анализа с УФ-детектированием при 280 нм продукты реакционной смеси GSSG +  $\text{H}_2\text{S}$  + NEM, соответствующие GS–NEM и GSS–NEM, имеют близкое соотношение площадей пиков ( $\sim 1.2$ , данные не показаны), что подтверждает незначительное преобладание относительно

стабильного GSH по сравнению с лабильным GSSH в условиях моделируемой реакции, что согласуется с результатами работы [16]. Возможное по этой причине некоторое завышение содержания генерируемого *in situ* образца сравнения GSS–NEM, определяемого по уровню GS–NEM, по мнению авторов, не должно ограничивать возможности масс-спектрометрического определения GSSH в биологических образцах, в вариабельность которого повышенный вклад вносят иные факторы. Более того, подобным завышением можно полностью пренебречь при применении описанной методики для выявления относительных изменений содержания GSSH в сложных матрицах, что может быть достаточным для решения многих биологических и фармакологических задач.

\*\*\*

Предложены методики контролируемой генерации персульфида глутатиона (GSSH) в реакции окисленного глутатиона с сульфидом натрия и его дериватизации с NEM, а также ВЭЖХ-масс-спектрометрического определения GSSH в режиме мониторинга множественных реакций по уровню образующегося восстановленного глутатиона. Полученные результаты могут быть использованы для определения содержания GSSH в различных химических и биологических тест-системах, в том числе для изучения новых соединений-доноров  $\text{H}_2\text{S}$  и GSSH, рассматриваемых в настоящее время в качестве перспективных терапевтических агентов [21]. Результаты представляют интерес для получения и определения других биологически значимых персульфидов, в том числе в сочетании с другими дериватизирующими агентами.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-75-01143 (<https://rscf.ru/project/23-75-01143/>).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Калинина Е.В., Гаврилюк Л.А. Синтез глутатиона в опухолевых клетках // Биохимия. 2020. Т. 85. № 8. С. 1051. <https://doi.org/10.31857/S0320972520080059> (Kalinina E.V., Gavriluk L.A. Glutathione synthesis in cancer cells // Biochemistry (Moscow). 2020. V. 85. № 8. P. 895. <https://doi.org/10.1134/S0006297920080052>)

2. *Kalinina E., Novichkova M.* Glutathione in protein redox modulation through S-glutathionylation and S-nitrosylation // *Molecules*. 2021. V. 26. № 2. Article 435.  
<https://doi.org/10.3390/molecules26020435>
3. *Noguchi N., Saito Y., Niki E.* Actions of thiols, persulfides, and polysulfides as free radical scavenging antioxidants // *Antioxid. Redox Signal*. 2023. V. 39. № 10–12. P. 728.  
<https://doi.org/10.1089/ars.2022.0191>
4. *Benchoam D., Cuevasanta E., Möller M.N., Alvarez B.* Hydrogen sulfide and persulfides oxidation by biologically relevant oxidizing species // *Antioxidants*. 2019. V. 8. № 2. Article 48.  
<https://doi.org/10.3390/antiox8020048>
5. *Iciek M., Bilska-Wilkosz A., Kozdrowicki M., Górny M.* Reactive sulfur species and their significance in health and disease // *Biosci. Rep.* 2022. V. 42. № 9. Article BSR20221006.  
<https://doi.org/10.1042/BSR20221006>
6. *Vašková J., Kočan L., Vaško L., Perjési P.* Glutathione-related enzymes and proteins: A review // *Molecules*. 2023. V. 28. № 3. Article 1447.  
<https://doi.org/10.3390/molecules28031447>
7. *Fukuto J.M., Hobbs A.J.* A comparison of the chemical biology of hydropersulfides (RSSH) with other protective biological antioxidants and nucleophiles // *Nitric Oxide*. 2021. V. 107. P. 46.  
<https://doi.org/10.1016/j.niox.2020.11.004>
8. *Takata T., Jung M., Matsunaga T., Ida T., Morita M., Motohashi H., et al.* Methods in sulfide and persulfide research // *Nitric Oxide*. 2021. V. 116. P. 47.  
<https://doi.org/10.1016/j.niox.2021.09.002>
9. *Zhou B., Xiao J.F., Tuli L., Resson H.W.* LC-MS-based metabolomics // *Mol. BioSyst.* 2012. V. 8. № 2. P. 470.  
<https://doi.org/10.1039/C1MB05350G>
10. *Ida T., Sawa T., Ihara H., Tsuchiya Y., Watanabe Y., Kumagai Y., et al.* Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* 2014. V. 111. № 21. P. 7606.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1321232111>
11. *Kasamatsu S., Owaki T., Komae S., Kinno A., Ida T., Akaike T., Ihara H.* Untargeted polysulfide omics analysis of alternations in polysulfide production during the germination of broccoli sprouts // *Redox Biol.* 2023. V. 67. Article 102875.  
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102875>
12. *Sutton T.R., Minnion M., Barbarino F., Koster G., Fernandez B.O., Cumpste A.F., et al.* A robust and versatile mass spectrometry platform for comprehensive assessment of the thiol redox metabolome // *Redox Biol.* 2018. V. 16. P. 359.  
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.02.012>
13. *Bailey T.S., Zakharov L.N., Pluth M.D.* Understanding hydrogen sulfide storage: Probing conditions for sulfide release from hydrodisulfides // *J. Am. Chem. Soc.* 2014. V. 136. № 30. P. 10573.  
<https://doi.org/10.1021/ja505371z>
14. *Lin V.S., Lippert A.R., Chang C.J.* Cell-trappable fluorescent probes for endogenous hydrogen sulfide signaling and imaging H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent H<sub>2</sub>S production // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* 2013. V. 110. № 18. P. 7131.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1302193110>
15. *Sitdikova G.F., Fuchs R., Kainz V., Weiger T.M., Hermann A.* Phosphorylation of BK channels modulates the sensitivity to hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) // *Front. Physiol.* 2014. V. 5. Article 431.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00431>
16. *Pan J., Carroll K.S.* Persulfide reactivity in the detection of protein S-sulfhydration // *ACS Chem. Biol.* 2013. V. 8. № 6. P. 1110.  
<https://doi.org/10.1021/cb4001052>
17. *Benchoam D., Semelak J.A., Cuevasanta E., Mastrogiorganni M., Grassano J.S., Ferrer-Sueta G., et al.* Acidity and nucleophilic reactivity of glutathione persulfide // *J. Biol. Chem.* 2020. V. 295. № 46. P. 15466.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014728>
18. *Francoleon N., Carrington S., Fukuto J.* The reaction of H<sub>2</sub>S with oxidized thiols: Generation of persulfides and implications to H<sub>2</sub>S biology // *Arch. Biochem. Biophys.* 2011. V. 516. № 2. P. 146.  
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.09.015>
19. *Sun X., Berger R.S., Heinrich P., Marchiq I., Pouyssegur J., Renner K., et al.* 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*. 2020. V. 10. № 7. Article 292.  
<https://doi.org/10.3390/metabo10070292>
20. *Thakur S.S., Balaram P.* Fragmentation of peptide disulfides under conditions of negative ion mass spectrometry: Studies of oxidized glutathione and contryphan // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2008. V. 19. № 3. P. 358.  
<https://doi.org/10.1016/j.jasms.2007.12.005>
21. *Yu B., Yang X., Yuan Z., Wang B.* Prodrugs of sulfide and persulfide species: Implications in their different pharmacological activities // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2023. V. 75. Article 102329.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2023.102329>

## OBTAINING AND OPTIMIZING THE MASS SPECTROMETRIC DETERMINATION OF GLUTATHIONE PERSULFIDE

R. A. Ishkaeva<sup>a, b, \*</sup>, L. V. Lopukhov<sup>a</sup>, I. S. Nizamov<sup>c</sup>, T. I. Abdullin<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University,  
Kazan, Russia*

<sup>b</sup>*Scientific and Educational Center of Pharmaceuticals, Kazan Federal University,  
Kazan, Russia*

<sup>c</sup>*Butlerov Institute of Chemistry, Kazan (Volga Region) Federal University,  
Kazan, Russia*

*\*E-mail: r.a.ishkaeva@gmail.com*

**Abstract.** Glutathione persulfide (GSSH) is an important cell metabolite involved in redox regulation and a potential therapeutic agent. Due to the instability and lack of commercial GSSH standards, an urgent task is to develop methods for its in situ generation and quantification in various test systems. The paper optimizes the conditions for obtaining GSSH in the reaction of oxidized glutathione with sodium sulfide with the aid of fluorescent monitoring of released hydrogen sulfide. The reaction was performed in the presence of an excess of N-ethylmaleimide to derivatize the generated GSSH and reduced glutathione (GSH) in similar amounts of both derivatives. A technique for determining GSSH by the level of GSH in a model reaction by HPLC-mass spectrometry in the multiple reactions monitoring mode is described. The contribution of the GSH impurity in the oxidized glutathione solution to the determined amount of GSSH as well as the detection limit of GSSH in the reaction mixture have been established. The results are of interest for the preparation and mass spectrometric analysis of biologically significant persulfides using various derivatizing agents.

**Keywords:** glutathione persulfide, glutathione, hydrogen sulfide, N-ethylmaleimide, HPLC mass spectrometry.