

基于普鲁士蓝离子缔合物反应共振散射猝灭法 检测谷胱甘肽

左卫元^{1,2}, 陈盛余^{1,2}, 林继锦^{1,2}, 欧阳辉祥^{1,2*}

(1. 百色学院化学与环境工程学院, 百色 533000; 2. 桂西区域生态环境分析和污染控制实验室, 百色 533000)

摘要: 目的 通过共振散射光谱法探索共振散射光谱猝灭法测定痕量谷胱甘肽, 以提高方法的灵敏度。**方法** 在 pH 为 3.0 的磷酸-硼酸-醋酸缓冲溶液 (BR 缓冲液) 中, Fe(III) 与 $K_4[Fe(CN)_6]$ 反应生成普鲁士蓝离子缔合物, 测得体系在 337 nm 处有较强共振散射效应, 当加入谷胱甘肽后, 谷胱甘肽分子中的巯基可还原 Fe(III) 为 Fe(II), 使体系发生猝灭, 导致体系共振散射猝灭效应减弱。**结果** 谷胱甘肽在浓度 0.010~2.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, 线性回归方程为 $\Delta I = 299.77\rho + 774.52$, r^2 为 0.9929, 检出限为 0.0024 $\mu\text{g/mL}$ 。**结论** 该法操作简便, 灵敏度高, 用于药物中的谷胱甘肽的测定, 得到满意的结果。

关键词: 谷胱甘肽; 共振散射猝灭法; 普鲁士蓝离子缔合物

Glutathione was determined by resonance scattering quenching method based on Prussian blue ion association reaction

ZUO Wei-Yuan^{1,2}, CHEN Sheng-Yu^{1,2}, LIN Ji-Jin^{1,2}, OUYANG Hui-Xiang^{1,2*}

(1. College of Chemical and Environmental Engineering, Baise University, Baise 533000, China;

2. Laboratory of Eco-Environment Analysis and Pollution Control in Western Guangxi, Baise 533000, China)

ABSTRACT: Objective To explore the determination of trace glutathione by resonance scattering spectral quenching method and improve the sensitivity of the method. **Methods** In the pH 3.0 phosphoric acid-boric acid-acetic acid buffer solution (BR buffer), Fe(III) reacts with $K_4[Fe(CN)_6]$ to form Prussian blue ion associates, and the system exhibits a strong resonance scattering effect at 337 nm. When glutathione is added, the sulfhydryl group in glutathione molecules can reduce Fe(III) to Fe(II), causing quenching of the system and weakening the resonance scattering quenching effect. **Results** The linear regression equation for glutathione within the concentration range of 0.010 to 2.0 $\mu\text{g/mL}$ is $\Delta I = 299.77\rho + 774.52$, with an r^2 of 0.9929 and a detection limit of 0.0024 $\mu\text{g/mL}$. **Conclusion** This method is simple and highly sensitive, and satisfactory results are obtained when used for the determination of glutathione in drugs.

KEY WORDS: glutathione; resonance scattering quenching method; Prussian blue ion associates

0 引言

谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) 是由谷氨酸、半胱氨酸和甘

氨酸通过肽键脱水缩合形成的三肽化合物^[1], 具有特殊的抗氧化性能^[2], 常用于预防抗肿瘤和放射治疗过程中可能产生的不良反应^[3-5], 或作为食品添加剂时, 用于延长肉类和水果的保质

* 通信作者: 欧阳辉祥, 博士, 教授, 主要研究方向: 环境分析。E-mail: 282824658@qq.com

*Corresponding author: OUYANG Hui-Xiang, Ph.D, Professor, College of Chemical and Environmental Engineering, Baise University, Baise 33000, China. E-mail: 282824658@qq.com

期的作用^[6]。

目前,针对GSH的定量检测方法包括紫外光度法^[7]、荧光光度法^[8-9]、高压液相色谱法^[10]、毛细管电泳法^[11]和电化学法^[12-13]。但现有的方法中,有些受样品本身和杂质颜色影响对测定结果产生影响;有些方法操作时间长,样品的稳定性影响方法的重现性。

共振散射光谱法是一种基于物质在共振条件下发生散射而产生的光信号变化进行分析的方法^[14]。我们课题组在共振散射光谱方面做了大量的工作,用RRS法构建了水胺硫磷等多种环境污染物^[15-17]的检测方法,这些方法灵敏、快速,取得了较好的效果。

众所周知,Fe(III)与 $K_4[Fe(CN)_6]$ 反应形成了普鲁士蓝离子缔合物,导致体系有较强的共振散射效应。当用谷胱甘肽对Fe(III)进行还原,会破坏缔合物的生成,从而导致体系共振散射效应猝灭,以此建立共振散射猝灭法检测微量谷胱甘肽,提高检测方法的灵敏度。

1 材料与方法

1.1 仪器

荧光分光光度计F-7000(日本日立公司)、去离子水制机TST-UPB-20(石家庄泰斯特仪器设备有限公司)、分析天平SQP(赛多利斯科学仪器有限公司)、数控超声波清洗器KG-200KDB(江苏昆山市超声波仪器有限公司)

1.2 实验材料

1 μg/mL 谷胱甘肽溶液(分析纯,上海克林生化科技股份有限公司)(使用时逐级稀释)、0.1 mol/L 亚铁氰化钾溶液(分析纯,成都金山化学试剂有限公司)、0.05 mol/L 三氯化铁溶液(分析纯,福州涵标科技有限公司)、冰乙酸(分析纯,天津市福晨化学试剂厂)、磷酸(分析纯,天津市大茂化学试剂厂)、硼酸(分析纯,天津市大茂化学试剂厂)、氢氧化钠(分析纯,广州广华科技股份有限公司),实验用水均为去离子水。

1.3 溶液配制

GSH 储备液:称量 1.00 g GSH 加入到 100 mL 容量瓶中,加适量的超纯水定容至刻度,浓度为 10 mg/mL; $K_4[Fe(CN)_6]$ 储备液的配制:称量 36.83 g $K_4[Fe(CN)_6]$ 至 100 ml 容量瓶中,加适量的超纯水定容至刻度线,浓度为 0.1 mol/L; BR 缓冲母液储备液的配制:在 100 mL 容量瓶中,加入相同比例混合浓度为 0.04 mol/L 的硼酸、冰乙酸和磷酸; BR 缓冲溶液工作液:用浓度为 0.2 mol/L 的 NaOH 溶液加入到缓冲母液中,调配出不同 pH 值的 BR 工作液。

1.4 实验方法

在 5 mL 的比色管中,加入 300 μL pH 为 3.0 的 BR 缓冲液,400 μL 1.00 mmol/L 的 $FeCl_3$ 溶液,混匀之后加入适量的 GSH 溶液,300 μL 1.00 mmol/L 的 $K_4[Fe(CN)_6]$ 溶液,最后加入超纯水至 3 mL 刻度线。静置 25 分钟后,设置荧光分光光度计为同步扫描、激发光和发射光的孔宽为 5.0 nm 和电压为 380 V,在 377 nm 波长处得到最高峰,从而计算共振散射光谱图中的 ΔI 值($\Delta I = I_0 - I$),其中 I_0 为空白组数值, I 为对照组数值。

2 结果与分析

2.1 实验原理

在 pH 3.0 的 BR 缓冲溶液中, $FeCl_3$ 与 $K_4[Fe(CN)_6]$ 反应生成普鲁士蓝离子缔合物(式 1), 体系共振散射峰有较强的共振散射效应(如图 1 中 a), 而谷胱甘肽中的巯基(-SH) 会使 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} , 从而减少了缔合物的生成, 使得体系共振散射猝灭效应减弱(如图 1 中 b)。

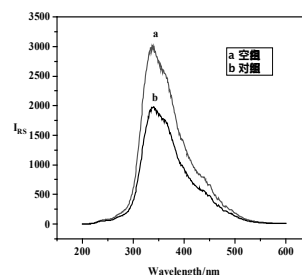


图 1 空白组与对照组共振散射光谱图

Fig.1 Resonance scattering spectrum of the blank group and the control group

2.2 共振散射光谱图

在 pH 3.0 BR 缓冲溶液中加入 $FeCl_3$ 和 $K_4[Fe(CN)_6]$ 后, 充分反应后生成 $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$ 缔合物, 形成固液界面, 这致使 $FeCl_3 - K_4[Fe(CN)_6]$ 体系表现出较强的共振散射效应, 而且共振散射峰在 337 nm 处表现明显, 如图 3 中的曲线 a 所示。当加入谷胱甘肽浓度时, 谷胱甘肽将 Fe(III) 还原为 Fe(II), 致使 $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$ 缔合物生成减少, 体系共振散射峰的强度减小, 并且随着谷胱甘肽浓度增大时, 体系共振散射强度在 337 nm 处呈线性降低, 如图 2 中曲线(a→g)所示, 因此实验选择 337 nm 处进行波长检测。

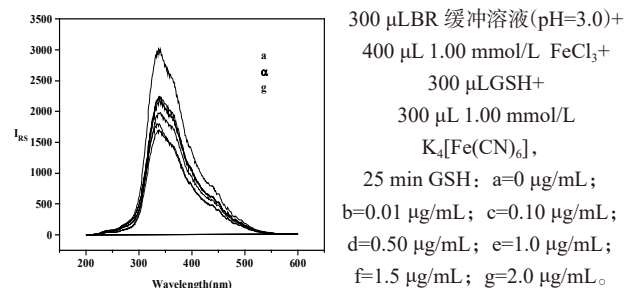


图 2 共振散射光谱图

Fig.2 Resonance scattering spectrum

2.3 条件优化

2.3.1 BR 缓冲溶液的 pH 值与用量的影响

实验研究了体系共振散射强度与 BR 缓冲溶液 pH 值和用量的关系, 如图 3 和图 4。实验中测定了体系在不同 pH (2.0、2.5、3.0、3.5、4.0) 条件下的 ΔI 值, 根据实验结果在 pH=3.0 的条件下, 体系的 ΔI 值较大; 而 pH 过低时缔合物易分解, 减少与铁离子成为配合物的机会, 导致共振散射猝灭效应减弱, 所以选择 BR 缓冲溶液在 pH 为 3.0 时进行进一步实验。此外, 根据实

验结果, BR 缓冲溶液使用量为 50~300 μL 时, ΔI 趋于上升趋势, 且用量超过 300 μL 时, 过多的氢离子会水解亚铁氰化钾, 减少体系生成缔合物, 从而使 ΔI 呈现下降趋势。因此, 实验选择使用 300 μL 的 pH 为 3.0 的 BR 缓冲溶液作为最优条件。

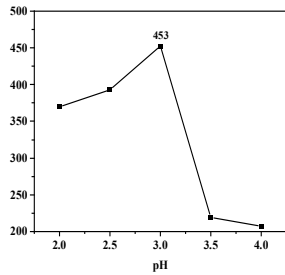


图 3 BR 缓冲溶液 pH 对体系 ΔI 的影响

Fig.3 Effect of pH of BR buffer solution on ΔI

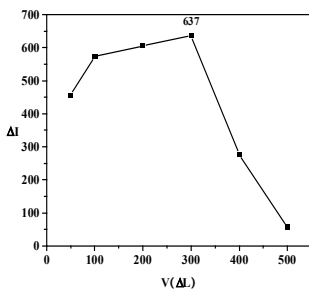


图 4 缓冲溶液用量对体系 ΔI 的影响

Fig.4 Effect of buffer solution on ΔI

2.3.2 FeCl_3 用量的影响

FeCl_3 的浓度对普鲁士蓝共振散射结果表明, 在一定范围内, 随着 FeCl_3 用量的增大, 生成的 $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ 也会增多, 溶液颜色逐渐变深蓝, 体系中 ΔI 也增大。当 FeCl_3 体积小于 400 μL 时, Fe^{3+} 的浓度不能与体系中的 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 反应完全, 而当 FeCl_3 体积为 400 μL 时, ΔI 达到最大值。若 FeCl_3 体积超过 400 μL 时, Fe^{3+} 浓度高会吸收共振散射强度, 降低 ΔI , 如图 5。因此选用 FeCl_3 用量为 400 μL , 体系浓度为 0.04 mmol/L。

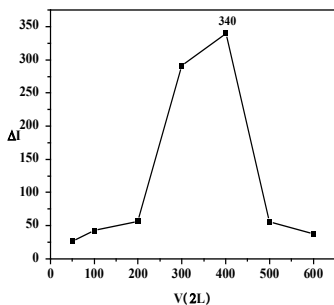


图 5 FeCl_3 的用量对体系 ΔI 的影响

Fig.5 Effect of FeCl_3 on ΔI

2.3.3 $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 用量的影响

实验表明, $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 的浓度对 ΔI 产生明显的影响。在一定范围内, 随着 $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 用量的增加, 生成的 $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ 也增多, ΔI 呈现增大的趋势。当 $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 加入 300 μL 时, 反应进行完全, ΔI 达到最大值, 再增大 $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 用量时,

$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 浓度过高会吸收共振散射光强度, 使 ΔI 下降, 如图 6, 故选择 300 μL 作为 $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 用量, 体系浓度为 0.03 mmol/L。

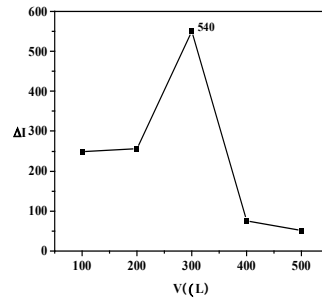


图 6 $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 的用量对体系 ΔI 的影响

Fig.6 Effect of $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ on ΔI

2.3.4 反应时间的影响

经过考察发现, 随着反应时间 (20 min 内) 的增加, 体系 ΔI 逐渐上升, 这表明反应尚未完全转化。当反应时间达到 25 min 时, 形成了固液界面, ΔI 达到最高值, 而随后 ΔI 逐渐减小, 这表明反应在 25 min 已经完全进行, 如图 7。因此实验选择在溶液混合后静置 25 min 后进行测定。

2.4 谷胱甘肽工作曲线

在优化实验条件的情况下, 分别测量 300 μL 0.01、0.10、0.50、1.0、1.5、2.0 $\mu\text{g/mL}$ 的谷胱甘肽标准溶液, 得出体系的 I 值, 再计算 ΔI 。在作图过程中以 ΔI 为纵坐标, 谷胱甘肽的浓度为横坐标, 绘制谷胱甘肽标准工作曲线, 如图 9。在 0.010~2.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, GSH 的浓度 ρ ($\mu\text{g/mL}$) 与共振散射强度 ΔI 呈现出良好的线性关系, 并且线性回归方程为 $\Delta I = 299.77\rho + 774.52$, r^2 为 0.9929, 检出限为 0.0024 $\mu\text{g/mL}$ 。

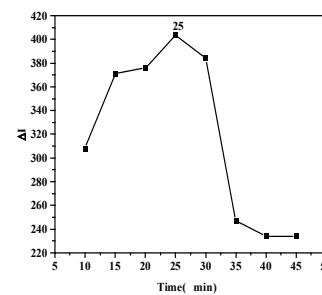


图 7 反应时间对体系 ΔI 的影响

Fig.7 Effect of reaction time on ΔI

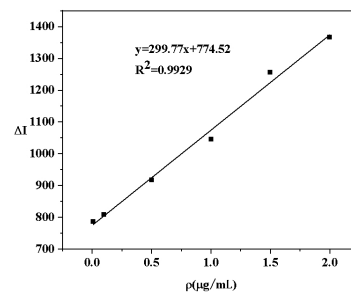


图 8 谷胱甘肽工作曲线

Fig.8 Working curve of glutathione

2.5 干扰离子的影响

在优化实验条件下选择了 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 GSH 浓度, 并分析了一系列常见共存物质的物质对测定 GSH 的影响。实验数据结果显示, 在相对误差 $\pm 5\%$ 范围内, 400 倍的 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 K^+ 、 NH_4^+ 、 SO_4^{2-} 、 CO_3^{2-} 、 Cl^- ; 20 倍的 Al^{3+} 和 NO_3^- 不会影响实验结果。铜离子、镍离子和锌离子会影响实验结果。

2.6 样品分析

将市场购买的某品牌药片精密称量 75.0 mg 后(含 50.0 mg 谷胱甘肽), 将其研磨后加入到 100 mL 容量瓶中加超纯水定容, 过滤并取出 1.00 mL 的滤液稀释至 100 mL 容量瓶中。按上述 1.4 实验方法采用标准加入法, 将谷胱甘肽标准液溶等量加入不同浓度的样品溶液, 样品的回收率在 89.5%~95.6% 之间(表 2)。

表 1 干扰离子实验

Table 1 Interference ion experiment

干扰离子	Na^+	Mg^{2+}	K^+	NH_4^+	SO_4^{2-}	CO_3^{2-}	Cl^-	Al^{3+}	NO_3^-
测定倍数	400	400	400	400	400	400	400	20	20

表 2 样品及回收率的测定($n=5$)

Table 2 Measurement of samples and recovery rates ($n=5$)

本底值 ($\mu\text{g/mL}$)	平均值 ($\mu\text{g/mL}$)	RSD(%)	加标值 ($\mu\text{g/mL}$)	总测定值 ($\mu\text{g/mL}$)	回收率 (%)	样品浓度 ($\mu\text{g/mL}$)
0.976						
0.936			0.50	1.453	95.6	
1.069	0.975	5.5				1.00
1.056			1.00	1.870	89.5	
1.012						

3 讨论与结论

普鲁士蓝离子缔合物的生成引起体系有强烈的共振散射信号, 我们利用谷胱甘肽分子中含有巯基且还原性, 将体系中的 Fe(III) 还原为 Fe(II) , 减少了普鲁士蓝的生成, 从而减弱了共振散射信号。在优化实验的情况下, 测得谷胱甘肽线性回归方程为 $\Delta I = 299.77\rho + 774.52$, r^2 为 0.9929, 检测限为 0.0024 $\mu\text{g/mL}$ 。这一方法简单易行、仪器简单, 并具有较高的灵敏度, 适用于测定谷胱甘肽的含量。此方法也可以应用于一些氧化还原反应破坏能生成具有共振散射信号的缔合物的反应, 使体系产生或猝灭共振散射光谱强度, 用以建立分析检测方法。

参考文献

- [1] DO DTH, FICKERS P, TAHAR IB. Improvement of glutathione production by a metabolically engineered *Yarrowia lipolytica* strain using a small-scale optimization approach [J]. *Biotechnol Lett*, 2020, 43(02): 1-8.
- [2] 刘英丽, 于青林, 万真, 等. 发酵剂抗氧化活性对发酵肉制品品质的影响研究进展 [J]. *食品科学*, 2021, 42(01): 302-312.

- [3] 梁江, 裴新荣, 王楠, 等. 海洋胶原肽长期喂养对SD大鼠自发肿瘤的抑制作用 [J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37(05): 1-6.
- [4] 蔡荣. 小球藻醇提取物对花鲈幼鱼生长作用及机理的初步研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2017.
- [5] 阮军, 尹恒, 寇国先, 等. 胸腺肽 $\alpha 1$ 联合还原型谷胱甘肽治疗酒精性肝病合并艾滋病的临床分析 [J]. *中西医结合肝病杂志*, 2021, 31(11): 1005-1007.
- [6] 戴庞聪, 吴慧. 探讨谷胱甘肽的应用研究进展 [J]. *现代食品*, 2020, (21): 40-43.
- [7] GAJELI G, KUMBHAR S, PATEL G. Development and Validation of Novel UV Spectroscopy Method for the Estimation of L-Glutathione in Bulk and Formulation with Congo Red [J]. *Asian J Pharm Anal*, 2022, 12(02): 72-82.
- [8] 韩雍, 汪慧, 杜雪蓉. 基于碳点的“开-关-开”型荧光探针测定蔬菜中的谷胱甘肽 [J]. *分析试验室*, 2024, 43(05): 609-614.
- [9] 唐瑞韩, 刘丹, 张心悦. 荧光猝灭体系测定谷胱甘肽 [J]. *四川文理学院学报*, 2020, 30, (02): 14-17.
- [10] 刘畅, 应译娴, 邱岳, 等. HPLC法测定四种食用坚果种子中还原型谷胱甘肽(GSH)和蛋白巯基(P-SH)含量 [J]. *食品工业科技*, 2017, 38(14): 1-5, 10.
- [11] 刘开敏, 王文坤, 吴丽云. 毛细管电泳法测定动物肝脏中的谷胱甘肽 [J]. *当代化工*, 2012, 41(09): 1003-1005.
- [12] 魏世楠, 赵灵芝, 张小清, 等. 电化学方法检测还原型谷胱甘肽的研究进展 [J]. *广州化工*, 2023, 51(16): 19-22.
- [13] 姜语芯, 叶仁才, 陈坤, 等. 中性毛细管电泳电化学发光法检测血清中的同型半胱氨酸和还原型谷胱甘肽 [J]. *分析试验室*, 2024, 43(08): 1088-1093.
- [14] 罗钟艳, 袁鹏翔, 易桂艳, 等. 共振散射光谱法测定卡托普利 [J]. *广东化工*, 2021, 48(05): 179-181.
- [15] OUYANG HX, LIANG AH, JIANG ZL. Fullerol nanocatalysis and trimodal surface plasmon resonance for the determination of isocarbophos [J]. *Front Chem*, 2020, (08): 673.
- [16] OUYANG HX, LI CN, LIU QY, et al. Resonance Rayleigh scattering and SERS spectral detection of trace Hg(II) based on the gold nanocatalysis [J]. *Nanomaterials*. 2017, 7(05): 114.
- [17] OUYANG HX, LIANG AH, JIANG ZL. A simple and selective resonance Rayleigh scattering-energy transfer spectral method for determination of trace neomycin sulfate using Cu_2O particle as probe [J]. *Spectrochim ACTA A*, 2018, 190: 268-273.

作者简介

左卫元, 博士, 副教授, 研究方向: 环境水分析与处理。
欧阳辉祥, 博士, 教授, 主要研究方向: 环境分析。