

基于钙黄绿素的荧光分光光度法测定谷胱甘肽

景蓓蓓 杨晓红 张胜海 答敏 张萍 朱依娜

(陕西师范大学化学与材料科学学院 陕西 西安 710062)

摘要 目的 基于钙黄绿素的荧光分光光度法建立一种测定谷胱甘肽的新方法。方法 在 pH=8.0 介质中, 铜(II)与钙黄绿素配位引起荧光猝灭, 由于谷胱甘肽与铜(II)的亲合力很强, 可从钙黄绿素-铜离子的络合物中夺取铜离子而使钙黄绿素游离出来使荧光强度得以恢复, 荧光恢复的程度与加入谷胱甘肽的浓度在一定浓度范围内成线性。结果 据此建立了一种测定谷胱甘肽的新方法, 该方法的线性范围为 $2.0 \times 10^{-6} \sim 1.4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $F = 8.1964C + 196.43$, 检测限为 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 。结论 用此法测定谷胱甘肽简便快速, 灵敏度高。

关键词 谷胱甘肽 荧光分光光度法; 钙黄绿素

中图分类号 Q503 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 07-1359-04

Determination of Glutathione by Fluorescence Spectroscopy Method Based on Calcein-Copper(II) System

JING Bei-bei, YANG Xiao-hong, ZHANG Sheng-hai, DA Min, ZHANG Ping, ZHU Yi-na

(School of Chemistry and Materials Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

ABSTRACT Objective: To establish a new method of measuring reduced glutathione by calcein copper (II) system. **Methods:** In pH=8.0 buffer solution, Copper (II) can coordinate with calcein, and cause the fluorescence intensity of calcein solution decreased. Because of the affinity between Copper (II) and reduced glutathione is very strong, so it can seize copper ions from calcein-Copper (II) complex and make calcein free, thus make the fluorescence recovered, and the recovery degree of its fluorescence was linear related to the concentration of reduced glutathione added into the solution. **Results:** Hereby established a new method of measuring reduced glutathione in the range of with $2.0 \times 10^{-6} \sim 1.4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $F = 8.1964C + 196.43$, a detect limit of $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$. **Conclusion:** This method of measuring reduced glutathione is simple, quick and sensitive.

Key words: Glutathione; Fluorescence; Calcein

Chinese Library Classification: Q503 **Document Code:** A

Article ID: 1673-6273 (2011) 07-1359-04

前言

谷胱甘肽是一种具有重要生理功能的天然活性肽, 它是由谷氨酸、甘氨酸、半胱氨酸形成的三肽, 化学名为 γ -L-谷氨酰-L-半胱氨酰-甘氨酸, 分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{O}_6\text{SN}_3$, 其分子含有活性巯基, 具有保护肝脏、抗病毒、解毒、抗肿瘤作用, 在细胞的多种基本代谢功能中起着抗氧化作用^[1-3]。谷胱甘肽在体内以两种形态存在, 即还原型谷胱甘肽 (reduced glutathione, 简称 GSH) 和氧化型谷胱甘肽 (oxidized glutathione, 简称 GSSG), 在机体中大量存在并起主要作用的是还原型谷胱甘肽^[4]。通常人们所指的谷胱甘肽是还原型谷胱甘肽。谷胱甘肽固体较为稳定, 水溶液在空气中则易被氧化^[5]。

作为机体内重要的生物活性巯基物质, 谷胱甘肽对于维持生物体内合适的氧化还原环境起着至关重要的作用。临床上^[6-8], 谷胱甘肽可以迅速提高机体免疫力, 在抗氧化、抗辐射、清除自由基、解毒、促进铁质吸收等方面具有良好的效果且无副作用; 在食品加工领域^[9-12], 谷胱甘肽具有增强食品营养价值和强化

食品风味等功能。

目前测定谷胱甘肽含量的方法有多种, 如酶循环法、比色法^[13]、荧光法^[14-15]、色谱法^[16-18]、毛细管电泳法^[19-20]、碘量法、四氧嘧啶法等。

本文利用谷胱甘肽能从钙黄绿素-铜(II)离子的络合物中夺取铜离子而使钙黄绿素游离出来, 使荧光强度得以恢复, 且其恢复的程度与加入的谷胱甘肽浓度在一定范围内成线性。据此建立了一种测定谷胱甘肽的新方法。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

970-CRT 荧光分光光度计 (上海分析仪器总厂); PHS-3D 数字酸度计 (上海雷磁仪器厂); SZ-96 自动纯水蒸馏器 (上海亚荣生化仪器厂); 恒温水浴锅 (上海市实验仪器厂); 钙黄绿素 (天津市福晨化学试剂厂); 谷胱甘肽 (科昊生物有限公司); CuSO_4 (西安化学试剂厂); 四硼酸钠标准缓冲试剂 (pH=9.18, 上海雷磁·创益仪器仪表公司); 阿托莫兰, 即注射用还原型谷胱甘肽 (重庆药友制药有限责任公司);

所用试剂均为分析纯, 实验用水为二次水。

1.2 实验方法

1.2.1 储备溶液配制 钙黄绿素标准溶液 ($1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$) 准确

作者简介 景蓓蓓 (1983-), 女, 硕士研究生, 主要从事光分析研究, Tel: 15891393677, E-mail: jingbei121@126.com

△通讯作者 景蓓蓓, E-mail: jingbei121@126.com

(收稿日期 2010-12-20 接受日期 2011-01-15)

称取 0.3333g 钙黄绿素固体,加 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液 25ml 使固体溶解后,转入 500ml 的容量瓶,用二次水定容到刻度,4℃ 保存;使用时用水逐级稀释至所需浓度,得钙黄绿素分析液。

铜(II)离子标准溶液(1.0×10^{-3} mol/L): 准确称取 0.0160g CuSO_4 ,溶于少量水后转入 100ml 的容量瓶,用二次水定容至刻度。使用时再用水逐级稀释到所需浓度,得分析用 Cu^{2+} 标准溶液。

谷胱甘肽标准溶液(1.0×10^{-3} mol/L): 准确称取 0.0307g 谷胱甘肽,溶于少量水后转入 100ml 的容量瓶,用二次水定容到刻度。使用时再用水逐级稀释到所需浓度,得分析用谷胱甘肽标准溶液(由于还原型谷胱甘肽已被氧化,故使用前临时配置)。缓冲溶液: 准确称取 0.2269g KH_2PO_4 溶于少量水后转入 25ml 的容量瓶,用二次水定容至刻度,配成 $1/15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 溶液;准确称取 11.935g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶于少量水后转入 500ml 的容量瓶,用二次水定容至刻度,配成 $1/15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_2HPO_4 溶液。分别取上述 Na_2HPO_4 溶液 475 ml 和 KH_2PO_4 溶液 25ml 配成 pH=8.04 的磷酸氢二钠 - 磷酸二氢钾标准缓冲溶液。

1.2.2 操作步骤 移取 2.5ml 磷酸氢二钠 - 磷酸二氢钾标准缓冲溶液、1.25ml 钙黄绿素分析液于 25ml 容量瓶中,再分别依次加入 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷胱甘肽标准溶液 0.5ml、1.0ml、1.5ml、2.0ml、2.5ml、3.0ml、3.5ml 或谷胱甘肽样品溶液,然后加入 1.25ml 分析用 Cu^{2+} 标准溶液后用二次水定容至刻度,摇匀。用 40℃ 水浴加热 20min,以 492nm 为激发波长、519nm 为发射波长测定荧光强度,绘制标准曲线,从曲线上求得谷胱甘肽样品的浓度。

2 结果

2.1 标准曲线的绘制

在 Calcein-GSH- $\text{Cu}(\text{II})$ 体系中,加入 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷胱甘肽标准溶液 0.5ml、1.0ml、1.5ml、2.0ml、2.5ml、3.0ml、3.5ml,40℃ 水浴加热 20min 后测定荧光强度,以相对荧光强度对标准谷胱甘肽浓度作图绘制标准曲线,如图 1。结果表明,在选定的实验条件下谷胱甘肽浓度在 $2.0 \times 10^{-6} \sim 1.4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内与荧光强度存在良好的线性关系,标准曲线为 $F = 8.1964C + 196.43$ (F 为相对荧光强度, C 为谷胱甘肽浓度),相关系数为 0.9958。对含量为 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的谷胱甘肽标准溶液进行 11 次平行测定,其相对标准偏差为 0.92%。根据 IUPACA 建议,计算得到方法的检测限为 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 样品的测定

在选定的实验条件下测定阿拓莫兰中谷胱甘肽,可通过标准曲线得到样品中谷胱甘肽的含量。实验结果表明,注射剂阿拓莫兰中谷胱甘肽含量为 97.9%。

3 讨论

3.1 钙黄绿素及钙黄绿素 - 铜配合物的荧光光谱

实验显示,在中性介质中钙黄绿素溶液呈现很强的荧光,最大激发波长为 492nm,最大发射波长在 519nm。向钙黄绿素溶液中加入一定量铜(II)离子后,溶液的荧光强度减弱,且最大

激发波长和最大发射波长无明显变化,一段时间后荧光趋于稳定,表明铜(II)离子和钙黄绿素配位完成。在钙黄绿素 - 铜(II)离子体系中加入谷胱甘肽后体系的荧光强度逐步恢复,并且荧光强度恢复的程度与加入谷胱甘肽的量在一定范围内呈线性。如图 2 所示,其中钙黄绿素(Calcein)溶液浓度为 $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$,介质条件是 pH=9.18 的四硼酸钠标准缓冲溶液。

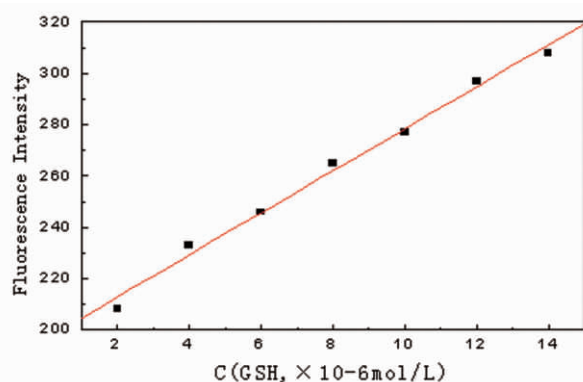


图 1 GSH 标准曲线

Fig.1 Standard curve of reduced glutathione

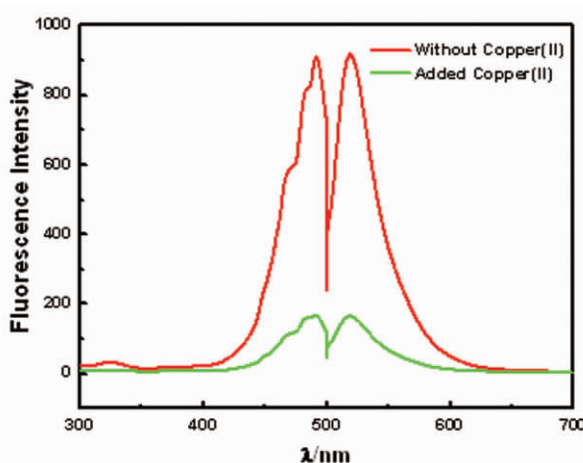


图 2 钙黄绿素和钙黄绿素-铜(II)的激发和发射光谱

Fig.2 The excitation and emission spectrum of Calcein & Calcein- $\text{Cu}(\text{II})$ complex

3.2 反应介质及 pH 值

文献^[21]报道,先以 0.01 mol/L 硼砂溶液做介质,用 HCl 溶液和 NaOH 溶液调节至不同 pH 值,测定加入等浓度的铜离子前后($5 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$)钙黄绿素溶液的荧光强度,以加铜前后溶液荧光强度变化值对 pH 作图(图 3),由图可见:当 pH=8.0 时,加铜前后溶液的荧光强度变化最大。然后分别测定在 pH=8.0 的 $\text{C}_4\text{H}_2\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O} - \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{NaOH}$, $\text{H}_3\text{BO}_3 - \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{NaCl} - \text{Na}_2\text{BO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 五种缓冲溶液中的荧光强度变化,做出不同缓冲体系下加铜前后溶液荧光强度的差值图(见图 4,其中 A $\text{C}_4\text{H}_2\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O} - \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, B $\text{H}_3\text{BO}_3 - \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, C $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, D: $\text{NaCl} - \text{Na}_2\text{BO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, E $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{NaOH}$)。由图可见:在 $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 缓冲介质中荧光强度差值最大。所以本文选择 pH=8.0 的 $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 缓冲溶液。

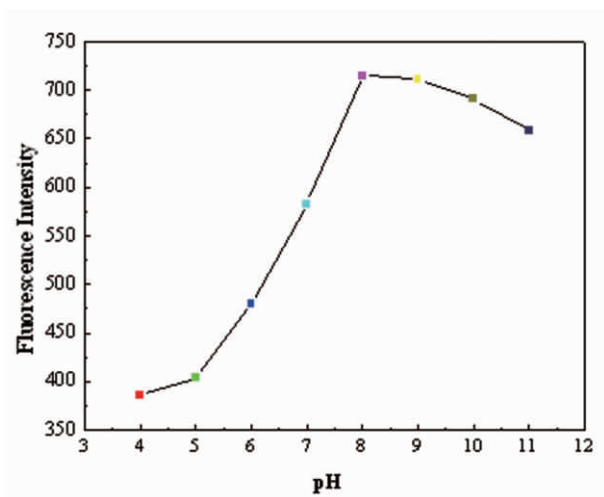


图3 pH对荧光强度的影响

Fig.3 Effect of pH on fluorescence intensity

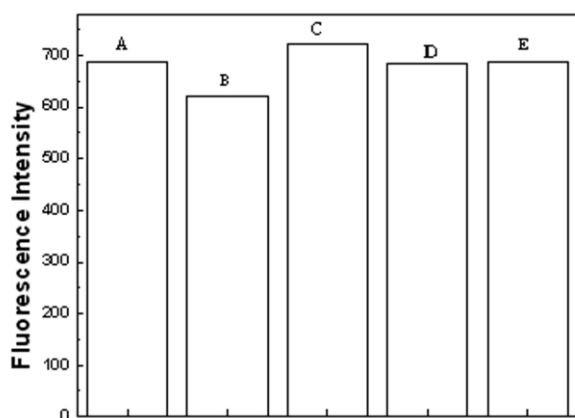


图4 缓冲体系对荧光强度的影响

Fig.4 Effect of buffer systems on fluorescence intensity

3.3 钙黄绿素与铜(II)离子浓度比的选择

移取 2.5ml 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ - KH_2PO_4 标准缓冲溶液、1.25ml 钙黄绿素分析液于 25ml 容量瓶中,再加入一定体积的铜(II)离子标准溶液后,用二次水定容至刻度,摇匀,放置 20min 后测定荧光强度。如图 5,实验结果表明钙黄绿素与铜(II)离子浓度比在 1:1 时,相对荧光强度趋于稳定。故本实验选择钙黄绿素与铜(II)离子浓度比为 1:1。

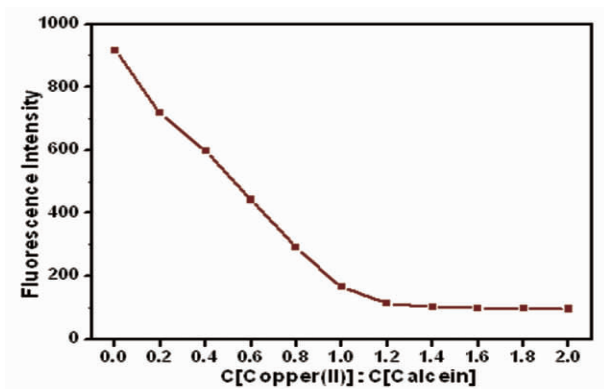


图5 铜(II)与钙黄绿素浓度比与荧光强度的关系

Fig.5 Effect of concentrations ratio of calcein and calcein-Cu(II) on fluorescence intensity

3.4 钙黄绿素与铜(II)离子的最佳浓度

上述体系中,分别使钙黄绿素与铜(II)的浓度为 $1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, $5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, $5 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$, $1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$, $5 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$, $1 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$,均放置 20min 后测定,考察钙黄绿素与铜(II)离子的浓度与荧光猝灭程度的关系。实验结果表明钙黄绿素与铜(II)离子浓度分别在 $5 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 时,荧光猝灭程度最大。故本实验选择钙黄绿素与铜(II)离子浓度均为 $5 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 。

3.5 试剂加入顺序、温度和反应时间的选择

试剂加入顺序对测定结果的影响较大。在 $\text{pH}=9.18$ 的硼砂介质中,钙黄绿素、铜(II)离子和 GSH 的浓度均为 $5 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 时,试剂加入顺序分别为 Calcein-GSH-Cu(II), Calcein-Cu(II)-GSH, GSH-Cu(II)-Calcein。结果显示按 Calcein-GSH-Cu(II)的顺序加入试剂时,体系的荧光强度较其它加入顺序较快稳定下来且至少 1h 保持不变。

按照实验方法,GSH、Cu(II)与钙黄绿素间的竞争反应速度较慢,反应 1.5 小时仍不能达到平衡,故水浴加热此反应。

移取 2.5ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ - KH_2PO_4 标准缓冲溶液、1.25ml 钙黄绿素分析液于 25ml 容量瓶中,然后加入 2.5ml 的 $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷胱甘肽标准溶液,再加入 1.25ml 分析用 Cu(II)标准溶液后,用二次水定容至刻度,摇匀。用 40°C 水浴加热 0~30min,每十分钟测定一次。结果表明,20min 后荧光强度基本不变,说明反应完全。故实验选择 Calcein-GSH- Cu(II)体系 40°C 水浴加热反应 20min。结果表明,20min 后荧光强度基本不变,说明反应完全。故实验选择 Calcein-GSH- Cu(II)体系 40°C 水浴加热反应 20min。

3.6 干扰离子的测定

考察了一些常见离子对谷胱甘肽测定的影响。在选定的实验条件下,对 $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 的谷胱甘肽进行了干扰实验。结果表明在干扰水平为 $\pm 5\%$ 范围内,500 倍量的糖精钠、 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 、 SCN^- 、 PO_4^{3-} 、 NO_3^- 和 NH_4^+ ,100 倍量的蔗糖、葡萄糖、淀粉,10 倍量的 CO_3^{2-} 、 Al^{3+} 不干扰,10 倍量的 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 有干扰。

4 结论

在 $\text{EX}=492\text{nm}$ 和 $\text{EM}=519\text{nm}$ 荧光波长下检测阿拓莫兰中谷胱甘肽含量是完全可行的。本测定方法在 $2.0 \times 10^{-6} \sim 1.4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度范围内具有良好的线性关系,操作方便、灵敏度高。

参考文献(References)

- [1] Cooper A.J.L. Glutathione in the brain: disorders of glutathione metabolism, in the molecular and genetic basis of neurological disease boston. Butterworth Heinemann, 1997,1195-1230
- [2] Baker MA, Cemiglia GJ, Zaman A. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples[J].Analytical Biochemistry, 1990,190(2):360-365
- [3] WuG, Fang Y, Yang S, et al. Turner ND Glutathione metabolism and its implications for health [J]. J Nutr, 2004,134:489-492
- [4] 汤亚杰,徐小玲,李冬生.发酵法生产谷胱甘肽的研究进展[J].食品与发酵工业, 2007, 33(1): 75-79
Tang Ya-jie, Xu Xiao-ling, Li Dong-sheng. Advance on the Produc-

- tion of Glutathione by Microbial Fermentation [J]. Food and Fermentation Industries, 2007, 33(1): 75-79
- [5] 赵绍强.还原型谷胱甘肽、纳洛酮联合治疗急性酒精中毒 51 例分析[J].中国实用神经疾病杂志,2009,12(9):61-62
Zhao Shao-qiang. 51 cases analysis of treatment on acute alcohol poisoning with reduced glutathione and naloxone [J]. Chinese Journal of Practical Nervous Diseases, 2009, 12(9):61-62
- [6] 范红,王雷.还原型谷胱甘肽的临床应用[J].基层医学论坛,2010, 14 (9)
Fan Hong, Wang Lei. Clinical application of reduced glutathione[J]. Primary Medical Forum, 2010, 14 (9)
- [7] 朱步东,李昕,赵启成,等.还原型谷胱甘肽增强恶性肿瘤化疗患者抗氧化能力的研究[J].癌症,2004,23(4):452-455
Zhu Bu-dong, Li Xin, Zhao Qi-cheng, et al. Enhancement of antioxidant capability of cancer patients during chemotherapy by reduced glutathione[J]. Chinese Journal of Cancer, 2004,23(4):452-455
- [8] 郝云龙,闻勤生,阿拓莫兰对缺血再灌注损伤肝脏的保护作用[J].中国急救医学,2002,22(5):274-275
Hao Yun-long, Wen Qin-sheng. Protective effect of atomolan on liver during ischemia-reperfusion injury[J]. Chin J Crit Care Med, 2002,22 (5):274-275
- [9] 江洁,单立峰.谷胱甘肽的生产及其在食品工业中的应用[J].中国调味品,2009, 34 (2):40-44
Gang Jie, Shan Li-feng. Research progress on the glutathione production and application in food industry [J]. China Condiment, 2009, 34 (2):40-44
- [10] 蒋凯,李崎,顾国贤.构建高产谷胱甘肽啤酒酵母基因工程菌提高啤酒抗老化能力的研究[J].生物工程学报,2007,23(6):1071-1076
Jiang Kai, Li Qi, Gu Guo-xian. Improvement of beer anti-staling capability by genetically modifying industrial brewing yeast with high glutathione content [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2007,23 (6):1071-1076
- [11] Wheeler GL, Grant CM. Regulation of redoxhomeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Physiol Plant, 2004,120:12-20
- [12] 张吉娜,何秀萍,张博润等.低双乙酰抗老化啤酒酵母工程菌的构建[J].生物工程学报,2005,21(6):942-946
Zhang Ji-na, He Xiu-ping, Zhang Bo-run, et al. Genetically modified industrial brewing yeast with high glutathione and low-diacetyl production. Chinese Journal of Biotechnology, 2005,21(6):942-946
- [13] 郭黎平,刘国良,张卓勇,等.铜(II)-新铜试剂-谷胱甘肽乙醇体系显色反应研究[J].光谱学与光谱分析,2000,20(30):412-414
Guo Li-ping, Liu Guo-liang, Zhang Zhuo-yong, et al. Study on Color Reaction of Copper (II)-Neocuprine-Glutathione-Alcohol System[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2000,20(30):412-414
- [14] 张静,吉宏武,周静,等.荧光分光光度法测定海洋生物中的谷胱甘肽[J].湛江海洋大学学报,2005,25(4):32-34
Zhang Jing, Ji Hong-wu, Zhou Jing, et al. Determining glutathione in several marine organisms by fluorescence spectrophotometry[J]. Journal of Zhanjiang Ocean University, 2005,25(4):32-34
- [15] Mahesh K. Bhalgat, Rosaria P. Haugland, Zhenjun Diwu, et al. 5-(pentafluorobenzoylamino) fluorescein: A selective substrate for the determination of glutathione concentration and glutathione S-transferase activity seksiri arttamangkul [J]. Analytical Biochemistry, 1999,269:410-417
- [16] Ariza AR, Toribio F, Barea JL. Rapid determination of glutathione status in fish Liver using high-performance liquid chromatography and electrochemical detection [J]. Journal of Chromatography B, 1994,656:311-318
- [17] 张丽荣,王志刚,谢清毅.HPLC 法测定注射用还原型谷胱甘肽含量[J].齐鲁药事,2005, 24 (2):93-94
Zhang Li-rong, Wang Zhi-gang, Xie Qing-yi. Determination of reduced glutathione for injection by HPLC [J]. Qilu Pharmaceutical Affairs, 2005, 24 (2):93-94
- [18] Camera E., Rinaldi M., Briganti S., et al. Simultaneous determination of reduced and oxidized glutathione in peripheral blood mononuclear by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography, 2001,757(1):69-78
- [19] Frassanito R, Rossi M, Dragani LK, et al. New and simple method for the analysis of the Glutathione adduct of atrazine[J]. Journal of Chromatography A, 1998,795:53-60
- [20] 郝丽萍,胡学锋,孙秀发,等.酒精对小鼠 NIT-1 细胞氧化损伤及凋亡的影响[J].卫生研究,2005,34(3):306-308
Hao Li-ping, Hu Xue-feng, Sun Xiu-fa, et al. Oxidative damage and apoptosis in NIT-1 cells induced by ethanol [J]. Journal of Hygiene Research, 2005,34(3):306-308
- [21] 章竹君,张云科,韩权.利用 Calcein-Cu²⁺-Hg²⁺ 体系的竞争反应光导纤维荧光法测定痕量汞[J].稀有金属,1987,6(3):211-216
Zhang Zhu-jun, Zhang Yun-ke, Han Quan. Determination of trace mercury using competitive-binding reaction by fiber optics fluorometry [J]. Rare Metals, 1987,6(3):211-216