

# 二氧化锰纳米颗粒比色法测定谷胱甘肽

李玲芳,尹俊霞,贾桥,马翔,王琦\*

(太原工业学院化学与化工系,山西太原 030008)

**摘要:**基于二氧化锰纳米颗粒具有优异的模拟酶特性,能够高效地催化氧化3,3',5,5'-四甲基联苯胺产生明显的蓝色变化,而谷胱甘肽的加入能够引起二氧化锰的降解从而抑制了基于二氧化锰的显色反应。据此制备了二氧化锰纳米颗粒并且建立了测定谷胱甘肽的比色法,结果表明,在最佳条件下,谷胱甘肽的线性范围为8~70  $\mu\text{mol/L}$ ,并且表现出了良好的选择性。

**关键词:**二氧化锰;纳米颗粒;模拟酶;比色法;谷胱甘肽

中图分类号:O65

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2020)08-0218-03

DOI:10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2020.08.048

## Determination of glutathione by manganese dioxide nanoparticles based colorimetry

LI Ling-fang, YIN Jun-xia, JIA Qiao, MA Xiang, WANG Qi\*

(Department of Chemistry and Chemical Engineering, Taiyuan Institute of Technology, Taiyuan 030008, China)

**Abstract:** Manganese dioxide nanoparticles ( $\text{MnO}_2$  NPs) reveal excellent mimetic enzyme performances, and can efficiently catalyze the oxidation of 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) to generate an obvious blue change. However, the addition of glutathione (GSH) can induce the decomposition of  $\text{MnO}_2$  and thus inhibit the color reaction based on  $\text{MnO}_2$ . Therefore,  $\text{MnO}_2$  NPs are synthesized and a colorimetry method for GSH determination is established. It is turned out that under the optimal conditions, the linear range of glutathione is 8~70  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  with a good selectivity.

**Key words:** manganese dioxide; nanoparticles; mimetic enzyme; colorimetry; glutathione

谷胱甘肽(glutathione, GSH)是一种体内大量存在的生物巯基三肽,扮演了抵抗自由基氧化的角色,因此在新陈代谢和病理过程中起到了关键作用<sup>[1-2]</sup>。它通过维持氧化还原平衡、去除重金属离子和清除自由基氧化压力等方式直接参与到各种生理过程中,因此与许多疾病息息相关。包括获得性免疫缺陷综合症、阿尔茨海默病、心脏病、肝损伤、糖尿病等在内的多种疾病都被证实与细胞内紊乱的谷胱甘肽含量有关<sup>[3-4]</sup>。更重要的是,癌细胞中的谷胱甘肽含量明显高于正常水平,这一点也被用来诊断癌症<sup>[5-6]</sup>。因此,检测生物体系样品中谷胱甘肽的含量具有重要意义。目前为止,检测谷胱甘肽的仪器分析方法主要有高效液相色谱法<sup>[7]</sup>、电化学法<sup>[8]</sup>、表面增强拉曼光谱法<sup>[9]</sup>、化学发光法<sup>[10]</sup>、荧光分析法<sup>[11-14]</sup>、比色法<sup>[15-17]</sup>等,其中比色法由于简单、快速、可视化的优点备受关注。

二氧化锰纳米材料得益于优异的物理、化学性能被广泛研究。除了较宽的光吸收性能和快速的电子转移性能之外,二氧化锰纳米材料还表现出了优异的模拟酶性能<sup>[18]</sup>,能够有效地催化酶底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)氧化为相应的蓝色产物。值得注意的是,谷胱甘肽能够与二氧化锰发生

特异的氧化还原反应使得后者降解<sup>[19-20]</sup>。受这点启发,本文中制备了二氧化锰纳米颗粒(manganese dioxide nanoparticles,  $\text{MnO}_2$  NPs),通过谷胱甘肽抑制其催化氧化TMB的显色反应,建立了测定谷胱甘肽的比色法。

## 1 实验部分

### 1.1 实验仪器和试剂

高锰酸钾、醋酸、醋酸钠、氢氧化钠、乙醇等均为分析纯;谷胱甘肽(GSH, 98%)、聚烯丙胺盐酸盐(PAH, 95%)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB, 98%)。

JEM-F200型透射电子显微镜、AXIS ULTRA DLD型X射线光电子能谱仪、Nano-ZS90型纳米粒度仪、TU-1901型紫外-可见吸收光谱仪。

### 1.2 二氧化锰纳米颗粒的制备

采用超声辅助法一步制备二氧化锰纳米颗粒。取10 mL浓度为3.5 mg/mL的高锰酸钾溶液置于烧杯中,加入30 mL去离子水后放入超声清洗机中震荡均匀后,加入5 mL浓度为40 mg/mL的聚烯丙胺盐酸盐溶液,在超声辅助下持续反应15 min后取出烧杯,用透析袋透析48 h后得到二氧化锰纳米

颗粒。

### 1.3 MnO<sub>2</sub> NPs 催化性能及 GSH 抑制评估

分别取 50 μL 二氧化锰纳米颗粒溶液加入到不同 pH(2、3、4、5、6、7) 的醋酸-醋酸钠缓冲液中,接着加入 200 μL 浓度为 0.4 mmol/L 的 GSH 溶液或相应的缓冲液(空白),摇匀后再加入 100 μL 浓度为 4 mmol/L 的 TMB 溶液,保持最终混合溶液体积为 2 mL。置于室温下反应 3 min 后,通过紫外-可见光谱仪在 653 nm 下测量吸光度。

### 1.4 谷胱甘肽标准曲线的绘制及选择性研究

分别取 50 μL 二氧化锰纳米颗粒溶液加入到 pH=4 的醋酸-醋酸钠缓冲液中,接着加入 200 μL 一系列不同浓度的 GSH 溶液,摇匀后再加入 100 μL 浓度为 4 mmol/L 的 TMB 溶液,保持最终混合溶液体积为 2 mL。置于室温下反应 3 min 后,测定其在 653 nm 下的吸光度。取 0.4 mmol/L 的 GSH 和不同氨基酸溶液(0.4 mmol/L),在上述条件下反应 3 min,测定其在 653 nm 下的吸光度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 二氧化锰纳米颗粒的表征

图 1(a)展示了制备的二氧化锰纳米颗粒的高分辨透射电子显微镜照片,从图中可以看出单独分散的颗粒。由于在制备过程中引入了聚烯丙胺盐酸盐,使得颗粒之间有一定程度的团聚,并且对比度不高。图 1(a)的插图是单独 1 个二氧化锰纳米颗粒的照片,从图中可以看到明显的晶格条纹。图 1(b)展示了材料动态光散射测试的结果,表明该纳米颗

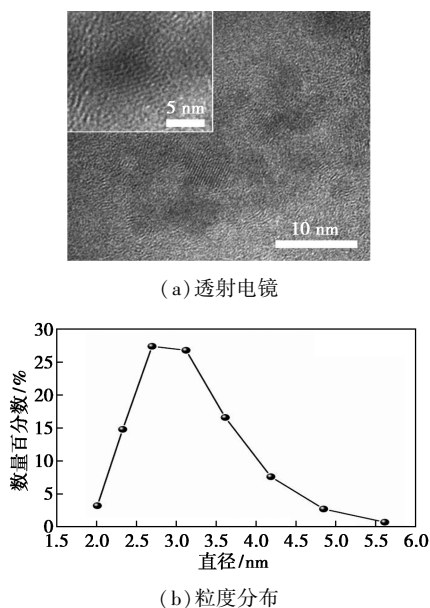


图 1 二氧化锰纳米颗粒的透射电镜和粒度分布图

粒尺寸分布在 2.01 ~ 5.61 nm,并且平均粒径为 3.07 nm。图 2 测试了制备的二氧化锰纳米颗粒的 X 射线光电能谱图,图 2(a)是锰元素的 XPS 分谱,从图中看到在 653.5/642.0 eV 处有 2 个分峰,分别对应于 Mn 2p<sub>1/2</sub>、Mn 2p<sub>3/2</sub>。而在 O 1s 的分谱中,在 529.6 eV 处表现出了 Mn-O-Mn 的结合形式。上述结果表明了该材料为二氧化锰纳米颗粒。

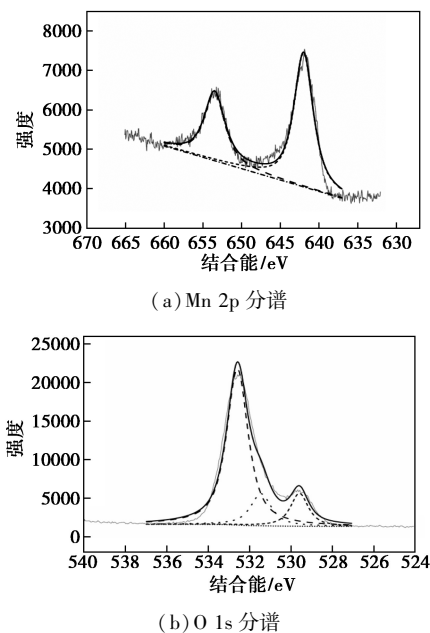
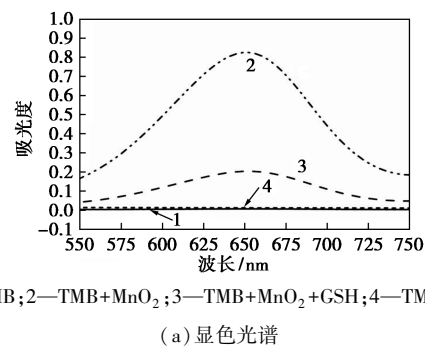


图 2 二氧化锰纳米颗粒的 XPS Mn 2p 分谱图和 O 1s 分谱图

### 2.2 二氧化锰纳米颗粒催化性能及谷胱甘肽抑制

图 3(a)记录了二氧化锰-TMB 反应体系在不同条件下反应产物的紫外-可见吸收光谱图。从图



1—TMB; 2—TMB+MnO<sub>2</sub>; 3—TMB+MnO<sub>2</sub>+GSH; 4—TMB+GSH

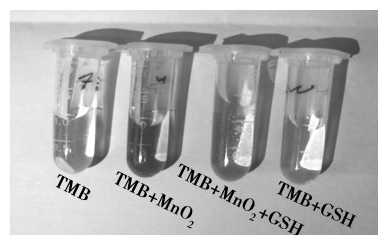


图 3 不同条件下显色光谱和相应照片

中可知,二氧化锰纳米颗粒能够高效地催化 TMB 显色,因此在 653 nm 处表现出明显的吸收峰,但是在体系中引入谷胱甘肽之后,653 nm 处的吸收峰明显地降低。此外,单独的 TMB 和 TMB+谷胱甘肽并没有发生显色反应。图 3(b)展示了相应的反应体系照片,从图中可以看出,引入谷胱甘肽之后,蓝色明显褪去。

### 2.3 比色法测定谷胱甘肽的条件优化

图 4 考察了不同 pH 的缓冲介质条件下,谷胱甘肽对二氧化锰-TMB 显色体系的抑制情况。从图中可以看出,在 pH=4 的条件下,相同浓度的谷胱甘肽表现出了吸光度最大程度的差值,因此在该酸度条件下,谷胱甘肽的抑制作用最强。这是由于二氧化锰在酸性条件下表现出了更高的氧化性,能够更大程度地被谷胱甘肽分解,但是太高的酸度又会抑制 TMB 的显色反应,因此在 pH=4 的条件下得到了最佳的响应。为了获得最大的测定灵敏度,后续实验都确定在 pH=4 的缓冲介质条件下进行。

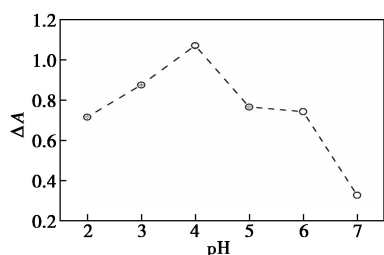
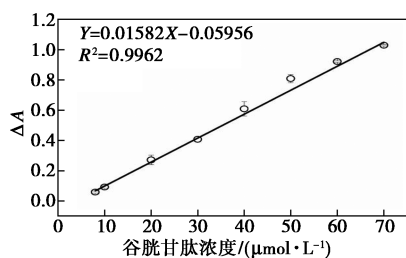


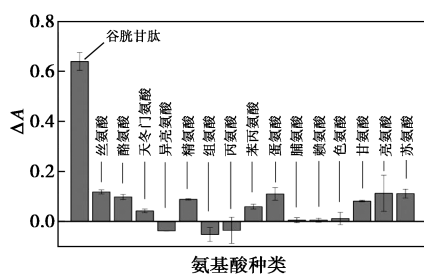
图 4 测定谷胱甘肽的 pH 优化

### 2.4 标准曲线及选择性

在上述最佳条件下,图 5(a)得到了二氧化锰纳



(a) 标准曲线



(b) 选择性考察

图 5 谷胱甘肽的标准曲线和选择性考察

米颗粒比色法测定谷胱甘肽的标准曲线。结果表明,在谷胱甘肽浓度为 8~70  $\mu\text{mol/L}$  吸光度差值 ( $\Delta A$ ) 与谷胱甘肽的浓度呈线性关系。线性方程为  $\Delta A=0.01582C-0.05956$ ,  $R^2=0.9962$ , 其中  $\Delta A$  为加入谷胱甘肽前后,二氧化锰-TMB 体系的吸光度差值; $C$  为加入后的谷胱甘肽浓度。为了研究该方法对于谷胱甘肽测定的选择性,图 5(b)考察了不同氨基酸对于二氧化锰-TMB 体系的吸光度影响,结果表明,常见氨基酸对于谷胱甘肽的测定没有干扰,证明该方法具有良好的选择性。

## 3 结论

通过超声辅助反应制备得到了二氧化锰纳米颗粒,该材料能有效催化 TMB 显色,但是体系中引入谷胱甘肽之后,由于与二氧化锰之间的作用,能够明显地抑制显色反应,降低吸光度。由此建立了基于二氧化锰纳米材料的比色法测定谷胱甘肽。该方法表现出了良好的线性范围和选择性。基于二氧化锰纳米材料的比色法有效地补充了谷胱甘肽的比色测定法。

## 参考文献

- [1] Hwang C S, Sinskey A J, Lodish H F. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic-reticulum [J]. Science, 1992, 257 (5076): 1496-1502.
- [2] Kanzok S, Schirmer R H, Turbachova I, et al. The thioredoxin system of the malaria parasite Plasmodium falciparum-Glutathione reduction revisited [J]. J Biol Chem, 2000, 275 (51): 40180-40186.
- [3] Estrela J M, Ortega A, Obrador E. Glutathione in cancer biology and therapy [J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2006, 43 (2): 143-181.
- [4] Chauhan A, Chauhan V. Oxidative stress in autism [J]. Pathophysiology, 2006, 13 (3): 171-181.
- [5] Feng Y, Zhang L C, Liu R, et al. Modulating near-infrared persistent luminescence of core-shell nanoplatfor for imaging of glutathione in tumor mouse model [J]. Biosens Bioelectron, 2019, 144: 111671.
- [6] He D, Yang X, He X, et al. A sensitive turn-on fluorescent probe for intracellular imaging of glutathione using single-layer  $\text{MnO}_2$  nanosheet-quenched fluorescent carbon quantum dots [J]. Chem Commun, 2015, 51 (79): 14764-14767.
- [7] Sun X N, Heinrich P, Berger R S, et al. Quantification and C-13-Tracer analysis of total reduced glutathione by HPLC-QTOFMS/MS [J]. Anal Chim Acta, 2019, 1080: 127-137.
- [8] Areias M C C, Shimizu K, Compton R G, et al. Voltammetric detection of glutathione: An adsorptive stripping voltammetry approach [J]. Analyst, 2016, 141 (10): 2904-2910.
- [9] Wei C H, Liu X, Gao Y, et al. Thiol-disulfide exchange reaction for cellular glutathione detection with surface-enhanced Raman scattering [J]. Anal Chem, 2018, 90 (19): 11333-11339.

(下转第 226 页)

## 参考文献

- [1] Park H C, Park Y J, Stevens R. Synthesis of alumina from high purity alum derived from coal fly ash[J]. *Materials Science and Engineering: A*, 2004, 367(1): 166-170.
- [2] Helmboldt O, Keith H L, Misra C, *et al.* Aluminum compounds, Inorganic[M]. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 2007.
- [3] Chueasupparobon N, Rawangbon W, Tangjaturonrasme N. Treatment of Frey's syndrome with topical ammonium alum: First report with twenty-two cases[J]. *Clinical Otolaryngology*, 2016, 41(5): 593-596.
- [4] 赵剑宇, 田凯. 微波酸化法从高岭土制取铵明矾的研究[J]. *无机盐工业*, 2006, 38(9): 32-34.
- [5] Hostomská V, Hostomský J. Recovery of ammonium alum from waste solutions with a varying ratio of  $\text{NH}_4$  to Al in groundwater remediation after underground uranium leaching[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 147(1): 342-349.
- [6] 黄燕华, 王建浩, 姚志远, 等. 结晶法由硫辛酸厂含铝废水制备铵明矾[J]. *过程工程学报*, 2013, 13(3): 60-65.
- [7] You Shaowei, Zhang Yifei, Zhang Yi. Nucleation of ammonium aluminum sulfate dodecahydrate from unseeded aqueous solution[J]. *Journal of Crystal Growth*, 2015, 411: 24-29.
- [8] Pires R F, Franco M R. Solubility of salicylic acid in water + salt ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{NaBr}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) at 293.5-313.3 K[J]. *Fluid Phase Equilibria*, 2012, 330: 48-51.
- [9] 冷一欣, 谭倩, 黄春香, 等. *L*-酒石酸水溶液结晶介稳区和诱导期的测定[J]. *化工学报*, 2016, 67(6): 2433-2439.
- [10] 李阳, 王保伟, 许根慧, 等. 激光散射法测定草酸结晶介稳区[J]. *化工学报*, 2000, 51(2): 274-277.
- [11] Nývlt J. Kinetics of nucleation in solutions[J]. *Journal of Crystal Growth*, 1968, 3: 377-383.
- [12] Sangwal K. Novel approach to analyze metastable zone width determined by the polythermal method: Physical interpretation of various parameters[J]. *Crystal Growth and Design*, 2009, 9(2): 942-950.
- [13] Sangwal K. Some features of metastable zone width of various systems determined by polythermal method[J]. *Cryst Eng Comm*, 2011, 13(2): 489-501.
- [14] Lyczko N, Espitalier F, Louisnard O, *et al.* Effect of ultrasound on the induction time and the metastable zone widths of potassium sulphate[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2002, 86(3): 233-241.
- [15] Sangwal K. Recent developments in understanding of the metastable zone width of different solute-solvent systems[J]. *Journal of Crystal Growth*, 2011, 318(1): 103-109.
- [16] Mullin J W. *Crystallization* [M]. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2001.
- [17] Kuldipkumar A, Kwon G S, Zhang G G Z. Determining the growth mechanism of tolazamide by induction time measurement [J]. *Crystal Growth & Design*, 2007, 7(2): 234-242.
- [18] Cao Shaotao, Zhang Yifei, Zhang Yi. Nucleation and morphology of monosodium aluminate hydrate from concentrated sodium aluminate solutions[J]. *Crystal Growth & Design*, 2010, 10(4): 1605-1610.
- [19] Bernardo A, Calmanovici C E, Miranda E A. Induction time as an instrument to enhance comprehension of protein crystallization[J]. *Crystal Growth & Design*, 2004, 4(4): 799-805.
- [20] Ushasree P M, Muralidharan R, Jayavel R, *et al.* Metastable zone-width, induction period and interfacial energy of zinc tris(thiourea) sulfate[J]. *Journal of Crystal Growth*, 2000, 210(4): 741-745. ■
- [10] Tang Y R, Song H J, Su Y Y, *et al.* Turn-on persistent luminescence probe based on graphitic carbon nitride for imaging detection of biothiols in biological fluids[J]. *Anal Chem*, 2013, 85(24): 11876-11884.
- [11] Wang Q, Liu X, Zhang L C, *et al.* Microwave-assisted synthesis of carbon nanodots through an eggshell membrane and their fluorescent application[J]. *Analyst*, 2012, 137(22): 5392-5397.
- [12] Qin J, Zhang L M, Yang R. Powder carbonization to synthesize novel carbon dots derived from uric acid for the detection of Ag(I) and glutathione[J]. *Spectrochim Acta Part A*, 2019, 207: 54-60.
- [13] 徐琴, 魏焕平, 胡效亚. 基于 ZnS 量子点荧光淬灭-恢复方法测定还原型谷胱甘肽[J]. *分析化学*, 2013, 41(7): 1102-1106.
- [14] 王媛, 陈潇潇, 刘学良, 等. 选择性检测谷胱甘肽的荧光探针[J]. *影像科学与光化学*, 2018, 35(4): 536-545.
- [15] Yuan Y, Zhang J, Wang M J, *et al.* Detection of glutathione in vitro and in cells by the controlled self-assembly of nanorings[J]. *Anal Chem*, 2013, 85(3): 1280-1284.
- [16] 景蓓蓓, 杨晓红, 张胜海, 等. 基于钙黄绿素的荧光分光光度法测定谷胱甘肽[J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(7): 1359-1362.
- [17] 郑希帆, 沈江涛, 段超, 等. 分光光度法结合抗干扰补偿检测谷胱甘肽[J]. *分析测试学报*, 2015, 34(6): 670-675.
- [18] Liu X, Wang Q, Zhao H, *et al.* BSA-templated  $\text{MnO}_2$  nanoparticles as both peroxidase and oxidase mimics [J]. *Analyst*, 2012, 137(19): 4552-4558.
- [19] Wang Q, Zhang Y, Wang X, *et al.* Dual role of BSA for synthesis of  $\text{MnO}_2$  nanoparticles and their mediated fluorescent turn-on probe for glutathione determination and cancer cell recognition [J]. *Analyst*, 2019, 144(6): 1988-1994.
- [20] Deng R, Xie X, Vendrell M, *et al.* Intracellular glutathione detection using  $\text{MnO}_2$ -nanosheet-modified upconversion nanoparticles [J]. *J Am Chem Soc*, 2011, 133(50): 20168-20171. ■

(上接第 220 页)