

一阶导数停流法测定还原型谷胱甘肽的方法研究

游文玮¹, 刘彦², 王尊本²

(1. 第一军医大学基础部, 广东 广州 510515; 2. 厦门大学化学系, 福建 厦门 361005)

摘要: 还原型谷胱甘肽(GSH)在新亚铜试剂存在下能被 Cu^{2+} 氧化而产生 Cu^+ 络合物, 该络合物在 454nm 处有特征吸收. 采用导数动力学分光光度法间接测定 GSH. 系统研究了导数动力学方法的实验条件, 并对流动注射装置进行改进, 保证导数光谱峰高的准确测量. 实验结果表明, 加入导数技术可基本消除因采样时间不准给流动注射方法带来的误差.

关键词: 导数光度法; 催化动力学; 分光光度法; 停流法; 还原型谷胱甘肽

中图分类号: O657.3

文献标识码: A

谷胱甘肽(GSH)是人体中许多新陈代谢过程所必需的物质, 它能非酶化还原过氧化物、自由基等膜物质. 通过谷胱甘肽转移酶的作用, 谷胱甘肽能与非生命物质或亲电物质结合, 起解毒作用. 在谷胱甘肽过氧化物酶的催化下, 还原态的谷胱甘肽能清除血红细胞中的过氧化氢. 谷胱甘肽的测定方法很多, 有滴定法、分光光度法、荧光光度法和酶催化法^[1~4]等. 本文采用导数动力学方法对 GSH 进行定量分析. 结果表明, 加入导数技术后方法的重现性好, 精密度高, 线性范围宽, 简单快速.

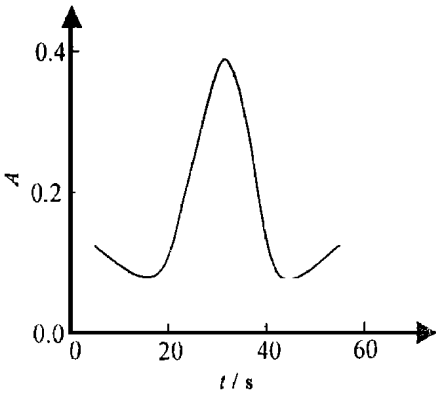


图 1 停流法动力学曲线

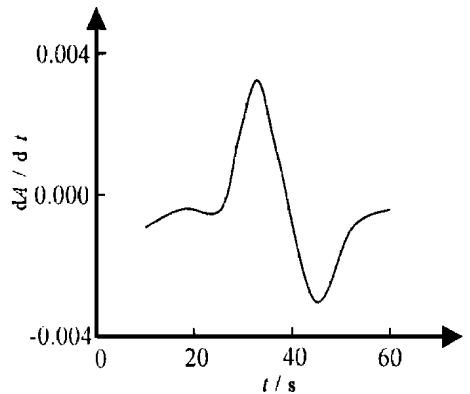


图 2 一阶导数光谱

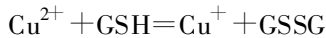
1 原理

导数分光光度法是利用反应速率随时间变化率与反应物或产物的浓度之间的定量关系, 通过测量与反应速率成比例关系的吸光度随时间的变化率(即导数峰的高度值 h), 从而求出待测物的含量. 图 1 表示本体系以停流法测得的动力学曲线, 图 2 是由图 1 变换得到的一

收稿日期: 1999-05-31

作者简介: 游文玮(1962-), 男, 副教授.

阶导数光谱曲线. 因为 $dA/dt = (dA/d\lambda) \times (d\lambda/dt)$, $d\lambda/dt$ 可控制恒定, 故 dA/dt 与 $dA/d\lambda$ 成比例关系, 也就与待测物的含量具有比例关系, 借此可以进行定量分析. 本文利用下列反应:



用新亚铜试剂与 Cu^{+} 反应形成具有特定吸收波长的稳定络合物, 测定该络合物, 便能间接求出谷胱甘肽的含量.

2 实验部分

1) 主要仪器 美国 Beckman DU-7HS 型分光光度计; 日本 HM-20E 型酸度计; LZ-1010 型蠕动泵; LZ-1020 型采样阀.

2) 试剂 1.00g/L GSH 标准溶液: 50.00mg GSH 溶于二次蒸馏水中, 在 50mL 容量瓶中定容, 避光存放, 当日现配. 10mmol/L 新亚铜试剂贮液: 0.2173g 新亚铜试剂, 滴加 0.05mol/L H_2SO_4 , 用二次蒸馏水溶解, 于 100mL 的容量瓶中定容, 随后于低温冷藏. 50mmol/L CuSO_4 溶液. 缓冲溶液: 0.1mol/L $\text{NaAc}-\text{HAc}$ (pH :3.50) 缓冲溶液; 0.01mol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4-\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH :7.20) 缓冲溶液; 0.01mol/L $\text{NaHCO}_3-\text{Na}_2\text{CO}_3$ (pH :9.60) 缓冲溶液.

3) 试验方法 在 100mL 容量瓶中, 移入 20mL 新亚铜试剂、1.6mL CuSO_4 溶液和一定量的缓冲溶液, 用二次蒸馏水定容. 另取 25mL 容量瓶, 移入若干毫升 GSH 标准溶液, 和一定量的缓冲溶液, 用二次蒸馏水定容, 将混合试剂及试样溶液分别由 2 支导管通过蠕动泵送入混合器, 由定时采样阀控制采样 15s, 停止采样 30s, 每次测量时间 120s. 溶液流过 30cm 长的反应管, 进入 DU-7 的流动池, 仪器在 454nm 波长处自动绘制动力学曲线, 共有 3 个吸收峰, 选择第二个峰为测量峰, 并将获得的动力学曲线自动变换成一阶导数曲线, 用游标量出峰高(峰-峰法).

4) 干扰实验 常见的阳离子, 如 $\text{Pb}(\text{II})$ 、 $\text{Cr}(\text{III})$ 、 $\text{Ni}(\text{II})$ 、 $\text{Co}(\text{II})$, 阴离子 $\text{Cl}(\text{I})$ 、 $\text{NO}_3(\text{I})$ 、 $\text{SO}_4(\text{II})$ 、 $\text{PO}_4(\text{III})$ 及环糊精、十二烷基磺酸钠等对本测定无干扰. 抗坏血酸及有还原性的 Fe^{2+} 有很强的干扰. Na_2SO_3 略有干扰. 过硫酸钠、高锰酸钾有干扰. NaNO_2 在酸性条件下有干扰, 在碱性条件下无干扰.

5) 标准曲线的绘制 在 5 个 25mL 容量瓶中, 各加入 2.5mL 0.01mol/L pH7.20 缓冲溶液, 分别移入 0.10、0.20、0.40、0.80、1.00mL 的 GSH 标准溶液, 按实验方法进行测定, 以测得的导数峰高 h 对相应的 GSH 浓度 c_{GSH} 做图, 即得标准曲线, 其拟合方程为 $A = 1.290c_{\text{GSH}} + 0.00019$, 相关系数 $r = 0.9998$. 若用非导数的普通动力学方法绘制的标准曲线的拟合方程为 $A = 7.68c_{\text{GSH}} + 0.00513$. 相关系数 $r = 0.9996$. 检测限为 0.104mg/L, 普通动力学法为 0.1983mg/L. 回收率为 89.68% ~ 94.67%.

6) 样品测定 取 3 个 25mL 容量瓶各加入 1.5mL 新小牛血清样品, 另取 3 个 25mL 容量瓶各加入 3.0mL 新小牛血清样品, 分别加入 2.5mL 缓冲液, 用二次蒸馏水定容, 按上述方法进行测定. 测定结果 GSH 含量为 80.52mg/L.

参考文献:

[1] Usha B N, Yathirajan H S. Oxidation of glutamic acid and its rare earth complexes with bromamine B [J].

Indian J Chem, Sect A, 1984, 23: 685

- [2] Tumuru M K, Reddy B S, Sastry C S P. Spectrophotometric determination of thiols using N, N-dimethyl-1, 4-phenylenediammonium dichloride and chloramine-T [J]. *Microchem J*, 1987, 36: 159.
- [3] Nakashima K, Akimoto H, Nishida K, et al. A new fluorogenic thiol-selective reagent: N-(2-(6-dimethylamino)benzofuranyl) phenyl maleimide [J]. *Talanta*, 1985, 32: 167.
- [4] Hua C, Smyth M R, Fagan C O. Determination of glutathione at enzyme-modified and unmodified glassy carbon electrodes [J]. *Analyst*, 1991, 116: 929.

Study on the First Derivative Stop-Flow Method to Determine Reduced Glutathione

YOU Wen-wei¹, LIU Yan², WANG Zun-ben²

(1. Department of Chemistry, The First Military Medical University, Guangdong Guangzhou 510515, China; 2. Department of Chemistry, Xiamen University, Fujian Xiamen 361005, China)

Abstract: Reduced glutathione (GSH), mixed with copper (II) and buthocuproine, could be oxidized to copper (I) complex, which had a characteristic absorption at 454nm. GSH was indirectly determined by derivative kinetic spectrophotometry. The experimental conditions were systematically studied and the apparatus of flow injection was improved to ensure the accurate detection. The results showed that derivative method could effectively eliminate the deviation of sampling time by flow injection.

Keywords: derivative spectrometry; catalytic kinetic; spectrophotometry; stop flow technique; reduced glutathione