

# 基于普鲁士蓝纳米立方的类过氧化物酶活性检测还原型谷胱甘肽

王加伟 倪朋娟 陈传霞 张华星 李长龙 刘文栋 姜媛媛

(济南大学 材料科学与工程学院, 山东 济南 250022)

**摘要** 本研究开发了一种基于普鲁士蓝纳米立方体(PB NCs)类过氧化物酶活性检测还原型谷胱甘肽(GSH)的方法. PB NCs 具有类过氧化物酶活性,可催化过氧化氢氧化3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)生成氧化态的TMB(oxTMB),在652 nm处有较强的紫外-可见吸收峰;GSH既可以与PB NCs表面 $Fe^{3+}$ 结合,又可还原oxTMB,这双重作用抑制了TMB的氧化过程,引起体系紫外-可见吸收峰强度降低.基于体系紫外-可见吸收峰强度随GSH浓度的变化关系,我们得到GSH检测线性范围为0.01-5.0  $\mu\text{mol/L}$ .该方法具有较高的灵敏度和较好的选择性,不仅为GSH的检测提供了一种新的思路,还拓展了PB NCs在生物分析检测中的应用.

**关键词** 类过氧化物酶;紫外-可见吸收光谱;普鲁士蓝;谷胱甘肽

**中图分类号** Q554

**文献标识码** A

## 0 引言

还原型谷胱甘肽(GSH)是一种由谷氨酸、半胱氨酸及甘氨酸组成的三肽抗氧化剂,广泛存在于生物体内中并参与许多代谢过程<sup>[1]</sup>.它的含量异常与许多疾病相关,如心脏病、癌症、肝病等<sup>[2]</sup>.因此,发展高灵敏度的方法用于GSH的检测具有重要的现实意义.目前,GSH的检测方法主要包括高效液相色谱法<sup>[3]</sup>、毛细血管电泳法<sup>[4]</sup>、荧光光谱法<sup>[5]</sup>、电化学法<sup>[6]</sup>等.尽管这些方法表现出较高的灵敏度,但其操作复杂、仪器价格昂贵等缺点限制了它们的应用.与其他检测方法相比,紫外-可见吸收光谱法具有操作简单、仪器设备价格低廉及适用范围广等优点被广泛应用于GSH的检测<sup>[7]</sup>.

天然酶作为生物催化剂具有显著的优点,在温和的条件下具有高效和专一的催化性能;但因天然酶的稳定性和价格昂贵及储存条件苛刻等缺点,限制了其实际应用<sup>[8]</sup>.自2007年 $Fe_3O_4$ 纳米粒子被证明具有类过氧化物酶活性<sup>[9]</sup>,类过氧化物酶纳米酶的制备引起人们广泛关注.近年来,许多纳米材料,如碳纳米材料<sup>[10]</sup>、金属纳米簇<sup>[11]</sup>、贵金属纳米粒子<sup>[12]</sup>、金属氧化物纳米粒子<sup>[13]</sup>、 $MoS_2$ 纳米片<sup>[14]</sup>、 $WS_2$ 纳米片<sup>[15]</sup>等被报道具有类过氧化物酶活性.与天然酶相比,纳米酶具有制备简单、稳定性高和成本低等优势,被广泛应用于生物分析检测中.由于PB NCs含有 $Fe^{3+}/Fe^{2+}$ 氧化还原电对,研究人员已证明PB NCs具有类过氧化物酶活性<sup>[16,17]</sup>.PB NCs的类过氧化物酶活性可通过催化过氧化氢( $H_2O_2$ )对3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)氧化效果进行评价.PB NCs催化 $H_2O_2$ 氧化TMB生成氧化态的TMB(oxTMB),在652 nm处有较强的紫外-可见吸收峰;GSH可抑制TMB氧化,导致紫外-可见吸收峰强度降低.通过紫外-可见吸收峰强度的变化值与GSH浓度之间的关系可实现GSH的检测.

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

UV-8000 紫外可见分光光度计(上海元析仪器有限公司).太平玛超纯水机(济南太平玛环保设备有限公司).溶液pH值由多参数测试仪(上海梅特勒-托利多仪器有限公司)测定.TG16-WS台式高速离心机(湖

收稿日期:2018-11-06

基金项目:国家自然科学基金项目(21705056);山东省自然科学基金项目(ZR2018BB057,ZR2018PB009,ZR2017MB022)资助

通讯作者:姜媛媛,女,汉,博士,讲师,研究方向:光谱分析检测、电催化,E-mail:mse\_jiangyy@ujn.edu.cn.

南湘仪实验室仪器开发有限公司). X 射线衍射仪(德国布鲁克 AXS 公司). 扫描电子显微镜(美国 FEI 公司).

聚乙烯吡咯烷酮(PVP, K30, MW~40000)、铁氰化钾( $K_3[Fe(CN)_6]$ )及浓盐酸均购自国药集团化学试剂有限公司;过氧化氢( $H_2O_2$ , 30%)购自上海沃凯生物试剂有限公司;3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)购自阿拉丁试剂有限公司;还原型谷胱甘肽(GSH)购自美国 Sigma 公司. 所用试剂均为分析纯,无需进一步纯化,直接使用.

### 1.2 PB NCs 的合成

PB NCs 制备参考之前文献报道的方法<sup>[18]</sup>. 详细步骤如下,在磁力搅拌下,将 PVP(6.00 g)和  $K_3[Fe(CN)_6]$ (264 mg)加入到 0.1 mol/L 盐酸水溶液(80.0 mL)中. 室温搅拌 30 min 后,将混合溶液置于烘箱中 80 °C 下反应 20 h. 通过离心收集获得的蓝色产物,用超纯水和乙醇洗涤数次,并在室温下彻底干燥.

### 1.3 GSH 检测

将 10  $\mu$ L 不同浓度的 GSH,10  $\mu$ L,0.04 mg/mL PBNCs,100  $\mu$ L 5 mmol/L TMB 和 10  $\mu$ L 2.5 mol/L  $H_2O_2$  依次加入到含有 870  $\mu$ L 醋酸缓冲溶液的离心管中. 充分混合后置于 37 °C 水浴箱中孵育 5 min 后进行紫外-可见吸收光谱测定.

## 2 结果与讨论

### 2.1 PB NCs 形貌及组成表征

图 1(a)和(b)显示了 PB NCs 在不同的放大倍数下拍摄的扫描电子显微镜图像,可清楚地观察到 PB NCs 是立方形且高度均匀分散,粒径为 136 nm 左右. 通过 X 射线衍射图谱和红外光谱表征所制备的 PBNCs 的化学组成. 图 1(c)显示了 PBNCs 的衍射峰位于  $2\theta=17.6^\circ, 24.8^\circ, 35.3^\circ, 39.6^\circ, 43.6^\circ, 50.7^\circ, 54.1^\circ, 57.2^\circ, 66.1^\circ$  和  $69.1^\circ$ , 根据标准卡片 JCPDS No. 73-0687 可以归属为面心立方  $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$  的(200), (220), (400), (420), (422), (440), (600), (620), (640)和(642). PBNC 的组成进一步由红外光谱证实,如图 1(d). 可以看出在  $2077\text{ cm}^{-1}$  处有一个尖峰,这归因于  $Fe^{2+}-CN-Fe^{3+}$  中  $C\equiv N$  基团的伸缩模式;此外,在  $501\text{ cm}^{-1}$  处观察到的一个较明显的峰,表明形成了  $M-CN-M'$  (M 代表金属)结构<sup>[16]</sup>. 上述表征结果说明了我们成功的制备了 PB NCs.

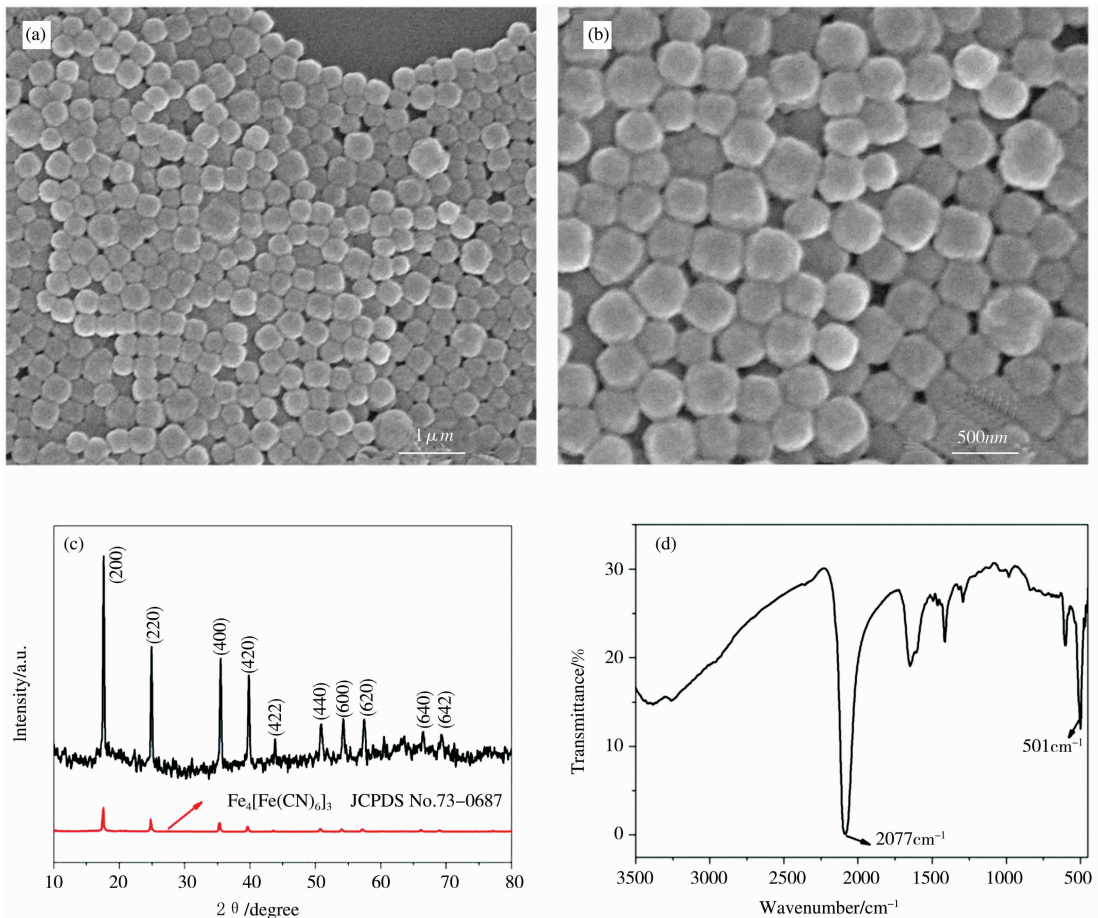


图 1 PB NCs 的低放大倍数(a)和高放大倍数(b)的扫描电子显微镜图像;PB NCs 的 X 射线衍射图谱(c)和红外图谱(d)

## 2.2 检测机理

利用普鲁士蓝纳米立方体类过氧化物酶活性检测 GSH 的机理如图 2 所示. PB NCs 可催化  $H_2O_2$  氧化 TMB 生成氧化态的 oxTMB, 在 652 nm 处有较强紫外-可见吸收峰; 加入 GSH 之后, 由于其可以与 PB NCs 表面的  $Fe^{3+}$  作用<sup>[19]</sup>, 同时其可还原 oxTMB<sup>[20-22]</sup>, 这双重作用抑制了 TMB 的氧化, 从而使 652 nm 处的紫外-可见吸收峰强度降低. 基于紫外-可见吸收峰强度随 GSH 加入浓度的变化关系, 可实现 GSH 的检测.

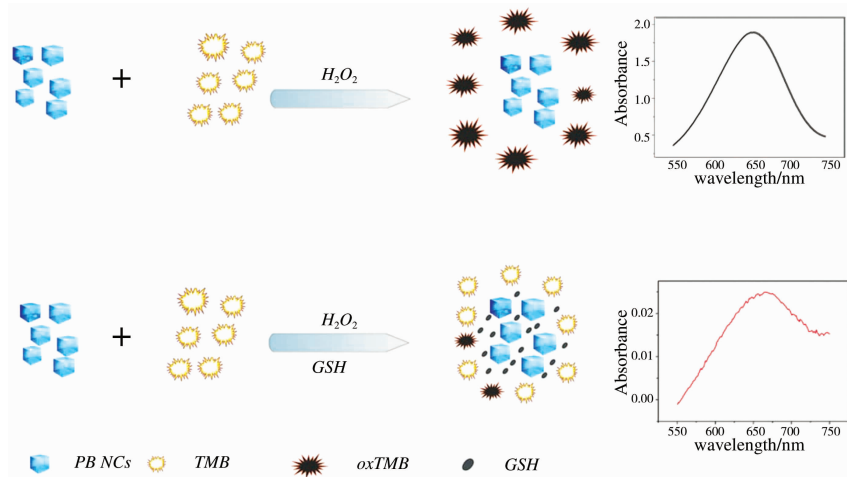


图 2 基于 PB NCs 类过氧化物酶活性检测 GSH 的原理示意图

## 2.3 检测条件优化

我们首先对可能影响该方法检测灵敏度的几个因素(反应温度、PB NCs 和  $H_2O_2$  的浓度)进行了优化, 以  $\Delta A$  值( $\Delta A = A_0 - A$ )作为优化条件的标准, 其中  $A_0$  和  $A$  分别代表 GSH 加入前、后体系在 652 nm 处的紫外-可见吸收峰强度.

2.3.1 反应温度的优化. 由于不同的孵育温度对检测结果的影响较大, 考察了温度为 22 °C, 27 °C, 32 °C, 37 °C, 42 °C, 47 °C 的影响. 如图 3 所示, 温度为 37 °C 时,  $A_0$  最大,  $A$  最小,  $\Delta A$  最大. 因此我们选取 37 °C 为该最佳孵育温度.

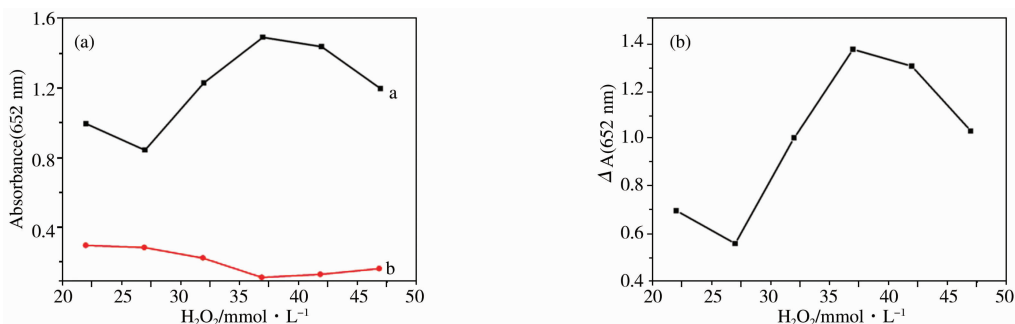


图 3 (a)不同孵育温度对体系紫外-可见吸收峰强度的影响;(b)不同孵育温度对  $\Delta A$  值的影响.

2.3.2 PB NCs 浓度的优化. 接着, 我们考察 PB NCs 浓度对检测方法灵敏度的影响. PB NC 的浓度太低或者太高都不利于提高检测方法的灵敏度. 从图 4 中可以得到, 当其浓度为 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,  $\Delta A$  值达到最大, 如图 4(b). 因此, 我们选取 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 PB NCs 为最佳检测条件.

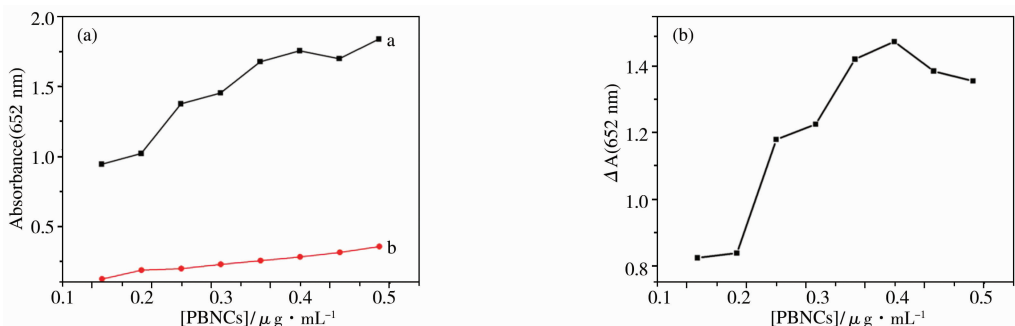


图 4 (a)不同浓度的 PB NCs 对体系紫外-可见吸收峰强度的影响;(b)不同浓度的 PB NCs 对  $\Delta A$  值的影响

2.3.3  $H_2O_2$  浓度的优化. 不同浓度的  $H_2O_2$  对检测效果也有很大的影响. 如图 5(a)所示,  $A_0$  值随  $H_2O_2$  浓度

升高而逐渐增大,当其浓度高于 20.0 mmol/L 时,  $A_0$  值基本保持不变;在  $H_2O_2$  浓度范围为 5.0-20.0 mM 时,  $A$  值随  $H_2O_2$  浓度升高而逐渐增大,在浓度范围为 20.0-25.0 mmol/L 时,  $A$  值逐渐减小,当浓度高于 25 mmol/L 时,  $A$  值逐渐增大. 结果表明  $H_2O_2$  最佳浓度为 25.0 mmol/L, 如图 5(b).

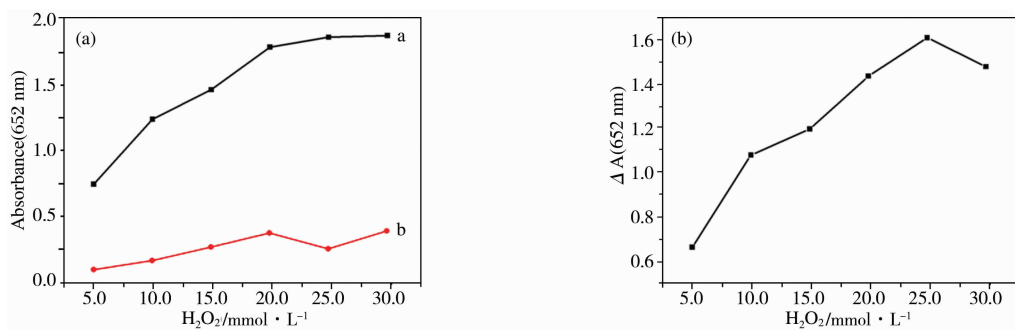


图 5 (a)不同浓度的  $H_2O_2$  对体系紫外-可见吸收峰强度的影响;(b)不同浓度的  $H_2O_2$  对  $\Delta A$  值的影响

## 2.4 检测方法的线性分析

在最佳检测条件下,我们实现了对 GSH 的定量检测. 如图 6(a)所示,随着 GSH 加入浓度的升高,体系在 652 nm 处的紫外-可见吸收峰强度逐渐减小.  $\Delta A$  值随 GSH 浓度升高而逐渐增大,当 GSH 的浓度高于 10.0  $\mu\text{mol/L}$  时,  $\Delta A$  值基本保持不变;在 GSH 的浓度为 0.01-5.0  $\mu\text{mol/L}$  时,  $\Delta A$  值与 GSH 浓度之间表现出良好线性关系,如图 6(b).

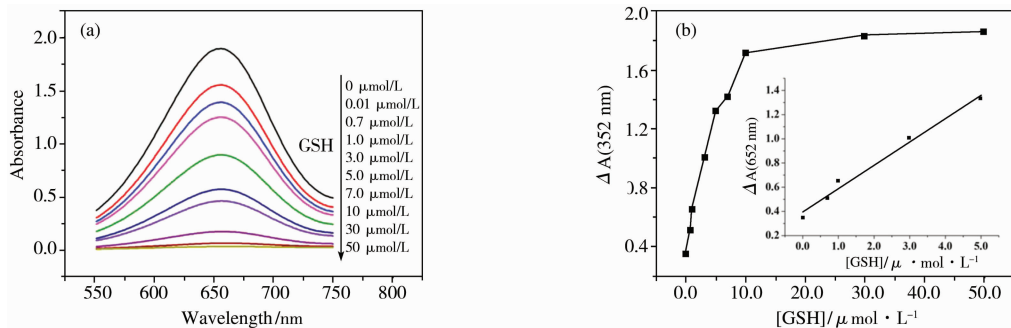


图 6 (a)加入不同浓度的 GSH 对体系紫外-可见吸收峰强度的影响;(b)不同浓度的 GSH 对  $\Delta A$  值的影响

## 2.5 选择性测试

为了考察该测定方法的选择性,我们选取了 17 种  $\alpha$ -氨基酸,加入与 GSH 的浓度及检测条件相同情况下进行了实验,结果如图 7 所示. 其它氨基酸加入后,体系紫外-可见吸收峰强度较空白溶液均没有明显变化,而 GSH 加入后体系紫外-可见吸收峰强度明显降低,说明该方法对 GSH 检测具有较好的选择性.

## 3 结论

我们提出了一种基于 PB NCs 类过氧化物酶活性检测 GSH 的方法. 与其他现有的方法相比,这种基于 PB NCs- $H_2O_2$ -TMB 体系测定 GSH 的方法更为简单、灵敏度高、选择性好,拓展了具有类过氧化物酶活性纳米材料在生物分析检测中的应用.

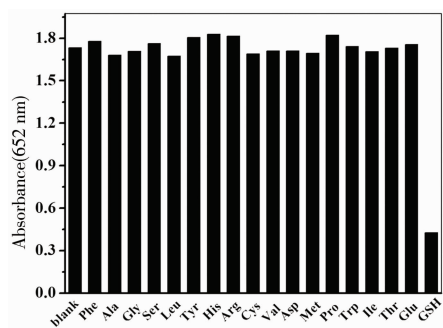


图 7 选择性测试

## 参 考 文 献

- [1] Gao Y, Wu K L, Li H Y, et al. Glutathione detection based on peroxidase-like activity of  $Co_3O_4$ -Montmorillonite nanocomposites Sens [J]. Actuators B, 2018, 273: 1635-1639.
- [2] Qi S J, Liu W M, Zhang P P, et al. A colorimetric and ratiometric fluorescent probe for highly selective detection of glutathione in the mitochondria of living cells[J]. Sens Actuators B, 2018, 270: 459-465.
- [3] McDermott G P, Francis P S, Holt K J, et al. Determination of intracellular glutathione and glutathione disulfide using high performance liquid chromatography with acidic potassium permanganate chemiluminescence detection[J]. Analyst, 2011, 136 (12): 2578-2585.
- [4] Tsardaka E C, Zacharis C K, Tzanavaras P D, et al. Determination of glutathione in baker's yeast by capillary electrophoresis using methyl propiolate as derivatizing reagent[J]. J Chromatogr A, 2013, 1300: 204-208.
- [5] Gong D Y, Han S C, Iqbal A, et al. Fast and selective two-stage ratiometric fluorescent probes for imaging of glutathione in living cells

- [J]. *Anal Chem*, 2017, 89 (24): 13112-13119.
- [6] Yuan B Q, Xu C Y, Zhang R C, et al. Glassy carbon electrode modified with 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane and graphene oxide triggered a synergistic effect: Low-potential amperometric detection of reduced glutathione[J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 96:1-7.
- [7] Xianyu Y L, Xie Y Z Y, Wang N X, et al. A dispersion-dominated chromogenic strategy for colorimetric sensing of glutathione at the nanomolar level using gold nanoparticles[J]. *Small*, 2015, 11 (41): 5510-5514.
- [8] Wang Q Q, Wei H, Zhang Z Q, et al. Nanozyme: An emerging alternative to natural enzyme for biosensing and immunoassay[J]. *TrAC-Trends Anal Chem*, 2018, 105: 218-224.
- [9] Gao L Z, Zhuang J, Nie L, et al. Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles[J]. *Nat Nanotechnol*, 2007, 2: 577-583.
- [10] Wang G L, Xu X F, Wu X M, et al. Visible-light-stimulated enzymelike activity of graphene oxide and its application for facile glucose sensing[J]. *J Phys Chem C*, 2014, 118: 28109-28117.
- [11] Hu L Z, Yuan Y L, Zhang L, et al. Copper nanoclusters as peroxidase mimetics and their applications to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and glucose detection[J]. *Anal Chim Acta*, 2013, 762: 83-86.
- [12] Tan L L, Zhang Y M, Qiang H, et al. A sensitive Hg(II) colorimetric sensor based on synergistic catalytic effect of gold nanoparticles and Hg[J]. *Sens Actuators B: Chem*, 2016, 229: 686-691.
- [13] Zhang L L, Han L, Hu P, et al. TiO<sub>2</sub> nanotube arrays: Intrinsic peroxidase mimetics[J]. *Chem Commun*, 2013, 49: 10480-10482.
- [14] Lin T R, Zhong L S, Guo L Q, et al. Seeing diabetes: visual detection of glucose based on the intrinsic peroxidase-like activity of MoS<sub>2</sub> nanosheets[J]. *Nanoscale*, 2014, 6: 11856-11862.
- [15] Lin T R, Zhong L S, Song Z P, et al. Visual detection of blood glucose based on peroxidase-like activity of WS<sub>2</sub> nanosheets[J]. *Biosens Bioelectron*, 2014, 62: 302-307.
- [16] Ni P J, Sun Y J, Dai H C, et al. Prussian blue nanocubes peroxidase mimetic-based colorimetric assay for screening acetylcholinesterase activity and its inhibitor[J]. *Sens Actuators B*, 2017, 240: 1314-1320.
- [17] Zhang W M, Ma D, Du J X. Prussian blue nanoparticles as peroxidase mimetics for sensitive colorimetric detection of hydrogen peroxide and glucose[J]. *Talanta*, 2014, 120: 362-367.
- [18] Hu M, Belik A A, Imura M, et al. Tailored design of multiplenanoarchitectures in metal-cyanide hybrid coordination polymers[J]. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 384-391.
- [19] Li P-H, Lin J-Y, Chen C-T, et al. Using Gold Nanoclusters As Selective Luminescent Probes for Phosphate-Containing Metabolites[J]. *Anal Chem*, 2012, 84 (13): 5484-5488.
- [20] Sun Y H, Wang J, Li W, et al. DNA-stabilized bimetallic nanozyme and its application on colorimetric assay of biothiols[J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 74: 1038-1046.
- [21] Xiong Y H, Chen S H, Ye F G, et al. Synthesis of a mixed valence state Ce-MOF as an oxidase mimetic for the colorimetric detection of biothiols[J]. *Chem Commun*, 2015, 51 (22): 4635-4638.
- [22] Feng J Y, Huang P C, Shi S Z, et al. Colorimetric detection of glutathione in cells based on peroxidase-like activity of gold nanoclusters: A promising powerful tool for identifying cancer cells[J]. *Anal Chim Acta*, 2017, 967: 64-69.

## Prussian Blue Nanocubes (PB NCs) Peroxidase Mimetic-based Method for Glutathione Detection

WANG Jia-wei NI Peng-juan CHEN Chuan-xia ZHANG Hua-xing

LI Chang-long LIU Wen-dong JIANG Yuan-yuan

(School of Materials Science and Engineering, University of Jinan, Jinan 250022, China)

**Abstract** In this paper, a novel method for glutathione detection is developed based on the peroxidase-like activity of Prussian blue nanocube (PB NCs). PB NCs catalyzes the oxidation of TMB by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to obtain the oxidized TMB (oxTMB) with a maximum absorption at 652 nm. The introduction of glutathione can cheat with Fe<sup>3+</sup> on the surface of PB NCs and cause the reduction of oxTMB, both of which inhibit the oxidation of TMB, resulting in the decrease of the absorbance at 652 nm. Based on the relationship between the changes of absorbance and the concentration of glutathione, a linear relationship in the glutathione range from 0.01 to 5.0 μmol/L is obtained. This method shows high sensitivity and good selectivity, which may not only provide a new idea for glutathione detection, but also expand the application of PB NCs in bioanalytical detection.

**Key words** peroxidase-like activity; UV-visible absorption spectra; Prussian blue; Glutathione