

衍生化法测定山药中还原型谷胱甘肽(GSH)和总巯基(-SH)含量

金京实, 沈丽, 崔胜云*

(延边大学长白山生物资源与功能分子教育部重点实验室, 延吉 133002)

摘要: **目的** 用衍生化法测定山药中还原型谷胱甘肽(GSH)和总巯基(-SH)的含量。**方法** 利用 4,4'-二硫代联吡啶(4-DPS)和邻苯二甲醛(OPA)为衍生化试剂,采用细胞破壁和衍生化为一体的样品前处理方法,分别用 UV-vis 分光光度法和荧光光谱法测定了山药鲜品中总巯基(-SH)、GSH 的含量。**结果** 山药中含较丰富的总巯基和 GSH, 含量分别达 0.4556 $\mu\text{mol/g}$ 和 0.1792 $\mu\text{mol/g}$ 。UV-vis 分光光度法和荧光光谱法测定方法的检测限分别为 1.0458 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.5666 $\mu\text{mol/L}$, 回收率分别为 98.73%和 98.40%。**结论** 本研究对山药中巯基化合物的含量、测定方法学和样品前处理方法提供了重要的基础数据和参考依据。

关键词: 山药; 还原型谷胱甘肽; 4,4'-二硫代联吡啶; 邻苯二甲醛; 衍生化

Determination of reduced glutathione (GSH) and total thiols (-SH) in Rhizoma Dioscoreae by derivatization methods

JIN Jing-Shi, SHEN Li, CUI Sheng-Yun*

(Key Laboratory of Natural Resources & Functional Molecules of Changbai Mountain, Ministry of Education, Yanbian University, Yanji 133002, China)

ABSTRACT: Objective To detect reduced glutathione (GSH) and total thiols (-SH) in Rhizoma Dioscoreae by derivatization methods. **Methods** Total thiols and reduced glutathione in Rhizoma Dioscoreae were determined by UV-vis spectrophotometry and fluorophotometry using 4,4'-dithiodipyridine (4-DPS) and *o*-phthaldehyde (OPA) as derivatization agents. Samples were prepared by simultaneous derivatization during cell rupture. **Results** 0.4556 $\mu\text{mol/g}$ of total thiols and 0.1792 $\mu\text{mol/g}$ of GSH were detected in the sample. The detection limits for UV-vis spectrophotometry and fluorophotometry were 1.0458 $\mu\text{mol/L}$ and 0.5666 $\mu\text{mol/L}$, and recoveries were 98.73% and 98.40%, respectively. **Conclusion** This study provides useful data and references for the content of thiol compounds in Rhizoma Dioscore determination methodology and pre-treatment methods for plant sample analysis.

KEY WORDS: Rhizoma Dioscore; reduced glutathione; 4,4'-dithiodipyridine; *o*-phthaldehyde; derivatization

基金项目: 国家自然科学基金项目(21165021)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China(21165021)

*通讯作者: 崔胜云, 博士, 教授, 主要研究方向为有机生物分析。E-mail: huaxuexi@ybu.edu.cn

*Corresponding author: CUI Sheng-Yun, Professor, Ph.D, Chemistry Department of Science College of Yanbian University, No.977, Gongyuan Road, Yanji 133002, China. E-mail: huaxuexi@ybu.edu.cn.

1 引言

山药(*Rhizoma Dioscoreae*)属多年生缠绕草本植物的根茎,既是中药,又是一种常见蔬菜^[1,2]。据报道,山药提取液中的活性成分具有保肝、抗炎、抗衰老、抗疲劳、抗癌等作用^[3-7]。目前山药中测定的活性成分主要有山药多糖,山药碱、氨基酸等^[8,9],但对含巯基生物活性物质,像还原型谷胱甘肽(GSH)等含量测定还未见报道。

植物中巯基化合物主要是半胱氨酸(CySH)和半胱氨酸残基为组成成分的肽类和蛋白质,具有代表性的像还原型谷胱甘肽(GSH)、植物螯合素(PCs)和金属硫蛋白(MT)等。这种含巯基化合物在人体内具有抗衰老、提高机体免疫、促氨基酸吸收、重金属解毒、抗癌、参与细胞信号转导等多重生理功能,是机体必不可少的重要活性物质^[10-12]。因此,通过分析筛选富含巯基化合物的药食同源植物,对合理膳食和防病、治病都有实际意义。

GSH 等巯基化合物的测定,目前应用较多的是利用衍生化试剂的光谱测定方法。其中常用的衍生化试剂为 5,5'-二硫双-2-硝基苯甲酸(DTNB)和邻苯二甲醛(OPA)^[13-16]。由于前者与巯基发生衍生化作用后定量释放出 4-硝基苯硫酚化合物有色离子(TNBA),而后者只与 GSH 发生衍生化作用生成三环荧光衍生化产物。因此,通过 UV-vis 分光光度法和荧光光谱法测定定量生成的有色产物和荧光衍生化产物可间接测定总巯基(-SH)含量和 GSH 的含量。然而,DTNB 衍生化法中,有色产物 TNBA 的吸收灵敏度较低,又由于样品前处理过程中巯基氧化变性降低衍生化效率,这给低含量总巯基含量测定带来困难甚至漏检。

为了改进上述不足,本研究选用了具有较高光谱灵敏度的 4-DPS 和 OPA 作为衍生化试剂,采用细胞破壁、衍生化为一体的同步衍生化提取方法来提高衍生化效率并提高测定灵敏度,再通过 UV-vis 分光光度法和荧光光谱法分别测定定量释放出的 4-硫代吡啶酮(4-TP)有色衍生化产物和三环荧光衍生化产物的方法,测定了山药中的总巯基含量和 GSH 的含量,以期对山药中巯基化合物的含量及分析方法学及前处理方法提供重要的参考依据。

2 材料与方方法

2.1 仪器与设备

UV-2500PC 紫外分光光度仪(日本岛津公司); RF-5301PC 荧光分光光度仪(日本岛津公司); SCIENTZ-IIID 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司); KQ-500DE 数控超声波清洗器; pHs-3C 型实验室酸度计。还原型谷胱甘肽(国药试剂 99.0%), 4,4'-二硫代联吡啶(Alfa Aesar 98.0%), 邻苯二甲醛(国药试剂), 半胱氨酸(AppliChem 公司), 其它试剂均为分析纯,实验用水为三次蒸馏水。

2.2 样品前处理和供试品的制备

将市售山药鲜品(郑州源鼎商贸有限公司)用蒸馏水淋洗、低温烘干去掉表面水分,再用粉碎机粉碎。取 2 g 样品加入含有一定浓度过量衍生化试剂(4-DPS= 3×10^{-5} mol/L, OPA= 1×10^{-3} mol/L)的 0.20 mol/L PBs (pH=8) 缓冲液,用超声细胞粉碎机破壁 5 min, 超声 30 min, 离心取上清液。取 10 mL 上清液,加入 2 倍体积的乙醇、放置 30 min, 然后在 8000 r/min 转速下离心 5 min 除蛋白,取离心后上清液作为供试品溶液。

2.3 分析方法

2.3.1 总巯基(-SH)的测定

总巯基(-SH)含量测定采用 4-DPS 衍生化法。该衍生化试剂在 PBs 缓冲溶液中与巯基化合物反应生成二硫键交换产物并定量释放出有色产物 4-硫代吡啶酮(4-TP)^[17,18](见下图 1)。4-TP 在~323 nm 处有灵敏的吸收峰。由于 4-DPS 与巯基化合物衍生化反应无选择性(包括含巯基蛋白质, Protein-SH), 释放出的 4-TP 的量能间接反映总巯基的含量。因此,利用 UV-vis 分光光度法间接测定总巯基含量。

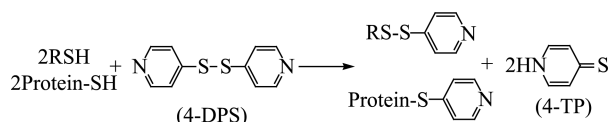


图 1 巯基化合物与 4-DPS 衍生化反应。

Fig. 1 Derivatization reactions between thiol compounds and 4-DPS

2.3.2 GSH 的测定

GSH 的定量分析是基于衍生化试剂 OPA 在 PBs 缓冲溶液中与 GSH 反应衍生化作用定量生成三环荧光衍生化产物^[19,20](见下图 2)。该衍生化产物在激发波长 $\lambda_{em}=350$ nm 时, 在 $\lambda_{em}=431$ nm 处发射灵敏的荧光发射峰, 借此利用荧光光度法测定 GSH 的含量。

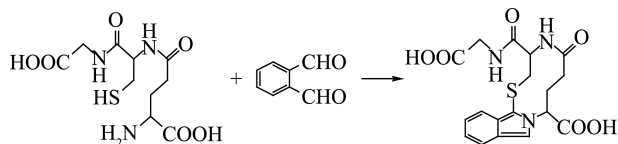


图 2 GSH 与 OPA 的衍生化反应

Fig. 2 Derivatization reaction between GSH and OPA

3 结果与讨论

3.1 4-DPS 和 OPA 与巯基化合物衍生化产物的光谱测定

为了探讨本实验条件下衍生化产物的光谱特性, 分别用 CySH 和 GSH 标准品测定了与 4-DPS 和 OPA 衍生化作用产物的吸收光谱和荧光光谱, 结果见下图 3。

如图 3A 所示, 4-DPS 在 $\lambda_{max}=246$ nm 出现芳香环的吸收峰, 而在波长 300 nm 以上只有微弱的末端吸收。当溶液中含有等浓度的 GSH 和 CySH 时, 分别在 $\lambda_{max}=323$ nm 处出现强度几近相同的灵敏的衍生化

产物 4-T-P 的吸收峰, 而在等浓度的 GSH 和 CySH 混合溶液中, 吸光度具有明显的加合性, 说明 GSH 和 CySH 与 4-DPS 的衍生化反应无选择性。由于 4-DPS 衍生化试剂本身在 4-TP 最大吸收波长范围内有微弱的末端吸收, 因此定量测定时必须扣除试剂空白。图 3B 结果显示, OPA、OPA 和 CySH 混合溶液在激发波长为 350 nm 时无明显的荧光发射强度, 而 OPA 和 GSH 的混合溶液, 由于生成三环荧光衍生化产物, 在 $\lambda_{em}=431$ nm 出现灵敏的荧光发射峰。

3.2 样品前处理对测定的影响

为了探讨衍生化之前的细胞破壁、去蛋白等分离操作导致的巯基氧化变性对衍生化反应的影响, 分别平行对样品采用如图 4 所示的前处理方法, 得到三种供试品。

如图 4 所示, 样品前处理包括植物组织细胞超声破壁提取、衍生化、除蛋白三个步骤。前处理方法 1 (Procedure1)中, 采用含衍生化试剂的 PBs 缓冲液进行超声破壁、衍生化为一体的同步衍生化处理。前处理方法 2 (Procedure2) 采用 PBs 缓冲液超声破壁提取, 然后分别衍生化和去蛋白。前处理方法 3 (Procedure3) 采用 PBs 缓冲液超声破壁提取、除蛋白, 最后行衍生化。图 5 是分别为三种前处理方法得到的山药供试品的 UV-vis 吸收光谱图和荧光光谱图。

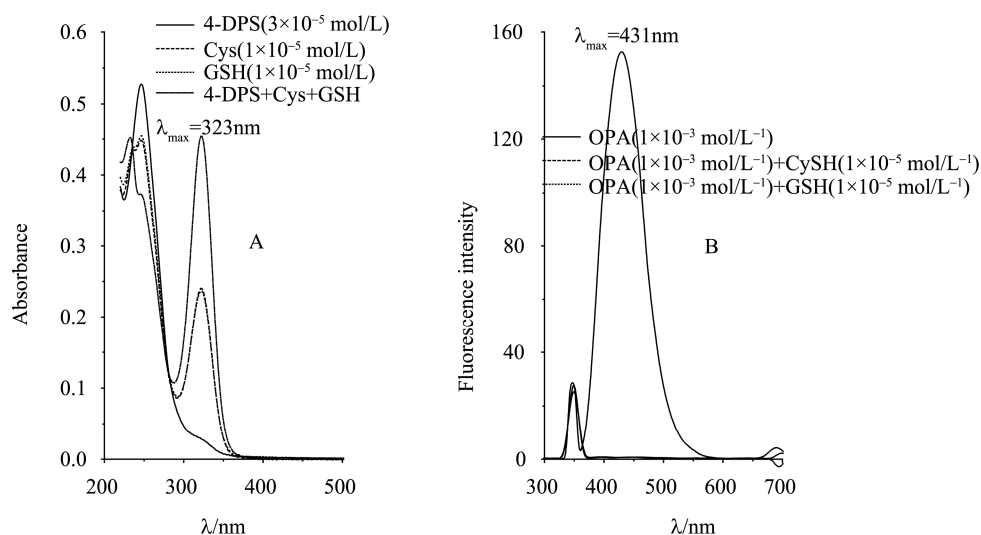


图 3 4-DPS 与 GSH, CySH 混合溶液的 UV-vis 吸收光谱图(A)和 OPA 和 GSH 混合溶液的荧光光谱图(B)

注: 溶液分别用 PBs 缓冲溶液配制。

Fig. 3 UV-vis spectra obtained from mixture solutions of GSH+CySH+4-DPS (A) and fluorescent spectra for the mixture solutions of GSH+OPA (B)

Note: All solutions were prepared with PBs buffer.

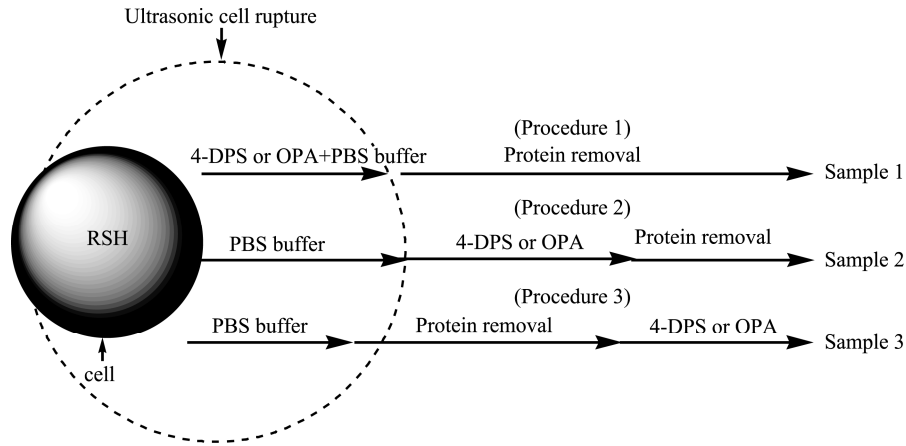


图 4 不同样品前处理模式图

Fig. 4 Pretreatment procedures for different samples

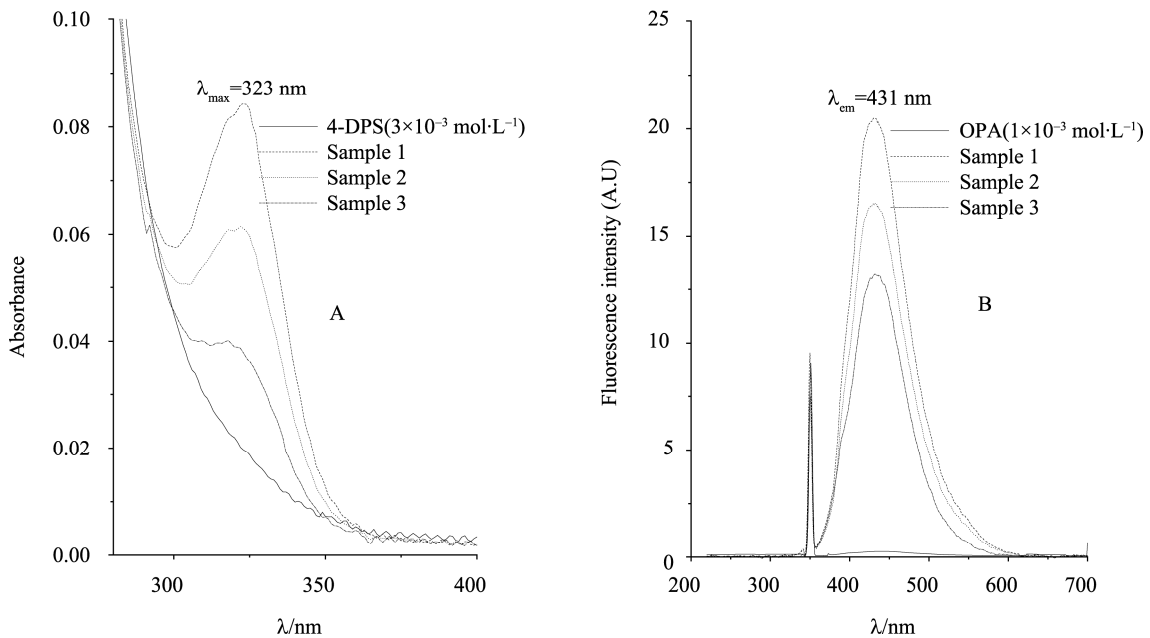


图 5 不同前处理方法得到的山药供试品的 UV-vis 吸收光谱图(A)和荧光发射光谱图(B)

Fig. 5 UV-vis spectra (A) and fluorescent spectra (B) of Rhizoma Dioscoreae samples obtained by different pretreatments

图 5 结果表明; 前处理方法 1 得到的供试品, 分别在 $\lambda_{\max}=323$ nm 处和 $\lambda_{\text{em}}=430$ nm 处具有最强的吸收强度和荧光发射强度, 前处理方法 2 和前处理方法 3 得到的供试品对应的光谱强度依次降低。这一结果说明; 山药中 GSH 等巯基化合物, 当组织细胞破壁之后发生明显的巯基的氧化变性并阻止有效的衍生化, 从而导致分析信号信噪比大大降低。而细胞破壁和衍生化为一体的前处理方法 1 得到的样品提取液, 因细胞破壁瞬间生成衍生化产物, 从而阻

止巯基在前处理过程中的氧化变性并得到了相对灵敏的分析信号。

3.3 山药提取液中总巯基和 GSH 含量

3.3.1 校正曲线的绘制

校正曲线是用测得的数据得线性回归曲线来绘出。取样品提取液和标准系列 GSH 溶液三份, 用光谱仪重复测定三次、取最大波长处的光谱强度均值, 然后以标准系列 GSH 浓度为自变量, 最大波长处的

光谱强度为因变量,求直线方程并制作回归曲线。 $\lambda_{\max}=323\text{ nm}$ 处的吸收光谱与加入的 GSH 浓度呈良好的线性关系,其线性回归方程为 $Y=0.3347+0.02199X$, 相关系数 $r=0.9999$, $\lambda_{\text{em}}=431\text{ nm}$ 处的荧光强度与加入的 GSH 的浓度也呈良好的线性关系,其线性回归方程为 $Y=21.0455+7.05716X$, 相关系数 $r=0.9998$ 。

3.3.2 山药中总巯基和 GSH 含量、回收率和检测限
样品中总巯基和 GSH 含量用加入法测定。回收率测定步骤如下: 分别取 1 mL 山药提取液于 10 mL 比色管中, 加入不同浓度的 GSH 标准系列溶液, 然后

依次用 PBS 缓冲液定容至 10 mL、测定其强度、计算回收率。检测线的测定是分别对空白溶液(PBS 缓冲液样品提取液)平行测定 6 次, 其荧光值($\bar{x}\pm s$)为 3.204 ± 0.6378 (吸收值为 0.02442 ± 0.000042)。据 $YE=\mu+k\sigma$ (YE 指可被检测出的最小分析信号值, μ 指空白的平均信号值, k 是与置信度有关的整数, 这里取 $k=3$), 则 $YE=3.204+3\times 0.6378=5.1174$ ($YE=0.02442+3\times 0.000042=0.02454$), 将其代入回归曲线方程得荧光光谱测定和紫外光谱测定方法的检测线^[20]。样品中总巯基、GSH 含量, 回收率和检测限测定结果, 见下表 1。

表 1 样品测定值、回收率和检测限
Table 1 Determination results, recoveries and detection limits

方法	含量 ($\mu\text{mol/g}$)				样品 (mL)	加入量 ($\mu\text{mol/L}$)	回收量 ($\mu\text{mol/L}$)	回收率均值 (%)	检测限 ($\mu\text{mol/L}$)
	平行 1	平行 2	平行 3	均值					
UV-Vis (-SH)						2.00	2.0407		
		0.4391	0.4734	0.4542	0.4556	4.00	3.9608	98.73	1.0458
						6.00	5.9906		
荧光 (GSH)						0.30	0.3018		
		0.1773	0.1801	0.1802	0.1792	0.60	0.5854	98.40	0.5666
						0.90	0.8523		

4 结 论

山药鲜品中含有较通常蔬菜类丰富的巯基化合物和谷胱甘肽 (GSH)^[21], 其中总巯基含量为 $0.4556\ \mu\text{mol/g}$, GSH 含量为 $0.1792\ \mu\text{mol/g}$ 。说明山药具有的许多生物活性功能可能与其含丰富的巯基化合物有关。

衍生化之前的细胞破壁提取、去蛋白过程会导致样品巯基发生氧化变性导致衍生化效率降低, 从而导致测定灵敏度大大降低甚至漏检。采用细胞破壁、衍生化为一体的样品提取方法可大大提高测定灵敏度。

参考文献

- [1] 杭悦宇, 秦慧贞, 丁志遵. 山药新药源的调查和质量研究 [J]. 植物资源与环境学报, 1992, 1(2): 10-15.
Hang Y Y, Qin H Z, Ding Z Z. A Survey and quality research on the new resources of Shan Yao (*Rhizoma Dioscoreae*) [J]. J Plant Res Environ, 1992, 1(2): 10-15.

- [2] 王飞, 刘红彦, 鲁传涛, 等. 5 个山药品种资源的农艺性状和营养品质比较 [J]. 河南农业科学, 2005(3): 58-59.
Wang F, Liu H Y, Lu C T, et al. Comparison of the agronomical traits and nutrient quality among five Yam Germplasm [J]. J Henan Agr Sci, 2005, (3): 58-59.
- [3] 袁书林. 山药的化学成分和生物活性作用研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2008, (29)3: 176-179.
Yuan S L. Research advances on chemical compositions and bio-activities of *Dioscoreae Opposita* Thunb (Chinese Yam) [J]. Food Res Dev, 2008, 3(29): 176-179.
- [4] 相湘. 山药的抗衰老作用研究 [J]. 医药论坛杂志, 2007, 24: 109-110.
Xiang X. Research on Antiaging activities of *Rhizoma Dioscoreae* [J]. J Med Forum, 2007, 24: 109-110.
- [5] Kim M J, Kim H N, Kang K S, et al. Methanol extract of *Dioscoreae Rhizoma* inhibits pro-inflammatory cytokines and mediators in the synoviocytes of rheumatoid arthritis [J]. Int Immunopharmac, 2004, 4(12): 1489-1497.
- [6] 赵国华, 王贇, 李志孝, 等. 山药多糖的免疫调节作用 [J]. 营养学报, 2002, 24(2): 187-188.

- Zhao GH, Wang Y, Li ZX, *et al.* Regulation of immune function by polysaccharide(RDPS-1)from Chinese Yam [J]. *Acta Nutr Sin*, 2002, 24(2): 187-188.
- [7] 赵国华, 李志孝, 陈宗道. 山药多糖 RDPS-1 的结构分析及抗肿瘤活性 [J]. *药学报*, 2003, 38(1): 37-41 .
Zhao GH, Li ZX, Chen ZD. Structural analysis and antitumor activity of RDPS-1polysaccharide from Chinese yam [J]. *Acta Pharm Sin*, 2003, 38(1): 37-41.
- [8] 赵宏, 谢晓玲, 万金志, 等. 山药的化学成分及药理研究进展 [J]. *今日药学*, 2009, 19(3): 49-52.
Zhao H, Xie XL, Wan JZ, *et al.* Advances in studies of chemical constituents and pharmacological activities of chienes yam [J]. *Parm Today*, 2009, 19(3): 49-52.
- [9] 张丽梅, 陈菁英, 黄玉吉 等. 山药品种间氨基酸含量差异性研究[J]. *氨基酸与生物资源*, 2008, 30(2): 12-15.
Zhang LM, Chen JY, Huang YJ, *et al.* Research on the difference of amino acid contents among Chinese yam varieties [J]. *Amino Acids Biotic Res*, 2008, 30(20): 12-15.
- [10] Pastore A, Federici G, Bertini E, *et al.* Analysis of glutathione:implication in redox and detoxification [J]. *Clin Chim Acta*, 2003, 333: 19-39.
- [11] Ballatori N, Krance SM, Marchan R, *et al.* Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology [J]. *Mol Aspects Med*, 2009, 30: 13-28.
- [12] Deponete M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1830: 3217-3266.
- [13] 范崇东, 王森, 卫功元, 等. 谷胱甘肽测定方法研究进展[J]. *生物技术*, 2004, 14(1): 68-70.
Fan CD, Wang M, Wei GY, *et al.* Reserch advances on glutathione determination methods [J]. *Biotechnology*, 2004,14(1): 68-70.
- [14] Peter M, Gyula W, Eszter K, *et al.* Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: An in-depth review [J]. *J Chromatogr B*, 2009, 877: 3331-3346.
- [15] Chen W, Zhao Y, Seefeldt T, *et al.* Determination of thiols and disulfides via HPLC quantification of 5-thio-2-nitrobenzoic acid [J]. *J Pharm Biomed*, 2008, 48: 1375-1380.
- [16] 朱亚玲, 张小勇, 崔胜云. 利用衍生化试剂 DTNB 测定枸杞中谷胱甘肽[J]. *食品科学*, 2011, 32(6): 250-255.
Zhu YL, Zhang XY, Cui SY. Determination of GSH in Lycium barbarum L fruits by derivatizing agent [J]. *Food Sci*, 2011, 32(6): 250-255.
- [17] Hansen RE, Østergaard H, Norgarrd P, *et al.* Quantification of protein thiols and dithiols in the picomolar range using sodium borohydride and 4,4'-dithiodipyridine [J]. *Anal Biochem*, 2007, 363: 77-82.
- [18] Riener CK, Kada G, Gruber HJ. Quick measurement of prptein sulphydyls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2002, 373: 266-276.
- [19] 李铨军, 韩玲, 朱爱花, 等. 邻苯二甲醛荧光衍生化法测定食用海藻中还原型谷胱甘肽[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(22): 81-83.
Li XJ, Han L, Zhu AH. Determination of glutathione in edible marine algae using OPA fluorescence derivatizing method [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2012, 33(22): 81-83.
- [20] 王秋林, 王浩毅, 丁怡, 等. 血浆中游离还原型及氧化型谷胱甘肽的荧光测定法[J]. *光谱学与光谱分析*, 2005, 25(11): 1834-1838.
Wang QL, Wang HY, Ding Y, *et al.* A novel fluorophotometric method for assaying free glutathione of both reduced and oxidized in plasma [J]. *Spectrosc Spect Anal*, 2005, 25(11): 1834-1838.
- [21] 郑建仙. 功能性食品[M] 第一卷. 北京: 中国轻工业出版社, 1995.
Zheng JX. *Functionaal Food* [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1995.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



金京实, 硕士, 主要研究方向为光谱法测定植物活性成分。
E-mail: jingshi519@163.com



崔胜云, 博士, 教授, 主要研究方向为有机生物分析。
E-mail: huaxuexi@ybu.edu.cn