基于氧化型 3,3',5,5'-四甲基联苯胺纳米材料的 比色和光热双模式检测谷胱甘肽

葛园园,王珂萱,廉 康, 亓俊洁, 王 欣, 张鸿雁*, 杜淑媛* (山东师范大学生命科学学院, 济南 250014)

摘 要:目的 建立基于氧化型 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)的比色和光热双 模式谷胱甘肽(glutathione, GSH)检测方法,用于保健食品和果蔬中谷胱甘肽含量的快速检测。**方法** 利用普鲁 士蓝(Prussian blue, PB)的过氧化物酶活性催化 TMB 与过氧化氢反应生成蓝绿色且具有光热转化性能的氧化 型 TMB。而 GSH 能将氧化型 TMB 还原为无色的 TMB,使溶液吸光度值和光热转化产生的温升与 GSH 含量 呈线性相关,实现比色法和光热法双模式定量检测 GSH。结果 检测最优 pH 为 3.5,反应时间为 5 min, PB 质量浓度为 1 mg/mL, 1 mL 显色液中 30%过氧化氢体积为 2.5 μL, TMB 质量浓度为 15 mg/mL,光热照射时间 为 70 s,照射功率为 3.5 W,最优条件下比色法检出限为 14.8 μg/mL,光热法为 1.1 μg/mL,光热检测灵敏度较 比色法提高约 13 倍,实际样品加标回收率在 84%~119%之间。结论 该方法具有良好的重复性、特异性和准 确性,可用于保健食品、果蔬中 GSH 的快速检测。

关键词: 谷胱甘肽; 光热检测; 比色检测; 普鲁士蓝; 3,3',5,5'-四甲基联苯胺

Dual-mode detection of glutathione based on the color and photothermal effect of oxidized 3,3',5,5' -tetramethylbenzidine nanomaterial

GE Yuan-Yuan, WANG Ke-Xuan, LIAN Kang, QI Jun-Jie, WANG Xin, ZHANG Hong-Yan^{*}, DU Shu-Yuan^{*}

(College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China)

ABSTRACT: Objective To establish a colorimetric and photothermal dual-mode glutathione (GSH) detection method based on oxidized 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) for rapid detection of glutathione content in health food, fruits and vegetables.. **Methods** Prussian blue (PB) was used to catalyze the reaction of TMB and hydrogen peroxide by its peroxidase activity to generate blue-green oxidized TMB with photothermal conversion property. However, GSH could reduce the oxidized TMB to colorless TMB, so that the absorbance value of the solution and the temperature rise generated by photothermal conversion were linearly related to GSH content, thus realizing the

基金项目: 国家自然科学基金项目(31871874)、山东省自然科学基金项目(ZR2020KC031、ZR2021MC132)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31871874), and the Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2020KC031, ZR2021MC132)

^{*}通信作者: 张鸿雁, 博士, 教授, 主要研究方向为食品危害物检测, 食品加工中雌激素筛选。E-mail: zhanghongyan@sdnu.edu.cn 杜淑媛, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品质量与安全检测方法研发。E-mail: dusy@sdnu.edu.cn

^{*}Corresponding author: ZHANG Hong-Yan, Ph.D, Professor, College of Life Science, Shandong Normal University, 88 Wenhua East Road, Lixia District, Jinan 250014, China. E-mail: zhanghongyan@sdnu.edu.cn

DU Shu-Yuan, Ph.D, Associate Professor, College of Life Science, Shandong Normal University, 88 Wenhua East Road, Lixia District, Jinan 250014, China. E-mail: dusy@sdnu.edu.cn

dual-mode quantitative detection of GSH by colorimetric method and photothermal method. **Results** The optimal pH value was 3.5, reaction time was 5 min, PB mass concentration was 1 mg/mL, 30% hydrogen peroxide volume was 2.5 μ L in 1 mL chromogenic solution, TMB mass concentration was 15 mg/mL, photothermal irradiation time was 70 s, and irradiation power was 3.5 W. Under the optimal conditions, the limit of detection of colorimetric method was 14.8 μ g/mL, and the limit of detection of photothermal method was 1.1 μ g/mL, the sensitivity of photothermal detection was about 13 times higher than that of colorimetric method, the actual recoveries of spiked samples were between 84% and 119%. **Conclusion** This method has good repeatability, specificity and accuracy, and can be used for rapid detection of GSH in health food, fruits and vegetables.

KEY WORDS: glutathione; photothermal detection; colorimetric detection; Prussian blue; 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine

0 引 言

谷胱甘肽(glutathione, GSH)常作为功能活性因子添加 于延缓衰老、增强免疫力、抗肿瘤等功能性食品中^[1-3]。在 食品加工中 GSH 可作为食品添加剂应用于食品生产及保 藏,如添加适量 GSH 可抑制加工中致癌物丙烯酰胺的生 产^[4], GSH 还能保持葡萄酒的香味和色泽^[5]。此外 GSH 在 治疗心血管疾病^[6]、肝病^[7]、糖尿病^[8]等中也发挥着重要作 用。因此快速、准确地检测 GSH,可对功能性食品中 GSH 的含量是否达标进行质量控制、对常规食品加工过程中 GSH 的添加量进行及时有效的监控。

目前常见的 GSH 检测方法主要有高效液相色谱法^[9]、 电化学分析法^[10]、荧光法^[11]、紫外分光光度法^[12]等。其中 高效液相色谱法和荧光法灵敏度高、特异性强,但需使用 大型仪器设备、且操作烦琐、检测成本高;电化学分析法 操作简单快速,但其灵敏度低、特异性差。而基于催化显 色的紫外分光光度法,利用 GSH 能抑制辣根过氧化物酶 催化 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)显色的机制而进行 GSH 的检测^[13],因其操作简单快 速、低成本等优点而受到广泛关注,但天然酶的成本高且 易失活,致使其准确度和灵敏度仍有待提高。开发操作简 单、灵敏度高、准确性好、设备简单的 GSH 的快速检测方 法是目前研究的热点。

利用材料的光热转化性能建立的检测方法不需要大型仪器设备,可实现实时高灵敏检测。QIN 等^[14]首次利用胶体金的光热效应将试纸条的灵敏度较视觉检测提高了 32 倍;接下来光热检测试纸条成功应用于沙门氏菌^[15]、癌 细胞^[16]等的检测。贵金属纳米材料、有机纳米材料、半导 体纳米材料^[17]等具有良好的光热转化性能。FU 等^[18]首次 发现氧化型 TMB (oxidized 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, oxTMB)作为有机纳米材料具有强烈的近红外激光驱动的 光热转换效应,且制备简单、价格低廉,逐渐引起关注。 随后基于 oxTMB 光热效应实现银离子^[19-20]、甲胎蛋白^[21]、 铜离子(Cu²⁺)^[22]等的检测;但单纯依靠 oxTMB 光热转化性 能产生的温升偏低,且易受环境温度干扰,难以保证检测 结果的准确性,因此与其他光热纳米材料的联合使用有望 解决上述问题。此外 TMB 作为过氧化物酶催化底物广泛 应用于酶联免疫分析法中, LAN 等^[23]也曾利用 TMB 的催 化显色实现 GSH 的比色检测, 但同时利用 TMB 反应体系 的催化显色和光热转化性能实现对 GSH 高灵敏度、高稳定 性、简单便携的双模式检测方法未见报道。

本研究利用具有过氧化物酶活性和光热转化性能的 普鲁士蓝(Prussian blue, PB)^[24]纳米材料催化 TMB 反应体 系生成蓝绿色的 oxTMB,而 GSH 对 oxTMB 进行还原,使 颜色褪去(图 1),因此可通过颜色变化,利用吸光度实现 GSH 的定量检测,同时利用 PB 和 oxTMB 的光热转化性能, 扩大检测信号,进一步降低 GSH 的检出限,从而实现对 GSH 的双模式检测,为快速准确检测食品中谷胱甘肽含量 提供新的技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黄瓜、梨、苹果(山东济南当地超市)。

普鲁士蓝(通过聚乙烯吡咯烷酮辅助结晶工艺实验室 自制);还原型谷胱甘肽、还原型 GSH 含量检测试剂盒(北 京索莱宝科技有限公司);3,3',5,5'-四甲基联苯胺、N,N-二 甲基甲酰胺(生物技术级,上海麦克林生化科技有限公司); 30%过氧化氢(优级纯)、十二水合磷酸氢二钠、一水合柠檬 酸、亚铁氰化钾(分析纯)(国药集团化学试剂有限公司);聚 乙烯吡咯烷酮(分析纯,上海源叶生物科技有限公司);浓 盐酸(分析纯,烟台远东精细化工有限公司)。

1.2 仪器与设备

MQX200 酶标仪(美国伯腾仪器有限公司); IRS S6 红外 热像仪(上海热像机电科技股份有限公司); 808 nm 近红外激 光器(上海熙隆光电科技有限公司); MOV-112 离心机(日本三 洋电气有限公司); 85-2 恒温磁力搅拌器(江苏中大仪器有限公 司); KQ-250DE 超声清洗仪(昆山舒美超声仪器有限公司); JEM-2100 透射电子显微镜(日本电子株式会社); BPG-9073 精 密电热恒温鼓风干燥箱(沙鹰科学仪器有限公司); BSA223S-CW 电子天平(感量 1 mg, 德国赛多利斯科学仪器 有限公司)。



图 1 双模式检测谷胱甘肽的示意图 Fig.1 Schematic diagram of dual-mode detection of glutathione

1.3 实验方法

1.3.1 PB 的制备

取 1.5 g 聚乙烯吡咯烷酮和 0.25 g 亚铁氰化钾于烧杯 中加入 20 mL 超纯水搅拌混匀,用浓 HCl 调节 pH 至 0.5, 磁力搅拌 30 min 后获得澄清溶液。上述溶液移入反应釜中 80℃加热反应 20 h,1200 r/min,15 min 离心收集蓝色沉淀,用 超纯水洗涤 3 次,室温下真空烘箱中干燥 5 h 获得 PB 粉末。 1.3.2 TMB 显色体系的配制

在离心管(eppendorf, EP)中按体积比为 395:4:1 的比例依 次加入 TMB 缓冲液(0.1 mol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸)、15 mg/mL TMB 溶液、30% H₂O₂溶液, 混匀后制得 TMB 显色液, 显色 液需现配现用。称取一定质量 PB 于 EP 管中加水超声分散 30 min 后制得 PB 溶液。向 EP 管中加入 100 μL TMB 显色液 和 20 μL PB 溶液制备 TMB 显色体系。

1.3.3 TMB 显色体系 PB 的酶动力学分析

在最优条件下,分别配制质量浓度为 1、5、10、15 和 20 mg/L 的 TMB 显色液。向 20 μL (1 mg/mL)的 PB 溶 液分别加入 100 μL 不同质量浓度的 TMB 显色液,振荡混 匀,反应 5 min 后,酶标仪测定 450 nm 波长处吸光度。

1.3.4 PB和TMB体系光热转化效率测定

向 EP 管中依次加入 20 µL 1 mg/mL 的 PB 溶液、121 µL 超纯水、100 µL TMB 显色液,制得 TMB 反应体系,用超纯 水代替 TMB 显色液设置 PB 溶液组。反应 5 min 后取 100 µL 液体于酶标仪下测定 808 nm 处吸光度值。取 40 µL 反应液于 3.5 W 红外激光下照射,记录反应液起始温度,每 0.5 min 记 录反应液的平均温度和最高温度,待其温度趋于稳定时结 束照射,继续每 0.5 min 记录其平均温度和最高温度,待温 度下降至室温后停止记录,根据公式计算出反应液的温升 [温升=(平均温度+最高温度)/2-起始温度],同样的操作记 录水的温度变化,根据公式(1)^[25-26]可分别计算出 PB 溶液 与 TMB 显色体系的光热转化效率(η)。

$$\eta = \frac{hA(\Delta T_{\max,\min} - \Delta T_{\max,H_2O})}{I(1 - 10^{-A_{\lambda}})}$$
(1)

式(1)中: h 为溶剂(超纯水)的传热系数; A 为容器的表面积; $\Delta T_{max,mix}$ 为溶液在最大稳态温度下的温度变化; $\Delta T_{max,H_2O}$ 为 H_2O 在最大稳态温度下的温度变化; I 为激光效率; A_1 为溶液在 808 nm 处的吸光度。

1.3.5 比色法检测 GSH

向 EP 管中加入 20 µL 1 mg/mL 的 PB 溶液和 120 µL 不同浓度 GSH 溶液,再加入 100 µL 的 TMB 显色液,混 匀反应 5 min 后,酶标仪测定 450 nm 波长下反应液的吸 光度值为 A_{b} ,以超纯水替代 GSH 作为空白对照,所测吸 光度值为 A_{b0} ,计算吸光度差值 $\Delta A_{b}=A_{b0}$,每组反应设置 3 组平行。

1.3.6 光热检测 GSH

取 40 μL 反应液于 EP 管中,分别用热像仪测定 3.5 W 红外激光照射 70 s 前后反应液的平均温度与最高温度,并 计算其温升,每组反应设置 3 组平行。

1.3.7 检测性能评价

为验证该方法的重复性,使用4µg/mL的GSH溶液作为目标物,分别显色和光热检测GSH。并计算12组平行的标准偏差、变异系数(coefficient of variation, CV)值,对 实验结果的重复性进行评价。

为验证该方法对 GSH 的选择性,选取抗坏血酸、蔗糖、葡萄糖、L-半胱氨酸等作为干扰物质进行实验。4 µg/mL 的干扰物质和 GSH 加入显色体系,分别进行 PB 催化比色和光热检测。

选取黄瓜、梨、苹果 3 种果蔬探究食品基质对该检测 方法的影响,用其榨汁稀释后的果蔬汁进行添加回收率实 验。向果蔬汁中分别添加 1.6、8.0、4.0 µg/mL 的 GSH 溶 液,并加入显色体系通过 PB 催化比色检测和光热检测 GSH,评价方法的回收率。

1.4 数据处理与分析

数据处理分析采用软件 OriginPro 8.5.1、Excel 和 Prism 8, 其中线性回归方程、作图使用 OriginPro 8.5.1, 重 复性、偏差值、回收率采用 Excel 处理数据,显著性分析 采用 Prism 8。

2 结果与分析

2.1 PB 纳米材料的表征和光热转化效率分析

从透射电子显微镜图(图 2A)中可看出 PB 为约 100 nm 的立方体,且粒径均一。图 2B 展示的是 PB 和 TMB 显色 体系的光热转化效率,其中 PB 的光热转化效率平均值为 16.7%,加入 TMB 显色液后光热转化效率平均值为 18.0%, 表明 TMB 显色体系中同时存在 PB 和 oxTMB 时光热转化 效率较单纯 PB 体系有所提高,虽然未形成显著的信号差 异,但增加了激光照射时的温升值,扩大了检测信号值。



注: ns 为差异不显著, P>0.05。 图 2 PB 透射电镜图(A)及 PB 和 TMB 显色体系光热转化效率(B) (n=3)。 Fig.2 TEM images of PB (A) and photothermal conversion efficiency of PB and TMB system (B) (n=3)

2.2 光热稳定性分析

TMB 检测体系的光热稳定性影响检测结果的重复性, 通过重复照射 TMB 反应体系 4 次,在照射过程中每 10 s 记录反应温度,在 4 个周期的开关循环中研究反应体系光 热稳定性能,结果如图 3 所示,每个循环体系最高温度基 本一致,证明反应体系光热性能稳定。



图 3 TMB 显色体系热循环曲线



2.3 TMB 显色体系的反应条件优化及 PB 酶动力学 分析

2.3.1 显色体系 pH 优化

PB 在中性和碱性条件下稳定性较差,故探究不同酸 性条件(pH=3.0、3.3、4.0、4.5、5.0)对 TMB 显色体系的影 响。随 pH 降低,反应体系的吸光度值升高,在 pH=3 时,吸 光度达到最高,但由于酸性太强导致 TMB 显色体系提前 终止而呈黄绿色^[27],而非反应产物产生的特征吸收峰。当 pH=3.5 时,反应体系呈蓝绿色,因此 TMB 显色体系最优 反应 pH 为 3.5。

2.3.2 反应时间优化

反应时间的长短影响反应结果的准确性,反应时间 过短导致反应不完全,若反应时间过长,可能导致反应产 物因不稳定而发生分解。探究不同反应时间(1、5、10、20、 30、40 min)对 TMB 显色体系反应结果的影响,实验结果 显示,随着反应时间延长,反应体系的颜色越浅,吸光度 值对应降低,5 min之前反应迅速,吸光度值下降速度较快, 5~10 min 内反应体系稳定性较好,吸光度值下降速度明显 减缓,因此选取 5 min 为 TMB 显色体系的最优反应时间, 便于实验操作。

2.3.3 H₂O₂体积优化

H₂O₂体积影响反应速度,同时影响 PB 催化活性,在 相同时间内探究 1 mL 显色体系中不同体积(1.0、2.5、5.0、 7.5、10.0 μL) 30% H₂O₂对实验的影响,每 mL 显色液中, H₂O₂体积小于 5 μL 时,随着 H₂O₂体积的不断增大,反应 体系的吸光度值逐渐增高,当 H₂O₂体积大于 5 μL 时,因 H₂O₂过量抑制 PB 催化活力^[28],反应体系的吸光度值随着 H₂O₂体积的增大而降低,而 H₂O₂体积为 5 μL 时,虽然吸 光度达到最大值,但反应过于迅速,因此选取 2.5 μL 为 H₂O₂最优体积。

2.3.4 PB质量浓度优化

PB 质量浓度不同,TMB 显色体系的反应效率不同。 实验结果显示随着 PB 质量浓度的增加(0.025、0.125、 0.250、0.500、1.000、2.000 mg/mL),反应体系的颜色逐渐 变深,反应体系的吸光度值不断升高,但当 PB 质量浓度为 2 mg/mL 时,PB 难以溶解且易聚沉,影响了实验结果的准 确性,因此 PB 的最优质量浓度为 1 mg/mL。

2.3.5 TMB质量浓度优化

为降低处理 TMB 的成本,减轻其对环境的污染,探究 TMB 的合适浓度。随着 TMB 质量浓度增加(1、5、10、15、20 mg/mL),催化效果增强,吸光度值随之增大,而 TMB 质量浓度高于 15 mg/mL 时,PB 与底物 TMB 结合接 近饱和,导致吸光度值增加缓慢,因此 15 mg/mL 为 TMB 的最佳质量浓度。

2.3.6 PB纳米材料酶动力学分析

以 TMB 浓度的倒数作为横坐标(*X*, M⁻¹), 吸光度值 的倒数作为纵坐标(*Y*)做双倒数曲线图, 其线性回归方程 为 *Y*=0.0091*X*+0.0244 (r^2 =0.9935), 得到底物浓度[*S*]和初 始反应速度反应 *v*, 根据 Michaelis-Menten 方程: $v=V_{max}[S]/(Km+[S])^{[29]}$ 计算 TMB 体系的酶动力学常数 Km 为 0.37 mol/L, 最大反应速度 V_{max} 为 40.97 mol/s, 证明 PB 在以 TMB 为底物时具有良好的催化活性。

2.4 光热条件的优化

最优的激光照射时间可提高检测效率,每隔 10 s 记录 下样品的温升优化激光照射时长。优化结果显示,随照射时 间增加温升增大,70 s 后温升趋于平缓,因此光热照射最优 时间为 70 s。

照射功率影响温度升高的时间,同时最佳的照射功 率有利于对实验的控制、节约能源、减少实验仪器的损耗 等。优化结果显示随着照射功率增加(1.0、2.0、2.5、3.0、 3.5、4.0 W),温升逐渐增大,当功率为 3.5 W 时温升为 75℃。若进一步增加照射功率,局部温度将超过 100℃,可 能会导致水分的蒸发使反应体系遭到破坏,从而影响实验 结果的准确性,因此,光热照射最优功率为 3.5 W。

2.5 检测性能分析

2.5.1 比色法和光热法检测 GSH 灵敏度分析 检测方法的灵敏度是重要的分析性能指标。在最优条

件下 TMB 显色体系吸光度的差值随着 GSH 的质量浓度增 大而逐渐增大,且表现出良好的线性关系,以谷胱甘肽的质 量浓度为横坐标(Q, mg/mL), 吸光度值为纵坐标(P)做标准曲 线,其线性回归方程为 P=15.1390Q-0.0730 (r²=0.9913),将空 白组的3倍标准方差代入方程,得出比色法对GSH的检出限 为 14.8 μg/mL, 线性范围为 5.0~30.0 μg/mL。此外光热检测中 以 GSH 质量浓度的自然对数值为横坐标(K, mg/mL), 光热 温升为纵坐标(Z, ℃)做标准曲线,线性回归方程为 Z=3.0838K+22.9760 (r²=0.9825),检出限为 1.1 µg/mL,线 性范围为 0.8~18.0 µg/mL, 结果显示光热检测较比色检测 灵敏度提高了约 13 倍。此外在不同浓度 GSH 下用将利用 比色检测得到的吸光度差值(ΔA_b)和光热检测得到的温升 差值(ΔT)进行线性拟合,其 r² 为 0.9511。可见针对不同 GSH 质量浓度,光热检测方法和比色检测方法具有相同的 变化趋势,进一步证明针对同一浓度 GSH,两种检测结果 能够相互验,提高检测结果的准确性。

2.5.2 检测方法重复性评价

检测结果的重复性能很好地反映检测方法的稳定性, 用已建立的检测方法分别测定并计算 12 个样品的吸光度 和光热的平均值和标准偏差。吸光度的平均值为 0.97, 标 准偏差为 0.02, CV 值为 0.02; 光热的平均温升为 15.47℃, 标准偏差为 1.38, CV 值为 0.03, 说明反应体系生成的 oxTMB 化学性质稳定,同时建立的检测方法具有良好的 重复性。

2.5.3 检测方法特异性评价

为了证明该方法对 GSH 具有较好的选择性,用抗坏 血酸、蔗糖、葡萄糖、L-半胱氨酸等作为干扰物质进行选 择性实验,结果如图 4 所示,比色检测法和光热检测法在 相同浓度干扰物和 GSH 存在时,GSH 的吸光度和温升都显 著高于干扰组,说明该方法对 GSH 具有较强的特异性,此 结果与先前报道相似,推测虽然抗坏血酸和葡萄糖等具有 还原性,但其还原能力可能不在还原 oxTMB 的区间中,因 此不会干扰 GSH 的检测^[30]。

2.5.4 实际样品加标回收率

在实际样品中的加标回收率是判断检测方法应用性能的重要标准,由图5A可得,比色检测法中梨样品中各浓度GSH的平均加标回收率在84%~90%之间;黄瓜平均加标回收率在92%~118%之间;苹果平均加标回收率在93%~119%之间。如图5B所示,光热检测法中梨、黄瓜和苹果3种实际样品高中低3个浓度的GSH加标回收率分别为85%~105%、82%~118%和87%~108%。3种实际样品两种方法的加标回收率均在84%~119%之间,满足快速检测中对加标回收率的要求。

2.5.5 与商品化检测方法相比较

与商品化 GSH 检测方法相比可进一步对比验证本研 究检测方法的实际应用性能。商品化检测方法的实际样品 加标回收率如图 6 所示,其中梨样品各浓度平均加标回收 率分别为 101%和 104%,黄瓜加标回收率为 90%和 102%, 苹果为 100%和 94%。虽然商品化检测方法的平均加标回 收率比本研究方法更接近于 100%,但对比图 5 和图 6 的标 准偏差可见本研究方法的标准偏差明显小于商业化检测方法, 说明本研究的稳定性更优, 且实验中商品化检测方法 不能检出浓度为 1.4 μg/mL 的 GSH, 进一步证明本研究方 法具有更高的检测灵敏度。



图 5 比色检测(A)和光热检测(B)实际样品加标回收率(n=3) Fig.5 Actual sample recoveries of colorimetric (A) and photothermal (B) methods (n=3)





3 结 论

本研究基于 PB 催化 TMB 反应生成蓝绿色且具有光 热转化性能的 oxTMB,而 GSH 能将 oxTMB 还原为无色 的 TMB,使溶液吸光度值和光热转化产生的温升与 GSH 含量呈线性相关,从而建立了 GSH 的比色和光热的双模 式检测方法。对比色检测和光热检测的条件进行了详细 优化,其中最优 pH 为 3.5,反应时间为 5 min, PB 质量浓 度为 1 mg/mL, 1 mL 显色液中 H₂O₂体积为 2.5 µL, TMB 质量浓度为 15 mg/mL,光热照射时间为 70 s,照射功率为 3.5 W。在最优条件下通过制定标准曲线实现了 GSH 的定量 检测,其线性检测范围为 0.8~30.0 µg/mL,其中比色法检出限 为 14.8 µg/mL,线性检测范围为 5.0~30.0 µg/mL,光热法检 出限为 1.1 μg/mL, 线性检测范围为 0.8~18.0 μg/mL, 双模 式检测相互验证在提高灵敏度的同时可提升检测准确 性。此外该方法具有良好的重复性和特异性, 对实际样品 梨、黄瓜和苹果的平均加标回收率均在 84%~119%之间, 因此本研究建立的检测方法可实现食品中 GSH 的快速、 灵敏、准确检测, 对功能性食品与药物的质量控制、食品 加工过程的监控具有重要意义。

参考文献

- 丛峰松. 神奇的小分子活性肽[M]. 上海: 上海交通大学出版社, 2015.
 CONG FS. Small molecular bioactive peptides [M]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University Press, 2015.
- [2] 戴庞聪, 吴慧. 探讨谷胱甘肽的应用研究进展[J]. 现代食品, 2020, (21): 40-43.

DAI PC, WU H. Research progress on the application of glutathione [J]. Mod Food, 2020, (21): 40–43.

- [3] 迟玉杰. 保健食品学[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2016.
 CHI YJ. Fundamentals of dietary supplements [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2016.
- [4] ZHU YC, LUO YH, SUN GY, *et al.* Role of glutathione on acrylamide inhibition: Transformation products and mechanism [J]. Food Chem, 2020, 326: 126982.
- [5] 苏静, 龚荣. 葡萄酒酿造过程中谷胱甘肽的研究进展[J]. 食品科学,
 2020, 41(7): 283–291.
 SU J, GONG R. Recent advances in understanding glutathione during

wine-making process [J]. Food Sci, 2020, 41(7): 283-291.

- [6] CHEN XX, NIU LY, YANG QZ. Visualizing the underlying signaling pathway related to nitric oxide and glutathione in cardiovascular disease therapy by a sequentially activated fluorescent probe [J]. Anal Chem, 2021, 93(8): 3922–3928.
- [7] CHO N, KOBAYASHI K, YOSHIDA M, et al. Identification of novel glutathione adducts of benzbromarone in human liver microsomes [J]. Drug Metab Pharmacok, 2016, 32: 46–52.
- [8] ACHARI AE, JAIN SK. L-cysteine supplementation increases insulin sensitivity mediated by upregulation of GSH and adiponectin in high glucose treated 3T3-L1 adipocytes [J]. Arch Biochem Biophys, 2017, 630(15): 54–65.
- [9] NO HS, KIM T, HONG JI. Iridium (III) complex-based phosphorescent and electrochemiluminescent dual sensor for selective detection of glutathione [J]. Sens Actuator B Chem, 2021, 342(1): 129868.
- [10] TSIASIOTI A, ZOTOU AS, TZANAVARAS PD. Single run analysis of glutathione and its disulfide in food samples by liquid chromatography coupled to on-line post-column derivatization [J]. Food Chem, 2021, 361(2): 130173.
- [11] GONG CC, LI ZJ, LIU G, et al. A sensitive fluorescence "turn on" nanosensor for glutathione detection based on Ce-MOF and gold nanoparticles [J]. Spectrochim Acta A, 2021, 265: 120362.
- [12] LEA KM, MAJA B, NJEGOMIR R. Determination of penicillamine,

tiopronin and glutathione in pharmaceutical formulations by kinetic spectrophotometry [J]. Acta Pharm, 2021, 71(4): 619–630.

- [13] SINGH P, OJHA RP, KUMAR S, et al. Fe-doped MoS₂ nanomaterials with amplified peroxidase mimetic activity for the colorimetric detection of glutathione in human serum [J]. Mater Chem Phys, 2021, 267: 124684.
- [14] QIN Z, CHAN W, BOULWARE DR, et al. Significantly improved analytical sensitivity of lateral flow immunoassays by using thermal contrast [J]. Angew Chem Int Ed, 2012, 124(18): 4434–4437.
- [15] LU LX, GE YY, WANG X, et al. Rapid and sensitive multimode detection of Salmonella typhimurium based on the photothermal effect and peroxidase-like activity of MoS₂@Au nanocomposite [J]. Sens Actuator B Chem, 2020, 326: 128807.
- [16] LI XY, LU SY, MU XJ, et al. Red-light-responsive coordination polymers nanorods: New strategy for ultrasensitive photothermal detection of targeted cancer cells [J]. Biosens Bioelectron, 2021, 190: 113417.
- [17] LI J, ZHANG W, JI WH, *et al.* Near infrared photothermal conversion materials: Mechanism, preparation, and photothermal cancer therapy applications [J]. J Mater Chem B, 2021, 9: 7909.
- [18] FU G, SANJAY ST, ZHOU W, et al. Exploration of nanoparticle-mediated photothermal effect of TMB-H₂O₂ colorimetric system and its application in a visual quantitative photothermal immunoassay [J]. Anal Chem, 2018, 90(9): 5930–5937.
- [19] ZHANG YY, ZHAO TF, ZHANG XH, et al. Photothermal and colorimetric dual-readout silver ions determination utilizing the oxidasemimicking activity of MnO₂ nanosheets [J]. Sens Actuator B Chem, 2021, 346: 130494.
- [20] LUO MY, XUE X, RAO HH, et al. Simply converting color signal readout into thermal signal readout for breaking the color resolution limitation of colorimetric sensor [J]. Sens Actuator B Chem, 2020, 309: 127707.
- [21] HUANG LT, CHEN JL, YU ZH, et al. Self-powered temperature sensor with see beck effect transduction for photothermal-thermoelectric coupled immunoassay [J]. Anal Chem, 2020, 92(3): 3809–2814.
- [22] GAO M, AN PL, RAO HH, et al. Molecule-gated surface chemistry of Pt nanoparticles for constructing activity-controllable nanozyme and a three-in-one sensor [J]. Analyst, 2020, 145(4): 1279–1287.
- [23] LAN WF, HU RF, HUANG DR, et al. Palladium nanoparticles/graphdiyne oxide nanocomposite with excellent peroxidase-like activity and its application for glutathione detection [J]. Chem Res Chin Univ, 2021. DOI: 10.1007/s40242-021-1038-1
- [24] 杨森. 普鲁士蓝复合电极和等离子体改性普鲁士蓝类似物的电化学性能研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2020.
 YANG S. Studies on the electrochemical properties of Prussian blue composite electrode and Prussian blue analogue modified by plasma [D].
 Lanzhou: Lanzhou University, 2020.
- [25] REN WZ, YONG Y, ZENG LY, et al. A near infrared light triggered hydrogenated black TiO₂ for cancer photothermal therapy [J]. Adv Health

Mater, 2015, 4(10): 1526-1536.

- [26] 沈昱君, 徐琪, 邵旭升. 普鲁士蓝纳米粒子光热性能及虫菌防治研究
 [C]. 中国化工学会农药专业委员会第十八届年会, 2018.
 SHEN YJ, XU Q, SHAO XS. Photothermal properties and application of Prussian blue nanoparticles on insect and bacteria [C]. The 18th annual meeting of Pesticide Committee of Chemical Society of China, 2018.
- [27] WU N, WANG YT, WANG XY, et al. Enhanced peroxidase-like activity of AuNPs loaded graphitic carbon nitride nanosheets for colorimetric biosensing [J]. Anal Chim Acta, 2019, 1091: 69–75.
- [28] 郑俊,张谷,何晓燕,等.显色液中 3,3'-二氨基联苯胺和 H₂O₂ 含量对 免疫组化抗原检测的影响[J].现代实用医学,2009,21(12):1315–1316. ZHENG J, ZHANG G, HE XY, *et al.* Effects of 3,3'-diaminobenzidine and H₂O₂ contents in chromogenic solution on immunohistochemical antigen detection [J]. Mod Pract Med, 2009, 21(12): 1315–1316.
- [29] CHOI B, REMPALA GA, KIM JK. Beyond the Michaelis-Menten equation: Accurate and efficient estimation of enzyme kinetic parameters [J] Sci Rep, 2017, 7: 17018.
- [30] KONG X, YANG RF, LI YY et al. Co₃O₄-binuclear phthalocyanine nanocomposites with enhanced peroxidase-like activity for sensitive detection of glutathione [J]. Colloid Surf A Physicochem Eng Asp, 2021,

615: 126261.

(责任编辑:张晓寒 韩晓红)

作者简介



葛园园,硕士研究生,主要研究方向 为食品危害物快速检测方法的建立。 E-mail: Gyyuan2021@163.com

张鸿雁,博士,教授,主要研究方向为 食品危害物检测,食品加工中雌激素筛选。 E-mail: zhanghongyan@sdnu.edu.cn

杜淑媛, 博士, 副教授, 主要研究方向 为食品质量与安全检测方法研发。 E-mail: dusy@sdnu.edu.cn