



基于电子顺磁共振技术的谷胱甘肽检测方法*

王志文¹⁾ 邝健¹⁾ 刘傲铨²⁾ 魏若彤²⁾ 于璐^{2,3)**} 田长麟^{1,2,3)**}

¹⁾ 中国科学技术大学化学物理系, 合肥 230026; ²⁾ 中国科学院合肥物质科学研究院强磁场科学中心, 合肥 230031;

³⁾ 中国科学技术大学生命科学与医学部, 合肥 230026)

摘要 目的 谷胱甘肽 (GSH) 是细胞中巯基 (—SH) 含量最丰富的非蛋白质化合物, 在提供还原当量、直接中和有毒反应物质以及维持细胞氧化还原平衡等方面发挥着至关重要的作用, 因此, 准确检测组织中的 GSH 含量具有重要意义。鉴于电子顺磁共振 (EPR) 技术在 GSH 检测方面的应用报道相对较少, 本文提出了一种基于 EPR 技术的 GSH 检测方法。**方法** 首先, 将 ABTS (2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) 溶液与 $K_2S_2O_8$ 溶液混合并在避光条件下反应 12~16 h 制备 $ABTS^{\cdot+}$ 溶液, 借助 UV-Vis 对 $ABTS^{\cdot+}$ 溶液进行浓度测定。然后, 基于 $ABTS^{\cdot+}$ 的 EPR 信号变化来检测 GSH 浓度, 在此基础上探究最适的反应时间和温度, 建立 $ABTS^{\cdot+}$ 的 EPR 信号强度和 GSH 浓度之间的标准方程。最后, 采用计算得到的标准曲线对 C57BL/6J 小鼠全血的 GSH 浓度进行定量分析, 并与文献结果进行比较, 验证方法的准确性。**结果** 实验结果显示, 本方法对 GSH 的检测范围 (50 nmol/L~15 μ mol/L) 分布超过两个数量级, 检测限 (LOD) 低至 0.50 nmol/L, 检测到的小鼠全血中 GSH 含量为 (10 660 \pm 706) nmol/g (每克血红蛋白所含 GSH 纳摩尔数), 与文献报道结果 ((11 200 \pm 237) nmol/g) 接近。此外我们还使用类似的方法进一步发展了对 GSSG 的检测方法。**结论** 本文提出了一种基于 EPR 技术, 使用 $ABTS^{\cdot+}$ 快速检测 GSH 的方法。得益于 EPR 技术的独特优势, 相比于传统的比色法, 本方法具有更高的检测灵敏度, 更宽的线性范围。我们进一步拓展了其在血液样品中的检测应用, 可以快速准确地检测全血中 GSH 的含量, 为衡量组织中氧化还原平衡状态提供数据支持, 具有重要意义。

关键词 谷胱甘肽检测, 电子顺磁共振, ABTS

中图分类号 Q5-33, O657.61

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0097

在细胞内非蛋白质化合物中, 谷胱甘肽 (γ 谷氨酰-L-半胱氨酰甘氨酸, GSH) 含有的巯基 (—SH) 比例最高。GSH 在组织中的浓度范围通常为 1~10 mmol/L。在血浆等细胞外基质中, 很大一部分巯基以游离半胱氨酸形式存在, GSH 水平较低, 一般为 2~20 μ mol/L, 约为细胞内浓度的 1/1 000^[1-2]。在哺乳动物细胞中, 谷胱甘肽主要以还原形式存在 (GSH), 而氧化型 (GSSG) 通常占比不到 1%^[3]。当机体处于低 GSH 水平或高 GSSG 水平时, 表明机体内氧化还原失衡和还原能力下降。GSH 在生物系统中发挥着多种重要作用, 例如, 防御毒素和自由基、维持硫醇状态以及调节细胞增殖等^[4-5]。GSH/GSSG 比例与多种人类疾病包括癌症、艾滋病、肝损伤、糖尿病和衰老相关。鉴于其生物学和临床意义, GSH 的快速、灵敏检测引起了人们的极大兴趣^[6-8]。

迄今为止, 检测 GSH 的方法主要有高效液相

色谱法^[9]、比色法^[10-11]、电化学法^[12]、核磁共振法^[13]和荧光光谱检测^[14-15], 然而, 这些方法都存在一定的局限性, 例如探针制备复杂、检测耗时、检测灵敏度低。考虑到 GSH 在细胞中含巯基化合物的重要性和主导地位, 有必要针对组织中的 GSH 建立一种快速、直接的定量方法。

电子顺磁共振 (electron paramagnetic resonance, EPR), 也称电子自旋共振 (electron

* 国家自然科学基金 (21825703, 21927814), 国家重点研发计划 (2019YFA0405600, 2019YFA0706900, 2021YFA1200104, 2022YFC3400500), 中国科学院战略性先导科技专项 (B类) (XDB0540200, XDB37040201), 安徽省科技重大专项计划 (202303a07020004) 和中国科学院青年创新促进会 (2022455) 资助项目。

** 通讯联系人。

于璐 Tel: 0551-63600795, E-mail: luyuesr@ustc.edu.cn

田长麟 Tel: 0551-63600872, E-mail: cltian@ustc.edu.cn

收稿日期: 2024-03-11, 接受日期: 2024-05-09

spin resonance, ESR), 是研究含未成对电子的物质的电磁波谱法。由于电子具有更高的旋磁比, 因此 EPR 比其他的磁共振技术 (例如核磁共振 (nuclear magnetic resonance, NMR)) 在灵敏度方面更具优势, 对其研究对象的固有灵敏度比 NMR 高出 3 个数量级。EPR 技术适用于多种体系的研究, 自由基、过渡/稀土金属离子及其化合物等样品都可以作为其研究对象^[16]。EPR 因其测试灵敏度高、检出限低、对样品的破坏性小以及不存在自然背景信号等优势而受到广泛的关注^[17-19], 因此, 在生物学、物理、化学、材料和医学等领域有着广泛的应用^[20]。

由 ABTS(2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)氧化所产生的阳离子自由基 (ABTS^{•+}) 是一种相对稳定的自由基, 它在 415、645、734 和 815 nm 处具有 4 个不同的特征吸收峰^[21-23]。ABTS^{•+}常被用于评估物质中的总抗氧化活性, 也可以用于特定条件下对单一抗氧化剂的检测, 但 ABTS^{•+}在检测特定生物样品方面的应用十分有限, 这种局限性主要源于 ABTS^{•+}对不同抗氧化剂的非特异性反应。

本文提出了一种基于 EPR 技术, 使用 ABTS^{•+}来检测 GSH 的方法。ABTS^{•+}具有稳定、可定量的 EPR 信号, 当抗氧化剂被引入到 ABTS^{•+}溶液中时, EPR 谱图的信号强度会降低。EPR 信号减少的幅度与抗氧化剂的活性、浓度和反应时间等因素相关。在反应前, ABTS^{•+}具有明显的特征 EPR 信号, 加入一定浓度的 GSH 后, ABTS^{•+}的 EPR 信号强度会随之下降, GSH 的浓度越高, EPR 信号的下降幅度越显著。EPR 方法比传统比色法具有更高的检测灵敏度和更广的线性范围, 显著提升了 GSH 检测的准确性。除此之外, 本文提供的方法可以用于准确检测哺乳动物全血中 GSH 浓度。本文使用 C57BL/6J 小鼠的全血上清液作为测试样本, 得到的结果与文献报道符合^[24]。此外, 使用 ABTS^{•+}测量二硫化物浓度 (如 GSSG) 的方法报道较少, 本文也建立了一个检测体系中 GSSG 浓度的方案, 同样具有高灵敏度和宽检测范围两大优点。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

ABTS (货号: A800764), 甲萘醌 (货号: M813096) 以及过硫酸钾 (K₂S₂O₈) (货号: P816371) 购自中国上海麦克林公司; 磷酸盐 (PBS) 缓冲液 (货号: E607008) 购自中国上海生

工生物公司; GSH (货号: 387160), GSSG (货号: 229432), N-乙基马来酰亚胺 (N-ethylmaleimide (NEM), 货号: 937101), 三氯乙酸 (货号: 519758), 二氯甲烷 (货号: 433893) 以及肝素钠 (货号: 542858) 购自中国北京百灵威科技公司。

1.2 实验动物

健康 C57BL/6J 小鼠, 6~8 周龄, 无特定病原体 (specific-pathogen-free, SPF) 级。小鼠进入动物房后适应性饲养 3 d 后开展实验, 室内温度为 20~26°C, 湿度为 40%~70%, 12 h 光照周期, 照明时间为每日 7:30~19:30, 给予实验动物良好的饲养条件, 优质的饲料, 充足干净的饮用水, 以及适宜的饲养环境, 保证实验动物在实验期间的生活质量。动物实验在中国科学院合肥物质科学研究院伦理委员会指导下进行, 伦理审查编号为: DWLL(P)-2024-70。

1.3 实验方法

1.3.1 ABTS^{•+}溶液的制备及浓度标定

配制浓度为 2.0 mmol/L 的 ABTS 水溶液, 用 pH 值为 8.0 的 PBS 缓冲液配置浓度为 28 mmol/L 的 K₂S₂O₈ 溶液, 将 2 ml K₂S₂O₈ 溶液添加到 98 ml ABTS 溶液中制备 ABTS^{•+}溶液。在 25°C, 避光环境中反应 12~16 h 后得到 ABTS^{•+}溶液^[22-23]。使用 UV-Vis (Ultra-Violet Visible) 光谱仪测量 ABTS^{•+}溶液在 734 nm 处的吸光度^[25], 根据其吸光度以及对应的摩尔消光系数 ($\epsilon_{734\text{nm}}=15\ 000\ \text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) 确定 ABTS^{•+}准确的浓度后, 将 ABTS^{•+}溶液浓度稀释至 300 $\mu\text{mol/L}$ 后于 -20°C 储存。在该存储条件下, 样品的 EPR 信号强度在 3 个月内没有显著衰减。

1.3.2 确定 ABTS^{•+}对 GSH 和 GSSG 的化学计量比

由于 EPR 谱仪只能确定 ABTS^{•+}的检测限 (limit of detection, LOD), 为了得到本方法对 GSH 以及 GSSG 的 LOD, 需要分别计算 ABTS^{•+}对 GSH 和 GSSG 的化学计量比。在 37°C 条件下, 配制不同浓度的 GSH 溶液 (0.1、1、5、10、15 $\mu\text{mol/L}$), 与 ABTS^{•+}溶液孵育 20 min 后进行 UV-Vis 测试, 记录 734 nm 特征吸收处的吸光度值, 建立 GSH 浓度和 ABTS^{•+}吸光度值之间的关系, 根据朗伯-比尔 (Lambert-Beer law) 定律, 计算出 ABTS^{•+}的浓度变化, 从而确定 ABTS^{•+}对 GSH 反应的化学计量比。在 60°C 条件下, 配制不同浓度的 GSSG 溶液, 与 ABTS^{•+}溶液孵育 60 min 后进行 UV-Vis 测试, 后续步骤与确定 ABTS^{•+}对 GSH 反应的化学计量比的方法相同。

1.3.3 建立标准曲线

在构建 GSH-ABTS \cdot^+ 标准曲线时, 将 200 μl ABTS \cdot^+ (150 $\mu\text{mol/L}$) 溶液、 X μl GSH 或 GSSG 以及 (200- X) μl PBS 缓冲液依次加入试管中。将最终体积为 400 μl 的样品溶液在 37°C 水浴中孵育 20 min (对 GSH 适用) 或在 60°C 水浴中孵育 60 min (对 GSSG 适用)。将 40 μl 样品转移至内径为 0.8 mm 的玻璃毛细管中, 并将毛细管底部封口。然后将该管放置在直径 4 mm 的石英管中, 随后将其插入 A300 EPR 谱仪的谐振腔中, 在 37°C 下采集 EPR 谱图。为了确保平行实验的一致性, 固定石英管在谐振腔中的位置, 在测量不同样品时, 只更换毛细管^[26]。处理 EPR 数据时, 需对 EPR 谱图进行二次积分, 所得数值作为溶液中 ABTS \cdot^+ 浓度的定量标准。随后, 根据换算关系建立 GSH 或 GSSG 浓度与 EPR 信号强度之间的标准方程。

1.3.4 EPR 测试参数设置及数据处理

EPR 谱仪测试参数如下: 磁场扫描范围为 3 330~3 390 Gauss, 微波频率约为 9.43 GHz, 微波功率为 5 mW, 调制幅度为 0.6 Gauss, 时间常数为 10.24 ms, 转换时间为 20 ms, 每张谱图采集 2 048 个数据点, 扫描次数为 10。

对 EPR 谱图进行二次积分获取信号强度作为 y 轴, GSH 或 GSSG 的浓度作为 x 轴绘图, 最终得到 GSH 或 GSSG 浓度与 ABTS \cdot^+ 的 EPR 信号强度之间的线性方程。

1.3.5 C57BL/6J 小鼠全血上清液中 GSH 含量的检测

C57BL/6J 小鼠麻醉后, 从心脏采集全血至预装有肝素的试管中。随后, 加入等体积 15% (v/v) 的三氯乙酸 (TCA) 酸化血液, 并以 14 000 r/min 离心 2 min。然后用超纯水将所得上清液稀释 100 倍, 并将 pH 重新调至 7.4^[27]。使用 Sysmex XT-1800i 血液分析仪对小鼠血液样本中的血红蛋白浓度进行定量。每个测试平行进行 3 组, 以确保实验测量的可靠性。

1.3.6 对 HCT 116 细胞总抗氧化能力检测

HCT116 细胞于 37°C、5% 二氧化碳培养箱培养 24 h 后, 实验组加入 100 $\mu\text{mol/L}$ 甲萘醌 (VK3), 对照组中加入相同体积的 DMSO, 然后继续培养 4 h^[28]。随后, 用 PBS 缓冲液洗涤细胞以除去 DMEM 培养基, 减少培养基中氧化还原成分对测试的干扰。细胞经超声破碎后离心取上清液用于检测。

2 结果与讨论

2.1 ABTS \cdot^+ 与 GSH 反应机制

ABTS 与 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 发生氧化还原反应, 形成稳定的自由基阳离子 ABTS \cdot^+ (图 1a)。EPR 谱仪可以直接检测 ABTS \cdot^+ 的信号, 无需额外的探针。然而, 一旦 ABTS \cdot^+ 被 GSH 还原为 ABTS, 它就不再具有 EPR 信号。GSH 被 ABTS \cdot^+ 氧化并生成硫自由基 (GS \cdot)。这些硫自由基不稳定, 可以相互反应形成谷胱甘肽二硫化物 (GSSG) (图 1b)。EPR 测量基于在 GSH 存在下 ABTS \cdot^+ 的还原, ABTS \cdot^+ 的 EPR 信号强度与 GSH 浓度成反比, 通过监测 ABTS \cdot^+ 信号强度下降的幅度, 可以确定出 GSH 浓度。实验发现, 6 min 的反应时间不足以使 GSH 与 ABTS \cdot^+ 充分反应, 但是, 60 min 或更长的反应时间会使实验流程变得过于耗时^[29]。为了保证检测结果更加可靠, 监测了 37°C 条件下, 不同浓度的 GSH 溶液 (0.1、1、5、10 $\mu\text{mol/L}$) 加入 ABTS \cdot^+ (150 $\mu\text{mol/L}$) 后的 EPR 信号强度随时间的变化曲线 (图 1c)。该实验中, 反应的前 1 min 未被记录, 因为这段时间需要将样品装入谐振腔并完成调谐, 程序设置每 2 min 采集一次谱图。如图 1c 所示, 当 GSH 浓度较低时 (小于 1 $\mu\text{mol/L}$), 反应很快达到平衡。当 GSH 浓度为 5 或 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, ABTS \cdot^+ 与 GSH 的反应也可在 20 min 内达到平衡。最终本文将 GSH 检测方法的反应条件确定为 37°C 下孵育 20 min。这种选择既保证了测试过程的便利性, 又保证了数据的准确性, 在 EPR 测试时, 使用布鲁克可变温度控制单元将样品温度维持在 37°C (对 GSH) 或 60°C (对 GSSG)。ABTS \cdot^+ 的工作浓度为 150 $\mu\text{mol/L}$ 。当 GSH 存在时, ABTS \cdot^+ 的 EPR 谱信号强度呈下降趋势 (图 1d)。另一方面, 先前的研究^[29] 表明, 由于二硫键 S 原子的进一步氧化, GSSG 也可以与 ABTS \cdot^+ 缓慢反应, 但需要指出的是, GSSG 在 37°C 时对 ABTS \cdot^+ 表现出较差的反应性, 不会干扰 GSH 的反应。在后续的实验中, 增加了对 GSSG 的检测, 并对反应条件进行了具体的优化。

2.2 确定 EPR 谱仪对 GSH 和 GSSG 的检测限 (LOD)

本文中提出的 EPR 测定中的 LOD 取决于 EPR 谱仪和反应中的样品。首先要计算的是谱仪对 ABTS \cdot^+ 的 LOD, 由于无法直接通过测试获得谱仪对 GSH 和 GSSG 的 LOD, 还需计算 ABTS \cdot^+ 对 GSH

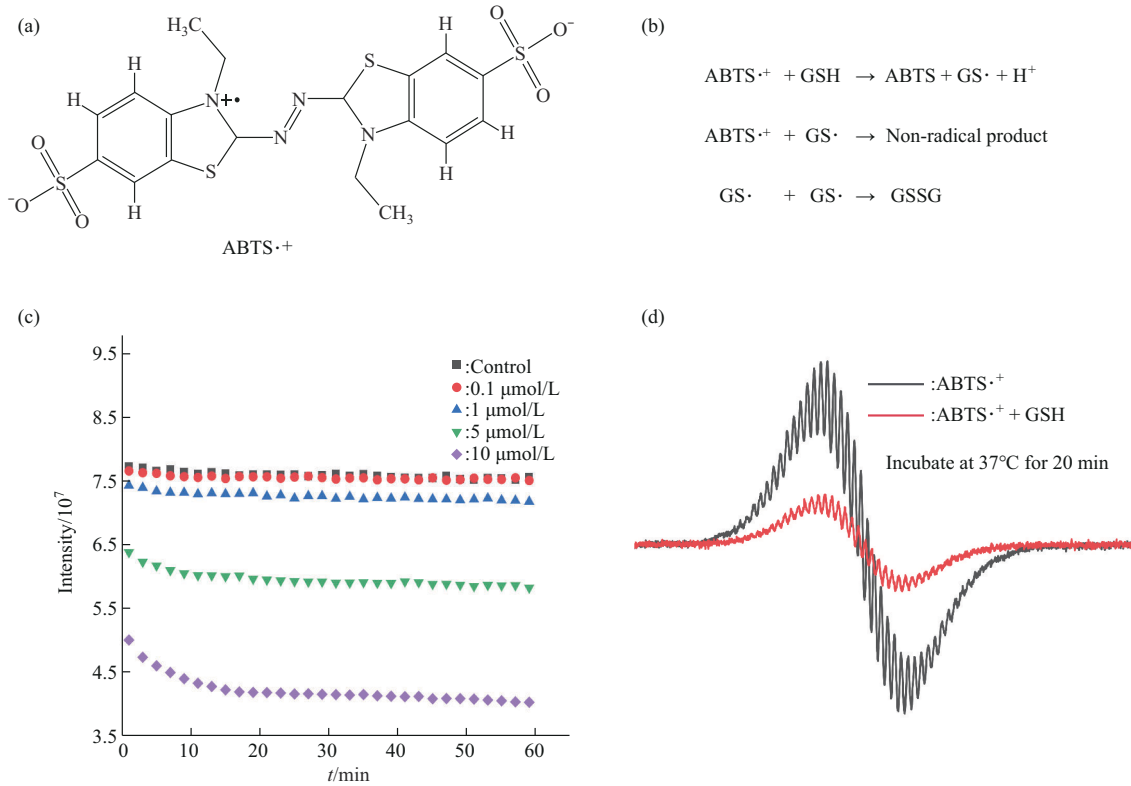


Fig. 1 The reaction mechanism of ABTS•⁺ and GSH

(a) Chemical structures of ABTS•⁺ (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid radical cation)). (b) Mechanism of oxidation of GSH by ABTS•⁺ to form GSSG. (c) Reaction of different concentrations of GSH with ABTS•⁺ (150 μmol/L), the first 1 min of the reaction is not recorded as the time is needed to transfer the sample into the resonator. (d) EPR spectra of ABTS•⁺ in the presence (—) and absence (—) of GSH.

以及 GSSG 的化学计量比 (该反应中 ABTS•⁺ 对 GSH/GSSG 的摩尔比例) 来计算本方法对 GSH 和 GSSG 的 LOD。由于 ABTS•⁺ 的 EPR 信号存在大量的超精细裂分, 准确测量单个裂分的振幅是存在困难的, 于是, 选择以 EPR 信号二次积分后的强度来代表当前 EPR 信号强度。利用 EPR 测量不同浓度 ABTS•⁺ (20、40、60、80、100 和 120 μmol/L) 的信号强度 (图 2a), 建立 EPR 信号强度与 ABTS•⁺ 浓度之间的标准方程 (图 2b, 方程 1), 通过记录空白样品 (PBS 缓冲液, 10 mmol/L) 的

EPR 光谱 (图 2c), 计算出空白样品信号的标准差, 根据 IUPAC 对 LOD 的定义, 基于 $S=3\delta$ 确定 EPR 谱仪对 ABTS•⁺ 的 LOD 为 3.04 nmol/L。随后, 通过 UV-Vis 测定 ABTS•⁺ 对 GSH (图 3a, b) 和 GSSG (图 3c, d) 的化学计量比, 图 3b, d 中拟合得到的线性方程分别为方程 2 和方程 3。公式 1 和 2 分别给出了 ABTS•⁺ 对 GSH 和 GSSG 化学计量比的计算过程, 最终计算出 EPR 谱仪对 GSH 和 GSSG 的 LOD 分别为 0.50 nmol/L 和 4.99 nmol/L。

$$\text{Signal intensity} = 3.60 \times 10^5 [\text{ABTS}\cdot^+] + 3.9 \times 10^5 \quad \text{方程 1}$$

$$\text{Signal intensity} = -1.0519 \times 10^{-2} [\text{GSH}] + 0.253 \quad \text{方程 2}$$

$$\text{Signal intensity} = -1.050 \times 10^{-3} [\text{GSH}] + 0.102 \quad \text{方程 3}$$

$$\frac{\Delta c_{\text{ABTS}\cdot^+}}{\Delta c_{\text{GSH}}} = \frac{\Delta A_{734\text{ nm}}}{\epsilon b \Delta c_{\text{GSH}}} = \left| \frac{-0.010519}{\epsilon b} \times 10^6 \right| = \frac{10519}{15000 \times 0.115} = 6.098 \quad \text{公式 1}$$

$$\frac{\Delta c_{\text{ABTS}\cdot^+}}{\Delta c_{\text{GSSG}}} = \frac{\Delta A_{734\text{ nm}}}{\epsilon b \Delta c_{\text{GSSG}}} = \left| \frac{-0.00105}{\epsilon b} \times 10^6 \right| = \frac{1050}{15000 \times 0.115} = 0.609 \quad \text{公式 2}$$

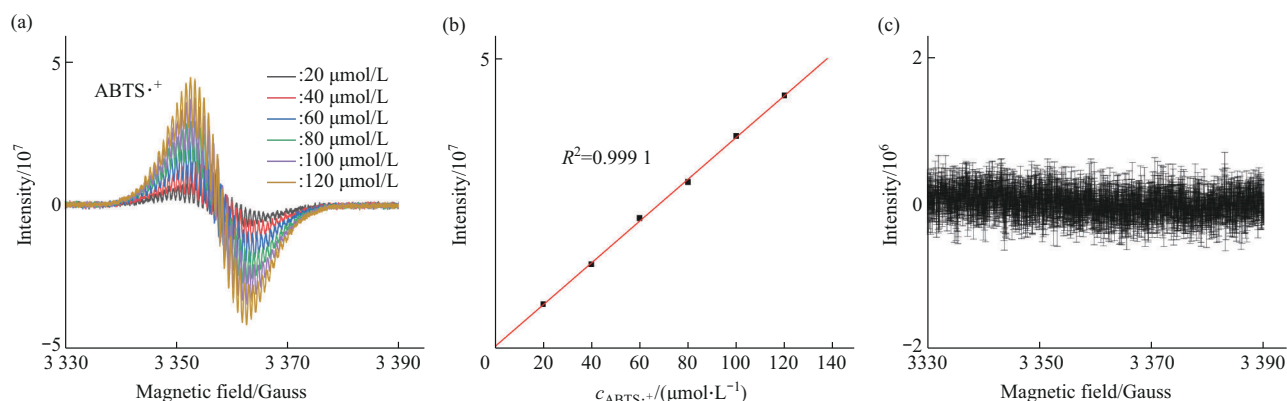


Fig. 2 Assessment of the detection limit for ABTS•+ using EPR spectroscopy

(a) Determination of EPR signals of ABTS•+ at different concentrations. (b) EPR spectra for ABTS•+ with different concentrations (20, 40, 60, 80, 100, 120 μmol/L). (c) PBS buffer as blank sample (error bars: standard deviation, $n=3$).

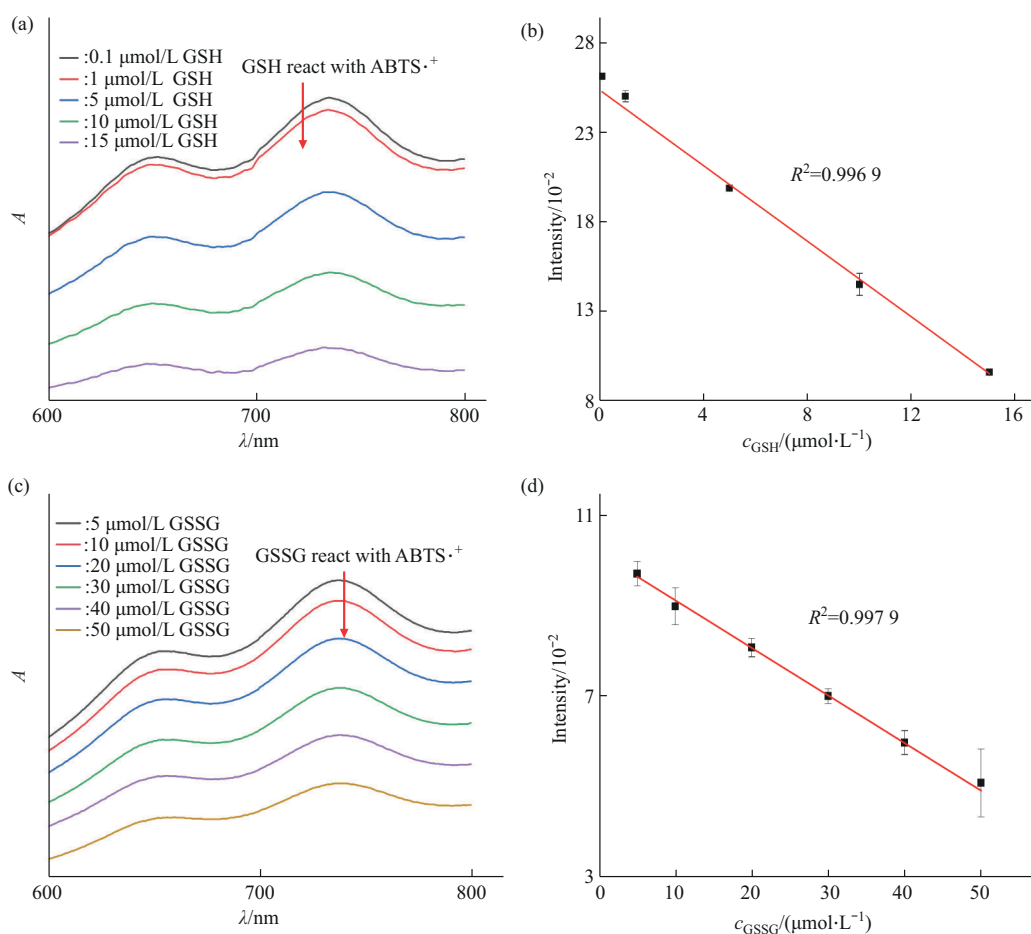


Fig. 3 Determination of stoichiometric ratios in GSH and GSSG reactions with ABTS•+

(a) Incubation at 37°C involving different GSH concentrations (0.1, 1, 5, 10, 15 μmol/L) interacting with ABTS•+ (150 μmol/L) for 20 min, followed by UV-Vis spectrum analysis. (b) Linear regression analysis of data at 734 nm to define the GSH concentration and EPR signal intensity correlation, calculating stoichiometric ratio in GSH and ABTS•+ reaction. (c) Incubation at 60°C involving different GSSG concentrations (5, 10, 20, 30, 40, 50 μmol/L) with ABTS•+ (150 μmol/L) for 60 min, followed by UV-Vis spectrum analysis. (d) Linear regression analysis of data at 734 nm to define the GSSG concentration and EPR signal intensity correlation, calculating stoichiometric ratio in GSH and ABTS•+ reaction.

2.3 确定本方法对GSH和GSSG的检测范围

如图4a所示, GSH浓度的增加导致 $\text{ABTS}\cdot^+$ 的EPR信号强度在特定范围内线性减弱。图4b展示了 37°C 孵育20 min后获得的GSH浓度(0.05~15 $\mu\text{mol/L}$)与 $\text{ABTS}\cdot^+$ 的EPR信号强度之间的线性方程(方程4), 得到的EPR信号强度与GSH浓度之间具有良好的线性关系($R^2=0.9967$)。由于 $\text{ABTS}\cdot^+$ 也能与GSSG发生反应, 所以也发展了对GSSG的检测。但GSSG在 37°C 下与 $\text{ABTS}\cdot^+$ 的反应速率较慢, 为了提高GSSG和 $\text{ABTS}\cdot^+$ 之间的反应速率, 本文将反应温度提高到 60°C 。图4c展示了 $\text{ABTS}\cdot^+$ 的EPR信号强度与GSSG浓度之间的关系。对EPR信号进行处理后, 在 $\text{ABTS}\cdot^+$ 的EPR信号强度和GSSG浓度(100 nmol/L~50 $\mu\text{mol/L}$)之间绘制线性拟合曲线(图4d)。得到的线性方程(方程5)。

$$\text{Signal intensity} = -2.43 \times 10^{11}[\text{GSH}] + 5.40 \times 10^{12}$$

方程4

$$\text{Signal intensity} = -2.62 \times 10^{10}[\text{GSSG}] + 2.48 \times 10^{12}$$

方程5

在整个实验过程中, 将反应体系的pH值维持在7.4。虽然 $\text{ABTS}\cdot^+$ 在酸性条件下更稳定, 但在生理pH条件下对其进行分析更有实际意义。在 37°C 时, $\text{ABTS}\cdot^+$ 的信号衰减较为缓慢, 在 60°C 时, 其信号衰减较为明显。与检测GSH相比, 当检测浓度较低(50 nmol/L)的GSSG时, 反应温度的升高引入了更大的误差并降低了可重复性, 导致无法准确检测到50 nmol/L的GSSG。将本文的GSH检测方法与文献中发表的其他方法的LOD和检测范围进行比较(表1), 发现与表1中从0.72 pmol/L到5 $\mu\text{mol/L}$ 的LOD相比, 本方法表现出相对较低的LOD(0.50 nmol/L)。

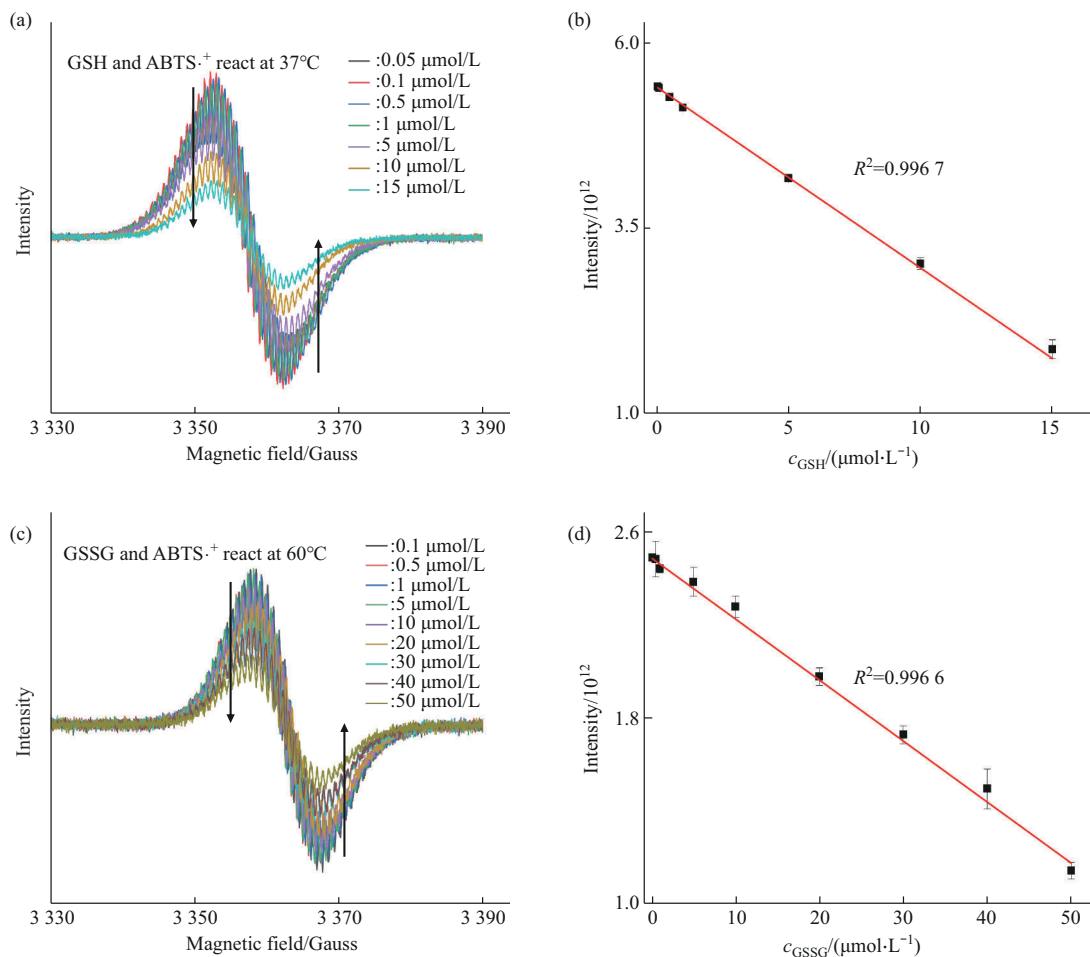


Fig. 4 Sensitive detection of GSH and GSSG by $\text{ABTS}\cdot^+$

(a) EPR spectra for $\text{ABTS}\cdot^+$ in the presence of different concentrations of GSH (0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 15 $\mu\text{mol/L}$). (b) Plot of EPR signal vs GSH concentration and its linear fit. Each experiment was conducted three times, the error bars represent standard deviation. (c) EPR spectra for $\text{ABTS}\cdot^+$ in the presence of different concentrations of GSSG (0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{mol/L}$). (d) Plot of EPR signal vs GSSG concentration and its linear fit. Each experiment was conducted three times, the error bars represent standard deviation.

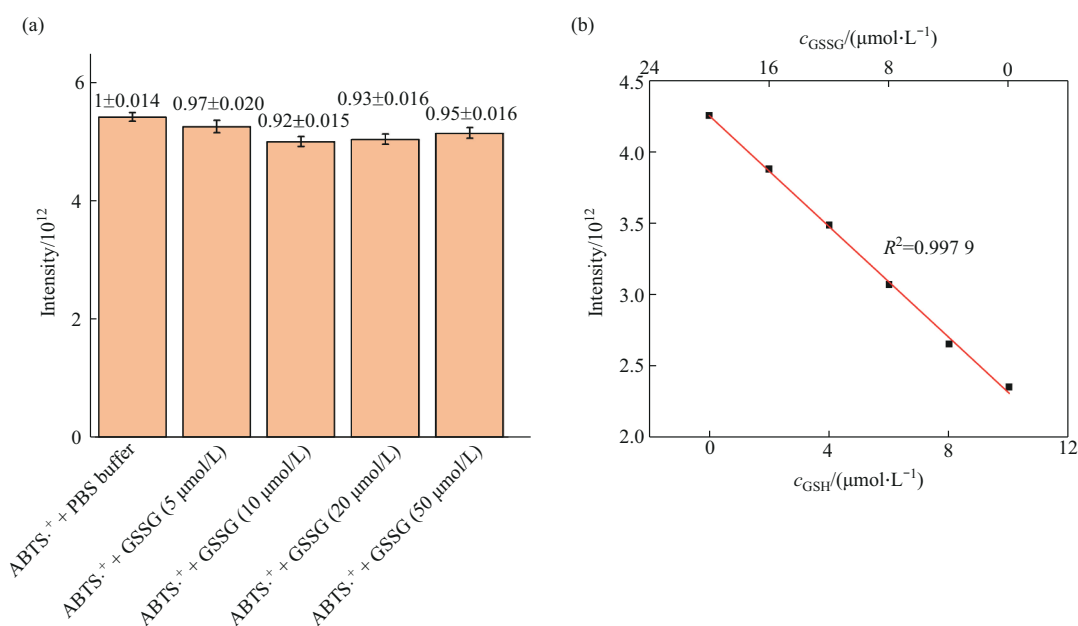
Table 1 Comparison of analytical performance of our work with other publications for the detection of GSH

Method	Principle	LOD (linearity range)	Reference
Centri-Voltammetric	Cu/PTH/GCE	20 nmol/L (20×10 ⁻³ –1×10 ³ μmol/L)	[12]
luminescent probe	Ir(III) complex	1.32 μmol/L (20–300 μmol/L)	[15]
HPLC-UV	ABTS	0.93 μmol/L (4.54–31.8 μmol/L)	[10]
UV-Vis	2-Chloro-1-methylquinolinium tetrafluoroborate	5 μmol/L (5–100 μmol/L)	[30]
Nanozyme	Fe ₃ O ₄ /N-HCS	9.3 nmol/L (0.02–250 μmol/L)	[31]
Hyper-dendritic rolling circle amplification	Circular nucleic acid template	0.72 pmol/L (1×10 ⁻⁶ –1 μmol/L)	[32]
This work	ABTS	0.50 nmol/L (5×10 ⁻² –15 μmol/L)	

2.4 评估37°C条件下GSSG对GSH检测的干扰

为了评估37°C下GSSG对GSH检测的干扰, 设计了两组实验以进一步验证所提出的EPR方法的可靠性。在第一组实验中, 测试前将不同浓度的GSSG (0、5、10、20、50 μmol/L) 与ABTS^{•+} (150 μmol/L) 在37°C下孵育20 min。未加GSSG的组作为对照组。计算实验组和对照组EPR信号的相对强度 (图5a), 发现在当前反应条件下, GSSG对GSH的分析结果没有显著影响。图5b使用Görüçük等^[10]提出的方法来量化每个测试组中GSH和GSSG对ABTS^{•+}的反应性, 确保每个测试组中硫醇化合物的N-乙酰半胱氨酸当量 (N-acetyl

cysteine equivalent, NACE) 一致。分析不同浓度的GSH和GSSG的混合溶液时, 观察到EPR信号强度和GSH浓度仍然呈现线性关系, 并且GSSG的引入并没有影响这种线性关系, 也就说明在37°C孵育20 min的反应条件下GSSG的存在不会干扰GSH的检测。此外, 考虑到生理环境中GSH的浓度显著高于GSSG (GSH在毫摩尔范围, GSSG在微摩尔范围, 低近3个数量级), 并且它们在体内都维持在一个相对稳定的浓度范围内, 因此, 在生理条件下GSSG的存在不会干扰GSH检测。因此, 在实际测试场景中, 可以忽略GSSG对GSH造成的潜在偏差。

**Fig. 5 Interference studies of GSSG on GSH and ABTS^{•+} responses at 37°C**

(a) Determination of the effects of different concentrations of GSSG (5, 10, 20, 50 μmol/L) on EPR signals. (b) Determination of the correlation between GSH and ABTS^{•+} intensity in mixed samples of GSH and GSSG.

此外, 还制备了GSH/GSSG混合溶液, 对混合溶液中GSH和GSSG浓度进行了定量检测。在测定GSSG浓度时, 为了防止GSH对GSSG测试造

成干扰, 预先添加20 mmol/L NEM以掩蔽游离巯基^[27]。再使用3倍样品体积的二氯甲烷萃取多余的NEM, 取上层清液进行测试。表2中给出了理

论上的 GSH 与 GSSG 浓度以及实际检测到的 GSH 和 GSSG 浓度, 使用本文的方法, 成功实现了对体

系中不同形式谷胱甘肽的准确检测。

Table 2 Determination of GSH and GSSG concentrations in mixture based on EPR method

Spiked GSH/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Found GSH/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Recovery/%	RSD/% (n=3)	Spiked GSSG/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Found GSSG/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Recovery/%	RSD/% (n=3)
2	2.004	99.8	2.46	40	40.817	97.96	1.79
	1.901	95.05			40.512	8.72	
	2.062	96.9			39.443	98.61	

2.5 GSH检测方法在生物样品中的应用

为了评估基于 EPR 技术的 GSH 检测方法的实用性和可靠性, 本文分别设计了两组对生物样品进行定性和定量检测实验。研究发现, 低浓度的 VK3 可通过抑制线粒体呼吸功能来抑制细胞增殖; 相反, 高浓度的 VK3 会导致细胞内活性氧类 (ROS) 水平显著增加, 从而诱导由 ROS 介导的细胞死亡^[28]。为获得具有显著差异的结果, 在 HCT116 细胞培养 24 h 后加入 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ VK3 继续培养 4 h, 获取细胞破碎上清液, 进行测试以测定 EPR 信号强度。实验结果如图 6a 所示, 与空白对照组 (ABTS^{•+}+PBS) 相比, 未添加 VK3 的实验组的 EPR 信号强度明显下降, 这表明该实验组中拥有较高浓度的还原性物质。添加较高浓度的 VK3 会引起细胞氧化应激, 从而显著降低还原性物质的浓度, 这导致 ABTS^{•+}信号强度仅有限的下降。这

些实验结果与预期一致。

血液中 GSH 的含量是机体氧化还原状态的重要指标。在哺乳动物血液中, 谷胱甘肽主要以其还原型 (GSH) 存在, 占其总浓度的 99% 以上。为了证明本文方法的实用性, 采集了 C57BL/6J 小鼠的全血, 并测定上清液中 GSH 的浓度。为了保证检测的精确性, 通过梯度稀释将测试样品的 GSH 浓度保持在 1~10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的范围内。浓度计算基于图 4b 所示的标准曲线。此外, 由于血液中的 GSH 主要存在于细胞内, 而血浆中 GSH 浓度很低, GSH 的浓度与血红蛋白浓度是密切相关的, 通常将全血中 GSH 的浓度值表示为每克血红蛋白所含 GSH 的纳摩尔数 (nmol/g)。本实验中小鼠的血红蛋白浓度通过血液分析仪测量得出, 最终结果如图 6b 所示。本文报道的方法得到的全血上清液中 GSH 浓度为 (10 660±706) nmol/g, 与文献报道

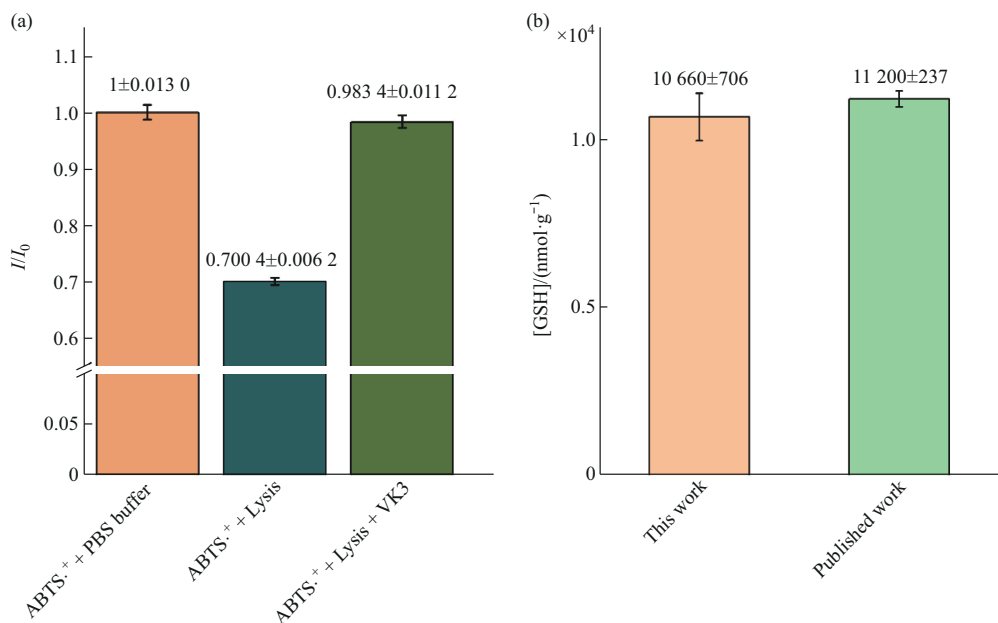


Fig. 6 Application of GSH detection methods in biological samples

(a) Qualitative assessment of redox state in HCT116 cells: analysis of total antioxidant capacity in the blank control group, within cell lysates, and in cell lysates post-VK3 induction. (b) Detection of GSH in whole blood supernatant of mice. Comparison of analytical performance of the work with other publications for the determination of GSH in whole blood supernatant of C57BL/6J mouse.

($11\ 200\pm 237$) nmol/g) 比较吻合^[24]。需要说明的是, 本方案不适合血浆或其他细胞外液, 因为它们的GSH浓度明显偏低(约 $1\sim 2\ \mu\text{mol/L}$, 即约为全血的 $1/1\ 000$), 同时细胞外液中其他硫醇(例如半胱氨酸)的存在会对检测造成严重干扰。因此, 我们不建议将本方案应用于这种情况。

3 结 论

这项工作提出了一种新型的基于EPR的GSH检测方法, 与更为常见的ABTS \cdot^+ 比色法相比, 这种基于EPR开发的检测方法具有更高的灵敏度和更宽的检测范围。基于EPR出色的灵敏度优势, 它可以检测低至 $0.50\ \text{nmol/L}$ 的GSH和 $4.99\ \text{nmol/L}$ 的GSSG, 而且检测范围均超过两个数量级。该方法不仅能够快速检测生物硫醇(还原型), 而且在改变反应温度和时间后, 也可以实现对应的氧化型硫醇的检测, 无需化学还原步骤或谷胱甘肽还原酶。此外, 它还可以进一步开发用于检测溶液中总硫醇化合物或总二硫化物含量。该方法已成功应用于小鼠全血中GSH含量的检测, 具有简便、快速、准确、灵敏度高等优点。

参 考 文 献

- [1] Wu G, Fang Y Z, Yang S, *et al.* Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*, 2004, **134**(3): 489-492
- [2] Griffith O W. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med*, 1999, **27**(9/10): 922-935
- [3] Vázquez-Meza H, Vilchis-Landeros M M, Vázquez-Carrada M, *et al.* Cellular compartmentalization, glutathione transport and its relevance in some pathologies. *Antioxidants*, 2023, **12**(4): 834
- [4] Dalle-Donne I, Milzani A, Gagliano N, *et al.* Molecular mechanisms and potential clinical significance of S-glutathionylation. *Antioxid Redox Signal*, 2008, **10**(3): 445-473
- [5] Giustarini D, Dalle-Donne I, Tsikas D, *et al.* Oxidative stress and human diseases: origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2009, **46**(5/6): 241-281
- [6] Ballatori N, Krance S M, Notenboom S, *et al.* Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem*, 2009, **390**(3): 191-214
- [7] Winther J R, Thorpe C. Quantification of thiols and disulfides. *Biochim Biophys Acta*, 2014, **1840**(2): 838-846
- [8] Qin Y, Fan J, Yang W, *et al.* Endogenous cys-assisted GSH@AgNCs-rGO nanoprobe for real-time monitoring of dynamic change in GSH levels regulated by natural drug. *Anal Chem*, 2020, **92**(2): 1988-1996
- [9] Nuhu F, Gordon A, Sturmeier R, *et al.* Measurement of glutathione as a tool for oxidative stress studies by high performance liquid chromatography. *Molecules*, 2020, **25**(18): 4196
- [10] Görüşük E M, Bekdeşer B, Bener M, *et al.* ABTS radical-based single reagent assay for simultaneous determination of biologically important thiols and disulfides. *Talanta*, 2020, **218**: 121212
- [11] Kim M S, Jung J M, Kang J H, *et al.* A new indazole-based colorimetric chemosensor for sequential detection of Cu^{2+} and GSH in aqueous solution. *Tetrahedron*, 2017, **73**(32): 4750-4757
- [12] Liu B, Ma C, Li Y, *et al.* Voltammetric determination of reduced glutathione using poly(thionine) as a mediator in the presence of Fenton-type reaction. *Talanta*, 2017, **170**: 399-405
- [13] Yang S, Zeng Q, Guo Q, *et al.* Detection and differentiation of Cys, Hcy and GSH mixtures by ^{19}F NMR probe. *Talanta*, 2018, **184**: 513-519
- [14] Liu T, Yue Y, Zhai Y, *et al.* Host-guest type multiple site fluorescent probe for GSH detection in living organisms. *Chem Commun*, 2021, **57**(100): 13764-13767
- [15] Mu X, Li M J, Fu F. Dual-channel luminescent Ir(III) complex for detection of GSH and Hcy/Cys in cells. *Biosens Bioelectron*, 2024, **246**: 115901
- [16] Davies M J. Detection and characterisation of radicals using electron paramagnetic resonance (EPR) spin trapping and related methods. *Methods*, 2016, **109**: 21-30
- [17] Escudero R, Segura J, Velasco R, *et al.* Electron spin resonance (ESR) spectroscopy study of cheese treated with accelerated electrons. *Food Chem*, 2019, **276**: 315-321
- [18] Xia P, Cheng B, Jiang J, *et al.* Localized π -conjugated structure and EPR investigation of $g\text{-C}_3\text{N}_4$ photocatalyst. *Appl Surf Sci*, 2019, **487**: 335-342
- [19] Biller J R, McPeak J E. EPR everywhere. *Appl Magn Reson*, 2021, **52**(8): 1113-1139
- [20] Tian S, Li X, Jiang J, *et al.* Highly sensitive detection of rabbit IgG by electron spin resonance using CuS nanoparticles as probe. *Sens Actuat B Chem*, 2021, **338**: 129835
- [21] Miller N J, Rice-Evans C A. Spectrophotometric determination of antioxidant activity. *Redox Rep*, 1996, **2**(3): 161-171
- [22] Kut K, Cieniek B, Stefaniuk I, *et al.* A modification of the ABTS \cdot^+ decolorization method and an insight into its mechanism. *Processes*, 2022, **10**(7): 1288
- [23] Katalinic V, Modun D, Music I, *et al.* Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2, 2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol*, 2005, **140**(1): 47-52
- [24] Rossi R, Giustarini D, Fineschi S, *et al.* Differential thiol status in blood of different mouse strains exposed to cigarette smoke. *Free Radic Res*, 2009, **43**(6): 538-545
- [25] Ilyasov I R, Beloborodov V L, Selivanova I A, *et al.* ABTS/PP decolorization assay of antioxidant capacity reaction pathways. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(3): 1131
- [26] Tang L, Wang C, Tian S, *et al.* Label-free and ultrasensitive detection of butyrylcholinesterase and organophosphorus

- pesticides by Mn(II)-based electron spin resonance spectroscopy with a zero background signal. *Anal Chem*, 2022, **94**(46): 16189-16195
- [27] Giustarini D, Dalle-Donne I, Milzani A, *et al.* Analysis of GSH and GSSG after derivatization with N-ethylmaleimide. *Nat Protoc*, 2013, **8**(9): 1660-1669
- [28] Sasaki R, Suzuki Y, Yonezawa Y, *et al.* DNA polymerase gamma inhibition by vitamin K3 induces mitochondria-mediated cytotoxicity in human cancer cells. *Cancer Sci*, 2008, **99**(5): 1040-1048
- [29] Walker R B, Everette J D. Comparative reaction rates of various antioxidants with ABTS radical cation. *J Agric Food Chem*, 2009, **57**(4): 1156-1161
- [30] Chwatko G, Kuźniak E, Kubalczyk P, *et al.* Determination of cysteine and glutathione in cucumber leaves by HPLC with UV detection. *Anal Methods*, 2014, **6**(19): 8039-8044
- [31] Zheng Y, Xu D, Sun L, *et al.* Construction of a bioinspired Fe₃O₄/N-HCS nanozyme for highly sensitive detection of GSH. *Colloids Surf A Physicochem Eng Aspects*, 2022, **648**: 129046
- [32] Shang X, Liu F, Hu Y, *et al.* Hyper-dendritic rolling circle amplification for RNA and GSH detection. *Microchem J*, 2020, **153**: 104381

Glutathione Detection Method Based on Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy*

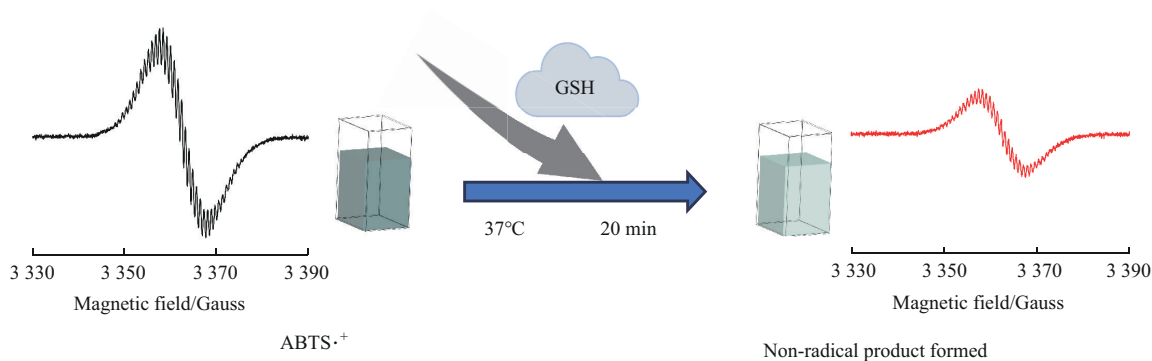
WANG Zhi-Wen¹⁾, KUANG Jian¹⁾, LIU Ao-Kun²⁾, WEI Ruo-Tong²⁾,
YU Lu^{2,3)**}, TIAN Chang-Lin^{1,2,3)**}

¹⁾Department of Chemical Physics, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China;

²⁾High Magnetic Field Laboratory, Hefei Institutes of Physical Science, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China;

³⁾Department of Life Sciences and Medicine, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

Graphical abstract



Abstract Objective Glutathione (γ -glutamyl-L-cysteinylglycine, GSH) is the most abundant non-protein compound containing sulfhydryl ($-SH$) groups in cells. It serves as a source of reducing equivalents, effectively neutralizing harmful reactive substances, and playing a crucial role in maintaining cellular redox balance. Therefore, sensitive detection and accurate measurement of GSH levels in tissues are of great importance. In this work, we presents a novel method for GSH detection utilizing electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. **Methods** Initially, ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate acid)) solution was mixed with $K_2S_2O_8$ solution and reacted in the dark for 12 to 16 h to prepare $ABTS\cdot^+$ solution, which was then quantified using UV-Vis spectroscopy. Subsequently, the concentration of glutathione (GSH) was determined based on the changes in the EPR signal of $ABTS\cdot^+$. On this basis, the optimal reaction time and temperature were explored to establish a standard equation correlating the EPR signal intensity of $ABTS\cdot^+$ with GSH concentration. Finally, the derived standard curve was employed to quantitatively analyze the GSH concentration in whole blood

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (21825703, 21927814), National Key Research and Development Program of China (2019YFA0405600, 2019YFA0706900, 2021YFA1200104, 2022YFC3400500), Strategic Priority Research Program (Category B) (XDB0540200, XDB37040201), Anhui Provincial Major Science and Technology Project (202303a07020004), and Youth Innovation Promotion Association of the Chinese Academy of Sciences (2022455).

** Corresponding author.

YU Lu. Tel: 86-551-63600795, E-mail: luyuesr@ustc.edu.cn

TIAN Chang-Lin. Tel: 86-551-63600872, E-mail: cltian@ustc.edu.cn

Received: March 11, 2024 Accepted: May 9, 2024

from C57BL/6J mice, and the results were compared with those reported in the literature to verify the accuracy of the method. **Results** The experimental results demonstrate that this method has a linear detection range from 50 nmol/L to 15 μ mol/L for GSH, spanning two orders of magnitude, with a limit of detection (LOD) at 0.50 nmol/L. The measured GSH content in mouse whole blood is $(10\ 660\pm 706)$ nmol/g Hb, which agrees with the value of $(11\ 200\pm 237)$ nmol/g Hb as previously reported. Furthermore, a similar method was developed for detection of glutathione disulfide (GSSG) at higher reaction temperature. **Conclusion** This article presents a novel assay for the rapid detection of GSH using the intensity of EPR signal from ABTS \cdot^+ as indicator. This method demonstrates enhanced detection sensitivity and a broader linear range compared to conventional colorimetric methods. Furthermore, we have extended the application of this method to detect GSH content in blood samples efficiently and accurately, offering valuable information for assessing tissue redox balance, thus holding significant potentials.

Key words glutathione assay, electron paramagnetic resonance, ABTS

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0097