

氧化石墨烯纳米片的制备及其对生物硫醇的便携式比色测定

王 焮^{1,2)}, 魏钰卜^{1,2)}, 李玉鹏^{1,2)}, 姚家灿^{1,2)}, 喻 芳^{1,2)}
(1)昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室;
2)现代生物医药产业学院, 云南 昆明 650500)

[摘要] **目的** 开发一种能够实时、快速、可视化检测生物硫醇(MEs)的方法, 为疾病的早期诊断和评估提供有力手段。**方法** 通过改良的 Hummers 方法制备具有优异的类过氧化物酶活性(POD-like)的片状氧化石墨烯(2D GO), 并将比色法与智能手机集成构建快速可视化检测 MEs 的传感策略。**结果** 2D GO 能够催化过氧化氢(H₂O₂)分解产生具有强氧化性的羟基自由基(\cdot OH), 进而将无色 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺(3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine, TMB)氧化为蓝色的ox-TMB, 结合 MEs 的强还原作用对“2D GO+TMB+H₂O₂”比色传感体系显色效果的抑制作用实现了对 MEs 的快速可视化检测。**结论** 基于 2D GO 所构建的比色平台具有较宽的线性检测范围(10 ~ 1000 μ mol/L)以及良好的检测限(LOD < 7 μ M), 并成功用于测定胎牛血清样品中的 MEs, 回收率表现良好。

[关键词] 氧化石墨烯; 生物硫醇; 比色传感; 过氧化物模拟酶

[中图分类号] O656.3 [文献标志码] A [文章编号] 2095 - 610X(2025)02 - 0030 - 07

Preparation of Graphene Oxide Nanosheets and Their Portable Colorimetric Determination of Biothiols

WANG Xin^{1,2)}, WEI Yubo^{1,2)}, LI Yupeng^{1,2)}, YAO Jiacaan^{1,2)}, YU Fang^{1,2)}
(1) College of Pharmacy & Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products of Yunnan Province; 2) The College of Modern Biomedical Industry, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To develop a method capable of real-time, rapid, and visual detection of MEs, providing a powerful tool for early diagnosis and assessment of diseases. **Methods** In this study, flake graphene oxide (2D GO) with excellent peroxidase-like activity (POD-like) was prepared by a modified Hummers' method, and a sensing strategy for the rapid visual detection of MEs was constructed by integrating colorimetry with a smartphone. **Results** 2D GO can catalyse the decomposition of hydrogen peroxide (H₂O₂) to produce highly oxidative hydroxyl radicals (\cdot OH), which oxidize the colourless 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) into blue ox-TMB. The strong reducing effect of MEs on the "2D GO + TMB + H₂O₂" colorimetric sensing system enables rapid visual detection of MEs. **Conclusion** The colorimetric platform constructed based on 2D GO has a wide linear detection range (10-1000 μ mol/L) and a good detection limit (LOD < 7 μ M), and was successfully used for the determination of MEs in foetal bovine serum samples, with satisfactory recovery rates.

[Key words] Graphene oxide; Biothiols; Colorimetric sensing; Peroxide mimics enzymes

[收稿日期] 2024 - 09 - 02

[基金项目] 云南省科学技术厅-昆明医科大学基础研究联合专项基金(202401AY070001-217; 202301AY070001-212); 云南省教育厅科学研究基金(2023Y0796); 昆明医科大学硕士研究生创新基金(2024S018); 昆明医科大学大学生创新创业训练计划(2024CYD405)

[作者简介] 王焮(1999~), 女, 贵州毕节人, 在读硕士研究生, 主要从事生物比色传感器的研究工作。

[通信作者] 姚家灿, E-mail: 739593259@qq.com; 喻芳, E-mail: yufang519@163.com

硫醇在生物体内扮演着至关重要的角色, 其含量的异常与多种疾病的发生发展密切相关。其中最具有代表性的是小分子生物硫醇(biological thiol, MEs): 谷胱甘肽(glutathione, GSH)、半胱氨酸(cysteine, Cys)和高半胱氨酸(homocysteine, Hcy), 因其独有的巯基(-SH)官能团, 参与了许多关键的生理过程和代谢途径。研究表明, GSH 是细胞内含量最高的硫醇, 被誉为细胞的氧化还原中心, 其水平的失衡与衰老、过敏、肿瘤等多种疾病状态密切相关; Cys 是蛋白质合成的重要组成部分, 能够影响细胞的氧化应激反应, Cys 的缺乏亦是过量均会对机体造成不同程度的伤害^[1-4]。Hcy 则是人体中一个重要的中间代谢产物, 高浓度的 Hcy 会导致一系列心血管疾病的发生。因此, 体内 MEs 的精确检测具有重要的应用价值, 诸如多种疾病的早期诊断、病情监测以及治疗效果评估^[5-7]。

迄今为止, 已经提出了多种检测 MEs 的技术, 如电化学发光^[8]、酶联免疫法^[9]、表面增强拉曼光谱^[10]、毛细管电泳法^[11]等。然而, 这些技术大多价格昂贵、操作繁琐、耗时较长, 因此无法实现即时监测 MEs。相比之下, 比色法因其简便易行、成本低廉、颜色直观等优势很好地弥补了传统检测方法的不足, 更具实用性。酶催化是比色测定最常见的方法之一^[12], 可以将检测事件转化为颜色变化。然而天然酶价格昂贵且不稳定使其应用受到局限^[13-14]。近年来, 随着纳米技术的发展, 一种显示着天然酶功能的纳米酶材料被发掘^[15]。其中石墨烯(graphene oxide, GO)是目前自然界中发现“最薄、最强韧”的材料, 在学术界引起了广泛关注, 其高比表面积及大量的活性基

团提供了更多的活性结合位点, 使其具有优异的一类过氧化物酶(POD-like)特性^[16-18]。因此, 基于 GO 构建一种能够快速实时比色检测 MEs 的平台, 是非常必要且有意义的。

本文通过改良的 Hummers 方法制备了具有超薄形貌的片状氧化石墨烯(2D GO)^[19]。鉴于 2D GO 优异的 POD-like 活性, 提出了一种与智能手机集成可视化检测 MEs 的策略。机理见图 1 所示: 2D GO 凭借其高比表面积和大量含氧官能团, 提供了更多的催化位点和反应界面, 有效地催化过氧化氢(H_2O_2)产生更多的活性氧自由基并触发类芬顿反应。这些活性氧自由基可以催化无色的 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺(3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine, TMB)在 652 nm 处产生具有特征吸收峰的蓝色氧化产物 ox-TMB。由于 MEs 的强还原性, 当 MEs 加入到显色体系中, “2D GO+TMB+ H_2O_2 ”比色传感体系的显色会被抑制, 并随着加入的 MEs 浓度的增加, 蓝色褪色越明显。进一步利用智能手机拍照装置和 APP 取色器 v3.1 对溶液颜色的 RGB 值进行采集分析, 实现了对 MEs 的实时智能可视化比色检测。总的来说, 本研究构建的比色传感平台巧妙的通过分析图像相关颜色信息来实现对目标物的定量检测, 具有快速、可靠、简便等特点。

1 材料与方法

1.1 实验材料

谷胱甘肽(GSH)、L-半胱氨酸(Cys)、高半胱氨酸(Hcy)、3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺(TMB)、乙醇($\geq 95\%$)、醋酸钠和醋酸均购置安徽泽升科

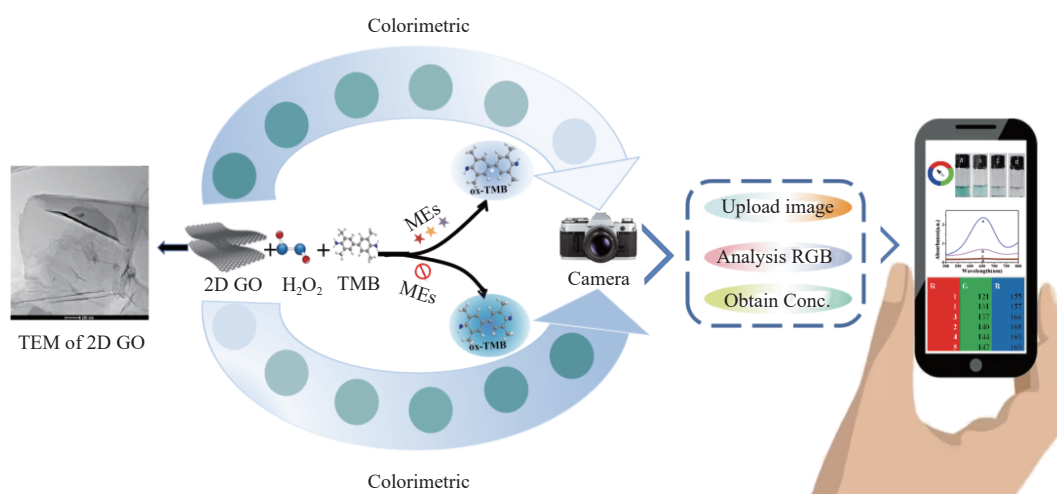


图 1 比色机理图

Fig. 1 Colourimetric mechanism diagram

技术有限公司, 石墨粉购置阿拉丁试剂(上海)有限公司, 硝酸钠购于北京百灵威科技有限公司, 此外实验所需危险试剂 98% 硫酸(H_2SO_4)、5% 盐酸、高锰酸钾和 30% 过氧化氢(H_2O_2)均由学校提供;

分析天平(BSA124S)购于赛多利斯科学仪器(北京)有限公司、电热恒温水浴锅(DZKW-D-1)购于北京市光明医疗仪器有限公司、LCD 数控加热型磁力搅拌器(MS-H-ProA)购于大龙兴创实验仪器(北京)股份公司、紫外-可见分光光度计(UV-4800)购于尤尼柯(上海)仪器有限公司。

1.2 研究方法

1.2.1 2D GO 的制备 2D GO 的制备参考 Hummers 进行了适当修改, 将含有 25 mL 98% H_2SO_4 的圆底烧瓶置于冰水浴中。搅拌下依次加入 1 g 石墨粉、0.5 g 硝酸钠和 3 g 高锰酸钾。35 °C 反应 30 min 后, 在 0 °C 下少量多次地加入 50 mL 纯水, 反应 15 min。加入适量 3% 双氧水, 热过滤, 5% 盐酸清洗滤饼, 纯水离心洗涤产物 GO 至 pH 中性。超声剥离 GO 5 ~ 6 h 获得 2D GO。

1.2.2 MEs 的检测 在含有 TMB (10 mmol/L) 和 H_2O_2 (10 mmol/L) 的 NaAc-HAc (0.2 M, pH = 3.7) 缓冲液中加入 20 μ L 的 2D GO 分散液 (10 μ g/mL) 和 200 μ L 不同浓度的 MEs, 充分混合后于 40 °C 恒温水浴锅中孵育 5 min, 通过紫外-可见分光光度计监测 652 nm 处氧化生成的 ox-TMB 的吸光度值。根据吸光度的变化 ΔA 建立 MEs 的校准曲线, $\Delta A = A - A_0$ (A_0 为无 MEs 时体系的吸光度, A 为有 MEs 时体系的吸光度)。

1.2.3 血清样品的检测 移取 0.5 mL 胎牛血清于离心管中, 混合 1 mL 甲醇, 8000 r/min 离心 15 min 以去除蛋白。将上清液通过 0.22 μ m 微孔膜过滤, N_2 吹干后稀释 100 倍制得血清样品。通过标准加

入法在处理过的血清样品中加入不同浓度的 MEs, 按 1.2.2 方法测定。

2 结果

2.1 方法的可行性

2D GO 在透射电镜下为薄片状见图 2A, 极高的比表面积增强了其催化活性。进一步的预实验表明: 当体系中同时存在 TMB、 H_2O_2 和 2D GO 时, 652 nm 处的吸光度显著升高见图 2B, 表明氧化石墨烯具有 POD-like。与单独的 TMB- H_2O_2 显色体系相比, 2D GO 的加入可以令显色更明显, 具有放大效应。

2.2 显色反应条件的优化

纳米酶类酶催化活性受许多因素的影响。本实验研究了影响检测灵敏度的参数, 包括缓冲溶液的 pH 值 (2.0 ~ 6.0)、反应温度 (30 °C ~ 70 °C)、 H_2O_2 的浓度 (0 ~ 20 mmol/L) 以及 2D GO 的浓度 (2 ~ 100 μ g/mL)。结果见图 3, 当 pH=4、温度为 40 °C 时, 以 10 mM H_2O_2 和 10 μ g/mL 2D GO 触发的显色反应获得最大差值 ΔA , 作为最佳实验条件。

2.3 米氏动力学研究

为了进一步评估 2D GO 的 POD-like 活性催化效率, 通过底物固定原则来考察 2D GO 对另一个底物的稳态动力学行为。从图 4A 和 4C 可以看出, 在一定底物浓度范围内, 2D GO 的催化反应符合典型的 Michaelis-Menten 动力学模型。进一步绘制其初速度与底物浓度相应的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线见图 4B 和 4D, 通过 $1/V$ 与 $1/[S]$ 呈现出的线性曲线的斜率及截距可以计算得到催化反应的表现动力学常数 K_m 和 V_{max} 。从表 1 可

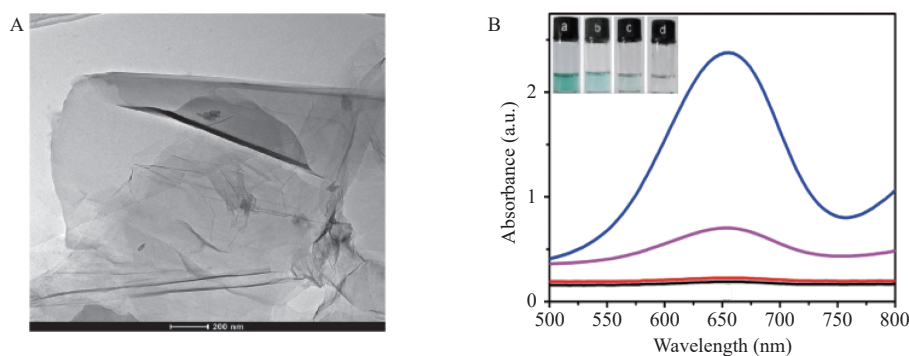


图 2 材料的表征及类酶活性验证

Fig. 2 Characterisation of the materials and validation of enzyme-like activity

A: 2D GO 的 TEM 图像; B: 不同溶液体系的紫外-可见吸收光谱图, 从上到下依次为 a. TMB+ H_2O_2 +2D GO; b. TMB+ H_2O_2 ; c. TMB; d. TMB+GO。

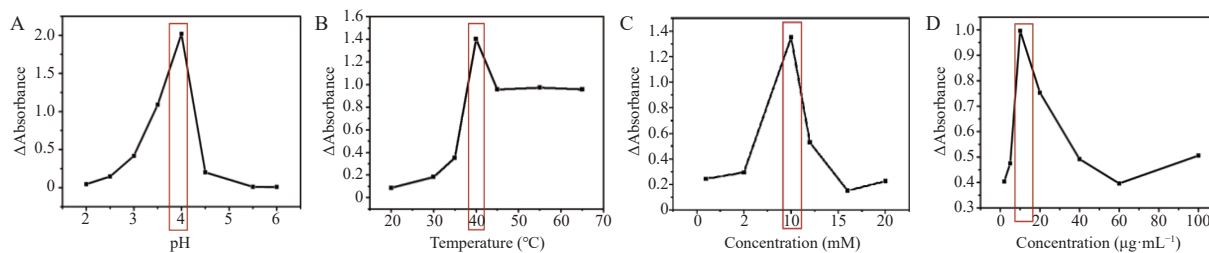


图3 实验条件的优化

Fig. 3 Optimisation of experimental conditions

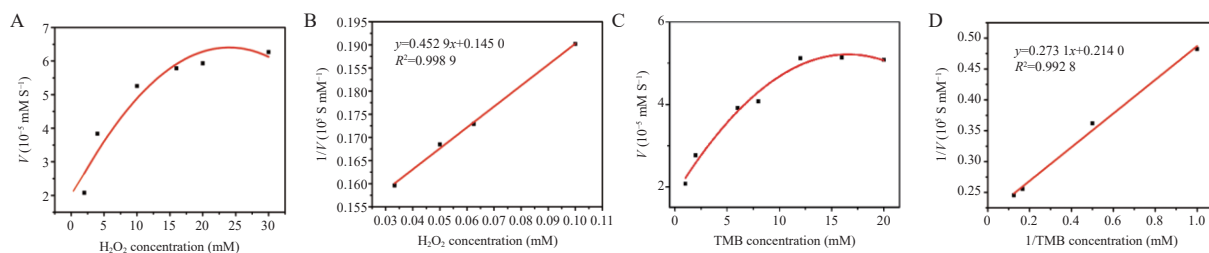
A: pH值; B: 温度; C: H₂O₂浓度; D: 2D GO浓度。

图4 米氏动力学研究

Fig. 4 Michaelis kinetics studies

A和C: 反应速度随H₂O₂或TMB浓度的变化曲线; B和D: H₂O₂或TMB相应的Lineweaver-Burk双倒数曲线。表1 米氏常数(K_m)和最大反应速率(V_{max})的比较Tab. 1 Comparison of Michaelis constants (K_m) and maximum reaction rates (V_{max})

| 纳米酶 | K _m (mmol/L) | | V _{max} (10 ⁻⁸ mol/L/s) | | 参考文献 |
|------------|-------------------------|-------------------------------|---|-------------------------------|------|
| | TMB | H ₂ O ₂ | TMB | H ₂ O ₂ | |
| HRP | 0.4340 | 3.700 | 10.00 | 8.170 | [20] |
| GO-COOH | 0.023 70 | 3.990 | 3.45 | 3.85 | [21] |
| Casein-CuS | 0.355 | 234 | — | — | [22] |
| H-GNs | 5.100 | 2.256 | 4.550 | 5.060 | [23] |
| 2D GO | 1.276 | 3.123 | 4.670 | 6.900 | — |

看到2D GO对底物TMB和H₂O₂均具有较好的亲和力。这主要归功于2D GO的大比表面积及其表面带负电且具有大量含氧官能团。

2.4 分析性能评价

基于2D GO的POD-like活性,在最优条件下检测MEs。从图5A~5C可以看出,随着MEs浓度的增加,吸光度逐渐降低,峰型趋于平缓。且其插图表明不同种类一系列浓度MEs与ΔA均具有良好的线性关系;计算其检测限分别为LOD_(GSH)=3.01 μM、LOD_(Cys)=6.79 μM、LOD_(Hcy)=0.66 μM。

使用APP取色器v3.1捕获每一份溶液的RGB值,为了提高检测的精密度,笔者通过计算RGB值的欧氏距离(euclidean distance, EDs),方程如下:EDs=(ΔR²+ΔG²+ΔB²)^{1/2},以评估手机辅助

定量检测MEs的灵敏度。如图5D~5F所示,不同类别MEs在10~1000 μg/mL浓度范围内与ln[EDs]值均呈良好的线性关系。本工作所构建的比色方法已成功用于三种MEs的检测,并与其他检测MEs方法进行比较。结果见表2,该方法检出限虽不突出,但其线性范围更宽,且检出限与毛细管电泳相比相差不大,虽不如高效液相色谱(HPLC)、质谱法等,但该比色法利用智能手机辅助可以实现生物硫醇的快速定量,更加快速便捷,同时为医学研究中MEs的现场分析提供了一种有发展潜力且高效的思路。

2.5 比色传感平台在实际中的应用

为了评估所建立方法在实际应用中的可行性,笔者通过标准加入法对胎牛血清中的MEs进行了检测,并使用APP取色器v3.13对溶液颜色进行

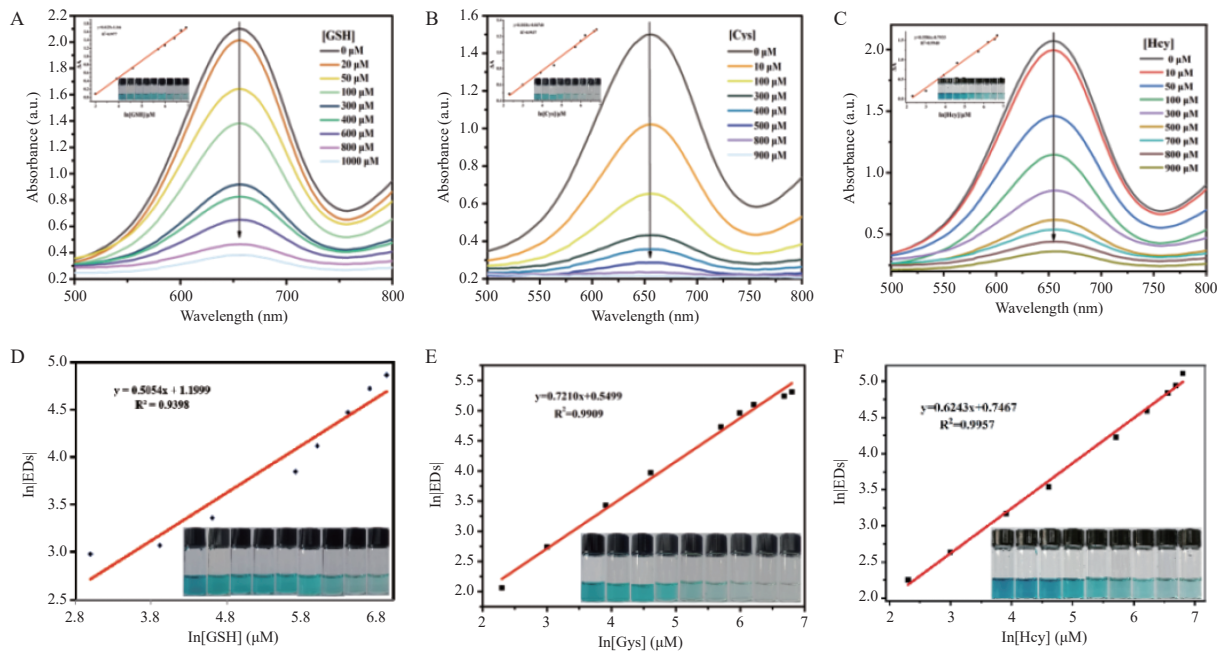


图 5 检测性能的评估

Fig. 5 Evaluation of detection performance

A ~ C: TMB+H₂O₂+2D GO 体系中加入不同浓度 MEs 的紫外-可见吸收光谱图(插图为不同浓度 MEs 与 ΔA 的线性关系图); D ~ F: 不同浓度 MEs 与通过智能手机辅助计算欧氏距离 EDs 的相关系数图。

表 2 不同方法检测 MEs 的比较

Tab. 2 Comparison of different methods for detecting MEs

| 催化剂 | 方法 | 物质 | 线性范围 | 检出限 | 参考文献 |
|---------------------------|--------|--------------------|---|-------------|------|
| mBrB | 毛细管电泳 | GSH | 7.5 ~ 100 μmol/L | 1.41 μmol/L | [24] |
| TCNQ 和 GO协同 | 电化学分析法 | GSH | 0.25 ~ 124.3 μmol/L, 124.3 μmol/L ~ 1.67 mmol/L | 0.15 μmol/L | [25] |
| MNPG | 荧光法 | GSH | 0.2 ~ 20 μmol/L | 0.05 μmol/L | [26] |
| 7 氟苯并-2-氧杂 -1, 3-二唑-4-磺酸铵 | 高效液相色谱 | Cys、Hcy、CysGly、GSH | 0.5 ~ 15 μmol/L | 0.10 μmol/L | [27] |
| BrDMC | 质谱法 | GSH | 1.0 ~ 100.0 μmol/L | 0.4 μmol/L | [28] |
| 2D GO | 比色法 | Hcy | 10 ~ 1000 μmol/L | 0.66 μmol/L | 本工作 |

识别定量, 计算其回收率。进一步将智能手机软件辅助检测 MEs 的实验结果与紫外-可见光谱法检测 MEs 的数据进行比较。结果见表 3: 与智能

手机集成的比色传感平台对胎牛血清中 MEs 检测的相对回收率为 88.4 ~ 107.9%, 表明该方法在实际应用中具有潜在应用价值。

表 3 胎牛血清加标实验中 MEs 检测结果

Tab. 3 Detection results of MEs in fetal bovine serum spiking assays

| 样品 | 加标量 (μmol/L) | 紫外-可见光谱法 | | | 手机可视化比色法 | | |
|-----|--------------|------------|--------|-------------|------------|--------|-------------|
| | | 检测(μmol/L) | 回收率(%) | RSD(n=3, %) | 检测(μmol/L) | 回收率(%) | RSD(n=3, %) |
| GSH | 0 | 55.20 | — | 4.3 | 7.80 | — | 4.9 |
| | 50 | 101.90 | 96.90 | 7.0 | 60.99 | 105.5 | 2.6 |
| | 400 | 458.74 | 100.8 | 3.3 | 411.82 | 101.0 | 0.5 |
| | 800 | 851.42 | 99.6 | 6.5 | 871.99 | 107.9 | 1.0 |
| Cys | 0 | 13.55 | — | 4.3 | 11.15 | — | 4.9 |
| | 50 | 60.20 | 94.20 | 7.9 | 65.90 | 107.8 | 4.3 |
| | 400 | 411.47 | 99.50 | 7.7 | 403.83 | 98.20 | 1.4 |
| | 800 | 817.99 | 100.5 | 6.3 | 716.78 | 88.40 | 0.5 |
| Hcy | 0 | 10.40 | — | 7.2 | 11.50 | — | 6.2 |
| | 50 | 61.22 | 99.50 | 2.0 | 62.27 | 100.9 | 5.6 |
| | 400 | 408.90 | 99.50 | 1.7 | 411 | 99.90 | 2.1 |
| | 800 | 813.00 | 100.3 | 0.4 | 811.4 | 100.1 | 1.1 |

3 讨论

本文通过改良的 Hummers 方法成功合成了具有优异 POD-like 活性的超薄纳米片 2D GO。该材料在酸性条件下, 能够催化 H_2O_2 产生 $\cdot OH$, 使 TMB 氧化成蓝色的 ox-TMB, 利用 MEs 的强还原性, 随着检测体系中 MEs 浓度的增加, 产生的 ox-TMB 越少, 溶液颜色肉眼可见的从有色到无色, 这种感官上的认识结合智能手机的拍照技术获取 RGB 值进行分析^[29], 提出了一种快速可视化检测 MEs 的方案。这种将智能手机可视化与新兴纳米酶显色比色法相结合, 用以建立具有快速便捷和即时检测等优点的新型 MEs 检测方法具有较大的应用潜能。正如预期那样, 本工作在应用中通过加标回收法取得了良好的回收率, 同时具有操作简单、检测时间短、仪器要求低等优点, 弥补了其它方法成本高、需借助大型检测仪器等缺点, 并且有望进一步开发应用于临床医学对疾病的早期诊断与评估。

[参考文献]

- [1] Dai J, Ma C G, Zhang P, et al. Recent progress in the development of fluorescent probes for detection of biothiols[J]. *Dyes Pigm*, 2020, 177(3): 108321.
- [2] Yin C X, Xiong K M, Huo F J, et al. Fluorescent probes with multiple binding sites for the discrimination of Cys, Hcy, and GSH[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, 56(43): 13188–13198.
- [3] Chen X, Zhou Y, Peng X, et al. Fluorescent and colorimetric probes for detection of thiols[J]. *Chem Soc Rev*, 2010, 39(6): 2120–2135.
- [4] Jung H S, Chen X, Kim J S, et al. Recent progress in luminescent and colorimetric chemosensors for detection of thiols[J]. *Chem Soc Rev*, 2013, 42(14): 6019–6031.
- [5] Yue Y, Huo F, Ning P, et al. Dual-site fluorescent probe for visualizing the metabolism of Cys in living cells[J]. *J Am Chem Soc*, 2017, 139(8): 3181–3185.
- [6] Xu T, Zhao S J, Wu X L, et al. β -Cyclodextrin-promoted colorimetric and fluorescence turn-on probe for discriminating highly toxic thiophenol from biothiols[J]. *ACS Sustainable Chem Eng*, 2020, 8(16): 6413–6421.
- [7] Chen H, Tang Y G, Lin W Y, et al. Recent progress in the fluorescent probes for the specific imaging of small molecular weight thiols in living cells[J]. *Trends Analyt Chem*, 2016, 76: 166–181.
- [8] Liu X R, Qian M P, Zhang C X, et al. Bis-cyclometalated Ir(III) complex-based electrogenerated chemiluminescence sensor array for discriminating three biothiols[J]. *JOAT*, 2020, 4(2): 114–121.
- [9] Li Z H, Li Z H, Sun S G, et al. Design and characterization of methyl mercaptan biosensor using alcohol oxidase[J]. *Sens Actuators B Chem*, 2014, 192: 680–684.
- [10] Shen Y, Yue J, Shi W, et al. Target-triggered hot spot dispersion for cellular biothiol detection via background-free surface-enhanced Raman scattering tags[J]. *Biosens Bioelectron*, 2020, 151: 111957.
- [11] Tu F Q, Zhang L Y, Guo X F, et al. Dual labeling for simultaneous determination of nitric oxide, glutathione and cysteine in macrophage RAW264.7 cells by microchip electrophoresis with fluorescence detection[J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1359: 309–316.
- [12] Duan W, Qiu Z, Cao S, et al. Pd-Fe₃O₄ Janus nanozyme with rational design for ultrasensitive colorimetric detection of biothiols[J]. *Biosens Bioelectron*, 2022, 196: 113724.
- [13] Wang X Y, Hua Y H, Wei H, et al. Nanozymes in bionanotechnology: From sensing to therapeutics and beyond[J]. *Inorg Chem Front*, 2016, 3(1): 41–60.
- [14] Lin S, Zhang Y, Cao W, et al. Nucleobase-mediated synthesis of nitrogen-doped carbon nanozymes as efficient peroxidase mimics[J]. *Dalton Trans*, 2019, 5, 48(6): 1993–1999.
- [15] Gao L Z, Zhuang J, Nie L, et al. Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles[J]. *Nat Nanotechnol*, 2007, 2(9): 577–583.
- [16] Guo S J, Wang E K. Noble metal nanomaterials: Controllable synthesis and application in fuel cells and analytical sensors[J]. *Nano Today*, 2011, 6(3): 240–264.
- [17] Vashist S K, Luong J H T. Recent advances in electrochemical biosensing schemes using graphene and graphene-based nanocomposites[J]. *Carbon Lett*, 2015, 84: 519–550.
- [18] Reina G, González-Domínguez J M, Criado A, et al. Promises, facts and challenges for graphene in biomedical

- applications[J]. *Chem Soc Rev*, 2017, 46(15): 4400–4416.
- [19] Saleh B D, Abdulwahhab G H, Ahmed S M R. Preparation and characterization of graphene oxide nanoparticles derived from wheat straw[J]. *Mater Today*, 2023, 80(2): 860–869.
- [20] Wu S, Tian J, Xie N, et al. A sensitive, accurate, and high-throughput gluco-oligosaccharide oxidase-based HRP colorimetric method for assaying lytic polysaccharide monoxygenase activity[J]. *Biofuel Bioprod Biorefin*, 2022, 15(1): 1–15.
- [21] Song Y J, Qu K G, Zhao C, et al. Graphene Oxide: Intrinsic peroxidase catalytic activity and its application to glucose detection[J]. *Adv Mater*, 2010, 22(19): 2206–2210.
- [22] Liu Y, Jin H, Zou W, et al. Protein-mediated sponge-like copper sulfide as an ingenious and efficient peroxidase mimic for colorimetric glucose sensing[J]. *RSC Adv*, 2020, 10(48): 28819–28826.
- [23] Guo Y J, Deng L, L J, et al. Hemin-graphene hybrid nanosheets with intrinsic peroxidase-like activity for label-free colorimetric detection of single-nucleotide polymorphism. *ACS Nano*, 2011, 5(2): 1282–1290.
- [24] Pérez-Rama M, Abalde J, Herrero C, et al. A capillary zone electrophoresis for determination of thiolic peptides in biological samples[J]. *J Sep Sci*, 2009, 32(12): 2152–2158.
- [25] 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.
- [26] Zhang H J, Chen J, Yang Y L, et al. Discriminative detection of glutathione in cell lysates based on oxidase-like activity of magnetic nanoporous graphene[J]. *Anal Chem*, 2019, 91(8): 5004–5010.
- [27] Ferin R, Pavão M L, Baptista J. Methodology for a rapid and simultaneous determination of total cysteine, homocysteine, cysteinylglycine and glutathione in plasma by isocratic RP-HPLC[J]. *J Chromatogr B*, 2012, 911: 15–20.
- [28] Feng C H, Huang H Y, Lu C Y. Quantitation of the glutathione in human peripheral blood by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry coupled with micro-scale derivatization[J]. *Anal Chim Acta*, 2011, 690(2): 209–214.
- [29] Shi R, Yang J, Cheng S Q, et al. Colorimetric determination of biothiols with AuNPs@MoS₂ NSs as peroxidase mimetic enzyme[J]. *New J Chem*, 2022, 46(39): 18718–18723.