



# 基于碳酸锰纳米氧化酶活性调控比色检测谷胱甘肽

张藜<sup>†</sup>, 闵远洪<sup>†</sup>, 付文升, 张文东, 王燚<sup>\*</sup>

活性物质生物技术教育部工程研究中心, 绿色合成与应用重庆市重点实验室, 重庆师范大学化学学院, 重庆 401331

<sup>†</sup>同等贡献

<sup>\*</sup>通讯作者, E-mail: ywang@cqnu.edu.cn

收稿日期: 2022-04-12; 接受日期: 2022-05-05; 网络版发表日期: 2022-07-04

国家自然科学基金(编号: 21775014)、重庆市高校创新研究群体(编号: CXQT21015)和重庆市自然科学基金(编号: cstc2021ycjh-bgzxm0037)资助项目

**摘要** 纳米氧化酶是一类具有类似天然氧化酶催化特性的纳米材料. 调控纳米氧化酶的催化活性在生物传感和临床诊疗等应用领域具有重要意义. 本文通过一步水热法制备了具有高效类氧化酶活性的碳酸锰纳米颗粒( $\text{MnCO}_3$  NPs), 其能够快速催化溶解氧产生活性氧自由基, 从而催化氧化无色底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)发生显色反应, 其蓝色氧化态产物(oxTMB)在652 nm波长处展现出特征吸收峰. 进一步研究发现, 在该显色体系中加入谷胱甘肽(GSH)后 $\text{MnCO}_3$  NPs催化氧化TMB的反应受到抑制, 蓝色产物oxTMB的生成减少, 652 nm处的吸光度减弱且与GSH的浓度在一定范围内呈线性关系. 基于该原理, 本文构建了一种基于 $\text{MnCO}_3$  NPs类氧化酶活性调控比色检测GSH的新方法, 并成功将其用于血清中GSH含量的测定. 借助智能手机的拍照和色度分析功能, 本文还开发了一种利用智能手机作为检测终端的便携式分析方法用于GSH的检测, 该方法有望进一步扩展到床边检测与疾病诊断.

**关键词** 碳酸锰, 纳米酶, 谷胱甘肽, 手机检测, 比色分析

## 1 引言

谷胱甘肽(GSH)是一种含 $\gamma$ -酰胺键和巯基的三肽, 由谷氨酸、半胱氨酸及甘氨酸组成. 它是一种细胞内重要的调节代谢物质, 参与体内三羧酸循环及糖代谢, 并能激活多种酶, 在人体生命活动中扮演着非常重要的角色<sup>[1]</sup>. 同时, GSH还能帮助保持正常的免疫系统功能, 具有抗氧化及整合解毒作用. 体内GSH水平异常与

阿尔兹海默病、艾滋病、癌症、肝损伤、心血管等多种疾病的发病有关<sup>[2-7]</sup>. 因此, 开发简单、可靠的GSH检测方法在生物医学和疾病诊疗方面具有重要的意义. 当前, 各种分析技术已被开发用于检测GSH, 如碘量法<sup>[8]</sup>、高效液相色谱法<sup>[9]</sup>、毛细管电泳法<sup>[10]</sup>、质谱法<sup>[11]</sup>、荧光法<sup>[12]</sup>、比色法<sup>[13-17]</sup>等. 其中, 比色法具有操作简便、成本低、易于实现床边检测等优势, 但如何进一步提高比色法检测GSH的选择性仍具有挑战

引用格式: Zhang L, Min Y, Fu W, Zhang W, Wang Y. Colorimetric detection of glutathione through tuning the oxidase-like activity of  $\text{MnCO}_3$  nanoparticles. *Sci Sin Chim*, 2022, 52: 1178–1186, doi: 10.1360/SSC-2022-0069

性. 例如, 常用的DTNB (Ellman试剂)法是基于5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)与GSH的巯基反应生成黄色的5-硫代-2-硝基苯甲酸, 利用该黄色产物在412 nm波长处的最大吸光度实现GSH的含量测定<sup>[18,19]</sup>. 但含巯基化合物均可以断裂DTNB的二硫键生成上述黄色产物, 因此该方法无法避免其他含游离巯基的分子对GSH检测的影响.

纳米酶因具有比天然酶更稳定、活性可调、成本低、易于批量制备和储存等优势, 近年来已在生物传感、食品安全、环境保护、疾病诊断与治疗等领域得到广泛应用<sup>[20-25]</sup>. Mn基纳米材料由于价态和结构可调、制备方法多样、催化活性高, 是用于设计不同功能和用途纳米酶的理想材料. 据报道, Mn基氧化物(如MnO、MnO<sub>2</sub>、Mn<sub>2</sub>O<sub>3</sub>和Mn<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)<sup>[26-29]</sup>、Mn基金属有机框架<sup>[30]</sup>以及Mn单原子纳米材料<sup>[31]</sup>等已被成功设计和制备, 并表现出不同种类的模拟酶活性, 如类似过氧化物酶(POD)、氧化酶(OXD)、过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)等性质. 但针对Mn基碳酸盐的模拟酶性质研究当前鲜有报道.

鉴于此, 本文以高锰酸钾为锰源, 碳酸胍为还原剂, 乙醇胺为辅助剂, 通过简单的一步水热法制备了具有类氧化酶活性的碳酸锰纳米颗粒(MnCO<sub>3</sub> NPs) (图1a). 在酸性条件下(pH 4.0), MnCO<sub>3</sub> NPs能将无色的底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)快速氧化为蓝色的氧化态产物(oxTMB), 其在652 nm波长处出现一个明显的特征吸收峰. 而GSH可通过还原作用抑制TMB的催化氧化过程, 随着GSH浓度的增加反应体系在652 nm处的吸光度逐渐减小, 溶液颜色也由蓝色逐渐变浅(图1b). 基于该原理, 我们建立了一种简便、快速的GSH比色分析新方法, 并成功用于人血清样品中GSH含量的检测. 进一步借助智能手机的拍照和色度分析功能, 本文还开发了一种基于智能手机检测终端的便携式分析方法用于GSH检测.

## 2 实验部分

### 2.1 试剂与仪器

谷胱甘肽、乙醇胺、邻苯二胺(OPD)、2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、碳酸胍、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)、对苯醌(PBQ)和硫

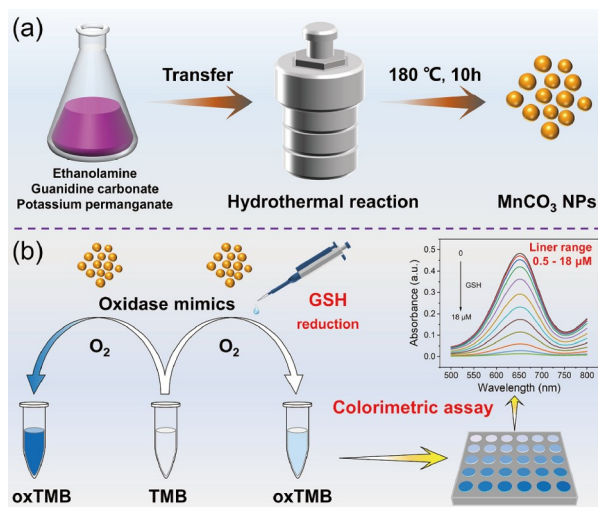


图1 (a) MnCO<sub>3</sub> NPs的合成方法示意图; (b) 基于MnCO<sub>3</sub> NPs类氧化酶活性调控比色检测GSH的示意图(网络版彩图)

Figure 1 Illustration of (a) the synthesis of MnCO<sub>3</sub> NPs and (b) GSH detection based on the regulation of oxidase-like activity of MnCO<sub>3</sub> NPs (color online).

脲(Thiourea)均购自阿拉丁化学试剂有限公司(上海, 中国). 色氨酸(TPR)购自国药集团(上海, 中国). 高锰酸钾、氯化钠购自川东化工试剂有限公司(重庆, 中国). 冰乙酸和乙酸钠购自科龙化工试剂厂(成都, 中国). 所有实验试剂均为分析纯级别, 实验用水均为超纯水(18.2 MΩ cm).

岛津UV-2550型紫外-可见吸收光谱仪(日本); 日立SU8020型场发射扫描电子显微镜(SEM, 日本); FEI Talos F200X场发射透射电子显微镜(TEM, 美国); ThermoFisher ESCALAB 250Xi型X射线光电子能谱仪(XPS, 美国); 岛津Lab XRD-6100型多功能X射线衍射仪(XRD, 日本); 布鲁克A300-10/12型电子顺磁共振仪(EPR, 德国); 布鲁克海文NanoBrook Omni粒度仪(美国); 小米Redmi 7 pro型智能手机(中国).

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 MnCO<sub>3</sub> NPs的合成

准确称取0.45 g碳酸胍和0.316 g高锰酸钾加入到含54 mL超纯水和9 mL乙醇胺的混合液中, 超声溶解得到暗红色溶液, 转移至100 mL聚四氟乙烯反应釜中, 在180℃烘箱中反应10 h. 待反应釜自然冷却至室温后, 产物以8000 r min<sup>-1</sup>离心10 min, 用无水乙醇和超纯水交替洗涤4次, 60℃下烘干样品.

### 2.2.2 $\text{MnCO}_3$ NPs的类氧化酶性质研究

将不同显色底物TMB/OPD/ABTS ( $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ )分别加入到含有 $\text{MnCO}_3$  NPs分散液( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ )和0.5 mL HAc-NaAc缓冲液(pH 4.0)的混合液中,用超纯水将反应体积补充至2 mL,混合均匀后在室温下反应10 min,用紫外-可见吸收光谱仪测量反应溶液的吸收光谱。

### 2.2.3 $\text{MnCO}_3$ NPs催化氧化TMB的动力学研究

在最佳反应条件下,以底物TMB的浓度为变量,将不同浓度TMB ( $10\sim 200 \mu\text{g mL}^{-1}$ )分别加入到含有 $\text{MnCO}_3$  NPs分散液( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ )和0.5 mL HAc-NaAc缓冲液(pH 4.0)的混合液中,用超纯水将反应体积补充至2 mL,立即用紫外-可见吸收光谱仪监测反应体系在波长652 nm处的吸光度值随反应时间的变化情况。根据米氏方程 $V_0 = V_{\max} [S] / (K_m + [S])$ 计算出米氏常数 $K_m$ 和最大反应速率 $V_{\max}$  ( $V_0$ 为初始反应速率,  $[S]$ 为底物浓度,  $K_m$ 为达到最大反应速率一半时对应的底物浓度)。

### 2.2.4 GSH的定量检测

将不同浓度GSH标准溶液( $0\sim 20 \mu\text{M}$ )分别加入到含有 $\text{MnCO}_3$  NPs分散液( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ )、底物TMB ( $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ )和0.5 mL HAc-NaAc缓冲液(pH 4.0)的混合液中,用超纯水将反应体积补充至2 mL,混合均匀后在室温下反应10 min,用紫外-可见吸收光谱仪测量反应溶液的吸收光谱,记录波长652 nm处的吸光度值。

### 2.2.5 实际样品中GSH的检测

将人血清样品通过离心和稀释适当倍数进行预处理后,将不同浓度GSH标准溶液(3、5、8  $\mu\text{M}$ )分别加入到含有 $\text{MnCO}_3$  NPs分散液( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ )、底物TMB ( $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ )、50  $\mu\text{L}$ 人血清样和0.45 mL HAc-NaAc缓冲液(pH 4.0)的混合液中,用超纯水将反应体积补充至2 mL,混合均匀后在室温下反应10 min,用紫外-可见吸收光谱仪测量反应溶液的吸收光谱,记录波长652 nm处的吸光度值。

## 3 结果与讨论

### 3.1 $\text{MnCO}_3$ NPs的表征

通过SEM和TEM对样品的形貌和元素组成进行

表征。从图2a~d可知,所合成的 $\text{MnCO}_3$  NPs呈类球形,尺寸大小均匀,统计结果显示其平均粒径为 $69.0 \pm 1.0 \text{ nm}$  (图2h)。动态光散射(DLS)测量结果也显示其水合粒径分布较窄,尺寸稍大于TEM统计结果(图S1)。图2e, f为样品的高分辨TEM结果,通过测量得到一系列晶面间距2.49、3.21、2.73、2.83 Å,分别对应于 $\text{MnCO}_3$ 的(202)、(211)、(024)、(116)晶面<sup>[32]</sup>,证明了 $\text{MnCO}_3$  NPs的成功合成。此外,从图中还能观察到 $\text{MnCO}_3$  NPs的表面存在大量晶格缺陷(图2f红色箭头和图S2黄色圆圈处,见网络版补充材料),这将使其在催化反应中可能暴露更多的催化活性位点。能谱(EDS)测定显示C、O、Mn元素均匀分布在 $\text{MnCO}_3$  NPs中,其原子占比分别为15.73%、60.22%和24.04% (图2g, i),其中O/C比例大于3:1可能是由于纳米颗粒表面存在部分吸

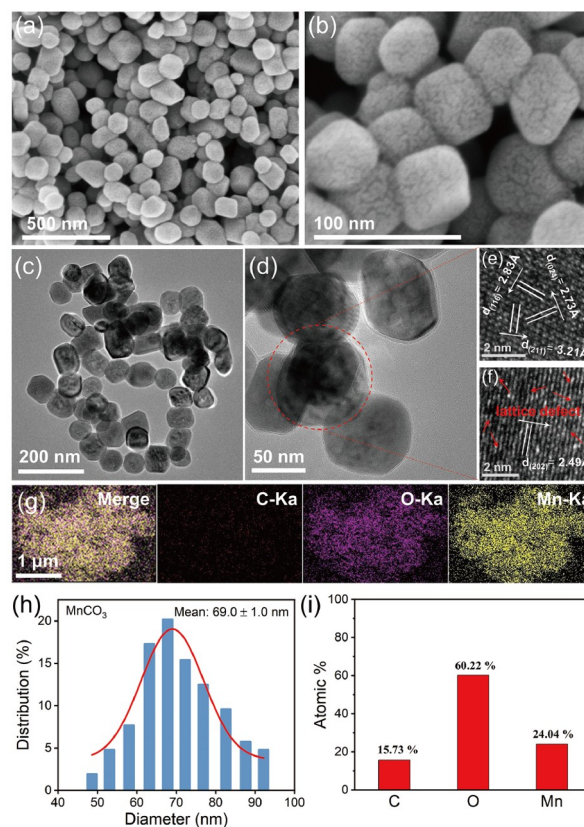


图2  $\text{MnCO}_3$  NPs形貌和元素表征。(a, b) SEM; (c~f) TEM和高分辨TEM; (g) 元素分布; (h) 粒径分布; (i) 原子占比(网络版彩图)

Figure 2 Morphological and elemental characterizations of  $\text{MnCO}_3$  NPs. (a, b) SEM images; (c~f) TEM and HR-TEM images; (g) elemental mapping; (h) particle size distribution; (i) atomic ratio of C, O, and Mn (color online).

附氧.

通过粉末XRD对 $\text{MnCO}_3$  NPs的晶体结构进行了表征. 如图3a所示, 样品的XRD衍射峰与 $\text{MnCO}_3$ 标准卡片(PDF:44-1472)的衍射峰匹配良好, 且样品具有良好的结晶度和纯度. 进一步通过XPS对 $\text{MnCO}_3$  NPs的表面元素组成和价态进行了分析. 如图3b所示,  $\text{MnCO}_3$  NPs的全光谱扫描结果显示了分别归属于C 1s、O 1s、Mn 2p、Mn 3s的光电子谱线. 进一步分析可知, Mn 2p轨道裂分为Mn 2p<sub>1/2</sub> (653.2 eV)和Mn 2p<sub>3/2</sub> (641.5 eV)两个峰, 其中不对称的Mn 2p<sub>3/2</sub>可细分为结合能分别为646.1、642.8、641.6和640.6 eV的4组峰(图3c), 分别归属于Mn (II)的卫星峰,  $\text{Mn}^{4+}$ 、 $\text{Mn}^{3+}$ 和 $\text{Mn}^{2+}$  [33~36]; Mn 3s高分辨光谱显示两峰之间的结合能差值 $\Delta E=6.0$  eV (图3d), 证实了样品表面的Mn元素主要以 $\text{Mn}^{2+}$ 形式存在[37]; O 1s高分辨光谱显示样品中存在晶格氧(529.8 eV)和吸附氧(531.5 eV) (图3e), 再次证明 $\text{MnCO}_3$ 的表面吸附有大量的溶解氧; C 1s高分辨光谱也表明 $\text{CO}_3^{2-}$  (289.3 eV)的存在(图3f) [35~38]. XPS实验结果充分说明了 $\text{MnCO}_3$  NPs的成功合成, 且其表面可以吸附大量氧分子.

### 3.2 $\text{MnCO}_3$ NPs的类氧化酶性质研究

本文以三种不同显色底物探究了 $\text{MnCO}_3$  NPs的类氧化酶活性. 研究发现, 在无 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的条件下,  $\text{MnCO}_3$  NPs能分别直接催化氧化无色底物TMB、OPD、ABTS发生显色反应, 其相应的氧化态产物分别显蓝色、黄色和绿色, 并分别在652、450和415 nm处产生最大吸收(图4a). 进一步以TMB为底物[39], 考察了 $\text{MnCO}_3$  NPs作为类氧化酶的催化性能及最佳反应条件.  $\text{MnCO}_3$  NPs催化TMB显色的动力学研究表明, 在不加入催化剂的情况下, TMB不能被水中的溶解氧所氧化, 30 min内反应液在652 nm处的吸光度几乎保持不变; 而当加入 $\text{MnCO}_3$  NPs后, 反应液在652 nm处的吸光度显著增大且在8 min内达到最大值, 而后一直保持不变(图4b). 该现象表明 $\text{MnCO}_3$  NPs确实可以加速TMB被氧化显色这一过程. 此外, 溶液的酸度对 $\text{MnCO}_3$  NPs催化氧化TMB显色也有明显的影响. 如图4c所示, 当反应溶液的pH值在3.5~5.5之间时, 测得652 nm处的吸光度最大且保持稳定, 说明在弱酸性条件下 $\text{MnCO}_3$  NPs的类氧化酶活性最高. 固定催化剂用

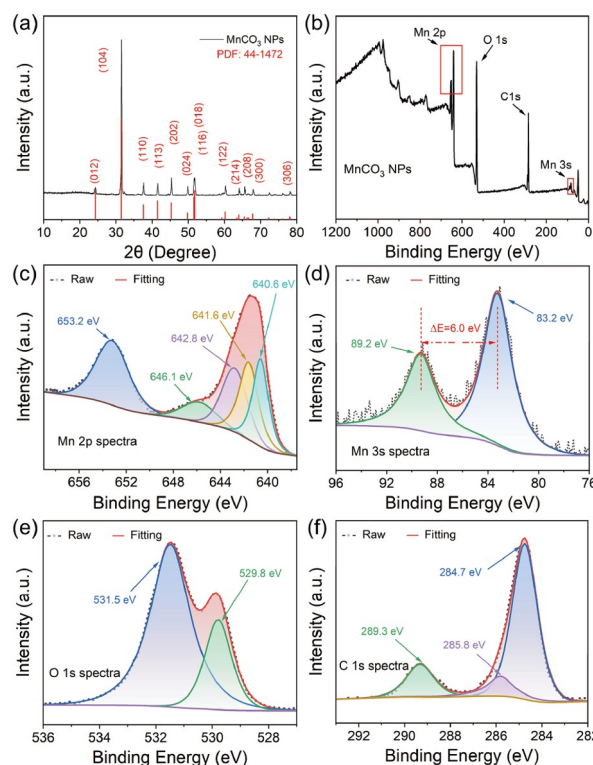


图3  $\text{MnCO}_3$  NPs的结构表征. (a) XRD; (b) XPS全谱; (c) Mn 2p 光谱; (d) Mn 3s光谱; (e) O 1s光谱; (f) C 1s光谱(网络版彩图)

Figure 3 Structural characterizations of  $\text{MnCO}_3$  NPs. (a) XRD pattern; (b) XPS survey spectrum; (c) Mn 2p spectrum; (d) Mn 3s spectrum; (e) O 1s spectrum; (f) C 1s spectrum (color online).

量, 反应体系在652 nm处的吸光度随TMB浓度的增加而增大, 当TMB完全转化为oxTMB后吸光度不再增加(图4d). 基于上述结果, 本文选择反应时间10 min、pH 4.0和TMB浓度 $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ 作为最佳催化反应条件. 此外, 相同条件下的对比实验显示游离的 $\text{Mn}^{2+}$ 不能催化氧化TMB变蓝(图S3), 表明 $\text{Mn}^{2+}$ 在弱酸性条件下无类氧化酶活性, 同时也从侧面证明了 $\text{MnCO}_3$  NPs在弱酸性条件下(pH 4)具有较好的稳定性.

本文通过稳态动力学实验进一步量化了 $\text{MnCO}_3$  NPs作为类氧化酶的催化效率. 通过绘制体系初始反应速率对TMB浓度的非线性曲线(Michaelis-Menten curve)及其双倒数曲线(Lineweaver-Burk curve), 可以计算得到最大反应速率 $V_{\max}$ 和米氏常数 $K_m$ . 其中 $K_m$ 值的大小表示了酶与底物的亲和力,  $K_m$ 值越小, 酶与底物的亲和力越强. 如图5所示, 底物TMB的稳态动力学数据符合典型的米氏方程曲线, 其 $K_m$ 和 $V_{\max}$ 分别为

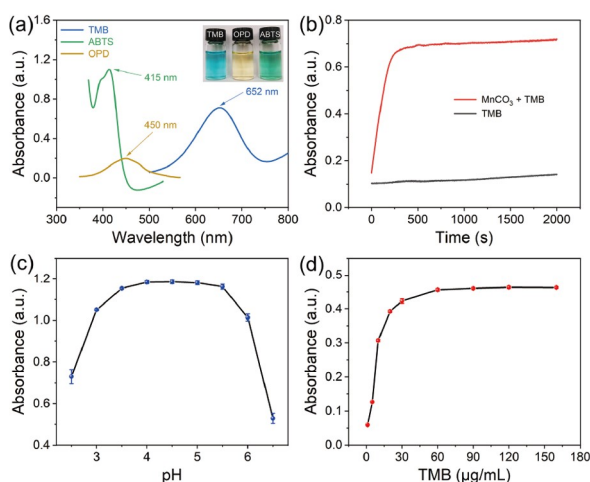


图4  $\text{MnCO}_3$  NPs的类氧化酶催化条件探究: (a) 与不同底物反应后的紫外-可见吸收光谱图(插图相应溶液照片); (b~d) 反应条件对催化氧化TMB的影响: (b) 反应时间; (c) 溶液pH值; (d) TMB浓度(网络版彩图)

**Figure 4** Reaction conditions for the catalytic oxidation of TMB by  $\text{MnCO}_3$  NPs: (a) UV-Vis absorption spectra of different catalytic substrates in the presence of  $\text{MnCO}_3$  NPs (embedded figure shows the photo of corresponding solutions); (b~d) effect of reaction conditions on catalytic oxidation of TMB: (b) reaction time; (c) pH value; (d) TMB concentration (color online).

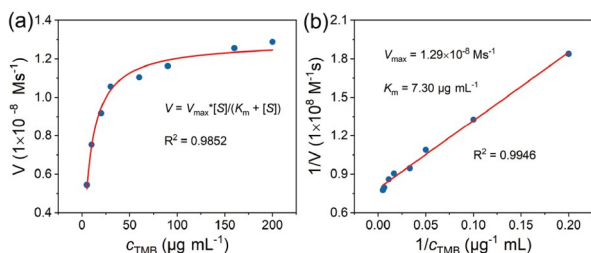


图5  $\text{MnCO}_3$  NPs催化氧化TMB的稳态动力学研究. 初始反应速率对TMB浓度的Michaelis-Menten (a)和Lineweaver-Burk (b)曲线(网络版彩图)

**Figure 5** Steady-state kinetics of TMB oxidation catalyzed by  $\text{MnCO}_3$  NPs. (a) Michaelis-Menten curve; (b) Lineweaver-Burk curve (color online).

$2.33 \times 10^{-5} \text{ M}$ 和 $1.29 \times 10^{-8} \text{ M s}^{-1}$ . 与大部分已报道的Mn基纳米酶的动力学参数相比, 本文所制备的 $\text{MnCO}_3$  NPs对TMB展示出更好的亲和性(表S1, 网络版补充材料). 根据纳米酶的催化活性标准定义<sup>[40]</sup>: 一个活性单位(U)被定义为每分钟催化产生 $1 \mu\text{mol}$ 产物的纳米酶量, 比活性(SA)定义为每毫克纳米酶的活性单位, 如式(1)和(2)

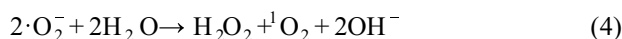
$$b_{\text{nanozyme}} = V / (\varepsilon \times l) \times (\Delta A / \Delta t) \quad (1)$$

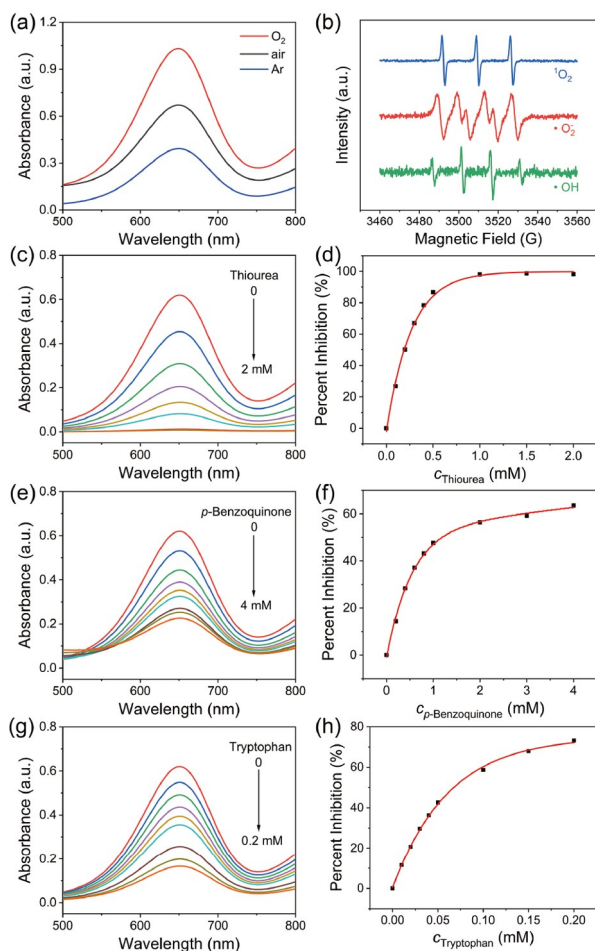
$$a_{\text{nanozyme}} = b_{\text{nanozyme}} / m \quad (2)$$

其中,  $b_{\text{nanozyme}}$ 表示纳米酶的催化活性;  $a_{\text{nanozyme}}$ 表示纳米酶的比活性;  $V$ 表示反应溶液的体积( $\mu\text{L}$ );  $\varepsilon$ 是比色底物的摩尔吸收系数( $\varepsilon_{\text{TMB}} = 39000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $\lambda = 652 \text{ nm}$ );  $l$ 是光通过溶液的距离;  $\Delta A / \Delta t$ 为吸光度变化的初始速率;  $m$ 是纳米酶的质量( $\text{mg}$ ). 根据上式计算出 $\text{MnCO}_3$  NPs类氧化酶的比活性为 $2.53 \text{ U mg}^{-1}$ .

### 3.3 $\text{MnCO}_3$ NPs的类氧化酶催化机理探究

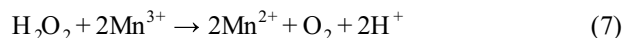
XPS和高分辨TEM结果证明了 $\text{MnCO}_3$  NPs表面有丰富的低价态锰和吸附氧, 且存在大量的晶格缺陷. 表面晶格缺陷能提供更多的催化活性位点, 为溶解氧与底物TMB提供反应场所, 有利于催化反应的进行. 为了探究 $\text{MnCO}_3$  NPs的类氧化酶催化机理, 本文首先考察了体系中溶解氧含量对 $\text{MnCO}_3$  NPs催化氧化TMB显色的影响. 在相同条件下, 向溶液中分别充入足量氧气和氩气. 与空气对照组相比, 充氧的溶液在 $652 \text{ nm}$ 处的吸光度显著升高, 而充氩的溶液吸光度明显降低(图6a), 证明了 $\text{MnCO}_3$  NPs催化氧化TMB的效率依赖于溶解氧的含量. 利用EPR对该体系进行自由基捕获试验, 如图6b所示,  $\text{MnCO}_3$  NPs在弱酸性条件下能催化溶解氧产生三种活性氧自由基, 即羟基自由基( $\cdot\text{OH}$ )、超氧阴离子自由基( $\cdot\text{O}_2^-$ )和单线态氧( $^1\text{O}_2$ ). 此外, 我们还分别利用硫脲<sup>[41]</sup>、对苯醌<sup>[42]</sup>、色氨酸<sup>[43]</sup>这三种活性氧自由基特异性抑制剂进一步证实了该催化过程中产生了上述三种自由基(图6c~h). 基于上述实验结果, 我们对 $\text{MnCO}_3$  NPs类氧化物酶催化机理进行了推测: 首先,  $\text{MnCO}_3$  NPs催化吸附在其表面的溶解氧产生 $\cdot\text{O}_2^-$  (式(3)), 由于 $\cdot\text{O}_2^-$ 在水溶液中极不稳定, 会迅速通过自由基链反应变成 $\text{H}_2\text{O}_2$ 和 $^1\text{O}_2$  (式(4)),  $\text{H}_2\text{O}_2$ 进一步与 $\cdot\text{O}_2^-$ 反应产生 $\cdot\text{OH}$  (式(5))<sup>[44]</sup>. 与此同时, 表面具有丰富低价态锰的 $\text{MnCO}_3$  NPs还可能作为类芬顿试剂催化 $\text{H}_2\text{O}_2$ 产生 $\cdot\text{OH}$ 和 $\cdot\text{O}_2^-$  (式(6)~(8)). 最后, 这些具有强氧化能力的活性氧自由基夺取TMB的电子生成蓝色的oxTMB.





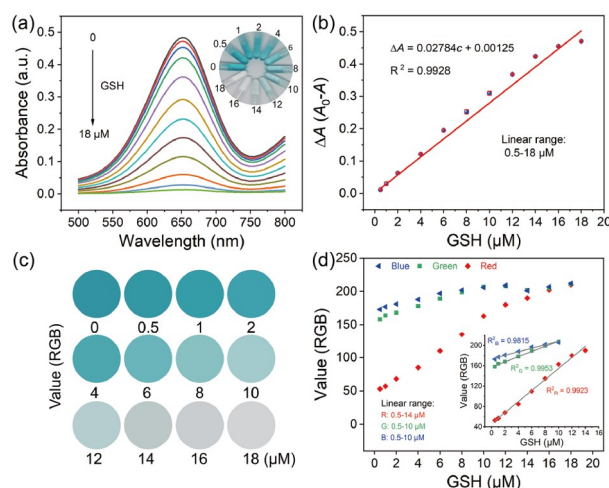
**图 6**  $\text{MnCO}_3$  NPs 的类氧化酶催化机理探究. (a) 溶解氧含量对催化效率的影响; (b) EPR 自由基捕获测试结果. (c~h) 三种活性氧自由基抑制剂对  $\text{MnCO}_3$  NPs 催化氧化 TMB 显色的影响: (c, d) 硫脲; (e, f) 对苯醌; (g, h) 色氨酸(网络版彩图)

**Figure 6** Catalytic mechanism of  $\text{MnCO}_3$  NPs. (a) Influence of dissolved oxygen content on catalytic efficiency; (b) results of EPR test. (c~h) Effects of three kinds of inhibitors towards reactive oxide species on catalytic oxidation of TMB by  $\text{MnCO}_3$  NPs: (c, d) Thiourea; (e, f) *p*-benzoquinone; (g, h) tryptophan (color online).



### 3.4 基于 $\text{MnCO}_3$ NPs 类氧化酶性质比色检测 GSH

作为一种抗氧化剂, GSH 在人体生命活动中扮演着重要的角色.  $\text{MnCO}_3$  NPs 可高效催化溶解氧产生活性氧自由基并将无色的 TMB 转变为蓝色的 oxTMB, 而当 GSH 加入体系中时, 该显色反应被显著抑制, 且抑制程度与 GSH 的浓度相关. 如图 7a 所示, 随着 GSH 浓度增



**图 7** 基于  $\text{MnCO}_3$  NPs 类氧化酶活性比色检测 GSH. (a, b) 光谱法定量检测 GSH 的紫外-可见吸收光谱图(插图: 相应溶液照片)和线性工作曲线; (c, d) 智能手机检测 GSH 的样品取色及 *R*、*G*、*B* 值对 GSH 浓度的线性工作曲线(网络版彩图)

**Figure 7** Colorimetric detection of GSH based on the oxidase-like activity of  $\text{MnCO}_3$  NPs. (a, b) UV-Vis absorption spectra (inset is the photograph of corresponding solutions) and linear calibration plot of the present system for GSH detection; (c, d) color pick by smartphone and linear calibration plots based on the relationship between *R*, *G*, *B* values and GSH concentration (color online).

加, 溶液在 652 nm 处的吸光度逐渐降低, 溶液的颜色也逐渐变浅. 吸光度变化值 ( $\Delta A = A_0 - A$ ) 与 GSH 浓度在 0.5~18  $\mu\text{M}$  范围内呈现良好的线性关系, 线性方程为  $\Delta A = 0.00125 + 0.02784c$  ( $R^2 = 0.9928$ ), 检出限为 0.3  $\mu\text{M}$  (图 7b). 由于通过肉眼可以直接分辨出加入不同浓度 GSH 后样品的颜色变化(图 7c), 我们借助智能手机的拍照和色度分析功能, 进一步构建了一种以智能手机作为检测器的便携式 GSH 分析方法, 即利用手机开源软件 Color Grab 对加入不同浓度 GSH 的样品进行 RGB 色度分析, 分别以 *R*、*G*、*B* 值与 GSH 浓度建立线性关系(图 7d), 得到相应的检测范围, 分别为 0.5~14  $\mu\text{M}$  ( $R^2 = 0.9923$ )、0.5~10  $\mu\text{M}$  ( $R^2 = 0.9953$ ) 和 0.5~10  $\mu\text{M}$  ( $R^2 = 0.9815$ ). 其中, 利用 *R* 值对 GSH 浓度拟合的工作曲线斜率更大、灵敏度更高, 且检测范围更宽. 相比于光谱法, RGB 法不需要使用专业的检测设备以及复杂的操作, 可用于 GSH 的快速半定量检测.

为评价该方法的选择性以及用于人血清中 GSH 检测的抗干扰能力, 我们考察了一些常见的酶(溶菌酶、葡萄糖氧化酶)、氨基酸(半胱氨酸、组氨酸、精氨酸、甲硫氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、赖氨酸

酸)、金属离子( $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ )等20种物质对检测的影响。如图8所示,以 $\text{MnCO}_3$  NPs和TMB的混合溶液作为对照组,除半胱氨酸外,上述各物质替代GSH加入后均不影响溶液在652 nm处的吸光度值。半胱氨酸作为GSH的组成部分,同样对TMB的氧化具有抑制作用。但由于血液中GSH含量比半胱氨酸高得多(1000倍以上)<sup>[45-47]</sup>,因此在实际样中检测GSH时半胱氨酸的影响相对有限。当GSH与上述20种干扰物(浓度为GSH的12.5倍)共存时,与只加入GSH的对照组相比,652 nm处的吸光度值和溶液颜色(无色)均无显著差异,表明该方法用于检测GSH具有较好的抗干扰能力。此外,由于该方法基于对底物的催化氧化及还原作用的原理对GSH进行检测,因此应避免检测样本中存在高含量的强氧化剂或强还原剂(如过氧化氢、抗坏血酸等),以免干扰检测信号。

通过人血清加标回收实验进一步评估该方法检测实际样品中GSH的可行性。在稀释一定倍数人血清样品中分别加入3.0、5.0和8.0  $\mu\text{M}$ 的GSH标准样品,然后测量样品在652 nm处的吸光度值并根据线性工作曲线计算测得量及加标回收率。测定结果见表1,人血清中GSH的加标回收率在105.1%~114.7%之间,相对标准偏差(RSD)均小于3.5%。结果表明,基于 $\text{MnCO}_3$  NPs类氧化酶活性调控的方法可用于血清中GSH含量的比色检测。

## 4 结论

本文以碳酸胍和高锰酸钾为原料,通过简便的水热法一步制备了具有类氧化物酶活性的 $\text{MnCO}_3$  NPs。其表面晶格缺陷有利于吸附溶解氧以及为与底物反应提供场所;表面低价态的锰离子能催化溶解氧产生具有强氧化能力的活性氧自由基,从而氧化底物显色。

## 补充材料

本文的补充材料见网络版chemcn.scichina.com。补充材料为作者提供的原始数据,作者对其学术质量和内容负责。

## 参考文献

- 1 Meister A. *Science*, 1983, 220: 472-477
- 2 Spencer JPE, Jenner P, Daniel SE, Lees AJ, Marsden DC, Halliwell B. *J Neurochem*, 2002, 71: 2112-2122
- 3 Liu J, Meng L, Fei Z, Dyson PJ, Jing X, Liu X. *Biosens Bioelectron*, 2017, 90: 69-74

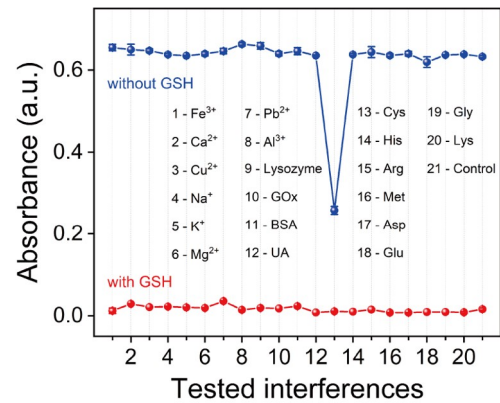


图8 该方法检测GSH的选择性与抗干扰能力(网络版彩图)  
Figure 8 Selectivity and interference study of the present method for the detection of GSH (color online).

表1 人血清中GSH的测定结果( $n=3$ )

Table 1 Detection of GSH in human serum ( $n=3$ )

| 血清样品 | 加标量( $\mu\text{M}$ ) | 测得量( $\mu\text{M}$ ) | 回收率(%) | RSD (%) |
|------|----------------------|----------------------|--------|---------|
| 样品1  | 3.0                  | 3.4                  | 112.4  | 3.5     |
|      | 5.0                  | 5.3                  | 105.1  | 2.1     |
|      | 8.0                  | 8.6                  | 107.4  | 2.6     |
| 样品2  | 3.0                  | 3.3                  | 114.1  | 2.2     |
|      | 5.0                  | 5.5                  | 114.7  | 3.4     |
|      | 8.0                  | 8.5                  | 108.1  | 2.6     |

进一步基于对 $\text{MnCO}_3$  NPs催化氧化TMB反应过程的抑制建立了一种比色检测GSH含量的新方法,并成功用于人血清中GSH的测定。借助智能手机作为检测器,本文还构建了一种便携式比色方法用于GSH的半定量检测。结合 $\text{MnCO}_3$ 纳米氧化酶催化底物高灵敏显色的优势,这种智能手机检测方法有望进一步扩展到床边检测,为人们日常健康监测或医疗落后地区疾病标志物检测等提供方法和技术支撑。

- 4 Li W, Wang J, Zhu J, Zheng YQ. *J Mater Chem B*, 2018, 6: 6858–6864
- 5 Zhang X, Mao X, Li S, Dong W, Huang Y. *Sens Actuat B-Chem*, 2018, 258: 80–87
- 6 Xi J, Zhu C, Wang Y, Zhang Q, Fan L. *RSC Adv*, 2019, 9: 16509–16514
- 7 Liu XR, Qian MP, Qi HL, Zhang CX. *J Anal Test*, 2020, 4: 114–121
- 8 Fan C, Wang M, Wei G, Huang L. *Biotechnol*, 2004, 14: 68–70 (in Chinese) [范崇东, 王淼, 卫功元, 黄玲. 生物技术, 2004, 14: 68–70]
- 9 Reed DJ, Babson JR, Beatty PW, Brodie AE, Ellis WW, Potter DW. *Anal Biochem*, 1980, 106: 55–62
- 10 Zhang J, Hu Z, Chen X. *Talanta*, 2005, 65: 986–990
- 11 Dieckhaus CM, Fernández-Metzler CL, King R, Krolikowski PH, Baillie TA. *Chem Res Toxicol*, 2005, 18: 630–638
- 12 Li X, Huo F, Yue Y, Zhang Y, Yin C. *Sens Actuat B-Chem*, 2017, 253: 42–49
- 13 Xianyu Y, Xie Y, Wang N, Wang Z, Jiang X. *Small*, 2015, 11: 5510–5514
- 14 Li Y, Wu P, Xu H, Zhang H, Zhong X. *Analyst*, 2011, 136: 196–200
- 15 Hu B, Cao X, Zhang P. *New J Chem*, 2013, 37: 3853–3856
- 16 Thomas A, Sivasankaran U, Kumar KG. *Spectrochim Acta Part A-Mol Biomol Spectr*, 2018, 188: 113–119
- 17 Liu Y, Zhou M, Cao W, Wang X, Wang Q, Li S, Wei H. *Anal Chem*, 2019, 91: 8170–8175
- 18 Ellman GL. *Arch Biochem Biophys*, 1959, 82: 70–77
- 19 Ellis HR. *Arch Biochem Biophys*, 2022, : 109174
- 20 Wu J, Wang X, Wang Q, Lou Z, Li S, Zhu Y, Qin L, Wei H. *Chem Soc Rev*, 2019, 48: 1004–1076
- 21 Jiang ZW, Zhao TT, Li YF, Huang CZ. *Nanoscale Horiz*, 2020, 5: 119–123
- 22 Tan J, Wu S, Cai Q, Wang Y, Zhang P. *J Pharm Anal*, 2022, 12: 113–121
- 23 Gao Z, Lv S, Xu M, Tang D. *Analyst*, 2017, 142: 911–917
- 24 Jiao J, Fan K, Hu Z, Yan X, Du P. *Sci Sin Chim*, 2019, 49: 1442–1453 (in Chinese) [焦健, 范克龙, 胡志刚, 阎锡蕴, 杜鹃. 中国科学: 化学, 2019, 49: 1442–1453]
- 25 Wu J, Wei H. *Prog Chem*, 2021, 33: 42–51 (in Chinese) [吴江洁星, 魏辉. 化学进展, 2021, 33: 42–51]
- 26 Zhang J, Wu S, Lu X, Wu P, Liu J. *Nano Lett*, 2019, 19: 3214–3220
- 27 Li W, Liu Z, Liu C, Guan Y, Ren J, Qu X. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 13661–13665
- 28 Kang ZW, Kankala RK, Chen BQ, Fu CP, Wang SB, Chen AZ. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11: 28781–28790
- 29 Lu W, Chen J, Kong L, Zhu F, Feng Z, Zhan J. *Sens Actuat B-Chem*, 2021, 333: 129560
- 30 Luo L, Ou Y, Yang Y, Liu G, Liang Q, Ai X, Yang S, Nian Y, Su L, Wang J. *J Hazard Mater*, 2022, 423: 127253
- 31 Zhu Y, Wang W, Cheng J, Qu Y, Dai Y, Liu M, Yu J, Wang C, Wang H, Wang S, Zhao C, Wu Y, Liu Y. *Angew Chem Int Ed*, 2021, 60: 9480–9488
- 32 Kang W, Yu DYW, Li W, Zhang Z, Yang X, Ng TW, Zou R, Tang Y, Zhang W, Lee CS. *Nanoscale*, 2015, 7: 10146–10151
- 33 Tan BJ, Klabunde KJ, Sherwood PMA. *J Am Chem Soc*, 1991, 113: 855–861
- 34 Biesinger MC, Payne BP, Grosvenor AP, Lau LWM, Gerson AR, Smart RSC. *Appl Surf Sci*, 2011, 257: 2717–2730
- 35 Sun X, Li Z, Cheng Y, Xue L. *ECS J Solid State Sci Technol*, 2017, 6: R63–R67
- 36 Jana M, Samanta P, Chandra Murmu N, Kuila T. *J Mater Chem A*, 2017, 5: 12863–12872
- 37 Gao M, Cui X, Wang R, Wang T, Chen W. *J Mater Chem A*, 2015, 3: 14126–14133
- 38 Karuppaiah K, Sakthivel P, Asaithambi S, Murugan R, Yuvakkumar R, Ravi G. *Mater Chem Phys*, 2019, 228: 1–8
- 39 Zhang X, Yang Q, Lang Y, Jiang X, Wu P. *Anal Chem*, 2020, 92: 12400–12406
- 40 Jiang B, Duan D, Gao L, Zhou M, Fan K, Tang Y, Xi J, Bi Y, Tong Z, Gao GF, Xie N, Tang A, Nie G, Liang M, Yan X. *Nat Protoc*, 2018, 13: 1506–1520
- 41 Wang W, Schuchmann MN, Schuchmann HP, Knolle W, von Sonntag J, von Sonntag C. *J Am Chem Soc*, 1999, 121: 238–245
- 42 Sang D, Li X, Xu Z, Lin H, Guo C, Qu F. *Biomater Sci*, 2020, 8: 6045–6055
- 43 Wang M, Zhou X, Wang S, Xie X, Wang Y, Su X. *Anal Chem*, 2021, 93: 3130–3137
- 44 Dou X, Lin Z, Chen H, Zheng Y, Lu C, Lin JM. *Chem Commun*, 2013, 49: 5871–5873
- 45 Wang Y, Jiang K, Zhu J, Zhang L, Lin H. *Chem Commun*, 2015, 51: 12748–12751
- 46 Song C, Ding W, Zhao W, Liu H, Wang J, Yao Y, Yao C. *Biosens Bioelectron*, 2020, 151: 111983
- 47 Gao W, Liu Z, Qi L, Lai J, Kittle SA, Xu G. *Anal Chem*, 2016, 88: 7654–7659

## Colorimetric detection of glutathione through tuning the oxidase-like activity of $\text{MnCO}_3$ nanoparticles

Li Zhang<sup>†</sup>, Yuanhong Min<sup>†</sup>, Wensheng Fu, Wendong Zhang, Yi Wang<sup>\*</sup>

*Engineering Research Center for Biotechnology of Active Substances (Ministry of Education), Chongqing Key Laboratory of Green Synthesis and Applications, College of Chemistry, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China*

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>\*</sup>Corresponding author (email: ywang@cqu.edu.cn)

**Abstract:** Nano-oxidases are a kind of nanomaterials with catalytic properties similar to natural oxidases. Regulating the catalytic activity of oxidase-like mimics is of great significance in biosensing as well as clinical diagnosis and treatment. In this article,  $\text{MnCO}_3$  nanoparticles (NPs) with oxidase-like activity were prepared by one-pot hydrothermal method, and were able to catalyze the production of reactive oxygen species from dissolved oxygen and transform colorless substrate 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) into blue oxTMB with a characteristic absorption peak at 652 nm. Further studies showed that the catalytic oxidation of TMB by  $\text{MnCO}_3$  NPs could be inhibited by the addition of glutathione (GSH), and thus the production of oxTMB as well as the absorbance at 652 nm decreased, which showed a linear relationship with the concentration of GSH in a certain range. Based on this mechanism, a new colorimetric method for GSH detection based on regulating the oxidase-like activity of  $\text{MnCO}_3$  NPs was established and successfully applied to the determination of GSH in serum. With the assistance of smartphone, a portable analysis method for GSH detection was also developed with the application potential for point-of-care testing and disease diagnosis.

**Keywords:** manganese carbonate, nanozymes, glutathione, smartphone-based assay, colorimetric detection

**doi:** [10.1360/SSC-2022-0069](https://doi.org/10.1360/SSC-2022-0069)