

微浓度过氧化氢的快速分光光度法检测

任东*, 陈芳, 杨艳, 罗敏

(西华师范大学环境科学与工程学院, 四川南充 637009)

摘要:建立了一种采用分光光度计快速测定溶液中微浓度过氧化氢的方法。该方法采用10-乙酰基-3,7-二羟基吩噻嗪在过氧化氢酶作用下与过氧化氢快速反应生成9-羟基-3-异吩噻嗪酮,然后于570 nm下完成吸光度测定,根据吸光度值与过氧化氢浓度间的线性关系确定溶液中过氧化氢的浓度。结果表明,显色反应的最佳条件为: $n(10\text{-乙酰基-3,7-二羟基吩噻嗪})/n(\text{H}_2\text{O}_2) \geq 5.0$,暗反应时长 ≥ 8.0 min;方法重现性测试的相对标准偏差为0.16%,准确性测试的相对标准偏差 $\leq 0.78\%$ 。该方法具有操作简单、反应灵敏且迅速、稳定性和重现性好及检测准确度高等优点,不仅适用于工业生产快速分析,也能满足检测低浓度过氧化氢的要求。

关键词:过氧化氢;分光光度法;微浓度;吩噻嗪

中图分类号:O657.3

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2018)12-0231-03

DOI:10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2018.12.053

A rapid determination method for microconcentration of hydrogen peroxide by spectrophotometry

REN Dong*, CHEN Fang, YANG Yan, LUO Min

(College of Environmental Science and Engineering, China West Normal University, Nanchong 637009, China)

Abstract: A spectrophotometric method is established to determine rapidly micromolar of hydrogen peroxide in a solution. This method bases on the rapid reaction between 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenazine and hydrogen peroxide under catalase, which produces 7-hydroxy-3-phenazin-3-one that absorb strongly light with a wavelength of 570 nm. According to the linear quantitative relationship between the absorbance and concentration of hydrogen peroxide, the concentration of hydrogen peroxide in the solution can be calculated. It is found that the best conditions for chromogenic reaction are as follows: $n(10\text{-acetyl-3,7-dihydroxyphenazine})/n(\text{H}_2\text{O}_2)$ is more than 5.0 and reaction time is longer than eight minutes in the dark. This method is of excellent stability, accuracy and accuracy performance. The relative standard deviation of the reproducibility and accuracy tests is 0.16% and no more than 0.78%, respectively. This method exhibits simple, sensitive, rapid and accurate. It can either be used for the rapid industrial analysis or satisfy the determination requirements of low concentration hydrogen peroxide.

Key words: hydrogen peroxide; spectrophotometry; micro-concentration; phenazine

过氧化氢(H_2O_2)俗称双氧水,常温常压下是一种无色透明液体,由于具有强氧化性、弱还原性和腐蚀性等特征,常被国防、化工、纺织、造纸、食品、生物、医药以及环保等行业广泛用作助燃剂、漂白剂、消毒剂和氧化剂等^[1]。在生产生活中,若 H_2O_2 投加过量,不但不会带来更高的收益,反而会给生产和环境带来压力。因此,为保障 H_2O_2 在各行各业更高效安全地应用,针对低浓度过氧化氢定量分析,建立准确、快速且操作简单的测定方法具有重要的意义。

定量分析溶液中 H_2O_2 的方法主要有常规滴定法^[2]、分光光度法^[3-4]、荧光光度法^[5-6]、化学发光法^[7]、色谱法^[8-9]、酶化学法^[10-11]和电化学分析法^[12-13]等。其中,常规滴定法(高锰酸钾法、碘量法和铈量法)因操作简单而被广泛应用于生产实践,但该方法的灵敏度较低,易受其他因素干扰,且反应终点辨识度低。虽然荧光光度法、色谱法和化学发

光法等灵敏度高,可连续自动操作,但这些方法依赖于现代分析仪器,需要昂贵的设备,且操作复杂,因此这些方法并未得到广泛地应用。尽管基于钛盐、铈盐等的分光光度法操作简单,但检出限较高;而酶法具有高的灵敏度、专一性和较低的检出限。

笔者将酶法和常规分光光度法相结合,以10-乙酰基-3,7-二羟基吩噻嗪和过氧化氢酶为反应试剂,建立了一种采用分光光度计即可快速完成 H_2O_2 浓度测定的新方法。优化了测定波长、试剂剂量比和反应时间等条件,并评价了该方法的精度和准确度。

1 实验部分

1.1 主要试剂

过氧化氢(30%),国药集团化学试剂有限公司生产;10-乙酰基-3,7-二羟基吩噻嗪(>98%)、过氧化氢酶(> 2×10^5 unit/g),上海aladdin试剂有限公司

收稿日期:2018-06-05;修回日期:2018-10-05

基金项目:国家自然科学基金(41807379);西华师范大学科研启动基金项目(17E053);西华师范大学基本科研业务费专项基金(18B022);西华师范大学创新团队基金(CXTD2018-13);西华师范大学英才科研基金(17YC145)

作者简介:任东(1987-),男,博士,讲师,主要从事环境污染防治方面的研究,通讯联系人,dren@cwnu.edu.cn。

生产。将 10-乙酰基-3,7-二羟基吩噻嗪和过氧化氢酶配制成混合液($\text{pH}=7.0$)并于 4°C 下保存,控制溶液中过氧化氢酶浓度为 2 unit/mL 。

1.2 主要仪器

岛津 UV-2600 型紫外-可见分光光度计、IKA 旋涡混匀器和 Eppendorf 移液器。

1.3 测试原理与方法

1.3.1 测试原理

在含有过氧化氢酶和 H_2O_2 的反应体系中,10-乙酰基-3,7-二羟基吩噻嗪能被迅速催化反应生成 9-羟基-3-异吩噻嗪酮(如图 1 所示),该生成物对一定波长范围内的光波均有一定的吸光能力。因此,根据溶液中生成的 9-羟基-3-异吩噻嗪酮对特定波长光波的吸收值的变化便可测定反应体系中 H_2O_2 的浓度。

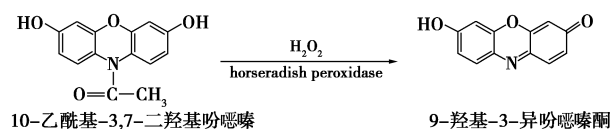


图 1 H_2O_2 光谱法测定原理

1.3.2 标准工作曲线绘制

准确量取浓度校正后的 H_2O_2 配制成稀释液,再分别量取不同体积稀释后的 H_2O_2 ($0.0 \sim 5.0 \text{ mL}$) 配制浓度为 $0.0 \sim 20.0 \mu\text{mol/L}$ 的标准溶液。将 H_2O_2 标准溶液与 10-乙酰基-3,7-二羟基吩噻嗪和过氧化氢酶混合液按体积比 1:1 混合,于暗处显色后检测反应体系在 570 nm 处的吸光度。于相同实验条件下,探讨反应时间和 10-乙酰基-3,7-二羟基吩噻嗪投加量对测定方法的影响。最后,以稳定实验条件下的最佳检测波长处的吸光度值及 H_2O_2 浓度建立标准曲线。

1.3.3 方法准确性校验

准确量取一定体积的环境地表水(采集自西华师范大学迎曦湖),加入一定量已知浓度的 H_2O_2 溶液,分别采用本方法和钛盐-分光光度法对其进行测定,并比较分析结果,从而确定该方法的准确性和适用性。

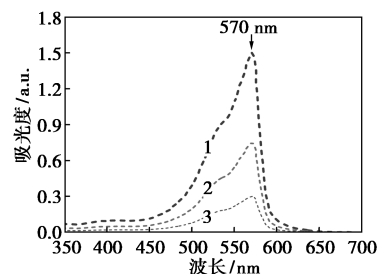
2 结果与讨论

2.1 测试条件确定与优化

2.1.1 最佳检测波长的选择

不同浓度 H_2O_2 与 10-乙酰基-3,7-二羟基吩噻嗪反应产物的吸收光谱曲线如图 2 所示。由图 2 可以看出,反应产物对 $450 \sim 650 \text{ nm}$ 内的光波均具有一定吸收,在波长 570 nm 处具有最大吸收值,且

最大吸收峰值与 H_2O_2 浓度具有一定正相关关系。因此,为了获得足够的灵敏度和较低的检出限,选择 570 nm 作为检出波长。



1— $40 \mu\text{mol/L}$; 2— $20 \mu\text{mol/L}$; 3— $8 \mu\text{mol/L}$

图 2 不同浓度 H_2O_2 与 10-乙酰基-3,7-二羟基吩噻嗪反应产物的吸光曲线

2.1.2 10-乙酰基-3,7-二羟基吩噻嗪投加量确定

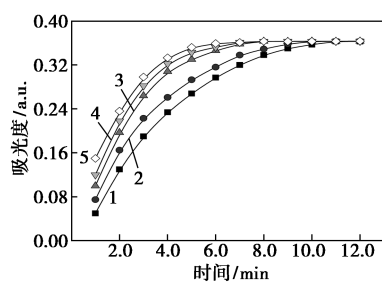
过氧化氢酶是一种高效生物催化剂,实验所采用的 2 unit/mL 过氧化氢酶已足够在短时间内完成催化目标。因此, H_2O_2 能否被准确、快速地检出取决于 10-乙酰基-3,7-二羟基吩噻嗪的投加量。不同 $n(10\text{-乙酰基-3,7-二羟基吩噻嗪})/n(\text{H}_2\text{O}_2)$ 反应体系对 570 nm 光波的吸收情况如表 1 所示。由表 1 可以看出,随着 $n(10\text{-乙酰基-3,7-二羟基吩噻嗪})/n(\text{H}_2\text{O}_2)$ 的增加,于暗处反应 15 min 后的体系对 570 nm 光波的吸收能力稍有增加,但当 $n(10\text{-乙酰基-3,7-二羟基吩噻嗪})/n(\text{H}_2\text{O}_2)$ 大于 3.0 时,反应体系的吸光度不再发生显著变化。因此,为确保测试系统中 H_2O_2 能被完全检出,须控制测试体系中 10-乙酰基-3,7-二羟基吩噻嗪与 H_2O_2 的摩尔比大于等于 3.0。

表 1 不同 $n(10\text{-乙酰基-3,7-二羟基吩噻嗪})/n(\text{H}_2\text{O}_2)$ 反应体系对 570 nm 光波的吸收情况

$n(10\text{-乙酰基-3,7-二羟基吩噻嗪})/n(\text{H}_2\text{O}_2)$	1	2	3	4	5
570 nm 处吸光度/a. u.	0.3209	0.3467	0.3588	0.3630	0.3631

2.1.3 反应时间的优化

在 $n(10\text{-乙酰基-3,7-二羟基吩噻嗪})/n(\text{H}_2\text{O}_2)$ 为 $3.0 \sim 7.0$ 范围内,对反应时间进行了优化,结果如图 3 所示。由图 3 可以看出,随着反应时间的增加,反应体系吸光度的平衡时间逐渐缩短。当 $n(10\text{-乙酰基-3,7-二羟基吩噻嗪})/n(\text{H}_2\text{O}_2)$ 大于等于 5.0 时,反应平衡时间变化不再明显。在同时考虑测试时间和试剂消耗量的条件下,采用 $n(10\text{-乙酰基-3,7-二羟基吩噻嗪})/n(\text{H}_2\text{O}_2) = 5.0$,并于暗处反应 8.0 min 作为本测定方法反应时间。



1—3.0;2—4.0;3—5.0;4—6.0;5—7.0

图3 不同 n (10-乙酰基-3,7-二羟基吩噁嗪)/ $n(\text{H}_2\text{O}_2)$ 下各反应体系吸光度随时间的变化

2.2 标准曲线

按 2.1 部分所确定的各测试条件建立 H_2O_2 浓度为 $0.0 \sim 10.0 \mu\text{mol/L}$ 的标准工作曲线,结果如图 4 所示。经分光光度计测得待测溶液在 570 nm 处的吸光度值后,拟合得到标准曲线方程: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 27.81\text{Abs} - 0.1602$, $R_{\text{Adj}}^2 = 0.9996$ ($n = 10$), 可计算出溶液中 H_2O_2 的浓度。方程式中, H_2O_2 浓度单位为 $\mu\text{mol/L}$; Abs 为溶液在优化条件下测得的吸光度值。

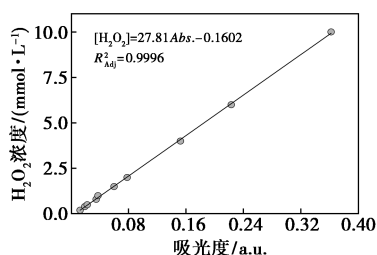


图4 过氧化氢浓度检测标准曲线

2.3 方法稳定性及准确性验证

为确定该方法的稳定性,向超纯水中投加一定量的标准 H_2O_2 溶液,采用已建立的方法和标准曲线对其进行 5 次重复测定并计算 H_2O_2 的浓度。结果表明,该方法的相对标准偏差为 0.16% ,如表 2 所示。因此,该方法具有相当高的稳定性,测试结果重现性较高,能满足工业生产的分析测试要求。

表2 方法稳定性验证

测试次数	1	2	3	4	5	平均值	相对标准偏差/%
测定浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	56.6	56.8	56.5	56.4	56.2	56.4	0.16

为了进一步验证该测试方法的准确性,测定了一组投加标准 H_2O_2 溶液的地表水,并将测定结果与钛盐-分光光度法进行比较,结果如表 3 所示。从表 3 中可以看出,该方法的测定结果与钛盐-分光光度法的测定结果基本一致,其标准偏差 $\leq 0.78\%$ 。因此,建立的快速测定 H_2O_2 的方法的准确性也可满足工业生产的分析测试要求。

表3 方法准确性验证

样品 编号	H_2O_2 浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)		相对标准 偏差/%
	钛盐-分光光度法	本文方法	
1	30.4	30.7	0.21
2	50.1	51.2	0.78
3	80.5	79.8	0.49
4	100.2	100.7	0.35
5	150.3	151.2	0.64

3 结论

建立了一种采用分光光度计快速测定溶液中过氧化氢浓度的方法。该方法的最佳反应条件为: n (10-乙酰基-3,7-二羟基吩噁嗪)/ $n(\text{H}_2\text{O}_2) \geq 5.0$, 暗反应时长 $\geq 8.0 \text{ min}$ 。该方法具有操作简单、反应灵敏且迅速、稳定性和重现性好以及检测准确度高优点,可用于工业生产快速分析溶液中的过氧化氢。

参考文献

- [1] 栾国颜,高维平,姚平经.高纯过氧化氢生产中有机物杂质的净化技术进展[J].现代化工,2005,25(4):20-24.
- [2] 古映莹,李丹.高锰酸钾法、碘量法和铈量法测定过氧化氢的比较[J].理化检验-化学分册,2007,43(9):788-789.
- [3] 张倩,付时雨,李海龙,等.一种快速测定过氧化氢浓度的方法[J].光谱学与光谱分析,2014,34(3):767-770.
- [4] 范华锋,张忠义,刘振林.分光光度法测定食品中过氧化氢[J].中国卫生检验杂志,2006,16(9):1079-1080.
- [5] Watabe S, Sakamoto Y, Morikawa M, et al. Highly sensitive determination of hydrogen peroxide and glucose by fluorescence correlation spectroscopy[J]. Plos One, 2011, 6(8): e22958.
- [6] Paital B. A modified fluorimetric method for determination of hydrogen peroxide using homovanillic acid oxidation principle [J]. BioMed Research International, 2014, Article ID 342958.
- [7] Arnous A, Petrakis C, Makris D P, et al. A peroxyoxalate chemiluminescence-based assay for the evaluation of hydrogen peroxide scavenging activity employing 9,10-diphenylanthracene as the fluorophore[J]. Journal of Pharmacological & Toxicological Methods, 2002, 48(3): 171-177.
- [8] 陈易晖,刘艳,周建立,等.高效液相色谱-紫外检测法测定食品中的过氧化氢[J].光谱实验室,2009,26(2):414-417.
- [9] Takeda K, Nojima H, Kuwahara K, et al. Nanomolar determination of hydrogen peroxide in coastal seawater based on the fenton reaction with terephthalate[J]. Analytical Sciences, 2018, 34(4): 459-464.
- [10] Zhou M, Diwu Z, Panchukvoloshina N, et al. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: Applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases[J]. Analytical Biochemistry, 1997, 253(2): 162-168.
- [11] Fernando C D, Soysa P. Optimized enzymatic colorimetric assay for determination of hydrogen peroxide (H_2O_2) scavenging activity of plant extracts[J]. Methods, 2015, 2: 283-291.
- [12] Wael K D, Bashir Q, Vlierberghe S V, et al. Electrochemical determination of hydrogen peroxide with cytochrome c peroxidase and horse heart cytochrome c entrapped in a gelatin hydrogel[J]. Bioelectrochemistry, 2012, 83(4): 15-18.
- [13] 韩莉,陶茜,张义明,等.两种过氧化氢检测方法的对比研究[J].现代化工,2014,34(4):165-167. ■