

# 基于三氰基呋喃修饰的荧光探针定量测定 $H_2O_2$ 及机理研究

曾晓丹<sup>1\*</sup>, 姜城<sup>2</sup>, 马明硕<sup>1</sup>, 金星<sup>1</sup>, 柳彩云<sup>3</sup>

(1. 吉林化工学院分析测试中心, 吉林 吉林 132022;  
2. 中国石油吉林石化公司电石厂, 吉林 吉林 132022;  
3. 济南大学水利与环境学院, 山东 济南 250022)

**摘要:**设计合成了一个识别  $H_2O_2$  的荧光探针。基于探针与过氧化氢荧光增强现象,建立了检测过氧化氢的荧光分析方法。检测过氧化氢的线性范围为 0~180 mmol/L,检出限为 3.482  $\mu\text{mol/L}$ 。将探针用于测定实际样品中的过氧化氢,回收率令人满意。本探针具有灵敏度高、选择性好的优点。

**关键词:**过氧化氢;荧光探针;活性氧;三氰基呋喃

中图分类号:O657

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2021)03-0237-03

DOI:10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2021.03.048

## Quantitative determination of $H_2O_2$ by a fluorescent probe based on modification of 2-dicyanomethylene-3-cyano-4,5,5-trimethyl-2,5-dihydrofura and study on mechanism

ZENG Xiao-dan<sup>1\*</sup>, JIANG Cheng<sup>2</sup>, MA Ming-shuo<sup>1</sup>, JIN Xing<sup>1</sup>, LIU Cai-yun<sup>3</sup>

(1. Analysis and Measurement Center, Jilin Institute of Chemical Technology, Jilin 132022, China;  
2. Calcium Carbide Plant, PetroChina Jilin Petrochemical Company, Jilin 132022, China;  
3. School of Water Conservancy and Environment, University of Jinan, Jinan 250022, China)

**Abstract:** A fluorescent probe for identifying  $H_2O_2$  is designed and synthesized. Based on the increasing fluorescence between probe and  $H_2O_2$ , a fluorescent determination method is established to determine  $H_2O_2$ . The fluorescence enhances linearly with the concentration of  $H_2O_2$  in the range of 0~180 mmol·L<sup>-1</sup> with a detection limit of 3.482  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Satisfied recoveries can be obtained when the fluorescent probe is used to detect  $H_2O_2$  in real samples. This probe is proved to have the advantages of high selectivity and sensitivity.

**Key words:** hydrogen peroxide; fluorescent probe; active oxygen species; tricyanofuran

过氧化氢( $H_2O_2$ )是一种强氧化剂<sup>[1-3]</sup>,应用在包括医用杀菌消毒、工业漂白、农业抗菌杀虫以及药物合成等领域。同时因为其漂白、防腐和除臭的特点,又可以用作食品添加剂。但是,过氧化氢的含量过高将会有致癌性,对人们的身体健康具有严重的危害性。

近年来,越来越多的研究表明,过氧化氢与人类许多重大疾病相关。它的浓度与生理机能密切相关。当浓度出现异常时,就会引起生理机能发生紊乱,导致癌症、糖尿病、唐氏综合症等疾病的产生<sup>[4-8]</sup>。

因此,对于过氧化氢含量的测定十分重要。构建和开发一些选择性高、灵敏度高的检测方法,能够对过氧化氢进行及时准确的分析,具有十分重要的意义。不仅可以更加深入透彻地了解关于过氧化氢的代谢以及转化过程,也可揭示与过氧化氢相关疾

病的发病机理,为预防、治疗由过氧化氢诱发的各类疾病和病理研究以及药物筛选和评价提供合理的数据。

目前,测定过氧化氢的方法主要有分光光度法<sup>[9]</sup>、电化学法<sup>[10]</sup>、共振散射光谱法<sup>[11]</sup>、色谱法<sup>[12]</sup>以及荧光光谱法<sup>[13]</sup>等。荧光技术以其灵敏度高、选择性好以及响应快速等特点成为广大科研人员的研究热点<sup>[14-15]</sup>。本文中三以三氰基呋喃类染料作为荧光团,合成了一个具有分子内电荷转移(ICT)识别机理的过氧化氢探针,实验表明探针具有较高的灵敏度以及选择性,线性关系良好以及检出限低等优点。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Cary-Eclipse 分子荧光光谱仪(美国 Varian 公

收稿日期:2020-05-29;修回日期:2021-01-04

基金项目:国家自然科学基金项目(21607053)

作者简介:曾晓丹(1976-),女,博士,副教授,研究方向为光谱分析与应用,通讯联系人,jiangzxd@163.com。

司)。Tris(三羟甲基氨基甲烷, Sigma)-HCl 缓冲溶液, pH = 7.4。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(分析纯) 其余所有合成原料和试剂均为市售分析纯, 使用前没有经过进一步处理。实验用水为超纯水。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 样品配置

称取一定量的探针配制成 1 mmol/L 的储备溶液。移取 0.25 mL 于 5 mL 试管中, 加入一定量乙醇, 再加入一定的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液, 用 Tris (pH = 7.4) 缓冲溶液定容至 5 mL, 使溶液的体系比为乙醇:水 = 5:5 (体积比), 探针的浓度为  $5 \times 10^{-5}$  mol/L。样品放置 30 min 进行荧光光谱的测定。

### 1.2.2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 标准溶液的配制

移取适量 36.5% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液 (约 10 mol/L) 稀释至 0.1 mol/L 作为母液, 用时逐级稀释。实验中所用浓度为 1 mmol/L。

### 1.2.3 光谱的测定

将配制好的溶液在荧光光度计上 480 ~ 800 nm 范围扫描样品的荧光光谱, 激发波长为 460 nm, 激发和发射狭缝均为 10 nm。

## 2 结果与讨论

### 2.1 探针与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 反应的特征光谱

研究了探针与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 反应前后荧光光谱的变化情况, 结果如图 1 所示。从图 1 可看出, 探针本身荧光强度比较弱, 加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 后, 在 621 nm 处形成一个强发射峰。可能的原因是 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 将酯基氧化, 改变了探针体系内的 ICT 效应。

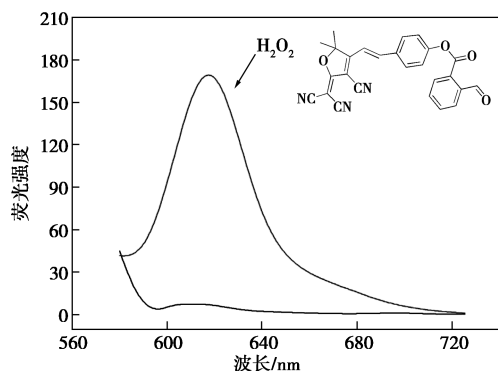


图 1 探针加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 前后的荧光对比谱图

### 2.2 探针分子的响应时间

在 Tris 缓冲溶液中检测了探针与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的响应时间。探针在加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 min 后达到荧光强度的最大值, 并且不随 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度变化而发生变化。同时探针本身的荧光强度随时间的增加没有什么明显

变化, 表明探针本身比较稳定。因此, 本实验选择加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 后 30 min 测量荧光强度。

### 2.3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的测定研究

根据选定的条件, 研究不同浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对探针荧光光谱的影响, 结果如图 2 所示。在未加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 时, 探针本身的荧光强度比较弱。随着 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度的增大, 621 nm 处的荧光强度不断增强。并且在 0 ~ 180 mmol/L 的浓度范围内, 621 nm 波长处的荧光与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度呈线性关系 (图 3)。关系曲线为  $y = 0.8731x + 5.2158$ ,  $R = 0.9940$ 。计算得到相检出限 3.482  $\mu$ mol/L。结果表明, 探针可用于检测痕量 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。

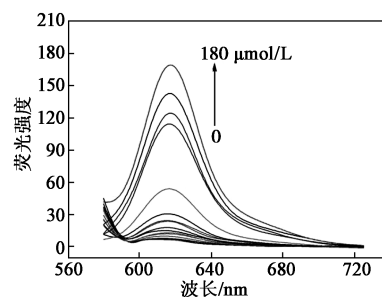


图 2 不同浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对探针的荧光光谱的影响

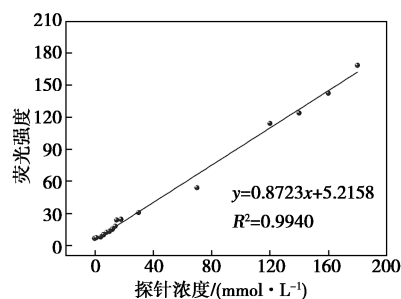


图 3 不同度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 与荧光强度线性拟合曲线

### 2.4 选择性测定

为了验证本方法对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的选择性, 选择了一些普遍存在的物质分别加入到含有探针的溶液中, 扫描相应溶液的荧光光谱, 记录荧光光强度, 取 621 nm 处的荧光强度并以含有 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液的强度为基准做归一化处理, 结果列于表 1。从结果可以看出, 在加入 Na<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>、PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>、Cl<sup>-</sup>、S<sup>2-</sup>、Fe<sup>3+</sup>、ClO<sup>-</sup> 等物质后, 探针的荧光强度非常小。结果证明探针对于 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 有很高的选择性。

### 2.5 干扰性测定

研究了可能存在于干扰物质情况下, 探针对于 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的响应情况, 取 621 nm 处的荧光强度并以含有 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液的强度为基准做归一化处理, 如表 1

所示。由表 1 可看出,在其他物质存在情况下,荧光强度几乎不发生变化,对于 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的测定几乎不产生干扰。结果表明,此探针对于测定 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 具有较高的选择性以及较强的抗干扰能力。

表 1 选择性与干扰性实验测定

加入物质	选择性相对 荧光强度	干扰性相对 荧光强度	加入物质	选择性相对 荧光强度	干扰性相对 荧光强度
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1	1	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	0.022	1.0138
Na <sup>+</sup>	0.022	0.9969	Cu <sup>2+</sup>	0.021	0.9989
Ca <sup>2+</sup>	0.021	0.9800	Pb <sup>2+</sup>	0.020	0.9661
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.053	0.9767	Cl <sup>-</sup>	0.051	0.9631
Mg <sup>2+</sup>	0.061	0.9902	S <sup>2-</sup>	0.0420	0.9733
Zn <sup>2+</sup>	0.045	0.9563	Fe <sup>3+</sup>	0.019	0.9496
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0.020	0.9665	ClO <sup>-</sup>	0.022	0.9293

## 2.6 合成样的测定

为了验证探针对于实际样品的适用性,将探针用于自来水的测定,结果列于表 2。由自来水的回收率在 98.00% ~ 107.00%,湖水的回收率在 91.00% ~ 103.00% 可以看出,探针对于测定 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 有良好的准确度和精密度,结果令人满意。

表 2 实际样品的测定结果

样品	加标量/ (mmol·L <sup>-1</sup> )	测得值/ (mmol·L <sup>-1</sup> )	回收率(n=3)/ %	RSD/%
自来水	1.00	1.07	107.00	1.45
	1.50	1.47	98.00	3.10
	2.00	2.09	104.50	1.87
湖水	1.00	1.03	103.00	2.10
	2.00	1.82	91.00	1.98
	3.00	2.82	94.00	2.05

注:湖水样品取自吉林省吉林市松花湖。

## 2.7 反应机理探讨

反应机理如图 4 所示。探针是一个三氟基咪喃的衍生物,在探针中存在酯基,此为过氧化氢的识别基团。酯基基团所连接的苯甲醛在与过氧化氢的反应过程中被氧化掉,探针转化成苯酚结构以后,ICT 效应增强,咪喃衍生物的荧光团就会发射荧光。

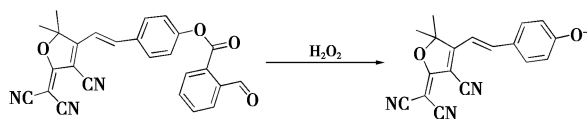


图 4 反应机理

## 3 结论

设计合成了一个用于识别 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的荧光探针。

在加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 之前,探针本身有微弱的荧光信号。加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 之后,探针的荧光强度显著增强,并且强度在 0~180 mmol/L 的浓度范围内呈现出良好的线性关系,检出限可达 3.482 μmol/L。实验结果表明,该方法简单,选择性好,灵敏度高,抗干扰性强,检出限低,有望可以用于环境样品中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的测定,为环境监测以及治理提供一定的数据以及参考价值。

## 参考文献

- [1] 黎克纯,凌敏,张颜,等.Fe(II)-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-双吡啶阻抑光度法测定食品中的微量过氧化氢[J].食品工业,2020,41(4):303-305.
- [2] 刘小娟.高效液相色谱法直接测定化妆品中的过氧化氢[J].香料香精化妆品,2019,(6):36-38,42.
- [3] 郭伟华,张悦,石亚东.纳米树枝状银-石墨烯复合材料的电化学合成及对过氧化氢的测定[J].分析实验室,2019,38(12):1397-1400.
- [4] Yao Y J, Zhang H L, Wang Z Y, et al. Reactive oxygen species (ROS)-responsive biomaterials mediate tissue microenvironments and tissue regeneration[J].J Mater Chem B,2019,7:5019-5037.
- [5] Chen B W, Zhang Y J, Ran R X, et al. Reactive oxygen species-responsive nanoparticles based on a thioketal-containing poly(β-amino ester) for combining photothermal/photodynamic therapy and chemotherapy[J].Polym Chem,2019,10:4746-4757.
- [6] Pandey N K, Chudal L, Phan J, et al. A facile method for the synthesis of copper-cysteamine nanoparticles and study of ROS production for cancer treatment[J].J Mater Chem B,2019,7:3027-3033.
- [7] 付艳华.常见的荧光探针及其在活性氧检测中的应用[J].当代化工,2019,48(2):384-387.
- [8] Barkhade T, Mahapatra S K, Banerjee I. Study of mitochondrial swelling, membrane fluidity and ROS production induced by nano-TiO<sub>2</sub> and prevented by Fe incorporation[J].Toxicol Res,2019,8:711-722.
- [9] 张爱菊,董娜,薛林科,等.Fe<sup>3+</sup>催化二苯胺磺酸钠显色-分光光度法测定消毒液中过氧化氢[J].理化检验:化学分册,2019,55(6):687-690.
- [10] 姜浩杰,李盛富,王斌堂.纳米银石墨烯修饰电极-电化学法测定血清中的过氧化氢[J].化学分析计量,2018,27(5):34-38.
- [11] 朱金,江信求,陈永宁,等.过氧化氢-钴-纳米银体系共振散射法测定痕量过氧化氢[J].化学研究与应用,2016,28(12):1754-1757.
- [12] 王任,吴鸳鸯,程巧鸳,等.建立柱前在线自动衍生-高效液相色谱法快速测定染发剂中过氧化氢的含量[J].药物分析杂志,2019,39(6):1148-1153.
- [13] 刘长辉,刘波,齐风佩,等.含羟基苯并咪唑的增强型荧光探针测定过氧化氢[J].湖南城市学院学报:自然科学版,2017,26(3):65-69.
- [14] 肖玲艳,黄姣,方敏,等.氯化血红素催化-荧光光谱法测定染发剂中的过氧化氢[J].理化检验:化学分册,2016,52(3):275-277.
- [15] 单雅琦,张容琿,陈永宁,等.牛血红蛋白催化荧光光度法测定痕量过氧化氢[J].化学研究与应用,2015,27(1):98-101.■