

两种过氧化氢检测方法的对比研究

韩莉^{1,2}, 陶菡², 张义明^{2,3*}, 黄民生¹

(1. 华东师范大学资源与环境科学学院, 上海 200241; 2. 贵州大学发酵工程与生物制药省重点实验室, 贵州 贵阳 550003; 3. 贵州工业职业技术学院, 贵州 贵阳 550008)

摘要:制备了辣根过氧化物酶/聚乙烯醇缩丁醛/碳纳米管修饰玻碳电极的过氧化氢生物传感器。以对苯二酚为电子媒介, 采用电流时间法考察了该传感器对 H₂O₂ 的催化性能, 并将其与紫外分光光度法检测过氧化氢进行对比研究。结果表明, 过氧化氢电化学传感器制备方法简便、操作简单、检测快速、线性范围宽、检出限低, 而紫外分光光度法在重现性、稳定性及抗干扰性能上存在优势。

关键词:生物传感器; 辣根过氧化物酶; 紫外分光光度法; 过氧化氢

中图分类号: O657.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2014)04-0165-03

Comparative study of two methods on determination of hydrogen peroxide

HAN Li^{1,2}, TAO Han², ZHANG Yi-ming^{2,3*}, HUANG Min-sheng¹

(1. School of Resource and Environmental Sciences, East China Normal University, Shanghai 200241, China;

2. Province Key Laboratory of Fermentation Engineering and Biopharmaceutical, Guizhou University, Guiyang 550003, China; 3. Guizhou Industry Polytechnic College, Guiyang 550008, China)

Abstract: A hydrogen peroxide biosensor has been made by horseradish peroxidase/polyvinyl butyral/multiwall carbon nanotube immobilizing on the glassy carbon electrode surface. Using hydroquinone as mediator, the electrocatalytic properties of this sensor toward hydrogen peroxide are observed by i-t curves, which are compared with ultraviolet spectrophotometry. The biosensor exhibits easy-making, simple operation, quick inspection, wider linear range and lower detection limit ability. In contrast, ultraviolet spectrophotometry has advantages in reproducibility, stability and noise immunity.

Key words: biosensor; horseradish peroxidase; ultraviolet spectrophotometry; hydrogen peroxide

过氧化氢作为一种常用的化学试剂广泛用于工业规模的无机和有机化工产品的生产。在环保领域, 过氧化氢用于水处理、气体洗涤和土壤整治。在人们日常生活中, 如洗涤剂、去污剂、彩妆品等都有过氧化氢的存在。过氧化氢对生命体代谢、物质结构性能和环境等都有着重要影响。因此, 常常需要对过氧化氢溶液的浓度作出标准的测定。如何检测过氧化氢一直是科研工作者研究的热点。目前, 过氧化氢的检测方法主要有滴定法^[1]、光谱法^[2]、化学发光法^[3]、色谱法^[4]、电化学法^[5]等。这些检测方法各有优缺点。

近年来, 采用辣根过氧化物酶(HRP)修饰的过氧化氢传感器得到了迅速发展。该种传感器用于检测过氧化氢具有检测快速、灵敏度高的特点。笔者首次以多壁碳纳米管(MWNT)和聚乙烯醇缩丁醛(PVB)作为复合固酶基质, 以对苯二酚为电子媒介, 制备了过氧化氢生物传感器。并将其与碘蓝紫外分光光度法检测过氧化氢作对比研究。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

CHI600C 电化学工作站, 上海辰华仪器公司生产, 工作电极为修饰玻碳电极, 铂电极为对电极, 参比电极为 Ag/AgCl(3 mol/L KCl)电极; UV-2550 紫外可见分光光度计, 日本岛津公司生产; SB-80 超声清洗仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司生产。

辣根过氧化物酶(HRP, EC. 1. 11. 1. 7, 250 U/mg), 国药集团化学试剂有限公司生产; 多壁碳纳米管(MWNT), 深圳纳米港公司生产, 在 2.6 mol/L HNO₃ 中回流 10 h; 聚乙烯醇缩丁醛(PVB), 上海楷洋生物技术有限公司生产; 对苯二酚, 成都科龙化工试剂厂生产; 碘化钾(KI), 重庆化学试剂厂生产; 盐酸(HCl), 重庆化学试剂厂生产; 淀粉, 天津瑞金特化学品有限公司生产; 氯化钠(NaCl), 成都科龙化工试剂厂生产; 过氧化氢(H₂O₂, 质量分数为 30%), 成都科龙化工试剂厂生产; 其他试剂均为分

收稿日期: 2013-11-08

基金项目: 贵州大学引进人才科研项目(贵大人基合字(2012)012号); 贵州省科学技术基金项目(黔科合J字[2013]2111号)

作者简介: 韩莉(1983-), 女, 博士研究生, 主要从事电化学生物传感器与环境监测方面的研究, h18949@gmail.com; 张义明(1957-), 男, 博士, 教授, 研究方向为应用微生物, 通讯联系人, ymzhang5262@163.com; 黄民生(1962-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事环境治理与修复技术研究, mshuang@des.ecnu.edu.cn。

析纯;试验用水均为二次蒸馏水。0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(PBS)由 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 配制; H_2O_2 现配现用,实验前对其进行标定。

1.2 过氧化氢生物传感器的制备

将直径为 3 mm 的玻碳电极用金相砂纸抛光,再在绸布上用 0.3 μm 和 0.05 μm 粒度的 $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ 粉末抛光。抛光后的电极经二次水洗净后,依次在乙醇、二次水中超声各 2 min。把处理好的玻碳电极放入 0.1 mol/L pH 7.0 的 PBS 进行循环伏安扫描直至电极稳定。取出用氮气吹干备用。

HRP/PVB/MWNT 电极的制备:将 30 μL 1 mg/mL MWNT 悬液和 25 μL 2.5 mg/mL HRP 溶液混合,1 h 后取 0.2 mL 15 mg/mL PVB 无水乙醇溶液于混合液中并搅拌均匀。取 5 μL 混合液滴加到玻碳电极上,室温晾干,制得 HRP/PVB/MWNT 修饰电极。制得的电极不用时置于 PBS 中 4 $^\circ\text{C}$ 保存。

1.3 紫外分光光度法溶液配制

取 8 只具塞比色管,分别加入 5、10、15、50、100、200、300、500 μL 1.0 mmol/L H_2O_2 溶液,分别加水定容至 15 mL,分别依次加入 1 mL 体积分数为 10% 的 HCl 溶液、0.75 mL 200 g/L NaCl 溶液、0.3 mL 10 g/L KI 溶液、0.2 mL 10 g/L 淀粉溶液,配成 H_2O_2 浓度系列。摇匀,避光反应 30 min。

1.4 检测方法

传感器检测方法:Ag/AgCl 电极为参比电极,铂丝电极为对电极,酶电极为工作电极。以 pH 7.0、0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液(PBS)为测试底液,4.2 mmol/L 对苯二酚为电子媒介,采用 $i-t$ 曲线探讨电极对 H_2O_2 的响应。 $i-t$ 曲线实验在电磁搅拌的 PBS 溶液中进行,测试工作电位为 -0.25 V。待背景电流稳定后加入不同质量分数的 H_2O_2 ,并记录其稳态还原电流。所有的测量都在室温条件(25 $^\circ\text{C}$)下进行。测试前向溶液中通氮气 10 min,以除去溶液中的溶解氧。酶电极不用时,保存于 4 $^\circ\text{C}$ PBS 溶液中。

紫外分光检测方法:将配制的不同浓度 H_2O_2 系列避光反应 30 min 后测量吸光度值。每个浓度重复测定 3 次取平均值,以吸光度对 H_2O_2 的浓度($\mu\text{mol/L}$)绘制曲线。

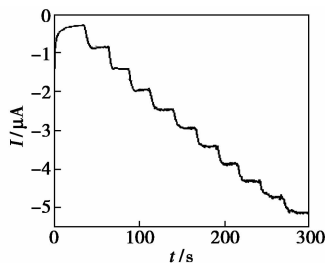
2 结果与讨论

2.1 传感器检测过氧化氢原理探讨

玻碳电极(GCE)是一类性能较好、制作相对简便的固态电极,笔者用其作为固定酶的基础电极。

在玻碳电极表面形成一层稳定的碳纳米管复合物膜。酸活化的 MWNT 带负电,具有高比面积的带负电荷的 MWNT 与表面带正电荷的 HRP(等电点 pH 8.9)产生静电吸附作用^[6],有效地防止酶从膜中泄漏,同时也保持了酶的活性^[7],有利于提高检测灵敏度。PVB 具有良好的黏性,也可以很好地固定酶,制备得到性能良好的电学生物传感器。

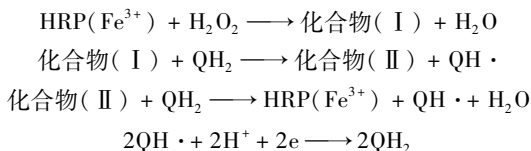
在对苯二酚媒介体的作用下,该生物传感器对过氧化氢表现出良好的电催化活性,如图 1 所示。



底液:6 mL 0.1 mol/L PBS(pH 7.0) + 4.0 mmol/L 对苯二酚溶液;工作电位: -250 mV

图 1 传感器对连续加入 0.10 mmol/L H_2O_2 的电流响应

其响应机理如下:



其中, Fe^{3+} 为 HRP 的辅因子,化合物(I)(氧化价态 +5)和化合物(II)(氧化价态 +4)分别代表 HRP 的中间产物; QH_2 代表电子媒介体对苯二酚,为电子供体; $\text{QH}\cdot$ 代表对苯二酚的氧化形式。HRP 被 H_2O_2 氧化,失去 2 个电子生成化合物(I),该中间体由含氧铁($\text{Fe}^{4+} = \text{O}$)和 1 个卟啉阳离子组成;随后化合物(I)从第 1 个电子供体 QH_2 得到 1 个电子,被还原为化合物(II),化合物(II)又从第 1 个电子供体 QH_2 上得到 1 个电子被还原为 HRP(Fe^{3+}),至此 HRP 被还原为初始状态;接着, $\text{QH}\cdot$ 从电极快速获得 1 个电子,又被还原为 QH_2 。

2.2 传感器的线性范围测定

经优化实验条件(PBS pH 7.0,对苯二酚溶液浓度为 4.0 mmol/L,工作电位为 -250 mV)后,用电流时间法测定传感器对 H_2O_2 的电流响应校正曲线,如图 2 所示。试验结果表明, H_2O_2 浓度在 $1.67 \times 10^{-7} \sim 8.90 \times 10^{-4}$ mol/L 范围内与响应电流呈线性关系,线性回归方程为 $I(\mu\text{A}) = 5.63c - 0.10$,相关系数为 0.992,检出限为 5.55×10^{-8} mol/L($S/N=3$)。

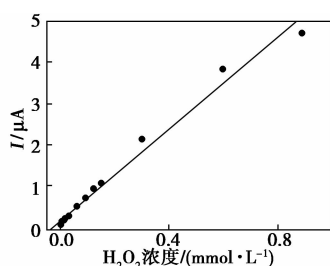


图2 传感器检测 H_2O_2 的标准曲线

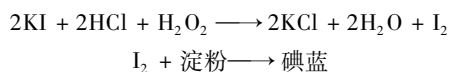
2.3 传感器的重现性、稳定性及抗干扰性

用 0.10 mmol/L H_2O_2 考察了传感器的重现性及稳定性。用同一支电极对 H_2O_2 重复测定 8 次, 相对标准偏差为 3.02% 。当酶电极不使用时置于 PBS 中 4°C 保存。5 d 后, 该生物传感器的响应下降约 4.3% ; 20 d 后, 该生物传感响应下降约 20% ; 50 d 后, 传感器的响应下降为最初的 50% 。

测定了 H_2O_2 浓度为 0.10 mmol/L 时传感器的抗干扰情况。加入 20 倍的葡萄糖、乙醇、乙酸、柠檬酸、甘氨酸均无明显干扰, 5 倍的抗坏血酸存在一定的干扰, 这是由于抗坏血酸在试验电位范围内具有电化学活性, 与 H_2O_2 发生了氧化还原反应, 使 H_2O_2 浓度降低的结果。由于抗坏血酸在碱性条件下不稳定^[8], 在测定前可将样品调成碱性, 放置一段时间, 待抗坏血酸分解后再进行测定, 可排除干扰。

2.4 紫外分光光度法检测原理

溶液中过氧化氢在稀 HCl 中可使碘化钾氧化产生碘, 碘与淀粉溶液反应生成碘蓝。不同浓度的过氧化氢生成颜色深浅不同的碘蓝^[9]。其吸光度与过氧化氢的浓度在一定范围内呈线性关系。其反应式为:



2.5 紫外分光光度法线性范围测定

经实验, H_2O_2 浓度在 $6.67 \times 10^{-7} \sim 1.33 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 范围内与吸光度值呈线性关系, 吸光度 y 与 H_2O_2 浓度 x 的关系为 $y = 0.0039x - 0.021$, 线性相关系数 $R = 0.9993$, 如图 3 所示。

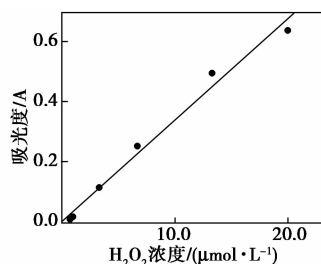


图3 过氧化氢浓度与吸光度的关系

2.6 重现性及抗干扰实验

利用本方法对人工配制的含 H_2O_2 0.3 、 1.0 、 $10 \mu\text{mol/L}$ 3 个浓度的样品进行重现性实验, 3 个浓度对应的 RSD 分别为 1.91% 、 1.03% 、 1.40% 。3 个浓度样品的 RSD 均符合检测方法要求。表明该方法的重现性较好。

实验研究了过氧化氢检测过程中可能存在的干扰情况。经证实, 样品中含有过硫酸铵、碘酸钾、溴酸钾等氧化剂 $15 \mu\text{mol/L}$ 时, 对过氧化氢测定无干扰。

3 结论

以对苯二酚为电子媒介, 聚乙烯醇缩丁醛为固酶基质, 将多壁碳纳米管与辣根过氧化物酶复合物固定在电极表面制备了一种过氧化氢生物传感器。将其与碘蓝紫外分光光度法进行对比研究表明, 该传感器制备方法简单, 易行, 检测灵敏, 有较好的电流响应和较低检测下限。较紫外分光光度法线性范围宽, 检出限低, 检测快速, 但该传感器在重现性、稳定性及抗干扰性方面还存在欠缺。

参考文献

- [1] 潘勇军, 谢洪泉, 谭晓明, 等. 碘量滴定法测定过氧化氢溶液浓度的改进[J]. 理化检验-化学分册, 2003, 39(7): 404-405.
- [2] Chai X S, Hou Q X, Luo Q, et al. Rapid determination of hydrogen peroxide in the woodpulp bleaching steam by a Dual-wavelength Spectral Method[J]. Anal Chim Acta, 2004, 507: 281-284.
- [3] 魏小平, 刘涛, 屈太原, 等. 磁性量子点电致化学发光法测定李氏禾提取液中的过氧化氢[J]. 分析测试学报, 2012, 31(3): 332-336.
- [4] 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.
- [5] Tian Shu, Zhou Qun, Gu Zhuomin, et al. Hydrogen peroxide biosensor based on microperoxidase-11 immobilized in a silica cavity array electrode[J]. Talanta, 2013, 107(3): 324-331.
- [6] Huang R, Hu N F. Direct electrochemistry and electrocatalysis with horseradish peroxidase in Eastman AQ film[J]. Bioelectrochemistry, 2001, 54(1): 75-81.
- [7] Zhuo Y, Yuan R, Chai Y Q, et al. A reagentless amperometric immunosensor based on gold nanoparticles/thionine/naftion-membrane-modified gold electrode for determination of α -1-fetoprotein [J]. Electrochem Commun, 2005, 7: 355-360.
- [8] 李华刚, 袁若, 柴雅琴, 等. HRP-纳米金/纳米硫化镉/聚天青 I 修饰玻碳电极的制备及用作过氧化氢生物传感器[J]. 理化检验-化学分册, 2008, 44(8): 701-705.
- [9] 张耀亭, 白世基, 张维. 改进的水中痕量过氧化氢的分光光度测定法[J]. 环境与健康, 2006, 23(3): 258-261. ■