

基于铜离子(II)类过氧化物酶性质可视化比色法检测过氧化氢

马纪^{1,2*}, 黄国霞^{1,2}, 李军生^{1,2*}, 阎柳娟^{1,2}, 张倩¹

1. 广西糖资源绿色加工重点实验室/生物与化学工程学院, 广西科技大学, 广西柳州 545006

2. 广西柳州螺蛳粉工程技术研究中心, 广西柳州 545006

摘要 过氧化氢(H₂O₂)在食品工业、环境监测分析、燃料电池、临床诊断等领域得到十分广泛的应用。过氧化氢不仅是严重疾病的生物标志物,也是重要的食品添加剂。无论从食品安全还是人类健康考虑,对过氧化氢构建简便、快速、灵敏的检测方法具有重要意义。比色法因具有易操作、成本低及检测结果可视化等优点被广泛关注。比色法普遍使用的酶是辣根过氧化物酶(HRP)。但天然酶存在易失活、生产成本低及稳定性差等不足。纳米酶克服了HRP易失活的缺点。然而部分纳米酶合成复杂、需要表征、水溶性差及催化活性低等。与HRP和纳米酶相比,具有类过氧化物酶性质的铜离子(II),不仅具有灵敏度高的特点,而且不需要复杂的合成、易获得、易储存、不需修饰可直接使用、操作简单及分析成本低廉等优势。铜离子(II)类酶能够通过催化过氧化氢生成羟基自由基,氧化3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)而产生氧化态TMB,使溶液的颜色由无色逐渐转变为蓝色,从而产生光信号,这些光信号可以肉眼识别和通过紫外分光光度计检测。基于上述原理构建过氧化氢的快速比色传感并应用于银耳样品的检测。实验考察了体系中过氧化氢浓度、pH值、温度等因素对吸光度的影响。选择缓冲溶液pH值为3.0,温度40℃,TMB和铜离子(II)浓度分别为 6.0×10^{-4} 和 8.0×10^{-3} mol·L⁻¹,反应时间为20 min。在最优条件下,过氧化氢浓度与体系的吸光度值呈良好的线性关系,线性范围是0.08~40 μmol·L⁻¹,检测限为0.14 μmol·L⁻¹。该法可检测银耳中过氧化氢的浓度,加标回收率在97.10%~107.08%之间,相对标准偏差(RSD)小于5%。该研究无需特殊检测设备条件下实现过氧化氢的简单、快速、成本低廉且灵敏的可视化检测,有利于过氧化氢的定量检测在食品领域和临床上的快速推广。

关键词 铜离子(II); 过氧化物模拟酶; 比色法; 过氧化氢

中图分类号: O657.3

文献标识码: A

DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2022)09-2795-05

引言

过氧化氢(H₂O₂)是一种强氧化剂,具有漂白、防腐、杀菌和消毒作用,广泛应用于工业、食品和医疗领域,但其过量添加产生的副作用日益凸显。过氧化氢进入人体可产生羟基自由基,导致细胞凋亡、加速人体衰老、诱发心血管疾病和癌症等^[1]。美国食品和药物管理局(FDA)规定了H₂O₂的最大残留限量标准为15 μmol·L⁻¹^[2]。因此,开发一种简便、快速、灵敏度高、成本低的过氧化氢检测方法刻不容缓。

目前,有关过氧化氢的分析方法主要有色谱法^[3]、化学

发光法^[4]、电化学法^[5-6]、荧光光度法^[7-8]、比色传感法^[9-11]等。其中,比色传感法因具有操作简单、检测速度快、分析成本低及检测结果可视化等优点被广泛关注。比色传感法主要是在酶的催化作用下,利用过氧化氢氧化底物光学性质的变化为检测信号。比色法通常使用的酶是辣根过氧化物酶(HRP),由于天然酶存在易失活、稳定性差及制备过程繁琐等限制了其广泛应用。因此,许多研究者探索人工模拟酶替代天然酶。自Fe₃O₄纳米粒子首次被证实具有类HRP的催化活性以来^[12],纳米酶在科学技术和研究中迅速得到了发展。越来越多不同形貌、尺度的模拟酶相继出现^[13-14]。然而,部分纳米材料模拟酶存在合成复杂、合成使用的有机溶剂易

收稿日期: 2021-07-24, 修订日期: 2021-11-01

基金项目: 国家自然科学基金面上基金项目(21966008), 广西自然科学基金面上基金项目(2020GXNSFAA159021), 广西高校中青年教师基础能力提升项目(2020KY08006), 广西糖资源绿色加工重点实验室基金项目(GXTZY202002), 广西科技大学博士基金项目(校科博20z26)资助

作者简介: 马纪,女,1981年生,广西科技大学生物与化学工程学院博士研究生 e-mail: 2008xiushui@163.com

* 通讯作者 e-mail: 2008xiushui@163.com; junshenglee63@aliyun.com

造成二次污染、需要表征、水溶性差、稳定性不高及催化活性低等不足。为了快速灵敏检测 H_2O_2 ，寻找高效的过氧化物模拟酶是一项迫切的任务。

与 HRP 和纳米过氧化物酶相比，铜离子(II)类过氧化物酶不仅具有灵敏度高、易获得、不需要复杂的合成、易储存、不需修饰可直接使用、操作简单及成本低廉等优点^[15]。因此，我们开发一种基于铜离子(II)类过氧化物酶的比色法检测过氧化氢的新方法。利用铜离子(II)类过氧化物酶的活性催化过氧化氢氧化 TMB 产生氧化态 TMB，使溶液颜色从无色转变为蓝色，变蓝的程度与过氧化氢的浓度成正比，构建线性关系，从而确定过氧化氢的含量。在此基础上，采用该方法高灵敏地检测了银耳中的过氧化氢含量。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

Cary60 紫外可见分光光度计，美国安捷伦科技有限公司(取样间隔：3 nm；扫描速度：快速；波长范围：500~750 nm)。梅特勒 AL104 分析天平(110 g/0.1 mg 电子天平)，梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。30% 过氧化氢(H_2O_2)，醋酸钠(NaAc)，冰乙酸(HAc)，醋酸铜，天津威晨化学试剂科贸有限公司；3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)，上海阿拉丁生化科技股份有限公司；实验所用的水为去离子水。

1.2 方法

1.2.1 基于铜离子模拟酶催化检测过氧化氢

在 5 mL 具塞试管中，分别加入一定量的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铜溶液、一定量的 $5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMB 溶液以及一定量不同浓度的过氧化氢，用缓冲溶液(pH 3.0)定容至 2.5 mL，将试管置于 40°C 水浴锅中反应 30 min。采用紫外-分光光度计在 500~750 nm 范围内对溶液进行光谱测定。记录 652 nm 波长下吸光度值 A 和相同条件下空白溶液的吸光度 A_0 ，计算 $\Delta A = A - A_0$ 。

1.2.2 银耳实际样品处理与测定

待测样品为银耳，购买于当地超市。将 5.0 g 银耳粉碎，溶于 5.0 mL HAc-NaAc 缓冲溶液中，超声震荡 20 min，经过离心和 $0.45 \mu\text{m}$ 孔径滤膜过滤，除去不溶物，向处理好的 1.0 mL 样品溶液中分别加入 1.0×10^{-5} ， 2.0×10^{-5} ， $3.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的过氧化氢，定容至 2.5 mL，得到处理后分别添加 1.0×10^{-5} ， 2.0×10^{-5} 和 $3.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 过氧化氢的待测样品溶液。

2 结果与讨论

2.1 可视化检测过氧化氢的原理

图 1 为铜离子(II)比色法检测过氧化氢的原理图。铜离子(II)具有类过氧化物酶性质[图 1(a)]，过氧化氢氧化 TMB，在铜离子(II)的催化下溶液从无色变为蓝色[图 1(b)]。该反应系统可以肉眼可视化和紫外-可见分光光度计检测。通过铜离子(II)催化过氧化氢氧化 TMB 显色，建立快速检测过氧化氢的比色传感器。

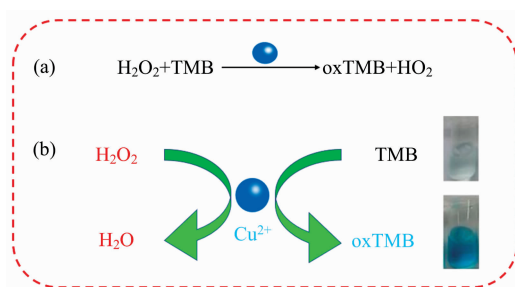


图 1 铜离子(II)- H_2O_2 -TMB 比色反应(a)和比色法检测过氧化氢的示意图(b)

Fig. 1 Schematic illustration of Cu^{2+} - H_2O_2 -TMB colorimetric reaction (a) and colorimetric detection of H_2O_2 (b)

2.2 检测体系可行性研究

采用比色法对体系进行可行性实验。如图 2 所示， H_2O_2 能缓慢氧化 TMB 使溶液呈现很浅的蓝色，在 652 nm 附近有一个弱的吸收峰(图 2a)； Cu^{2+} 不能氧化 TMB(图 2b)，但在 TMB- H_2O_2 体系加入 Cu^{2+} 后， H_2O_2 氧化 TMB 的速度明显加快，使溶液呈现深蓝色，在 652 nm 处的吸收峰强度显著增加(图 2c)，说明铜离子(II)具有类过氧化物酶活性，能催化 TMB- H_2O_2 体系并能可视化检测过氧化氢。

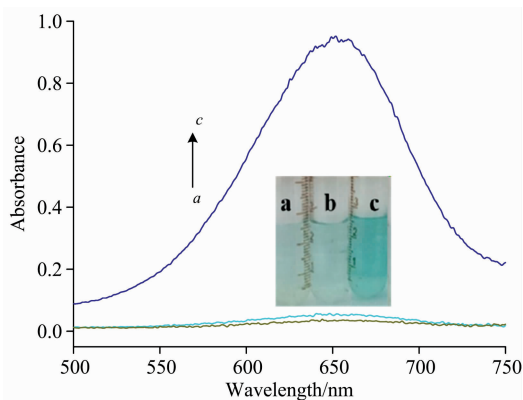


图 2 可行性试验的紫外可见光谱图，插图各曲线对应的反应体系的照片

a: TMB- H_2O_2 ; b: TMB- Cu^{2+} ; c: TMB- H_2O_2 - Cu^{2+} ; $c_{\text{TMB}} = 6 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{Cu}^{2+}} = 8 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{H}_2\text{O}_2} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig. 2 UV-Visible absorption spectra of feasibility experiment;

Inset is the typical photograph of the corresponding curve

a: TMB- H_2O_2 ; b: TMB- Cu^{2+} ; c: TMB- H_2O_2 - Cu^{2+} ; $c_{\text{TMB}} = 6 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{Cu}^{2+}} = 8 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{H}_2\text{O}_2} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

2.3 条件优化

考察了缓冲溶液 pH 值对体系吸光度值的影响。随着 pH 值的增大，溶液在 652 nm 处的紫外吸光度值逐渐增大，当 pH 3.0 时溶液在 652 nm 处的吸光度值 ΔA 最大，之后溶液吸光度值逐渐降低。因此，反应体系最佳 pH 值为 3.0。考察了温度对体系吸光度值的影响，结果表明， 40°C 时体系在 652 nm 处的吸光度值最大，从而确定最佳反应温度为 40°C 。考察了铜离子(II)浓度对体系吸光度值的影响。当 Cu^{2+}

浓度达到 $8.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 溶液在 652 nm 处的吸光度值 ΔA 达到最大, 从而确定检测试剂中铜离子的最佳浓度为 $8.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。考察了 TMB 浓度对体系吸光度值的影响。当 TMB 浓度为 $6.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 溶液在 652 nm 处的吸光度值最大, 之后溶液吸光度值趋于平缓。因此, 确定检测试剂中 TMB 溶液的最佳浓度为 $6.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。考察了反应时间对体系吸光度值的影响。如图 3 所示, 20 min 后溶液在 652 nm 处的吸光度值 ΔA 达到最大, 从而确定最佳反应时间为 20 min。

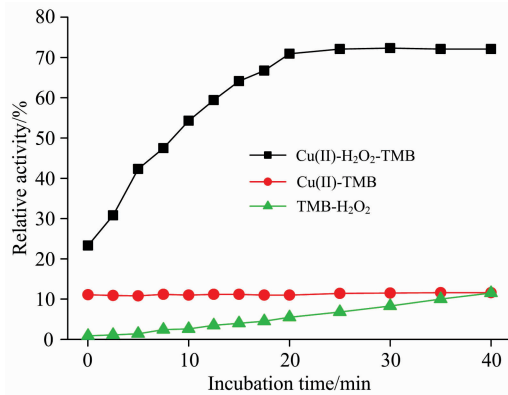


图 3 反应时间的影响

$c_{\text{TMB}} = 6 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{Cu}^{2+}} = 8 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{H}_2\text{O}_2} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig. 3 Effect of reaction time

$c_{\text{TMB}} = 6 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{Cu}^{2+}} = 8 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{H}_2\text{O}_2} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

2.4 标准曲线

在最优条件下, 按 1.2.1 的实验方法分别测定不同浓度的过氧化氢标准溶液, 采集紫外光谱(图 4), 以紫外光谱中 652 nm 处的紫外吸收强度变化值 $\Delta A(A - A_0)$ 对过氧化氢的浓度建立定量分析的标准曲线(图 5)。根据图 5 拟合得到线性方程 $\Delta A = 0.0268c - 0.0289$, $r^2 = 0.9980$ 。过氧化氢的浓度范围为 $0.08 \sim 40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 检测限为 $0.14 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.5 样品分析

对银耳中的过氧化氢进行检测分析。向 3 支 5 mL 具塞刻度试管中, 分别加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铜溶液 $200 \mu\text{L}$ 和 $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMB 溶液 $250 \mu\text{L}$, 用缓冲液定容至 2.5 mL, 分别加入上述处理后的待测样品溶液 $250 \mu\text{L}$, $40 \text{ }^\circ\text{C}$

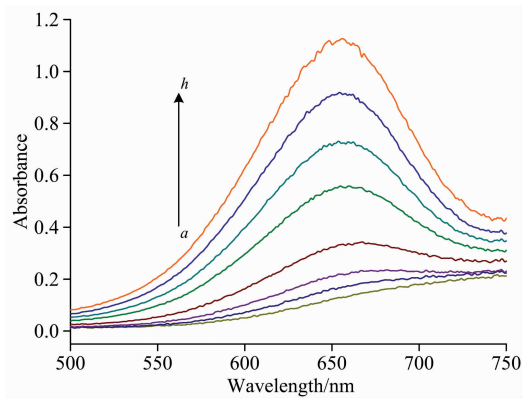


图 4 Cu^{2+} -TMB- H_2O_2 体系紫外吸收光谱

$c_{\text{TMB}} = 6 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{Cu}^{2+}} = 8 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; a-h: H_2O_2 浓度分别为 (0, 0.80, 2.0, 4.0, 8.0, 16, 24, 32, 40) $\times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig. 4 UV-Vis spectra of the Cu^{2+} -TMB- H_2O_2 system

$c_{\text{TMB}} = 6 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{Cu}^{2+}} = 8 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; a-h: the H_2O_2 concentrations are 0, 0.80, 2.0, 4.0, 8.0, 16, 24, 32 and $40 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively

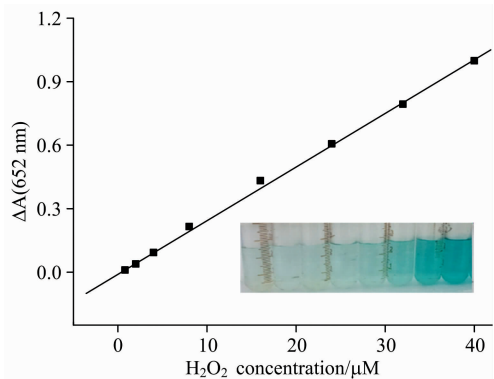


图 5 紫外吸收强度与浓度的线性拟合图

Fig. 5 The fitted curve of A_{652} versus the concentration of H_2O_2

水浴反应 20 min。采集紫外光谱, 读取 652 nm 处的紫外吸光强度值, 每个样品重复测样 3 次, 求平均值, 计算得到银耳中过氧化氢的含量为 $12.24 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (见表 1)。通过加标实验得到样品的加标回收率在 97.10%~107.08% 之间, 相对标准偏差(RSD)小于 5%, 表明该检测方法准确度高, 选择性好。

表 1 本方法检测银耳中过氧化氢的结果

Table 1 Result of H_2O_2 in tremella detected by this proposed method

样品	起始量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	加标量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	测定值/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	回收率/ %	相对标准偏差 (%, $n=3$)
1	0.36	10.00	10.59	102.22 ± 1.35	3.02
2	0.36	20.00	19.77	97.10 ± 0.42	1.26
3	0.36	30.00	32.51	107.08 ± 1.26	0.52

3 结 论

建立了一种铜离子(II)类过氧化物酶活性催化过氧化氢氧化 TMB 显色, 利用紫外分光光度法检测过氧化氢的新方法。在最佳的实验条件下, 过氧化氢的浓度在 0.08 ~ 40

$\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围与体系的吸光度变化值 ΔA 呈现良好的线性关系, 检测限(3σ)为 $0.14 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该法用于银耳样品中过氧化氢含量的测定, 结果令人满意。所建立的食品中过氧化氢的检测方法具有简便、快速、灵敏、成本低廉等优点, 在食品分析领域具有潜在的应用价值。

References

- [1] Camevale R, Nocella C, Pignatelli P, et al. *Atherosclerosis*, 2018, 274: 29.
- [2] Food and Drug Administration. *Code Fed. Regul.*, 2018, 21: 178.
- [3] Ivanova A S, Merkuleva A D, Andreev S V, et al. *Food Chem.*, 2019, 283: 431.
- [4] Pourfaraj R, Kazemi S Y, Fatemi S J. *J. Photoch. Photobio. A*, 2018, 364: 534.
- [5] Kostoa Y, Zanutb A, Franchi S, et al. *Appl. Surf. Sci.*, 2019, 488: 351.
- [6] Keziban A, Mahmut Ö. *Mater. Chem. Phys.*, 2021, 266: 124527.
- [7] Yang Z P, Liu Y, Lu C F, et al. *J. Alloy Compd.*, 2021, 862: 158323.
- [8] ZHU Dan-dan, QU Peng, SUN Chuang, et al(朱单单, 瞿 鹏, 孙 闯, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2020, 40(6): 1775.
- [9] Gong L, Chen Y, Bai X P, et al. *Microchem. J.*, 2021, 163: 105872.
- [10] Chen H Y, Shi Q, Deng G Q, et al. *Sensor Actuat. B-Chem.*, 2021, 343: 130104.
- [11] Kyoung M L, Hyungwoo K. *Dyes Pigments*, 2019, 170: 107546.
- [12] Gao L Z, Zhuang J, Nie L I. *Nat. Nanotechnol.*, 2007, 2: 577.
- [13] Mei X, Hu T T, Wang H, et al. *Biomaterials*, 2020, 258: 120257.
- [14] Tang Q, Cao S J, Ma T. *Adv. Funct. Mater.*, 2020, 31: 2007475.
- [15] Yang D Z, Li Q L, Tammina S K. *Sensor Actuat. B-Chem.*, 2020, 319: 128273.

A Visual Colorimetric Method for Hydrogen Peroxide Detection Based on the Peroxidase-Like Properties of Cu(II)

MA Ji^{1, 2*}, HUANG Guo-xia^{1, 2}, LI Jun-sheng^{1, 2*}, YAN Liu-juan^{1, 2}, ZHANG Qian¹

1. Guangxi Key Laboratory of Green Processing of Sugar Resources, College of Biological and Chemical Engineering, Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou 545006, China

2. Guangxi Liuzhou Luosifen Research Center of Engineering Technology, Liuzhou 545006, China

Abstract Hydrogen peroxide (H_2O_2) is widely used in the food industry, environmental monitoring and analysis, fuel cell, clinical diagnosis and other fields. Hydrogen peroxide is not only a biomarker of severe diseases but also an important food additive. In terms of food safety and human health, it is of great significance to construct a simple, rapid and sensitive detection method. Colorimetric method is widely concerned because of its advantages such as easy operation, low cost and visualization of detection results. The enzyme commonly used in colorimetric method is horseradish peroxidase (HRP). However, natural enzymes are easy to deactivate, have high production costs and have poor stability. Nanoenzyme overcomes the disadvantage of HRP's easy inactivation. However, some nanoenzymes are complex in synthesis, need to be characterized, and have poor water solubility and have low catalytic activity. Compared with HRP and nanoenzyme, copper ion (II) with peroxidase-like properties has the characteristics of high sensitivity and does not need complex synthesis, is easy to obtain, easy to store, without modification can be directly used, simple operation and low analysis cost, etc. Copper ion (II) can catalyze hydrogen peroxide to generate hydroxyl radicals and oxidize 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine (TMB) to produce the oxidation state TMB, which makes the color in the solution gradually change from colorless to blue, thus producing light signals that can be recognized by the naked eye and detected by ultraviolet spectrophotometer. Based on the above principles, a fast colorimetry sensor based on hydrogen peroxide was constructed and applied to detect tremella samples. The effects of hydrogen peroxide concentration, pH value, temperature and other factors on the absorbance were investigated. The pH value of the buffer solution was 3.0, the temperature was 40 °C, the concentration of TMB and Cu(II) was 6.0×10^{-4} and $4.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively, and the

reaction time was 20 min. Under the optimal conditions, the concentration of hydrogen peroxide had a good linear relationship with the absorbance of the system, the linear range was $0.08 \sim 40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, and the detection limit was $0.14 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The recoveries of hydrogen peroxide in tremella were $97.10\% \sim 107.08\%$, and the relative standard deviation (RSD) was less than 5%. In this study, a simple, rapid, low-cost and sensitive visual detection of hydrogen peroxide was achieved without special detection equipment, which is conducive to the rapid promotion of quantitative detection of hydrogen peroxide in the food field and clinical practice.

Keywords Copper ion (II); Peroxidase mimetic; Colorimetric method; Hydrogen peroxide

(Received Jul. 24, 2021; accepted Nov. 1, 2021)

* Corresponding authors

关于《光谱学与光谱分析》调整审稿费收费标准的通知

尊敬的《光谱学与光谱分析》广大作者、读者：本刊自2018年7月1日以后登记的稿件向投稿作者收取审稿费200元/篇，在您投稿之前，为免受经济损失，请您必须考虑：

1. 没有创新的一般性稿件，请您不要投稿。
2. 没有国家级基金资助的稿件，请您不要投稿。
3. 不是光谱专业的稿件，请您不要投稿。
4. 与其他文章重合率超过10%的稿件，请您不要投稿。

所投稿件经初审通过后，作者会收到缴纳审稿费的通知。请作者及时从我刊网站(<http://www.gpxygpx.com>)查询稿件是否处于交审稿费状态，在收到通知后，请及时缴纳审稿费；如在10天之内没有收到您的审稿费，被视为自动放弃，本刊不再受理。交费后本刊开据增值税电子普通发票，并传至作者提供的电子邮箱，作者可自行打印。

联系电话：010-62181070, 62182998

电子邮箱：chngpxygpx@vip.sina.com

感谢您多年来对《光谱学与光谱分析》的支持和厚爱！

《光谱学与光谱分析》期刊社

2018年6月30日