

酶催化荧光法测定大气水相中过氧化氢

沈 济 赵倩雪

(中国科学院生态环境研究中心)

摘 要

本文报道的酶催化荧光技术测定大气水相中 H_2O_2 ，可以在野外采集样品，经简单前处理后带回中心实验室测定。方法的最低检测限为 $2 \times 10^{-8} \text{M}$ ，在 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 至 $2 \times 10^{-5} \text{M}$ H_2O_2 浓度范围内工作曲线呈线性，在 $2 \times 10^{-6} \text{M}$ 和 $1 \times 10^{-5} \text{M}$ 时的变异系数小于3.0%。若用流动注射方式工作，样品量小于1ml，2—3min可以测定一个样品。

酸雨形成的一个重要途径是大气中的二氧化硫在水相中被氧化成硫酸，大气中气态二氧化硫 $\text{SO}_2(\text{g})$ 在大气水相中溶解，生成溶解态二氧化硫 $\text{SO}_2(\text{aq})$ ， $\text{SO}_2(\text{aq})$ 解离成 H^+ ， HSO_3^- ， SO_3^{2-} 等。 $\text{SO}_2(\text{aq})$ ， HSO_3^- 及 SO_3^{2-} 统称为溶解态 $\text{S}(\text{IV})$ 。随着大气水相pH降低， $\text{S}(\text{IV})$ 溶解度减小， O_3 氧化 $\text{S}(\text{IV})$ 及铁、锰催化氧化 $\text{S}(\text{IV})$ 的速度减慢，与之相反，由于酸催化作用，溶解态 H_2O_2 氧化 $\text{S}(\text{IV})$ 的速度不受pH的影响^[1]，这就造成这些反应物在通常大气浓度下，在pH小于4.6—5时，大气水相中 H_2O_2 氧化 $\text{S}(\text{IV})$ 是 $\text{S}(\text{IV})$ 被氧化的最快途径^[2]。

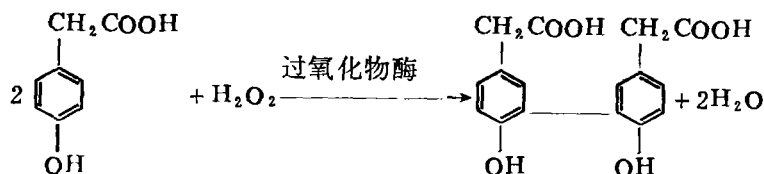
在一次降水过程中， H_2O_2 氧化 $\text{S}(\text{IV})$ 形成硫酸的多少决定于大气中 H_2O_2 和 $\text{S}(\text{IV})$ 的含量。因此，积累不同时间、不同地点大气水相（云、雾、雨、雪等）中 H_2O_2 的数据是研究控制酸雨的重要一步。

大气水相中溶解态 H_2O_2 来自大气中气态 H_2O_2 的溶解，或水相中自己生成的^[3]，直接测定气态 H_2O_2 比较困难。但 H_2O_2 作为氧化剂是在水相中氧化 $\text{S}(\text{IV})$ ，测量水相中溶解态 H_2O_2 不能不算是一种有效途径^[4]。由于鲁米诺试剂化学发光法测量大气水相中 H_2O_2 受到干扰^[4]，最近发展的酶催化荧光法，充分利用了荧光法的高灵敏度和酶催化反应的专一性，使该法广泛用于大气水相 H_2O_2 的测定^[5]。

本文报道一种酶催化荧光法测定大气水相中的 H_2O_2 ，尽量使用国产药品，可以在野外多点采样，集中到中心实验室测定。可以是流动注射式，也可以是非流动式，这样，很多型号的荧光仪都可以利用。

基 本 原 理

过氧化物酶催化还原过氧化物，使对羟基苯乙酸（PHOPAA）形成二聚物^[6]。例如，对 H_2O_2 有如下反应式：



反应是定量的, 即每打开一个过氧键 ($-\text{O}-\text{O}-\text{H}$), 就有一个二聚物生成。二聚物在激发峰波长320nm时产生荧光, 发射峰波长为 400nm, 因此, 二聚物荧光强度与过氧化物浓度成正比, 二聚物在几天内是稳定的, 可以在采样点反应生成, 带到中心实验室测定^[6]。

实 验 部 分

1. 仪器和试剂

所用仪器及试剂的生产厂家及规格列于表1, 除对羟基苯乙酸外, 其余均为国产试剂。用酶催化荧光法测定 H_2O_2 对去离子水的纯度要求较高^[5], 本实验用新蒸的二次蒸馏水或市售蒸馏水通过阴阳离子交换柱的去离子水。

表 1 试 剂 和 仪 器
Table 1 Chemicals and apparatus

试 剂	三羟甲基氨基甲烷 (TRIS), 分析纯 过氧化物酶 (辣根), 250单位/mg酶 对羟基苯乙酸 (PHOPAA) 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA), 分析纯 30%过氧化氢, 分析纯	成都化学试剂厂 上海生物化学研究所 东京化成工业株式会社 成都化学试剂厂 中国医药公司北京采购供应站
仪 器	PE-1000 荧光分光光度计 RF-510 荧光分光光度计 RF-540 荧光分光光度计 FP-550 荧光分光光度计 LP-1型蠕动泵 不锈钢聚四氟乙烯六通阀 石英荧光比色杯 (10mm×10mm)	Perkin Elmer 岛津 岛津 日本分光 中科院科仪厂 温州市南郊电器元件厂 上海玻璃四厂

2. 操作步骤

H_2O_2 标准液用市售30% H_2O_2 试剂经多次稀释得到, 在1% H_2O_2 标准储备液中加入 $5 \times 10^{-5} \text{M}$ 锡酸钠, H_2O_2 的分解速度每月小于1%^[5], 制作工作曲线的 H_2O_2 标准液由1%的标准储备液每天配制。 H_2O_2 标准液用高锰酸钾法标定, 高锰酸钾溶液用草酸钠标定^[7]。

PHOPAA使用液用Kelly改进的方法制备^[4], 准确称取3.03g TRIS, 0.095g EDTA, 1.50g PHOPAA和3.1mg辣根过氧化物酶, 加去离子水及1mL 3N盐酸使其溶解, 转移至50ml容量瓶中用去离子水稀至刻度, 此溶液称 PHOPAA 混合液, 保存在冰箱中可使用一周。PHOPAA混合液用去离子水稀释5倍称PHOPAA 使用液, 保存在冰箱或冰瓶中可使用一、二天。

准确吸取10.0ml雨水于10ml具塞试管中, 准确加入 1.0ml PHOPAA 使用液, 保存

在冰箱或冰瓶中。若样品可能有S(IV)干扰时,在10.0ml两样中加入1.0mL 20mM甲醛溶液,摇匀,放置一分钟再加入PHOPAA使用液。

在稀释到不同浓度的10.0ml标准 H_2O_2 溶液中,各加入1.0ml PHOPAA 使用液,在荧光仪上测定荧光值,绘制工作曲线。

图1是测定PHOPAA二聚物荧光值的流动注射装置示意图^[8]。用2ml玻璃注射器吸取样品1ml,注入六通阀的进样圈中,转动六通阀,样品即被蠕动泵驱动的去离子水载入Perkin-Elmer1000型荧光仪的流动池,流速为5.3ml/min。荧光仪的输出信号记录在记录仪上,如图2。

国内大多数荧光仪未安装流动池,用10mm×10mm荧光比色杯同样可以测定。

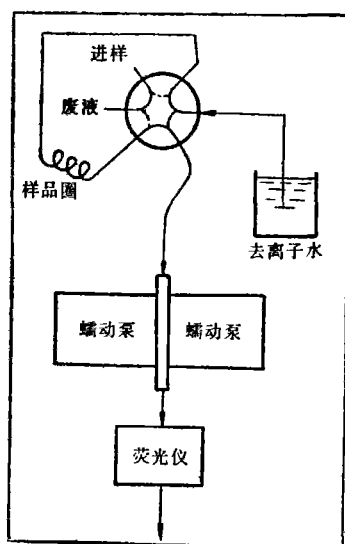


图1 流动注射式酶催化荧光法测定 H_2O_2 装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the apparatus for determination of aqueous hydrogen peroxide by the PHOPAA fluorescence method

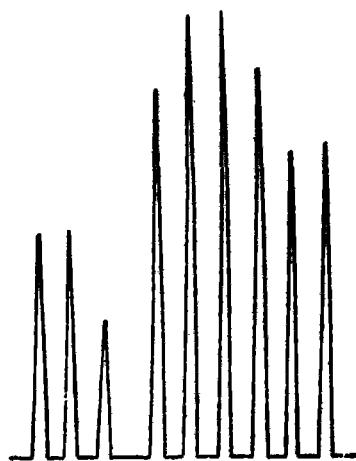


图2 流动注射式测定不同浓度 H_2O_2 的记录

Fig. 2 A record for determination of aqueous hydrogen peroxide by flow-injection system

结 果 与 讨 论

H_2O_2 浓度在 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 至 $2 \times 10^{-5} \text{M}$ 范围内,荧光值与 H_2O_2 浓度呈线性相关,相关系数为0.999,工作曲线呈直线。以3倍空白样的标准偏差为最低检测限,测得为 $2 \times 10^{-8} \text{M}$ 。在 H_2O_2 浓度分别为 $1 \times 10^{-5} \text{M}$, $2 \times 10^{-8} \text{M}$ 时,一个样品10次测量的变异系数为3.0%和2.9%。

大气水相中 H_2O_2 平均以每小时5%的速率衰减^[5]。用化学发光法^[9]、荧光法^[5,10]测 H_2O_2 。采集的水样要立即分析,这就要求在每一个采样点上都需配备一台仪器及相应的实验条件。用酶催化法测 H_2O_2 ,生成的PHOPAA二聚物是稳定的,在

4℃的冰箱中保存12天后荧光值没有显著变化。因此,不论在什么条件的采样点上,只要将大气水样加入适量的 PHOPAA 使用液,保存在冰箱或冰瓶中,采样完毕,带回中心实验室测定,不影响其准确性。不同型号的荧光仪测定结果都较理想,工作曲线如图3所示。

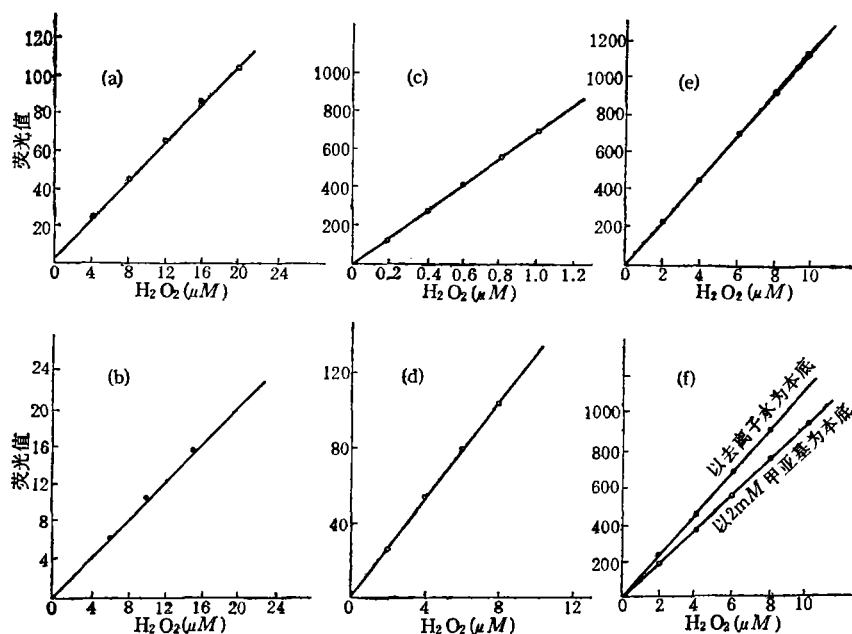


图3 不同型号荧光仪测定 H_2O_2 的工作曲线

Fig. 3 Calibration curves for determination of hydrogen peroxide with different fluorescence spectrophotometers

(a) 岛津RF-510 荧光仪; (b) 岛津RF-540荧光仪; (c) Perkin-Elmer PE-1000 荧光仪; (d) Perkin-Elmer PE-1000 荧光仪; (e) 日本分光FP-550 荧光仪; (f) 日本分光FP-550 荧光仪

d、f 为有2mM HCHO时的工作曲线

用过氧化物酶催化PHOPAA和过氧化物反应生成二聚体,测得的实际上是样品中的总过氧化物,包括过氧化氢、甲基过氧化氢、正丙基过氧化氢及过氧乙酸等。用过氧化氢酶除去样品中的过氧化氢,酶催化荧光技术可以测有机过氧化物,由差减法求得过氧化氢^[5]。大气有机过氧化物主要是甲基过氧化氢,亨利系数20℃时为307M/atm,而 H_2O_2 为 $1.09 \times 10^5 M/atm$,在通常的大气条件下,大气水相中过氧化物主要是过氧化氢^[8,11]。因此,可以测量大气水相中总过氧化物,并认为是过氧化氢。

用鲁米诺试剂化学发光法测量大气水相中的 H_2O_2 ,受到金属离子等无机物及PAN等有机物的干扰^[4]。而在PHOPAA混合液中加入了EDTA以掩蔽金属离子的干扰,又由于酶催化的专一性^[5],酶催化荧光法受到的干扰小。

大气中有 SO_2 , H_2O_2 等痕量气体,云水、雨水会洗脱这些气体,并在水相中反应。在地面收集雨水并测定 H_2O_2 ,由于S(IV)的干扰,测得的浓度和采样分析方法有关。例如,在地面采集半小时雨样,在雨样中立即加入PHOPAA使用液。此时,采样开始时收

集到的雨水中的 H_2O_2 有足够长的时间(半小时)和 S(IV) 反应,已基本完成。而采样结束时收集到的雨水尚未完成反应。如果在采样器中加入 HCHO ,使雨样中最终 HCHO 浓度为 2mM 左右。雨水中 S(IV) 优先和 HCHO 进行加成反应:



消除 S(IV) 的干扰^[5,8]。这时测量的 H_2O_2 浓度代表降雨到达地面时浓度。在有 2mM HCHO 存在时,工作曲线的斜率比没有 HCHO 时小 20% 左右(见图 3d, f),对其他参数没有影响。

由于大气水相中 H_2O_2 和 S(IV) 反应速度快^[1],在大气水相中不可能两者同时以高浓度存在。即有 H_2O_2 存在时, S(IV) 就很少;有 S(IV) 存在时, H_2O_2 就很少。两种方法测得结果相差不很大。

图 4 是在贵阳地区测得分段雨样中 H_2O_2 浓度频率分布图,典型的采样时间为半小时。如图所示,在城区基本上测不出 H_2O_2 ,在远郊区测得 H_2O_2 的频度还比较高。

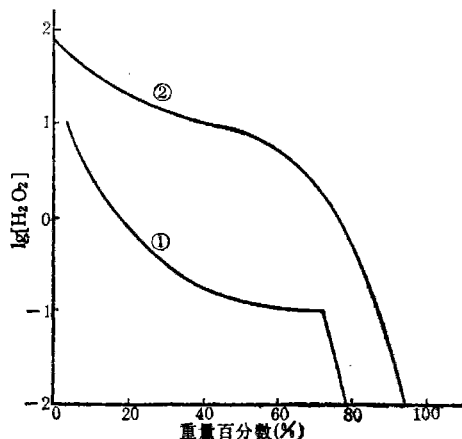


图 4 贵阳地区分段降雨中 H_2O_2 浓度分布
(1) 城区 (2) 远郊区

Fig. 4 Distribution of concentrations of hydrogen peroxide in the precipitations collected in Guiyang area

小 结

本文报道的荧光法测定大气水相中 H_2O_2 的方法比较实用,基本上使用国产试剂,几乎每个地方都能找到可以使用的荧光仪。不过要测量云水等少量珍贵样品或大量样品时,最好使用流动注射式,样品量可小于 1ml ,二、三分钟可测一个样品。

参 考 文 献

- [1] Lee Y-N, Shen J, Klotz P J et al., 1986. Kinetics of Hydrogen Peroxide-Sulfur(IV) Reaction in Rainwater Collected at a Northeastern U.S. Site. *J. Geophys. Res.*, 91(D12): 13264—74
- [2] Seigneur C, Saxena P, 1988. A Theoretical Investigation of Sulfate Formation in Clouds. *Atmos. Environ.*, 22(1): 101—15
- [3] Schwartz S E, 1984. Gas- and Aqueous-Phase Chemistry of H_2O_2 in Liquid Clouds. *J. Geophys. Res.*, 89(D7): 11589—98
- [4] Kelly T J, Daum P H, Schwartz S E, 1985. Measurements of Peroxides in Cloudwater and Rain. *J. Geophys. Res.*, 90(D5): 7861—71
- [5] Lazrus A L, Kok G L, Gitlin S N et al., 1985. Automated Fluorometric Method for Hydrogen Peroxide in Atmospheric Precipitation. *Anal. Chem.*, 57(4): 917—22
- [6] Kok G L, Thompson K, Lazrus A L et al., 1986. Derivatization Technique for the Determination of Peroxides in Precipitation. *Anal. Chem.*, 58(6): 1192—4
- [7] Vogel A I, 1961. A Text-book of Quantitative Inorganic Analysis (Third Edition) Longmans, Green and Co Ltd.
- [8] Tanner R L, Markovits G Y, Ferreri E M et al., 1986. Sampling and Determination of Gas-

- Phase Hydrogen Peroxide Following Removal of Ozone by Gas-Phase Reaction with Nitric Oxide. *Anal. Chem.*, 58(8): 1957—55
- [9] Kok G L, 1980. Measurements of Hydrogen Peroxide in Rainwater. *Atmos. Environ.*, 14(6): 653—6
- [10] 李巍, 苏维瀚, 1987. 自动荧光法测定大气及其降水中的过氧化氢. *环境化学*, 6(6): 23—9
- [11] Lee Y N, Shea J, Klotz P J, 1986. Chemical Composition of Precipitation at a Northeastern U.S. Site. *Water Air and Soil Pollution*, 30(1—2): 143—52

1989年1月20日收到。

DETERMINATION OF HYDROGEN PEROXIDE IN ATMOSPHERIC PRECIPITATION BY ENZYME CATALYZED FLUOROMETRIC METHOD

Shen Ji Zhao Qianxue

(Research Center for Eco-Environmental Sciences, Academia Sinica)

ABSTRACT

An enzyme catalyzed fluorometric method for the determination of hydrogen peroxide in atmospheric precipitation is reported. The determination is based on the formation of a stable fluorescent dimer by the reaction of hydrogen peroxide with *p*-hydroxyphenylacetic acid in the presence of peroxidase. The dimer can be made at the point of sampling location, and analyzed at a later time in a central laboratory. The minimum detection limit for H_2O_2 was found to be $2 \times 10^{-8} M$. The calibration curve was linear in the range of 1×10^{-7} to $2 \times 10^{-6} M$ of H_2O_2 . Less than 1ml aqueous sample and 2—3 minutes are required for measuring one sample if a flow-injection system is used.