

食品及其包装材料中双酚A的测定方法研究

蔡义林^{1,2,3}, 邓大庆^{1,2,3}, 丁鑫², 沈敏², 齐斌^{2,3}, 朱颖越^{2,3}

(1. 中国矿业大学, 徐州 221000; 2. 常熟理工学院, 常熟 215500;

3. 苏州食品生物技术重点实验室, 常熟 215500)

摘要: **目的** 基于阳离子聚合物(PDDA)能诱导金纳米粒子聚集, PDDA与单链核酸之间的电荷吸引效应能够阻止PDDA的诱导作用, 以及BPA核酸适配体的特异性, 构建一种新型生物传感器检测分析双酚A含量的方法。 **方法** 在含有特定浓度的单链DNA金纳米粒子溶液中依次加入双酚A和阳离子聚合物, 室温下混匀反应, 最后利用紫外检测器扫描整个体系光谱图。研究特定波长下的吸光值随双酚A浓度的变化值。 **结果** 在最佳优化条件下, 检测体系在特定波长处吸光值随BPA浓度的不同而发生变化, 在质量浓度为1~50 ng/mL时呈良好线性关系, 检出限为0.6 ng/mL。将该检测体系应用于BPA类似物的检测, 有较为明显的专一性。应用该法测定湖泊水中BPA标样的含量, 回收率为95.6%~108.0%。 **结论** 该方法对工业生产和食品安全中BPA的痕量检测具有一定的应用前景。

关键词: 阳离子聚合物(PDDA); 双酚A; 金纳米粒子; 吸光值

中图分类号: TB484.9; TS206.4; TS207 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-3563(2015)01-0033-04

Determination of Bisphenol A in Food and Plastic Food Containers

CAI Yi-lin^{1,2,3}, DENG Da-qing^{1,2,3}, DING Xin², SHEN Min², QI Bin^{2,3}, ZHU Ying-yue^{2,3}

(1. China University of Mining and Technology, Xuzhou 221000, China; 2. Changshu Institute of Technology, Changshu 215500, China; 3. Soochow Key Laboratory of Food Biotechnology Institute of Technology, Changshu 215500, China)

ABSTRACT: To design a new kind of biosensor for detection of bisphenol A (BPA) based on the fact that the aggregation of gold nanoparticles (AuNPs) could be induced by Phthalic Diglycol Diacrylate (PDDA), and that oligonucleotides combine with PDDA to prevent AuNPs from aggregation, and the specificity of the anti-BPA aptamer. AuNPs solution containing anti-BPA aptamer and PDDA at a certain concentration was set as the reaction system. Upon the addition of BPA and reaction at room temperature, the specific wavelength of light absorption value changed along with the concentration of BPA which could be determined by UV-Vis spectrometry. Under the optimal conditions, a low limit of detection of 0.6 ng/mL was obtained in the range of 1 ~ 50 ng/mL. In addition, the specificity was outstanding among analogues of BPA. The recovery rate in lake water samples spiked with BPA could reach 95.6% to 108.0%. A convenient and sensitive method was successfully used to determine BPA, and the method has a certain application prospect for industrial production and food security in the trace detection of BPA.

KEY WORDS: phthalic diglycol diacrylate (PDDA); bisphenol A(BPA); gold nanoparticles (AuNPs); absorption value

双酚A(BPA, 2,2-双对羟苯基丙烷)是合成聚碳酸酯、环氧树脂等多种高分子材料的重要单体, 可通过食品包装容器和塑料薄膜渗入食品或饮料。相关研究表

明^[1-2], BPA是一种内分泌干扰物, 具有雌性激素的特性, 影响人或动物的中枢神经系统和生殖免疫系统, 导致生殖器官异常和组织癌变等^[3]。为保证食品安全, 塑

收稿日期: 2014-10-08

基金项目: 江苏省基础研究计划(自然科学基金)项目(BK20130379); 江苏省高校自然科学研究面上资助经费项目(13KJB550001); 苏州市科技计划项目(SS201335)。

作者简介: 蔡义林(1989—), 男, 河南人, 中国矿业大学硕士生, 主攻生物检测分析。

通讯作者: 朱颖越(1983—), 男, 博士, 常熟理工学院讲师, 主要研究方向为食品安全。

料包装及水样中BPA检测新技术的研究具有重要意义。在现代检测技术中,以仪器为基础的检测BPA的方法已经得到广泛应用,如高效液相色谱法、气相色谱-质谱法等^[4-6],此外还有免疫学测定方法^[7-8]和电化学测定方法等^[9-11]。自从BPA适配子在2011年首次被筛选出来后,相较于免疫学测定方法,核酸配子具有抗体的特异性和敏感性,而且合成简单,在许多相关论文中已利用BPA寡核苷酸适配子检测BPA^[12-14]。

此外,金纳米粒子由于具有小尺寸效应,且展现出不同的电化学和光化学性质^[15-17],其溶液吸光值信号与金纳米的聚集程度具有很好的对应关系,因此相关比色方法探索目标物引起研究者的广泛兴趣。文中利用阳离子聚合物对金纳米粒子的诱导聚集效应^[18-19],结合具有特异性的单链DNA与阳离子聚合物、目标分析物BPA之间的相互作用,构建一种新型生物传感器,灵敏高效地检测食品及其包装材料中双酚A的含量。

1 实验

1.1 试剂与仪器

实验试剂:氯金酸(HAuCl_4)、柠檬酸三钠,分析纯,上海sigma公司;阳离子聚合物(PDDA)、BPA及其类似物,分析纯,上海百灵威科技;Tris碱,分析纯,上海化学试剂有限公司;实验用水均为超纯水。BPA核酸配子ssDNA,其序列为:5'-CCG GTG GGT GGT CAG GTG GGA TAG CGT TCC GCG TAT GGC CCA GCG CAT CAC GGG TTC GCA CCA-3',上海生工公司。

实验仪器:UV-2450型紫外可见分光光度计,日本岛津公司;密理博超纯水器,北京普析通用公司。

1.2 金纳米粒子溶液的合成

所用试剂均用超纯水配制。将配制的质量分数为0.01%的氯金酸溶液100 mL加入锥形瓶中,置于恒温电磁搅拌器上加热至沸腾并持续2 min,而后迅速加入2 mL质量分数为1%的柠檬酸三钠水溶液,继续搅拌加热,直到溶液变成透亮的酒红色时继续加热10 min,后停止加热,继续搅拌使其冷却,于温度为4 °C的环境下保存备用。

1.3 方法

将470 μL 0.02 mmol/L Tris-HCl缓冲液加入2

mL离心管中,依次加入ssDNA(终浓度为15 nmol/L),一定量的BPA溶液,用移液枪混合,室温下反应10 min,加入PDDA(终浓度为10 nmol/L)溶液,混合后加入1000 μL 金纳米粒子溶液,总定容为1.5 mL。室温下混合反应5 min,在波长为400~800 nm范围内扫描其吸光光谱。

1.4 原理

首先,PDDA作为阳离子聚合物能够代替盐诱导金纳米粒子聚集,且少量的PDDA就能引起体系吸光度的较大改变。另一方面,PDDA与ssDNA磷酸骨架之间相互吸引,使两者之间能够结合形成复合物。当含有特定比例的PDDA与ssDNA的反应体系中存在目标BPA时,由于ssDNA对BPA具有特异性的识别作用,ssDNA首先与BPA结合,体系中释放出自由状态的PDDA,加入金纳米粒子溶液后,由于不同BPA量释放出的自由PDDA量不同,溶液发生不同程度的聚集,溶液颜色由酒红色逐渐变为蓝紫色,紫外吸光值也随之改变。利用此原理,文中设计一种能快速检测BPA的生物检测方法。

2 结果与讨论

2.1 实验条件的优化

依据实验原理可知,PDDA与ssDNA的浓度对该方法有较大影响。首先,在金纳米粒子溶液中加入一系列不同浓度的PDDA,引起金纳米粒子不同程度的聚集和体系颜色的变化,其表现为680和520 nm处吸光度比值(A_{680}/A_{520})变化的不同。由图1a可知, A_{680}/A_{520} 值随PDDA浓度的不断增加而上升,在10 nmol/L处达到最高值,说明金纳米的聚集程度最大,因此实验体系的PDDA浓度确定为10 nmol/L。其次,为确定ssDNA的含量,在金纳米粒子溶液中先加入10 nmol/L PDDA,然后加入不同浓度的DNA。由图1b可知,当DNA的浓度为15 nmol/L时,反应体系的 A_{680}/A_{520} 值变化程度较小,表明此时溶液的聚集度较小,ssDNA与PDDA的比值最佳,因此实验确定ssDNA的浓度为15 nmol/L。

2.2 BPA标准曲线的测定

在最优化的实验条件下,设置一系列不同质量浓度的BPA(0.5, 1, 5, 10, 30, 50, 80, 100 ng/mL),依据实

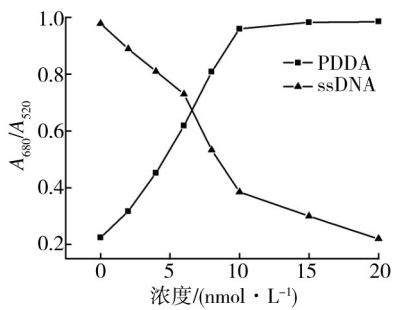


图1 纸蜂窝夹心复合材料结构

Fig.1 The structure diagram of paper honeycomb sandwiched composite material

验方法对体系的吸光值进行测量,见图2—3。随着BPA质量浓度的变化,溶液的 A_{680}/A_{520} 值呈上升趋势,且在BPA质量浓度为1~50 ng/mL范围内呈现出线性变化,线性方程为 $y=0.35+0.0095x$,线性相关系数为0.9932,其中 y 为体系的 A_{680}/A_{520} 值, x 为体系中BPA的质量浓度,检测限可达0.6 ng/mL。

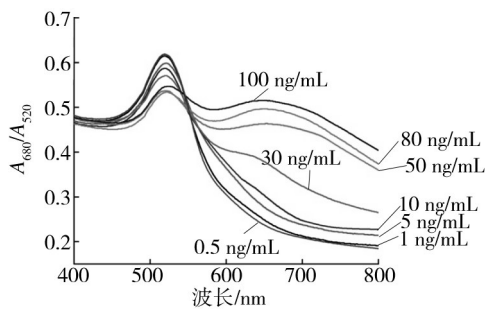


图2 不同BPA质量浓度下溶液的紫外可见光谱

Fig.2 The UV-Vis spectra of solutions containing different concentrations of BPA

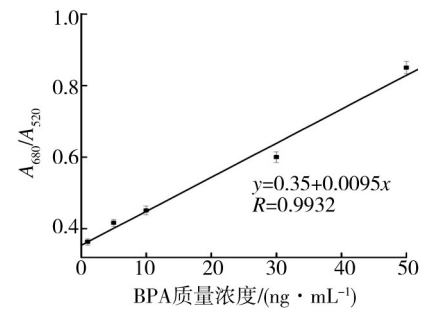


图3 BPA质量浓度标准曲线

Fig.3 BPA concentration standard curve

2.3 特异性分析

取3种BPA类似物,双酚B(BPB)、双酚C(BPC)和己烯雌酚(DES),采用与BPA相同的实验方法,在各自质量浓度均为50 ng/mL时测量体系的吸光值变化,实

验结果见图4。由图4可知,BPA类似物对实验体系的 A_{680}/A_{520} 值影响较小,结果表明当BPA类似物存在时,运用此方法检测BPA具有较好的专一性和选择性。

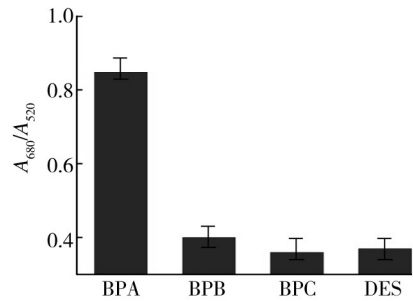


图4 特异性分析

Fig.4 Analysis of specificity

2.4 实际样品检测分析

取适量的湖水,配制成不同浓度的BPA标液,在实验最佳条件测量,进行加标回收实验,结果见表1。由表1可知,回收率在95.6%~108.0%之间,说明该检测方法可用于BPA实际样品的测定。

表1 湖泊水样中BPA回收率测定结果			
Tab.1 BPA recovery determination in lake water samples			
标样 编号	标样质量浓 度/(ng·mL ⁻¹)	测得量(平均值±标准 偏差)/(ng·mL ⁻¹)	平均回 收率/%
1	1	1.08±0.07	108.0
2	5	5.1±0.12	102.0
3	10	10.4±0.17	104.0
4	30	28.7±0.41	95.6

注:平均值为5次实验平均值。

3 结语

基于阳离子聚合物导致的金纳米溶液吸光性质的变化和核酸配子的优异特性,设计出一种能实时快速检测水样中BPA的生物比色传感器,在优化条件下,定量和定性检测均取得较好结果。相比于传统的仪器检测和免疫学检测技术,该方法简便、快速,具有高选择性和特异性,实现了对实际水溶液中BPA的测定。

参考文献:

[1] CHAPIN R E, ADAMS J, BOEKELHEIDE K, et al. NTP-CE-RHR Expert Panel Report on the Reproductive and Developmental Toxicity of Bisphenol A[J]. Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology, 2008, 83:

- 157—395.
- [2] 金岭,董文丽,孙智慧. 聚碳酸酯中双酚A的毒性及迁移规律研究进展[J]. 包装工程,2013,34(9):122—126.
JIN Ling, DONG Wen-li, SUN Zhi-hui. Research Progress of Toxicity and Migration Rule of Bisphenol A in Poly-carbonate[J]. Packaging Engineering, 2013, 34(9): 122—126.
 - [3] LUDOVIC L C, LYDIE I D M, PHILIPPE B, et al. Bisphenol a Disrupts the Intestinal Lipid Metabolism[J]. Toxicology Letters, 2012, 211: 210.
 - [4] 赖莺,王鸿辉,蔡鹭欣,等. 高效液相色谱法测定环氧树脂粘接剂中的双酚A[J]. 分析试验室,2012,31(3):43—46.
LAI Ying, WANG Hong-hui, CAI Lu-xin, et al. Determination of Bisphenol a in Epoxy Resin Adhesives by High Performance Liquid Chromatography[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2012, 31(3): 43—46.
 - [5] 焦艳娜,丁利,李晖,等. 加速溶剂萃取GC-MS/MS法测定食品接触材料中双酚A、双酚F及其衍生物的残留量[J]. 包装工程,2011,32(15):53—57.
JIAO Yan-na, DING Li, LI Hui, et al. Determination of Bisphenol A, Bisphenol F and Their Derivatives Residues in Food Contact Materials by Accelerated Solvent Extraction and GC-MS/MS[J]. Packaging Engineering, 2011, 32(15): 53—57.
 - [6] 卫碧文,缪俊文,宇文佳. 气相色谱-质谱法分析食品包装材料中双酚A[J]. 分析试验室,2009,28(1):107—109.
WEI Bi-wen, MIAO Jun-wen, YU Wen-jia. Determination of Bisphenol A in Food Packing by Gas Chromatography-mass Spectrometry[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2009, 28(1): 107—109.
 - [7] MARCHESINI G R, MEULENBERG E, HAASNOOT W, et al. Biosensor Immunoassays for the Detection of Bisphenol A[J]. Analytica Chimica Acta, 2005, 528(1): 37—45.
 - [8] PIAO M H, NOH H B, RAHMAN M A, et al. Label Free Detection of Bisphenol A Using a Potentiometric Immunosensor[J]. Electroanalysis, 2008, 20(1): 30—37.
 - [9] 王玉春,刘赵荣,弓巧娟. 电化学分析法对食品包装材料中双酚A的检测[J]. 食品科学,2010,31(20):303—306.
WANG Yu-chun, LIU Zhao-rong, GONG Qiao-juan. Electrochemical Determination on of Bisphenol A in Food Packaging Materials[J]. Food Science, 2010, 31(20): 303—306.
 - [10] 孙希岚,朱争礼,单营营,等. 食品金属罐用涂层中双酚A的快速定性分析方法[J]. 包装工程,2013,34(1):38—43.
SUN Xi-lan, ZHU Zheng-li, SHAN Ying-ying, et al. Quick Qualitative Analyzing Method of Bisphenol A in Metal Food Cans Coating[J]. Packaging Engineering, 2013, 34(1): 38—43.
 - [11] 罗敏,张吉坪,李晨曦,等. 食品容器中双酚A的一种现场检测方法[J]. 包装工程,2014,35(15):11—14.
LUO Min, ZHANG Ji-ping, LI Chen-xi, et al. A Portable Method for Rapid Determination of Bisphenol A in Food Containers[J]. Packaging Engineering, 2014, 35(15): 11—14.
 - [12] JO M, AHN J Y, LEE J, et al. Development of Single-stranded DNA Aptamers for Specific Bisphenol A Detection[J]. Oligo-nucleotides, 2011, 21(2): 85—91.
 - [13] MEI Z, CHU H, CHEN W, et al. Ultrasensitive One-step Rapid Visual Detection of Bisphenol A in Water Samples by Label-free Aptasensor[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2013, 39(1): 26—30.
 - [14] KUANG H, YIN H, LIU L, et al. Asymmetric Plasmonic Aptasensor for Sensitive Detection of Bisphenol A[J]. ACS Applied Materials & Plant Physiology and Biochemistry Interfaces, 2013, 6(1): 364—369.
 - [15] 杜鹃. 金纳米粒子微波及水热反应合成研究及其在光谱分析中的应用[D]. 重庆:重庆大学,2013.
DU Juan. Gold Nanoparticles Synthesized by Microwave-assisted Heating Method and Hydrothermal Method and Its Applications in Spectral Analysis[D]. Chongqing: Chongqing University, 2013.
 - [16] 姚素薇,邹毅,张卫国. 金纳米粒子的特性、制备及应用研究进展[J]. 化工进展,2007,26(3):310—319.
YAO Su-wei, ZOU Yi, ZHANG Wei-guo. Research Progress of the Properties, Preparation and Application of Au Nanoparticles[J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2007, 26(3): 310—319.
 - [17] 郭筱兵,李忠海,黎继烈,等. 金纳米粒子在食品检测领域中的研究进展[J]. 食品工业科技,2013,34(5):368—370.
GUO Xiao-bing, LI Zhong-hai, LI Ji-lie, et al. Research Progress in Food Detection of Gold Nanoparticles[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(5): 368—370.
 - [18] ZHENG Y, WANG Y. Aptamer-based Colorimetric Biosensing of Dopamine Using Unmodified Gold Nanoparticles[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2011, 156(1): 95—99.
 - [19] OFIR Y, SAMANTA B, ROTELLO V M. Polymer and Biopolymer Mediated Self-assembly of Gold Nanoparticles[J]. Chemical Society Reviews, 2008, 37(9): 1814—1825.

(上接第32页)

- in the Colorimetric Detection of Lead (II) Ion Using Gallic Acid-capped Gold Nanoparticles; Improving Size Distribution and Minimizing Interparticle Repulsion[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2010, 25(5): 984—989.
- [15] CHAI F, WANG C, WANG T, et al. L-cysteine Functionalized Gold Nanoparticles for the Colorimetric Detection of Hg^{2+} Induced by Ultraviolet Light[J]. Nanotechnology, 2010, 21(2): 025501.
 - [16] AMBROSI A, CASTA EDA M T, KILLARD A J, et al. Double-codified Gold Nanolabels for Enhanced Immunoanalysis[J]. Analytical Chemistry, 2007, 79(14): 5232—5240.