

双酚 A 电化学适配体传感器的研究

郑景伊¹,杜芳静²,贺彩梅¹,李晓霞^{1*}

(1. 延安大学 化学与化工学院,陕西 延安 716000;

2. 汉中市佛坪县环境监测站,汉中 佛坪 723400)

摘要:制备了一种检测双酚 A 的电化学适配体传感器。将末端带巯基的双酚 A 适配体 DNA 链通过自组装作用固定在金电极表面,以铁氰化钾-亚铁氰化钾平衡电对为电化学信号探针,利用循环伏安法、交流阻抗法和差分脉冲伏安法对适配体传感器进行表征和定量测定。结果表明,适配体传感器检测双酚 A 的线性范围为 $1.0 \times 10^{-15} \sim 1.0 \times 10^{-12}$ mol/L,检出限为 6×10^{-16} mol/L ($S/N = 3$)。该传感器制作过程简单,灵敏度高,可用于自来水中双酚 A 的测定。

关键词:双酚 A;适配体;电化学传感器

中图分类号:O657.1;X132 文献标识码:A 文章编号:1004-602X(2018)01-0050-04

双酚 A (Bisphenol A, BPA) 是合成聚碳酸酯塑料和环氧树脂的原材料,因其对健康具有危害,许多国家对 BPA 的使用进行了严格限制^[1]。目前检测双酚 A 的主要方法有超高效液相色谱-四级杆串联质谱法^[2]、分子印迹磁性固相萃取/液相色谱法^[3]、气相色谱-质谱联用法^[4]、分光光度法^[5]和电化学法^[6-12]等。其中电化学适配体传感器因其高灵敏度和高选择性受到分析者的关注。本实验利用巯基自组装作用将双酚 A 适配体 DNA 固定到金电极表面,用牛血清白蛋白封闭空余位点,制备了检测双酚 A 的电化学传感器。以铁氰化钾-亚铁氰化钾平衡电对为电化学探针,当适配体传感器与 BPA 特异性结合,DNA 单链由松散的构象变为 G-四分体结构^[13]。由于空间位阻增大,阻碍了探针向电极的电子传递引起电流信号的改变。电化学适配体的制备及检测原理如图 1 所示。该传感器制作过程简单,灵敏度高。

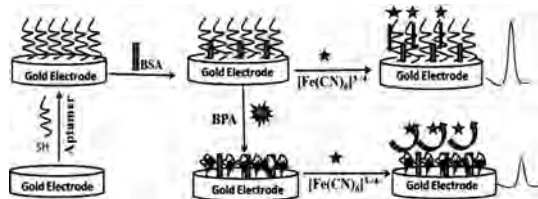


图 1 电化学适配体传感器的制备及测定原理

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

CHI660E 电化学工作站(上海辰华)。采用三电极系统:工作电极为金电极($Au, \phi = 2 \text{ mm}$),饱和甘汞电极(SCE)和铂片电极分别为参比电极和对电极。

双酚 A (BPA, 99.5%), 双酚 P (BP-p), 双酚 F (BP-F) 和牛血清白蛋白(BSA)均购于国药集团化学试剂有限公司。铁氰化钾($K_3(FeCN)_6$)和亚铁氰化钾($K_4(Fe(CN)_6)$)购于西安化学试剂厂。经 HPLC 纯化的双酚 A 适配体 DNA 链由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,其序列为 5'-HS-(CH_2)₆-TTGGC ACT GGT GCG AAC CCG TGA TGC GCT GG-3'。电化学检测液为 5 mmol/L 1:1 [$Fe(CN)_6$]^{3-/4-} 用 0.1 mol/L PBS (pH 7.4) - 0.1 mol/L KCl 配置。1 mmol/L 双酚 A 储备液用甲醇溶解,后用 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 逐级稀释。实验所用试剂均为分析纯,所用水为二次去离子水。

1.2 电化学适配体传感器的制备

电化学适配体传感器的制备:金电极进行预处理参见文献[14]。在处理好的金电极上滴涂 5 μL 1.0×10^{-6} mol/L 适配体 DNA (Aptamer-DNA), 4 $^{\circ}\text{C}$

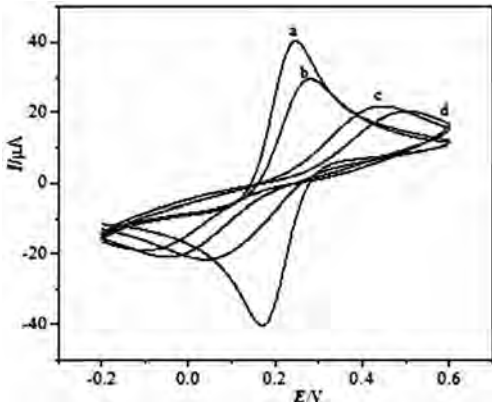
固定 14 h, 记为 Ap - DNA/Au。后将修饰电极置于 1 mg/mL BSA 溶液中, 37°C 浸泡 40 min, 以封闭未结合空余位点。最后用二次水冲洗干净, 晾干, 制备得适配体传感器 (Ap - DNA/BSA/Au)。

1.3 实验方法

室温下, 将适配体传感器置于 5 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 进行采用循环伏安法 (CV) 和交流阻抗法 (EIS) 扫描, 记录电化学曲线。CV 的电位范围 -0.2 ~ 0.6 V, 扫速为 0.5 mV/s。EIS 频率范围 100 KHz ~ 1.0 Hz, 振幅 5.0 mV。将制备好的适配体传感器置于不同浓度的 BPA 溶液中反应 50 min, 利用差分脉冲伏安法 (DPV) 进行定量测定, 用电流信号增加百分比来评估电化学适配体传感器的性能: 公式 %SE = $[(I_0 - I)/I_0] \times 100$, I_0 为适配体传感器未与 BPA 结合的氧化峰电流, I 为适配体传感器与 BPA 结合后的氧化峰电流。DPV 测定参数分别是振幅 0.05 V, 脉冲宽度 0.05 s, 脉冲周期 0.5 s。

2 结果与讨论

2.1 适配体传感器的电化学表征



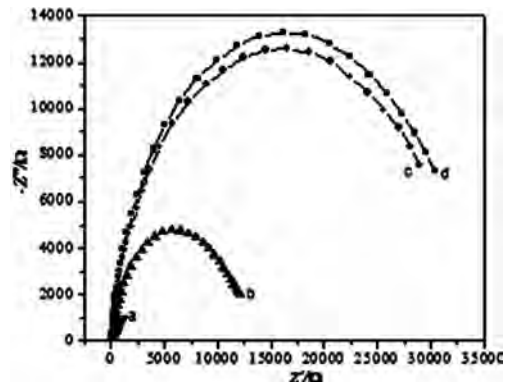
a. Au, b. Ap - DNA/Au, c. Ap - DNA/BSA/Au, d. BPA - Ap - DNA/BSA/Au

图 2 不同修饰电极在 5.0 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 溶液中的循环伏安图

图 2 为不同电极在 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 中的循环伏安曲线。曲线 a 为金电极的循环伏安曲线, 电位差 $\Delta E = 76$ mV, 氧化峰电流 $I_{pa} = 45 \mu\text{A}$ 。将适配体 DNA 固定在金电极表面, I_{pa} 降低为 $32 \mu\text{A}$ (曲线 b), 原因是单链 DNA 磷酸骨架上荷负电, 阻碍了 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 的电子传递, 因而电流变小。当用 BSA 封闭后 I_{pa} 进一步降低 (曲线 c)。当适配体传感器与 1.0×10^{-13} mol/L BPA 结合后, I_{pa} 继续减小 (曲线 d), 表明适配体与目标物 BPA 特异性结合, 使得松

散的长链 DNA 构象发生转变, 形成了大的空间位阻, 对 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 平衡电对的电子传递阻碍作用增大。CV 图说明适配体传感器制备成功并可用于 BPA 的测定。

进一步对不同修饰电极进行了交流阻抗表征。由图 3 可知, 金电极的电子传递阻抗值 $R_{et} = 50.8 \Omega$ (曲线 a)。适配体 DNA 固定到裸金电极表面时 (曲线 b), R_{et} 增大为 886Ω 。BSA 封闭后, R_{et} 继续增大为 20770Ω (曲线 c)。当适配体传感器与 1.0×10^{-13} mol/L BPA 结合后, R_{et} 为 22670Ω (曲线 d)。



a. Au, b. Ap - DNA/Au, c. Ap - DNA/BSA/Au, d. BPA - Ap - DNA/BSA/Au

图 3 不同修饰电极在 5.0 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 溶液中的交流阻抗图

2.3 条件优化

分别考察了适配体固定时间和适配体与 BPA 的结合时间的影响。实验结果表明, 当适配体 DNA 固定时间小于 14 h 时, 响应电流 ΔI 随时间的增加而增大, 14 h 时电流变化达到最大值, 继续增加固定时间, 电流降低 (图 4A), 说明 14 h 电极表面固定的适配体达到饱和。因此, 选择 14 h 为最佳固定时间。

研究了适配体传感器与双酚 A 的结合时间 (见图 4B), 当结合时间小于 50 min, 差分脉冲响应电流随时间延长而增大, 当结合时间为 50 min 时电流变化值最大, 继续增加结合时间, 电流变化趋于稳定, 因此, 选择 50 min 为最佳结合时间。

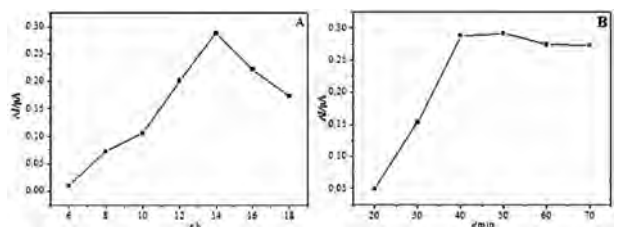
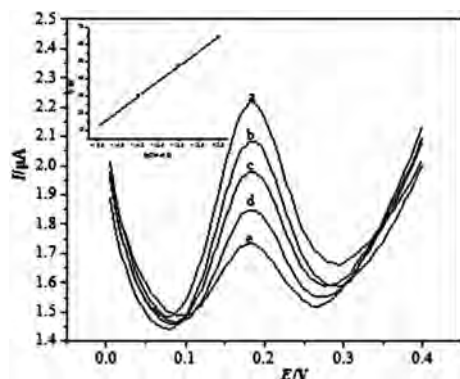


图 4 适配体固定时间 (A) 与 BPA 结合时间 (B) 对传感器的影响 ($C_{\text{BPA}} = 1.0 \times 10^{-13}$ mol/L)

2.4 适配体传感器的分析性能

在最优的实验条件下,用所制备的传感器对不同浓度的 BPA 进行了定量测定,结果如图 5 所示,发现适配体传感器的电流信号与 BPA 浓度在 $1 \times 10^{-15} \sim 1 \times 10^{-12}$ mol/L 范围内具有良好的线性关系,线性方程为($\%SE = 17.44 \lg C(\text{mol/L}) + 273.58$), $R = 0.9998$,检出限为 6×10^{-16} mol/L($S/N = 3$)。表 1 为本法所制备传感器与文献中报道检测双酚 A 的电化学传感器进行比较,结果表明,本传感器制备方法简单,灵敏度较文献[8-12]高,但是线性范围没有文献[7-9]的宽。



a - 0; b - 1.0×10^{-15} ; c - 1.0×10^{-14} ; d - 1.0×10^{-13} ; e - 1×10^{-12} mol/L

图 5 不同浓度 BPA 测定的微分脉冲伏安图和线性关系

表 1 不同电化学传感器测定 BPA 的性能比较

电化学传感器	检测方法	线性范围(mol/L)	检出限(mol/L)	文献
Graphene/aptamer sensor	DPV	$1.0 \times 10^{-15} \sim 1.0 \times 10^{-10}$	3.3×10^{-16}	[7]
Graphene/MIPs/ABPE	DPV	$3.21 \times 10^{-10} \sim 2.8 \times 10^{-2}$	4.22×10^{-13}	[8]
AuNPs - rGO - MWCNTs/GCE	DPV	$1.0 \times 10^{-9} \sim 1.0 \times 10^{-5}$	1.0×10^{-9}	[9]
Pd/GR - Chit/GCE	DPV	$6.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-5}$	1.0×10^{-8}	[10]
Graphene/Au	DPV	$3.0 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-5}$	1.0×10^{-8}	[11]
MIMPF ₆ /CPE	DPV	$3.0 \times 10^{-7} \sim 6.0 \times 10^{-5}$	5.0×10^{-8}	[12]
BSA/Ap - DNA/Au	DPV	$1.0 \times 10^{-15} \sim 1.0 \times 10^{-12}$	6×10^{-16}	This work

2.5 适配体传感器的选择性和重现性

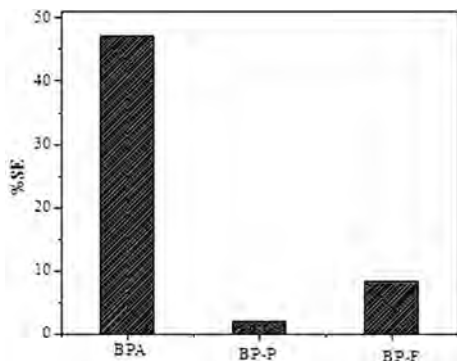


图 6 传感器对 BPA、BP-P 和 BP-F 的电流响应

在完全相同的实验条件下,对两种双酚类似物双酚 P 和双酚 F 进行测定来考察适配体传感器的选择性。实验中 BPA、双酚 P 和双酚 F 的浓度均为 1×10^{-13} mol/L。测定方法同 2.2 实验方法。结果如图 6 所示,发现传感器对 BPA 的电流响应信号 $\%SE = 47.14$,而双酚 P 的 $\%SE = 2.01$;双酚 F 的 $\%SE = 8.29$,说明该传感器具有良好的选择性。同时考察了传感器的重现性,用同样的方法制备了 7 支传

感器分别与 1.0×10^{-13} mol/L BPA 结合 50 min 后,电化学响应电流的相对标准偏差 $RSD = 3.4\%$ 。用制备的 1 支传感器对浓度为 1.0×10^{-13} mol/L BPA 进行了平行测定了 11 次,电化学响应电流的相对标准偏差 $RSD = 4.0\%$ 。表明该传感器具有良好的重现性。

2.6 回收率的测定

为了考察此电化学适配体传感器在实际样品中的应用,本文采用一系列不同浓度的加标自来水样品进行测试,分别对自来水样品进行 3 个浓度水平 (1.0×10^{-15} mol/L, 5.0×10^{-15} mol/L, 1.0×10^{-14} mol/L) 的加标回收率测定。其回收率依次为: 99.3%, 98.9%, 100.7%, 3 次测定的 RSD 分别为 3.7%、4.8% 与 3.3%,由此说明该传感器可用于实际样品中 BPA 的测定

3 结论

本文利用高特异性的适配体构建了双酚 A 电化学适配体传感器。与其他检测 BPA 的电化学传

感器相比,该传感器制作过程简单,灵敏度高,选择性好,可用于自来水样中 BPA 的测定。

参考文献:

[1] Rochester J R, Bolden A L Bisphenol S F. A systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol A substitutes [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2015, 123(7): 643 – 650.

[2] 郑赛, 杨蕴嘉, 张昕, 等. 超高效液相色谱 – 四级杆串联质谱法检测饮用水中双酚 A 和双酚 F 及其氯化消毒副产物[J]. *中国食品卫生杂志*, 2017, 29(2): 155 – 159.

[3] 丘秀珍, 黄志伟, 朱惠娟, 等. 分子印迹磁性固相萃取/液相色谱法检测奶制品中的双酚 A [J]. *分析测试学报*, 2017, 36(2): 236 – 241.

[4] Deceuninck Y, Bichon E, Marchand P, et al. Determination of bisphenol A and related substitutes/analogues in human breast milk using gas chromatography – tandem mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407(9): 2485 – 2497.

[5] Zhuang Y F, Zhou M, Gu, et al. Spectrophotometric and high performance liquid chromatographic methods for sensitive determination of bisphenol A [J]. *Spectrochim Acta A*, 2014, 122(6): 153 – 157.

[6] 于浩, 冯晓, 陈小霞, 等. 还原氧化石墨烯 – 多壁碳纳米管复合膜负载金纳米粒子修饰玻碳电极检测双酚 A [J]. *分析化学*, 2017, 45(5): 713 – 720.

[7] 贺彩梅, 冯荣荣, 李晓霞. 石墨烯修饰电化学适配体传感器测定双酚 A [J]. *分析试验室*, 2017, 36(11): 1306 – 1309.

[8] 袁飞. 纳米材料掺杂分子印迹聚合物修饰乙炔黑糊电极的制备及其对双酚 A 的检测分析 [D]. 镇江: 江苏大学, 2017.

[9] 张子俊, 李慧, 张媛媛, 等. 基于纳米钨/石墨烯增敏效应对双酚 A 的电化学检测 [J]. *武汉工程大学学报*, 2017, 39(1): 5 – 11.

[10] 刘洁, 丁金龙, 赵肃清, 等. 非共价作用石墨烯 – 金纳米复合材料修饰电极的制备及检测双酚 A 的方法研究 [J]. *现代食品科技*, 2017, 33(4): 201 – 206 + 235.

[11] 方燕, 马琳琳, 陕多亮, 等. 石墨烯 – 金纳米粒子复合膜修饰电极的制备及对双酚 A 的测定 [J]. *高等学校化学学报*, 2015, 36(8): 1491 – 1497.

[12] 花小霞, 郑香丽, 刘珊, 等. 双酚 A 在离子液体修饰碳糊电极上的电化学行为及测定 [J]. *食品科学*, 2015, 36(22): 152 – 155.

[13] 周玲. 食品中双酚 A 检测用新型电化学传感器的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2014.

[14] Li X X, Qi H L, Shen L H, et al. Electrochemical aptasensor for the determination of cocaine incorporating gold nanoparticles modification [J]. *Electroanalysis*, 2008, 20(13): 1475 – 1482.

[责任编辑 贺小林]

Electrochemical Sensor for Detection of Bisphenol A Incorporating Aptamer

ZHENG Jing-yi¹, DU Fang-jing^{2*}, HE Cai-mei¹, LI Xiao-xia^{1*}

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Yan'an University, Yan'an 716000, China;

2. Environmental Monitoring Station in Foping County, Hanzhong, Foping 723400, China)

Abstract: An electrochemical sensor for the detection of bisphenol A (BPA) was successfully constructed based on aptamer combined with BPA. The aptasensor was fabricated by self – assembling of thiolated DNA probes onto the surfaces of the gold electrode. Cyclic voltammetry and impedance method were used to characterize the aptasensor. Electrochemical measurements were performed using $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ as a redox indicator. The oxidation peak current of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ decreased with increasing the concentration of BPA due to higher affinity for aptamer with BPA. The liner range was between 1×10^{-15} mol/L and 1×10^{-12} mol/L, and down to levels as low as 6×10^{-16} mol/L. The aptasensor has the advantages of simple fabrication, high sensitivity and high selectivity, and it could find applications in the analysis of BPA in water samples.

Key words: bisphenol A; aptamer; electrochemical sensor