

基于分子印迹-量子点荧光材料的双酚 A 检测技术研究

刘 艳¹, 刘晨曦², 徐锦锦², 孙爱丽^{2*}

(1. 宁波职业技术学院 应用化工系, 浙江 宁波 315800; 2. 宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315823)

摘要: 利用分子印迹聚合物的高选择性和量子点的优良荧光特性, 制备获得了对双酚 A (Bisphenol A, BPA) 具有特异荧光响应的分子印迹-量子点纳米结构聚合物(MIP-QDs), 并应用于痕量 BPA 的测定。采用扫描电镜、红外光谱、选择性分析等对获得的 MIP-QDs 特征进行分析, 表明其对 BPA 具有较高的选择性响应。在此基础上获得的 MIP-QDs 最佳反应体系如下: 水:乙醇=6:4 (V/V)、pH 为 5.0、NaCl 质量浓度 3.5%。在最佳条件下, MIP-QDs 在 0.002~10.0 mg·L⁻¹ 时, 抑制剂浓度与 $(F_0-F)/F$ 之间具有较好的线性关系, 相关系数为 0.998 3, LOD 为 0.75 μg·L⁻¹。在添加质量浓度分别为 0.002, 0.1, 2.0 mg·L⁻¹ 时, 回收率为 96.8%~102.8%, 相对标准偏差(RSD)低于 7.4%。结果表明, 获得的 MIP-QDs 对 BPA 具有较好的选择性荧光抑制性能。

关键词: 分子印迹-量子点; 水产品; 药物残留; 快速检测; 双酚 A

中图分类号: O653.32

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2019) 06-0110-05

双酚 A (Bisphenol A, BPA) 作为一种重要的化工合成原料, 广泛地应用于制备环氧树脂及碳酸酯塑料, 能够显著改善包装材料的耐高温、抗冲击、防辐射性能和透明度等特性, 其制品普遍应用于生活当中, 如塑料饮料瓶、食品包装袋等^[1-2]。此外, 在罐头瓶内壁涂上含有 BPA 的涂层能够延缓内含物对金属容器的腐蚀, 在纸杯内壁涂上含有 BPA 的涂层能够起到隔水作用^[3]。然而, 由于含有 BPA 制品的广泛使用, 人们已经在食品、土壤及环境中检测到其残留^[4]。尤其是研究表明, BPA 经人体呼吸道、消化道等吸收后, 能够产生内分泌干扰效应, 对人体生殖系统、神经系统和免疫系统造成潜在危害^[5-6]。目前研究发现 BPA 能够迅速地穿过胎盘, 某些胎儿组织含量甚至超过母体^[7-8]。因此, BPA 作为一类典型的环境内分泌干扰物, 其残留对人体健康产生重要潜在危害, 发展对其检测、监测技术具有重要的实际意义^[9]。目前, 常用的 BPA 检测方法主要有气相色谱-质谱法和液相色谱-质谱法等^[10-11], 这些方法虽然具有灵敏度

高、定量准确等优点, 但是设备昂贵, 维护费用也较高, 而且前处理也比较复杂^[12]。基于酶和抗原-抗体反应的酶联免疫吸附测定法(ELISA)具有操作简单、高通量的优点^[13], 但通常生物抗体具有制备复杂、稳定性差、对检测环境要求较高等缺点。

为此, 本研究利用分子印迹聚合物的高选择性及量子点的优良发光性能, 采用反向微乳液聚合方法, 制备获得了对双酚 A 具有选择性荧光抑制响应的分子印迹-量子点纳米结构聚合物 (Molecularly Imprinted-Quantum Dot nanostructure polymers, MIP-QDs), 与常规生物抗体相比, 获得的 MIP-QDs 具有相似的识别特异性和更好的稳定性。并在此基础上通过条件优化, 制备获得了基于 MIP-QDs 的 BPA 荧光检测方法, 也成功应用于实际样品中 BPA 残留的检测。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

双酚 A (99.0%, BPA)、己烯雌酚 (99.0%, DES)、

收稿日期: 2019-03-16。

宁波大学学报(理工版) 网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家自然科学基金 (31372572); 浙江省自然科学基金 (LR16C190001); 2017 高校访问工程师“校企合作项目”(FG2017056)。

第一作者: 刘艳 (1977—), 女, 辽宁辽阳人, 博士/讲师, 主要研究方向: 分析化学。E-mail: 68727077@qq.com

*通信作者: 孙爱丽 (1978—), 女, 山东潍坊人, 博士/高级实验师, 主要研究方向: 环境与水产品安全。E-mail: sunaili@nbu.edu.cn

双烯雌酚(99.0%, DIES)、己烷雌酚(98.0%, HES)、4-肉桂苯酚(99.0%, 4-CP)、Triton X-100、正硅酸乙酯(98.0%, TEOS)、3-氨丙基三乙氧基硅烷(98.0%, APTES)购自 Sigma 公司(Steinheim, Germany). CdS/ZnS 量子点(Quantum Dots, QDs, 发射波长 628 nm, 激发波长 365 nm)购自北达聚邦科技有限公司, 其余试剂均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司; 实验用水均为超纯水(18.5 MΩ·cm).

1.2 实验方法

1.2.1 BPA-MIP-QDs 的制备

将 1.8 mL 的 Triton X-100 加入到 7.5 mL 环己烷中, 磁力搅拌 15 min, 然后依次加入 400.0 μL 的 QDs(溶于三氯甲烷, 浓度为 1 nmol·L⁻¹)、50.0 μL 的 TEOS、100.0 μL 的氨水(25%), 磁力搅拌 2 h. 然后再加入 200.0 μL 一定浓度的双酚 A 和 22.8 μL 的 APTES, 磁力搅拌 12 h. 最后, 在反应溶液中加入 10.0 mL 丙酮静置, 直至完全沉淀. 9 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 后, 加入 6 mL 超纯水, 分散均匀. 然后 9 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 去上清. 沉淀中加入 5.0 mL 乙醇/乙腈混合溶液(8:2, V/V)超声清洗除去模板分子, 获得的 MIP-QDs 分散于乙醇中备用. NIP-QDs 为合成过程中不加模板分子的双酚 A, 其他制备方式同 MIP-QDs.

1.2.2 BPA-MIP-QDs 和 NIP-QDs 的表面形态及化学结构分析

通过扫描电子显微镜(SEM)对获得的 MIP-QDs 的大小、表面特征进行观察. 通过傅里叶变换红外光谱(FT-IR)对得到的 MIP-QDs 的化学结构进行分析.

1.2.3 BPA-MIP-QDs 荧光响应分析

利用荧光分光光度计(F-4600)对 MIP-QDs 进行荧光强度(FLs)检测. 荧光检测条件如下: 激发波长为 365 nm, 发射波长为 628 nm, 光电倍增管电压为 700 eV. 加入 960.0 μL 分散剂, 然后加入 20.0 μL MIP-QDs (15.0 μg·mL⁻¹), 再加入荧光猝灭剂静置反应 15 min 后检测. 所有实验进行 3 个平行. 荧光猝灭与抑制剂浓度相关性采用 Stern-Volmer 方程表示:

$$F_0 / F = 1 + K_{sv} [Q],$$

式中, F_0 为 MIP-QDs 的初始荧光值; F 为加入抑制剂后 MIP-QDs 的荧光值大小; K_{sv} 为方程中的恒定

参数; $[Q]$ 为加入的抑制剂浓度^[14].

$\Delta F (F_0 - F)$ 表示加入 BPA 后 MIP-QDs 的荧光猝灭值, $(F_0 / F - 1)$ 表示 MIP-QDs 的印迹效率. 印迹因子(IF)用来评估 MIP-QDs 对氟氯氰菊酯的选择能力大小, 为 MIP-QDs 和 NIP-QDs 的 K_{sv} 值的比值^[15].

1.2.4 实际样品的前处理

取一定量海水, 加入一定浓度的双酚 A, 过 0.22 μm 水相滤膜去除杂质, 用玻璃瓶收集滤液, 采用荧光分光光度计进行分析. 所有实验进行 3 个平行, 确保实验的重复性.

2 结果与讨论

2.1 MIP-QDs、NIP-QDs 的 SEM 分析

通过 SEM 对 MIP-QDs 和 NIP-QDs 的表面特征、形状和大小进行分析. 如图 1 所示, MIP-QDs 为大小均一的微球, 平均直径约为 100 nm, 微球表面粗糙不平. 结果同时表明, MIP-QDs 和 NIP-QDs 在表面形态上没有明显差异, 这是由于 MIP-QDs 和 NIP-QDs 制备方法相同, 只是 NIP-QDs 的合成没有添加模板分子.

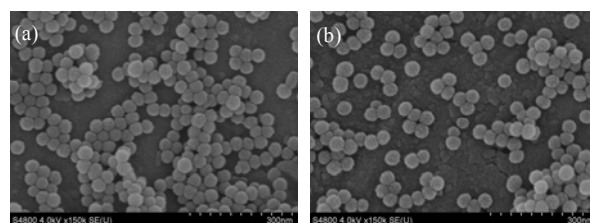


图1 MIP-QDs(a)和NIP-QDs(b)扫描电镜图

2.2 MIP-QDs、NIP-QDs 的 FT-IR 分析

通过 FT-IR 对 MIP-QDs 和 NIP-QDs 的表面化学结构进行分析. 如图 2 所示, 在 1 057 cm⁻¹ 处的特征吸收峰是 Si-O-Si 伸缩振动峰, 在 789 cm⁻¹ 和

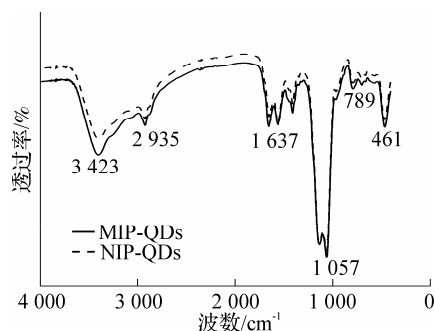


图2 MIP-QDs 和 NIP-QDs 的红外光谱图

461 cm^{-1} 处的特征吸收峰是 Si-O 伸缩振动峰, 在 2935 cm^{-1} 的特征吸收峰是 C-H 伸缩振动峰, 在 3423 cm^{-1} 和 1637 cm^{-1} 处的特征吸收峰是 N-H 伸缩振动峰. 结果表明, 在量子点表面成功接枝了分子印迹硅胶层及功能基团^[16-17]. 此外, NIP-QDs 和 MIP-QDs 的红外图谱基本相同, 表明 MIP-QDs 和 NIP-QDs 具有相似的化学组成.

2.3 MIP-QDs 响应体系的优化

为获得最佳的选择性荧光猝灭效率, 首先考察了水在乙醇中比例对 MIP-QDs 选择性荧光猝灭的影响. 图 3 表明, 当水在乙醇中比例达到 60.0% 时, MIP-QDs 的猝灭值 ($F_0 - F$) 最大, 表明水在乙醇中相对质量为 60.0% 时, MIP-QDs 具有最好的印迹效果.

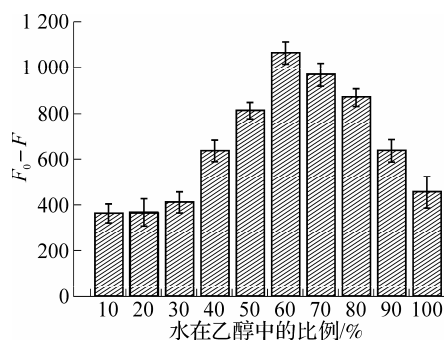


图3 不同乙醇与水比例对 BPA-MIP-QDs 的荧光猝灭影响

MIP-QDs 表面分子印迹硅胶层在较高 pH 条件下会发生电离, 使其产生缺陷, 并破坏形成的特异性分子印迹结合位点, 从而影响猝灭剂对 MIP-QDs 的荧光猝灭效果^[18]. 如图 4 所示, 抑制剂对 MIP-QDs 的猝灭效果受 pH 影响较大. 在 pH 5.0 时, MIP-QDs 对 BPA 具有最高的 IF 值. 当 pH 小于 5.0 时, IF 值减小, 原因可能是在强酸性条件下, MIP-QDs 表面特异性结合位点被破坏.

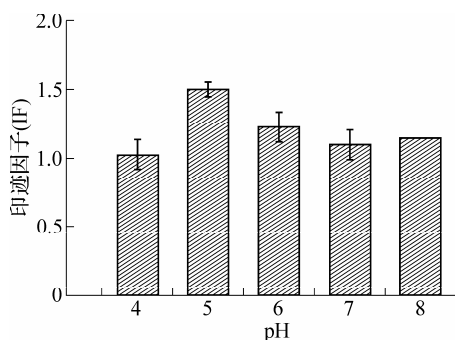


图4 不同 pH 比例对 BPA-MIP-QDs 的荧光猝灭影响

同时, 为更好地将 MIP-QDs 响应体系应用于海水样品中 BPA 的检测分析, 我们考察了 1.5%、2.5%、3.5%、4.5% 4 个相对质量浓度 NaCl 溶液的荧光猝灭影响. 图 5 表明, 在 3.5% NaCl 相对质量浓度时, MIP-QDs 具有最高的荧光猝灭值 ($F_0 - F$), 而 NIP-QDs 荧光猝灭值无明显变化, 表明在分子识别过程中, 离子相互作用起到重要作用. 所以选择 3.5% NaCl 相对质量浓度为最佳浓度.

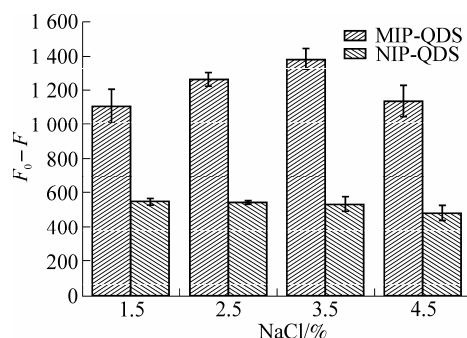


图5 不同 NaCl 比例对 MIP-QDs 的荧光猝灭影响

2.4 MIP-QDs、NIP-QDs 的选择性分析

为评价制备的 MIP-QDs 选择性, 选择 BPA 及其化学结构类似物 DES、DIES、HES 和 4-CP 对 MIP-QDs 的荧光猝灭响应进行分析. 如图 6 所示, 与 DES、DIES、HES 和 4-CP 相比, BPA 对 MIP-QDs 具有更强的荧光响应猝灭能力, 而 BPA 及其结构类似物对 NIP-QDs 具有相似的 K_{sv} 值, 并无明显的选择性, 表明在 NIP-QDs 表面不存在 BPA 特异性结合位点. 以上结果表明, MIP-QDs 表面具有对 BPA 的特异性结合位点, 再次接触 BPA 后, BPA 通过氢键紧密结合在 MIP-QDs 表面的特异性结合位点, 最终导致荧光猝灭.

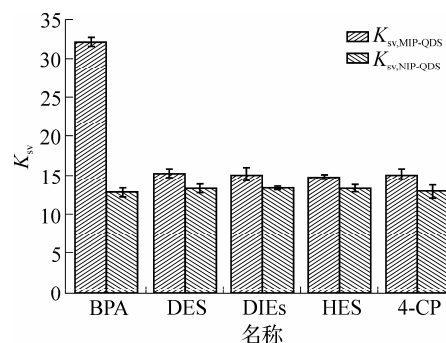


图6 MIP-QDs 的选择性评价

2.5 MIP-QDs 在实际样品中的应用研究

MIP-QDs 具有制备简单、成本低和稳定性好

等优点,我们把建立的基于 MIP-QDs 的荧光猝灭响应体系应用于实际样品海水 BPA 残留的检测,并对建立方法的线性、准确度、灵敏度和检测限(LOD)等参数进行评价。在最佳响应条件下,研究不同质量浓度 BPA(0.002~10.0 mg·L⁻¹)对 MIP-QDs 荧光抑制响应的影响。如图 7 所示,随着 BPA 浓度的增加, MIP-QDs 的荧光猝灭程度不断加大,其荧光猝灭与 BPA 浓度之间的关系遵循 Stern-Volmer 方程, $(F_0 - F)/F$ 与 BPA 在 0.002~10.0 mg·L⁻¹ 质量浓度范围内具有较好的线性相关性,相关系数为 0.998 3,表明 MIP-QDs 荧光猝灭与 BPA 浓度之间具有较好的线性相关性。

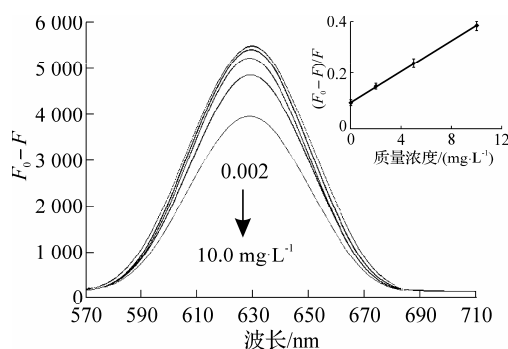


图 7 MIP-QDs 的荧光光谱和线性方程

同时,由表 1 可见,在 0.002、0.1、2.0 mg·L⁻¹ 的 3 个添加质量浓度时,实际样品中 BPA 的回收率分别为 97.8%、102.8%和 96.8%,相对标准偏差(RSD)小于 7.4%; LOD 值(荧光抑制值为 3 倍空白值的标准偏差时,对应的抑制剂浓度)为 0.75 μg·L⁻¹。结果表明,基于 MIP-QDs 对海水中 BPA 残留定量分析具有较高的准确度、精密度和灵敏度,有着较好的应用可行性。

表 1 海水中 BPA 的 MIP-QDs 荧光测试分析(n=3)

加标/(mg·L ⁻¹)	回收率/%	RSD/%
0.002	97.8	6.4
0.1	102.8	7.4
2.0	96.8	5.8

3 结论

将分子印迹技术的选择性与量子点的优良荧光性能相结合,采用表面接枝技术,通过对制备条件优化,成功获得了对 BPA 具有特异荧光抑制响应的 MIP-QDs,获得的 MIP-QDs 具有最佳的印迹

效率和荧光猝灭效率,显示出较强的抗干扰能力和较好的重现性。进一步将获得的 MIP-QDs 作为荧光传感器识别元件,通过对测定条件优化选择,得到 BPA 浓度与 $(F_0 - F)/F$ 之间具有较好的线性关系, LOD 为 0.75 μg·L⁻¹。该荧光传感器在海水实际样品 BPA 残留测定中得到了较好的选择性、重复性和再现性。相对于高效液相色谱、气相色谱仪等实验室仪器检测法,该快速检测技术具有操作简单、快速准确的特点。

参考文献:

- [1] 汪仕韬,曹霞,朱昊浩,等. 塑料包装材料中双酚 A 毒性及检测研究进展[J]. 包装与食品机械, 2019, 37(1): 69-72.
- [2] 刘忠瑞,孙立文,李洋洋,等. 塑料食品包装材料中双酚 A 的迁移量检测[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(10):2350-2355.
- [3] 常翩翩,田春蓉,梁书恩,等. 双酚 A 型氰酸酯泡沫塑料的制备与性能[J]. 中国塑料, 2016, 30(4):55-60.
- [4] Almeida S, Raposo A, Almeida G M, et al. Bisphenol A: Food exposure and impact on human health[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2018, 17(6):1503-1517.
- [5] 李园园,赵峰,张文丽,等. 双酚 A 对生殖健康影响的研究进展[J]. 环境卫生学杂志, 2019, 9(1):73-77; 84.
- [6] 吴皓,孙东,蔡卓平,等. 双酚 A 的内分泌干扰效应研究进展[J]. 生态科学, 2017, 36(3):200-206.
- [7] Mínguez A L, Hauser R, Gaskins A J. Effects of Bisphenol A on male and couple reproductive health: A review[J]. Fertility and sterility, 2016, 106(4): 864-870.
- [8] 李慧艳. 双酚 A 人群暴露情况和健康风险研究进展[J]. 中国公共卫生, 2018, 34(10):1442-1445.
- [9] Mahemuti L, Chen Q, Coughlan M C, et al. Bisphenol A induces DSB-ATM-p53 signaling leading to cell cycle arrest, senescence, autophagy, stress response, and estrogen release in human fetal lung fibroblasts[J]. Archives of Toxicology, 2018, 92(4):1453-1469.
- [10] Correia S L, Norberto S, Delerue M C, et al. Micro-QuEChERS extraction coupled to GC-MS for a fast determination of bisphenol A in human urine[J]. Journal of Chromatography B, 2018, 1072:9-16.
- [11] 朱华蓉,郝鹏鹏. 固相萃取-液相色谱-质谱联用法检测饮用水中双酚 A[J]. 食品工业, 2017, 38(2):288-291.
- [12] Zimmers S M, Browne E P, O'Keefe P W, et al. Determination of free bisphenol A (BPA) concentrations

- in breast milk of US women using a sensitive LC/MS/MS method[J]. *Chemosphere*, 2014, 104:237-243.
- [13] 许龙, 章英, 朱立鑫, 等. 双酚 A 单克隆抗体的制备及酶联免疫分析方法的建立[J]. *食品科学*, 2015, 36(20): 202-206.
- [14] Huy B T, Se M H, Zhang X, et al. Selective optosensing of clenbuterol and melamine using molecularly imprinted polymer-capped CdTe quantum dots[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 57: 310-316.
- [15] Zhang W, He X W, Chen Y, et al. Composite of CdTe quantum dots and molecularly imprinted polymer as a sensing material for cytochrome c[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 26(5): 2553-2558.
- [16] Sun A L, Chai J Y, Xiao T T, et al. Development of a selective fluorescence nanosensor based on molecularly imprinted-quantum dot optosensing materials for saxitoxin detection in shellfish samples[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 258:408-414.
- [17] Tirado G A, Paraguay D F, Pina L G E. A molecularly imprinted polymer-coated CdTe quantum dot nanocomposite for tryptophan recognition based on the Förster resonance energy transfer process[J]. *Methods and Applications in Fluorescence*, 2016, 4(4):45003-45008.
- [18] Ren X H, Chen L G. Quantum dots coated with molecularly imprinted polymer as fluorescence probe for detection of cyphenothrin[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, 64:182-188.

Rapid detection of Bisphenol A based on molecularly imprinted quantum dot fluorescent materials

LIU Yan¹, LIU Chenxi², XU Jinjin², SUN Aili^{2*}

(1.Department of Applied Chemical Engineering, Ningbo Polytechnic, Ningbo 315800, China;

2.School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315823, China)

Abstract: A new type of molecularly imprinted-quantum dot nanostructure polymers (MIP-QDs) for Bisphenol A (BPA), which combines the high selectivity of molecularly imprinted polymers and excellent fluorescence properties of QDs, is presented using the surface grafting technique. The MIP-QDs are firstly characterized by scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and selective fluorescence quenching properties in different solutions. Under the optimal conditions (water:ethanol (4:6, V/V), pH 5.0, NaCl 3.5%), a good linear relationship with a correlation coefficient of 0.998 3 is obtained in the range of 0.002~10.0 mg·L⁻¹. The detection limit of BPA in seawater samples is set to be 0.75 µg·L⁻¹. Satisfying recoveries ranging from 96.8% to 102.8% and the RSD below 7.4% are obtained for the seawater samples at three spiked levels of BPA. The results demonstrate that the developed MIP-QDs approach possesses most satisfactory fluorescence quenching properties.

Key words: molecularly imprinted quantum dots; aquatic products; drug residues; rapid detection; Bisphenol A

(责任编辑 章践立)