

基于上转换试纸快速检测一次性纸杯热溶出的双酚 A

李巧凤^{1,2}, 白家磊¹, 彭媛¹, 王周平², 高志贤^{1*}

(1. 军事科学院军事医学研究院环境医学与作业医学研究所, 天津市环境与食品安全风险监控技术重点实验室, 天津 300050; 2. 江南大学食品学院, 无锡 214122)

摘 要: **目的** 研制基于上转换颗粒(up-conversion particles, UCNPs)和适配体探针的试纸条, 检测一次性纸杯热溶出的双酚 A(bisphenol A, BPA)。**方法** 制备高发光效率的 UCNPs, 对其表面进行氨基和链霉亲和素修饰并连接适配体制备荧光探针, 通过优化加样体积和硝酸纤维素膜(cellulose nitrate membrane, NC)种类成功组装试纸条。**结果** 未修饰的 UCNPs 粒径约为 73 nm, 表面成功修饰氨基和链霉亲和素之后的粒径约为 85 nm, 在测试样品体积为 200 μ L, 以 Sartorius CN 140 作为硝酸纤维素膜的最优检测条件下, 试纸检测范围为 50~800 ng/mL, 最低检出限达 12.5 ng/mL。该方法应用于纸杯溶出的 BPA 检测, 加标回收率在 94.53%~103.78% 之间, 相对标准偏差小于 3.75%, 与国家标准高效液相色谱法的测得结果无显著性差异($P>0.05$)。**结论** 用本实验研制的试纸条检测一次性纸杯热溶出的 BPA, 灵敏度高、特异性好、检测时间短, 适用于现场检测。

关键词: 上转换颗粒; 适配体; 双酚 A; 试纸条

Rapid detection of bisphenol A dissolved from disposable cup based on up-conversion test paper

LI Qiao-Feng^{1,2}, BAI Jia-Lei¹, PENG Yuan¹, WANG Zhou-Ping², GAO Zhi-Xian^{1*}

(1. Tianjin Key Laboratory of Risk Assessment and Control Technology for Environment and Food Safety, Institute of Environmental and Operational Medicine, Academy of Military Medical Science, Academy of Military Science, Tianjin 300050, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

ABSTRACT: Objective To develop a test strip based on UCNPs and aptamer probes, and test the BPA dissolved from disposable cups. **Methods** The UCNPs with high luminescence efficiency were prepared and modified with amino-group and streptavidin on its surface. Then, the fluorescent probes were prepared by connecting the aptamer. The test strip was successfully assembled by optimizing the amount of sample added and the type of cellulose nitrate membrane. **Results** Diameter of bare UCNPs was about 73 nm, after surface modification with amino-group and streptavidin, the diameter increased to about 85 nm. Under the optimal detection condition of Sartorius CN 140 as the cellulose nitrate membrane, with the sample volume of 200 μ L, the detection range of strip for BPA was from 50 ng/mL

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFC1200903), 天津市科技支撑计划项目(18YFZCNC01260)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program (2017YFC1200903), and Tianjin Science and Technology Support Program (18YFZCNC01260)

***通讯作者:** 高志贤, 研究员, 主要研究方向为食品安全。E-mail: gaozhx@163.com

***Corresponding author:** GAO Zhi-Xian, Professor, Tianjin Key Laboratory of Risk Assessment and Control Technology for Environment and Food Safety, Institute of Environmental and Operational Medicine, Academy of Military Medical Science, Academy of Military Science, Tianjin 300050, China. E-mail: gaozhx@163.com

to 800 ng/mL and the limit of detection was 12.5 ng/mL. The method was applied to detect the BPA dissolved from paper cups. The recoveries were between 94.53% and 103.78%, the RSD was below 3.75% and there was no significant difference ($P>0.05$) between the results obtained by the HPLC from national standard. **Conclusion** The test strip developed in this experiment can be used to detect the BPA dissolved from the disposable paper cup, which has high sensitivity, good specificity and short detection time, and is suitable for on-site detection.

KEY WORDS: up-conversion particles; aptamer; bisphenol A; test strip

1 引言

双酚 A(bisphenol A, BPA)是一种典型的环境雌激素,作为重要的化工原料, BPA 广泛应用于塑料制品,如饮料瓶、婴儿奶瓶、一次性纸杯等^[1,2]。国内外研究结果表明, BPA 是一种低毒性化合物,具有类似雌激素的作用^[3],长期在体内聚集会引发机体出现各种生理问题,如性早熟、胚胎发育不良,甚至可增加男性不育、前列腺癌的发病率^[4]。鉴于 BPA 的广泛应用及其带来的健康危害,越来越多的检测技术应运而生。如高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[5]、液相色谱-质谱联用法^[6]都可准确测得 BPA 的含量,但因仪器昂贵、前处理复杂、检测时间长等问题,不适用于现场检测; ELISA 方法检测便捷,但抗体制备耗时^[7], 综上,建立一种高效、快速、便携的 BPA 检测方法尤为重要。

近年来,试纸条越来越多的应用在各种污染物的检测上,多数试纸的检测原理是基于纳米颗粒和抗原-抗体的免疫反应^[8-10],利用胶体金、量子点或者荧光染料发光来实现可视化或定量检测。随着适配体技术的发展,不少学者用适配体代替抗体运用于试纸条也取得了一些成果^[11-13]。上转换纳米颗粒(up-conversion particles, UCNPs)是一种新型的荧光纳米材料,具有反斯托克斯的光学效能、背景荧光低、检测灵敏度高等特点,具有较好的应用前景。将 UCNPs 用于试纸条的研制已有报道^[14,15],本课题组在研究时发现偶联物量的多少关系到实验结果的检测灵敏度,但很少有文献对其表面修饰物定量进行研究,课题组前期在不同实验条件下制备 UCNPs,并成功对其表面进行修饰并优化定量^[16],本研究将延续先前工作,制备高发光效率、偶联物多的颗粒与适配体相结合制成增敏型检测试纸条,测定一次性纸杯中热溶出 BPA 的含量,为将 UCNPs 应用于现场检测奠定基础,为快速检测包装材料中的 BPA 开辟新思路。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

镧系金属氯化物 $\text{YCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{YbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{ErCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (纯度 99.99%, 山东西亚化学工业有限公司); BPA 标准品及其结构类似物双酚 B(BPB)、双酚 C(BPC)、6F-

双酚 A(6F-BPA)、四溴双酚 A(TBBPA)(分析纯,上海源叶生物技术公司); 3-氨丙基三乙氧基硅烷、三乙氧基硅烷(分析纯, Sigma 公司); 玻璃纤维素垫、硝酸纤维素膜(cellulose nitrate membrane, NC 膜)、底板、吸水垫、结合垫等耗材(上海杰一生物技术有限公司); 一次性纸杯(天津乐购超市)。

BPA 适配体^[17]: 5'-biotin-CCGGT GGGTG GTCAG GTGGG ATAGC GTTCC GCGTA TGGCC CAGCG CATCA CGGGT TCGCA CCA AAAAA AAAAA AAAAA-3', T 线(捕获探针 1): 5'-CTGAC CACCC ACCGG-biotin-3', C 线(捕获探针 2): 5'-TTTTT TTTT TTTT-biotin-3'(上海生工生物工程有限公司合成)。

2.2 仪器与设备

TU-1901 紫外可见分光光度计(日本岛津公司); JEM-100CXII 透射电子显微镜(日本株式会社); FTS6000 傅里叶红外光谱仪(美国 Bio-Rad 公司); 98-II-B 磁力搅拌电热套(天津市泰斯特仪器有限公司); HM3010 单维往复划膜仪、ZQ2000 微电脑自动斩切机(上海金标公司); UPT-3A 便携式上转换发光免疫分析仪(北京热景生物技术有限公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 上转换颗粒的制备和修饰

在参考文献^[18]的基础上改变实验条件制备上转换颗粒 NaYF_4 : Yb, Er UCNPs。方法如下: 取 1 mmol 一定摩尔比例的镧系金属氯化物,加入体积比 1:3 的油酸和 1-十八烯溶液于 100 mL 三颈烧瓶中,在恒温磁力加热套上加热至 160 °C 保持 30 min,冷却后缓慢滴入溶有 0.5 mmol/L 的氧化钠和氟化铵的甲醇溶液 20 mL,搅拌升温,除去甲醇后,将反应物快速加热到 320 °C 直至形成目标晶体。冷却收集产物,用环己烷多次清洗,干燥备用。颗粒包硅壳氨基化^[19]方法如下: 取 100 mg 制备的颗粒溶于 60 mL 乙醇中超声分散,依次加入一定量的氨水、20 mL 超纯水、30 μL 三乙氧基硅烷,40 °C 搅拌 4 h,之后加入 100 μL 3-氨丙基三乙氧基硅烷继续反应 4 h,离心清洗、干燥备用。对制备的颗粒表面进行氨基定量和链霉亲和素(streptavidin, SA)定量,根据氨基定量方法和紫外吸光度变化情况选择表面修饰量较多的颗粒,以便后续连接更多的生物分子,具体方法参考先前实验^[16]。

2.3.2 上转换荧光探针的制备

称取一定量表面连接 SA 的颗粒重悬在 PBS 中,至终

浓度为 0.5 mg/mL。为使适配体与目标物更好的结合, 使用前将 BPA 适配体在 95 °C 加热 5 min 后立即冰水浴冷却。将生物素修饰的适配体和连接 SA 的颗粒混合, 37 °C 孵育 1 h, 反应结束后离心清洗, 重悬于 PBS 中待用。捕获探针 1 和 2 也同上述方法连接 SA, 以便固定在 NC 膜上。用透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)和傅里叶变换红外光谱仪(fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)表征修饰效果。

2.3.3 试纸条检测条件的优化

由于在测流层析试纸法检测加样量的体积和硝酸纤维素膜种类孔径大小对反应的流动速度和生物分子的结合过程有一定的影响, 故本实验选取不同加样体积(50、100、150、200、250 μ L)和硝酸纤维素膜的种类(sartorius CN 140, 爬速为 110~140 s/cm 和 sartorius CN 95, 爬速为 90~130 s/cm)进行优化, 按照层析流动的方向以加样垫、T 线、C 线和吸水垫分别为 a、b、c、d 指示区域, 加号“+”表示该区域能观察到 UCNPs 的分布, 越多颜色越深, 根据实验结果, 选取最佳的实验条件。

2.3.4 试纸条检测原理

本实验方法是基于核酸特异性互补配对和上转换荧光探针进行设计。试纸由 PVC 板、样品垫、结合垫、NC 膜、吸收垫组成。使用前将上转换荧光探针均匀涂在结合垫上, 用划膜仪在 NC 膜上划 T、C 线固定捕获荧光探针 1 和 2, 干燥后将纸板用斩切机切成 4 mm 宽的试纸条。检测时, 如果待测液含有 BPA, BPA 与结合垫中的指示探针所连的适配体结合, 流经 T 线时, 适配体互补序列, 即捕获探针 1 不能与适配体结合, 而捕获探针 2 可与适配体多出的一段 polyA 结合, 故此时 T 线无荧光, C 线有荧光; 反之, 待测液不含 BPA, 则 T 线区域就能与 BPA 适配体互补配对结合, 此时 T 线荧光较强。利用 UPT 免疫分析仪读取 T、C 线处荧光强度, 不同浓度 BPA 和 T/C 值有一

定的线性关系。

2.3.5 试纸条性能评价

对制备的试纸条从方法检出限、特异性、准确度和精密度 3 个方面评价其性能。首先用试纸条分别检测浓度为 0、25、50、100、200、400、600、800、1200、1600 ng/mL 的 BPA 标准品, 每个浓度重复检测 3 次, 以不同浓度 BPA 为横坐标, 检测的 T/C 值为纵坐标, 得到该方法的标准曲线和最低检测限($3\sigma/S$, σ 为 11 次空白样品的标准偏差, S 为得到的线性关系的斜率绝对值)。

特异性评价是用试纸条依次检测低、中、高 3 个浓度的 BPA 及其 4 种结构类似物, 通过对比其 T/C 值可知方法的特异性效果。

方法准确度和精确度用样品加标回收实验评价。首先在一次纸杯中装满 100 °C 开水静置冷却到 25 °C, 先用 HPLC 检测基底 BPA 含量, 之后加入 3 个不同浓度标准品, 做加标回收实验, 以 HPLC 为对照作为准确度的评价指标; 每个浓度测量 5 次, 以其相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)作为精密度评价指标。

3 结果与分析

3.1 上转换颗粒制备和表征

由实验结果(图 1)可知, 制备的未经修饰的 UCNPs 粒径大约(73 ± 0.5) nm, 包硅壳修饰过的 UCNPs 粒径大小约为(85 ± 0.6) nm, 为进一步验证颗粒连接成功, 利用傅里叶红外光谱表征颗粒修饰前后的图谱变化, 由图 1B 可知, 与修饰前的裸颗粒相比(图谱 a), 修饰后的颗粒(图谱 b)在波长 1091 cm^{-1} 处 Si-O 键的对称伸缩振动峰大大增强, 表明颗粒表面成功包上了硅壳, 在 1650 cm^{-1} 和 1535 cm^{-1} 处出现了蛋白胺类-CONH-酰胺键的伸缩振动峰^[20], 表明颗粒表面已成功连接 SA, 可用于生物分子的偶联。

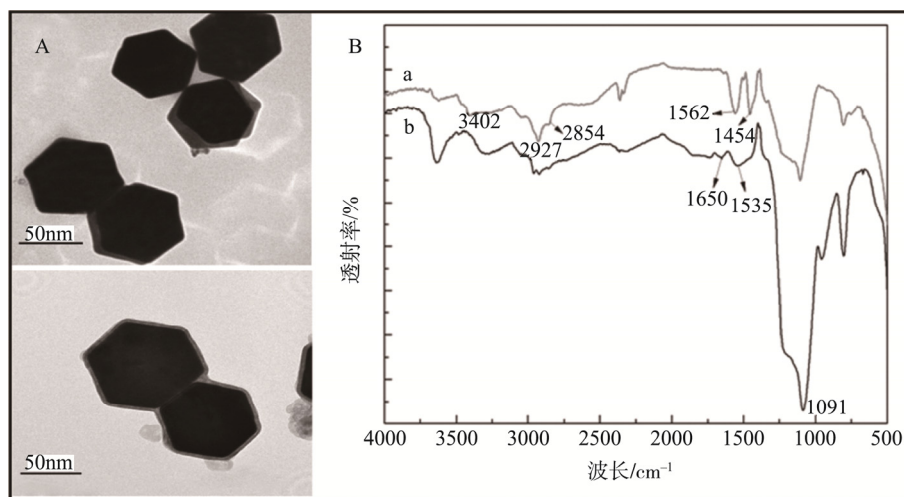


图 1 UCNPs 修饰前后的透射电镜图(A)和红外光谱图(B)

Fig.1 TEM images (A) and FTIR spectra (B) of UCNPs before and after modified

3.2 试纸条检测条件的优化

以加样量的体积和硝酸纤维素膜种类的孔径 2 个因素变化对试纸条的检测条件进行评价, 实验结果见表 1。由结果可知, 对于同一种膜, 在 200 μL 以下时, 加样垫上存留较多探针复合物, 随着加样量的增多, 层析作用逐渐向前推进, TC 线上荧光强度逐渐增强, 当加样量增加到 250 μL 时各区域的荧光信号基本没有变化; 对于不同爬速的膜来说, 爬速较快的膜在各个区域流动较快, 反应时间相对较短, 可能会对检测结果带来假阳性的干扰, 而爬速较慢的膜可以保证充分的反应时间, 综合以上实验, 结果表明 200 μL 的量足以带动所有的探针流动并充分于 TC 线反应, 同时也间接证明了探针的成功制备, 故选用 CN 140 膜, 加样 200 μL 进行实验。

表 1 检测条件的优化
Table 1 Optimization of detection conditions

膜种类	加样量/ μL				
	50	100	150	200	250
CN 140	a+++b+	a+b+++c+	a+b+++c+	b+++c+d+	b+++c+d+
CN 95	a+++b++	a+b+++c+	a+b+++c+d+	b+++c+d+	b+c+d+++

3.3 制作标准曲线

实验表明试纸条可以检测出 12.5~1600 ng/mL 范围内的 BPA, 但在 50~800 ng/mL 区间内 BPA 浓度与 T/C 值线性关系良好, 如图 2 所示, 线性方程为 $Y=-0.0836X+86.12$, $r=0.993$, 最低检测限达 12.5 ng/mL 。

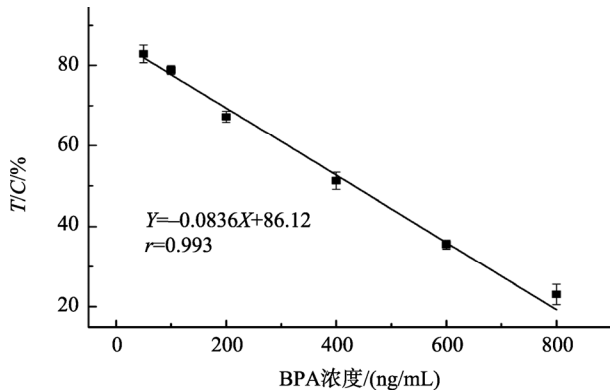


图 2 BPA 检测的标准曲线($n=3$)
Fig.2 Calibration curve of the BPA detecting ($n=3$)

3.4 检测特异性

选取 50、200、800 ng/mL 低、中、高 3 种浓度的 BPA 及其 4 种结构类似物, 评价试纸检测的特异性效果。由图 3 可知, 5 种物质中, 只有 BPA 随着浓度变化与 T/C 值有一定反比关系, 符合预期检测结果, 其他物质只引起检测结

果的轻微变化, 无特异性。证明采用本方法检测 BPA 时, 其他 4 种 BPA 结构类似物对实验结果的干扰较小, 表明本方法具备很好的特异性。

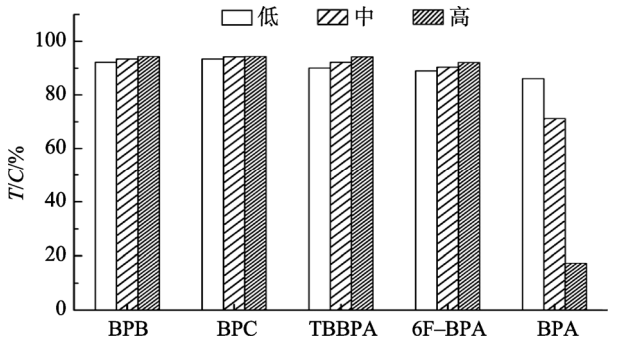


图 3 快速检测方法的特异性
Fig.3 The specificity of the rapid detection method

3.5 准确度和精密度

加标回收实验评价试纸条检测准确度和精密度的结果见表 2。结果表明, 纸杯水中 BPA 的加标回收率在 94.53%~103.78%之间, 相对标准偏差小于 3.75%; 将该方法与国标方法 HPLC 对比, 由表 2 可知, 在 3 个浓度水平下, 2 种方法测定的 BPA 含量无显著性差异($P>0.05$), 表明该方法的准确度和精密度良好, 可用于 BPA 快速检测。

表 2 加标回收实验结果($n=5$)
Table 2 Detection results of the recovery test ($n=5$)

加入量 /(ng/mL)	测得量 /(ng/mL)		回收率 /%		相对标准偏差 RSD/%	
	试纸条 HPLC	试纸条 HPLC	试纸条 HPLC	试纸条 HPLC	试纸条 HPLC	试纸条 HPLC
100	94.53 [*]	97.31 [*]	94.53	97.31	3.34	2.79
200	207.56 [#]	204.97 [#]	103.78	102.49	3.75	1.45
400	397.09 [△]	401.25 [△]	99.27	100.31	2.48	2.19

注: 经 HPLC 测定, 加标前一次性纸杯冷却水中未检出 BPA; 上标*, #, Δ 表示在 0.05 显著性水平上差异显著。

4 结 论

本研究经过条件优化, 制备了发光效率较高的 UCNPs, 研制了基于 UCNPs 和适配体探针的试纸条, 可快速检测一次性纸杯中溶出的 BPA, 加标回收率在 94.53%~103.78%之间, $RSD<3.75\%$ 。本方法相较于胶体金试纸条肉眼观察法有更高的检测灵敏度, 相比仪器法, 检测时间大大缩短, 仅需 20 min 即可完成检测, 满足现场快速检测的需求, 具有良好的市场前景。

参考文献

[1] Becerra V, Odermatt J. Detection and quantification of traces of bisphenol

- a and bisphenol s in paper samples using analytical pyrolysis-gc/ms [J]. *Analyst*, 2012, 137(9): 2250–2259.
- [2] Chung E, Jeon J, Yu J, *et al.* Surface-enhanced raman scattering aptasensor for ultrasensitive trace analysis of bisphenol A [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 64: 560–565.
- [3] Staples CA, Dome PB, Klecka GM, *et al.* A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A [J]. *Chemosphere*, 1998, 36(10): 2149–2173.
- [4] Lim DS, Kwack SJ, Kim KB, *et al.* Potential risk of bisphenol a migration from polycarbonate containers after heating, boiling, and microwaving [J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2009, 72(21,22): 1285–1291.
- [5] Watabe Y, Kondo T, Morita M, *et al.* Determination of bisphenol a in environmental water at ultra-low level by high-performance liquid chromatography with an effective on-line pretreatment device [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1032(1,2): 45–49.
- [6] Motoyama A, Suzuki A, Shirota O, *et al.* Direct determination of bisphenol a and nonylphenol in river water by column-switching semi-microcolumn liquid chromatography/electrospray mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1999, 13(21): 2204–2208.
- [7] Moreno MJ, D'Arienzo P, Manclus JJ, *et al.* Development of monoclonal antibody-based immunoassays for the analysis of bisphenol a in canned vegetables [J]. *J Environ Sci Health B*, 2011, 46(6): 509–517.
- [8] 洪文艳, 杨瑞馥, 唐博恒. 纳米颗粒在免疫层析试纸检测技术中的应用[J]. *医学综述*, 2011, 17(13): 2017–2019.
Hong WY, Yang RF, Tang BH. The application of nano-materials in lateral flow immunochromatographic assays [J]. *Med Recapit*, 2011, 17(13): 2017–2019.
- [9] Mei ZL, Deng Y, Chu HQ, *et al.* Immunochromatographic lateral flow strip for on-site detection of bisphenol a [J]. *Microchim Acta*, 2012, 180(3,4): 279–285.
- [10] 姜会聪, 任舒悦, 王瑜, 等. 上转换发光免疫层析法快速检测牛奶中雌二醇[J]. *食品研究与开发*, 2017, 38(3): 119–123.
Jiang HC, Ren SY, Wang Y, *et al.* An up-converting phosphor technology based immunostrip assay for rapid detection of estradiol in milk [J]. *Food Res Dev*, 2017, 38(3): 119–123.
- [11] Wang LB, Ma WW, Chen W, *et al.* An aptamer-based chromatographic strip assay for sensitive toxin semi-quantitative detection [J]. *Biosens Bioelectron*, 2011, 26(6): 3059–3062.
- [12] Jauset-Rubio M, Svobodov AM, Mairal T, *et al.* Aptamer lateral flow assays for ultrasensitive detection of β -conglutin combining recombinase polymerase amplification and tailed primers [J]. *Anal Chem*, 2016, 88(21): 10701–10709.
- [13] 侯巧华, 孟轲音, 李忠义, 等. 胶体金免疫层析试纸快速灵敏检测沙门菌[J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, 25(24): 4216–4218.
Hou QH, Meng KY, Li ZY, *et al.* Colloidal gold immunochromatographic strip for rapid and sensitive detection of *Salmonella* [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2015, 25(24): 4216–4218.
- [14] He H, Liu BL, Wen SH. Quantitative lateral flow strip sensor using highly doped upconversion nanoparticles [J]. *Anal Chem*, 2018, 90: 12356–12360.
- [15] Wu SJ, Liu LH, Duan N, *et al.* A test strip for ochratoxin A based on the use of aptamer-modified fluorescence upconversion nanoparticles [J]. *Microchim Acta*, 2018, 185(11).
- [16] Li QF, Bai JL, Ren SY, *et al.* An ultrasensitive sensor based on quantitatively modified upconversion particles for trace bisphenol A detection [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2019, 411(1): 171–179.
- [17] Jo M, Ahn JY, Lee J, *et al.* Development of single-stranded DNA aptamers for specific bisphenol a detection [J]. *Oligonucleotides*, 2011, 21(2): 85–91.
- [18] Li ZQ, Zhang Y. An efficient and user-friendly method for the synthesis of hexagonal-phase NaYF₄: Yb, Er/Tm nanocrystals with controllable shape and upconversion fluorescence [J]. *Nanotechnology*, 2008, 19(34): 45606.
- [19] Stalder K, Stober W. Haemolytic activity of suspensions of different silica modifications and inert dusts [J]. *Nature*, 1965, 207(4999): 874–875.
- [20] Dong H, Yan F, Ji H, *et al.* Quantum-dot-functionalized poly(styrene-co-acrylic acid) microbeads: step-wise self-assembly, characterization, and applications for sub-femtomolar electrochemical detection of DNA hybridization [J]. *Adv Funct Mater*, 2010, 20(7): 1173–1179.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



李巧凤, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全。
E-mail: qiaofengli001@foxmail.com



高志贤, 研究员, 主要研究方向为食品安全。
E-mail: gaozhx@163.com