

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2024.80973

# 无标记适配体—金属有机框架模拟酶比色检测牛奶和奶粉中双酚 A

姜黎<sup>1</sup> 卢春霞<sup>2</sup> 林祥群<sup>1</sup> 陈霞<sup>3</sup>

(1. 新疆石河子职业技术学院食品工程学院, 新疆 石河子 832000; 2. 长江师范学院现代农业与生物工程学院, 重庆 408100; 3. 农业农村部食品质量监督检验测试中心(石河子), 新疆 石河子 832000)

**摘要:** [目的] 以双酚 A 核酸适配体为识别分子, 金属有机框架(Fe-MIL-101) 纳米模拟酶为信号探针, 建立了一种无标记、可视化快速检测双酚 A(BPA) 的新方法。[方法] 将 BPA 适配体添加到 Fe-MIL-101 溶液中, 适配体通过静电相互作用吸附到 Fe-MIL-101 表面, 进而抑制其模拟酶活性, 当测试样品中含有 BPA 时, 适配体特异性结合 BPA, 适配体从 Fe-MIL-101 表面脱落, Fe-MIL-101 催化无色过氧化物酶底物产生比色输出信号, 通过比色信号的变化实现对 BPA 的定性和定量分析。[结果] 在优化条件下, BPA 在缓冲液中线性检测范围为 1~80 ng/mL, 肉眼可视化检出限为 0.5 ng/mL。将该方法应用于牛奶和奶粉中 BPA 检测, 加标回收率为 83.6%~95.2%, RSD 值为 2.96%~7.45%。[结论] 该方法具有简便、快速、准确性高等特点, 具有良好的应用前景。

**关键词:** 双酚 A; 适配体; 金属有机框架; 无标记; 比色分析

## Colorimetric detection of bisphenol A in milk and milk powder based on label-free aptamer and metal-organic framework enzyme mimics

JIANG Li<sup>1</sup> LU Chunxia<sup>2</sup> LIN Xiangqun<sup>1</sup> CHEN Xia<sup>3</sup>

(1. School of Food Engineering, Xinjiang Shihezi Vocational Technical College, Shihezi, Xinjiang 832000, China; 2. School of Advanced Agriculture and Bioengineering, Yangtze Normal University, Chongqing 408100, China; 3. Ministry of Agriculture and Rural Food Quality Supervision and Inspection Testing Center (Shihezi), Shihezi, Xinjiang 832000, China)

**Abstract:** [Objective] To develop a label-free and visual colorimetric assay for the rapid detection of bisphenol A (BPA) using a BPA aptamer as the recognition molecule and metal-organic framework (Fe-MIL-101) nanozyme mimics as the signal probe. [Methods] The BPA aptamer was added to the Fe-MIL-101 solution, where it was adsorbed onto the Fe-MIL-101 surface through electrostatic interactions, thereby inhibiting the activity of nanozyme mimics. In the presence of BPA in the test sample, the aptamer specifically binds to BPA and detaches from the Fe-MIL-101 surface, restoring the catalytic activity of Fe-MIL-101. This enables Fe-MIL-101 to catalyze a colorless peroxidase substrate, generating a colorimetric output signal. The qualitative and quantitative analysis of BPA was achieved by monitoring the changes in the colorimetric signal. [Results] Under optimized conditions, the linear detection range for BPA in a buffered solution was 1~80 ng/mL, with a naked-eye visual detection limit of 0.5 ng/mL. When applied to BPA detection in milk and milk powder, the method achieved spike recoveries ranging from 83.6% to 95.2%, with relative standard deviations (RSDs) between 2.96% and 7.45%. [Conclusion] This method is simple, rapid, and highly accurate, demonstrating strong potential for practical applications.

**Keywords:** bisphenol A; aptamer; metal-organic framework; label-free; colorimetric assay

基金项目: 重庆市教委科学技术研究计划重点项目(编号: KJZD-K202201405)

通信作者: 卢春霞(1978—), 女, 长江师范学院教授, 博士。E-mail: shzlcx2002@163.com

收稿日期: 2024-09-21 改回日期: 2025-02-23

引用格式: 姜黎, 卢春霞, 林祥群, 等. 无标记适配体—金属有机框架模拟酶比色检测牛奶和奶粉中双酚 A[J]. 食品与机械, 2025, 41(6): 88-95.

Citation: JIANG Li, LU Chunxia, LIN Xiangqun, et al. Colorimetric detection of bisphenol A in milk and milk powder based on label-free aptamer and metal-organic framework enzyme mimics[J]. Food & Machinery, 2025, 41(6): 88-95.

双酚A(BPA),简称二酚基丙烷,是一种化工原料,常被用于生产食品接触材料及制品,如食品容器、食品包装材料和婴幼儿产品等<sup>[1]</sup>。BPA是一种环境内分泌干扰物,具有潜在的雌激素效应,可对人和动物的内分泌系统<sup>[2]</sup>、神经系统<sup>[3]</sup>和生殖系统<sup>[4]</sup>造成不良影响。在动物试验中,即使暴露于低剂量(nmol/L)BPA条件下,BPA也会显著影响细胞增殖和健康<sup>[5]</sup>。鉴于BPA对人体健康的危害,中国和欧盟国家等禁止BPA不得用于生产婴幼儿专用食品接触材料及制品,并且规定了食品及食品包装材中BPA的限量和迁移限量。如中国GB 5749—2022《生活饮用水卫生标准》限定饮用水中BPA含量不得超过10 mg/L;GB 9685—2016《食品安全国家标准 食品接触材料及制品用添加剂使用标准》规定BPA不得用于生产婴幼儿专用食品接触材料及制品,同时限定了食品接触材料及制品、食品接触用涂料和涂层中BPA的特定迁移限量(SML)为0.6 mg/kg。日本《食品卫生法》规定聚碳酸酯制品中BPA含量 $\leq 500 \mu\text{g/g}$ ,迁移量为 $2.5 \mu\text{g/mL}$ 。

随着BPA的广泛应用,部分BPA可释放到水及环境中,通过生物链或食物链造成牛奶中BPA的残留。另外,牛奶在生产、加工和储运等过程中,设备及包装材料中的BPA可能迁移到牛奶中,进而对人体健康造成危害。但是,中国尚未制定牛奶及奶粉中BPA的国标检测方法。

目前,BPA的检测方法主要有液相色谱法<sup>[6]</sup>、气相色谱法<sup>[7]</sup>、酶联免疫吸附测定法<sup>[8]</sup>等。仪器分析方法虽然具有高的准确性,但仪器昂贵、样品前处理复杂、需要专业人员操作,无法满足现场快速检测需求。免疫分析方法虽然具有简便快速、特异性强等优点,但是抗体制备需要免疫动物,过程繁琐、耗时长、成本高。近年来,核酸适配体(aptamer)作为新型识别分子成为人们关注的焦点,自从Tuerk等<sup>[9]</sup>发明了指数富集的配体系统进化技术以及Ellington等<sup>[10]</sup>提出“aptamer”一词以来,适配体以其体积小、特异性高、适应范围广、合成成本低、易于修饰和标记等优点,被广泛应用于分析检测<sup>[11]</sup>、生物医药和诊断<sup>[12]</sup>等领域。

金属有机框架材料(MOFs)是由金属离子和有机配体通过配位键自组装形成的一种多孔杂化材料,因其具有晶体结构可调、结构多样、孔隙率高、吸附性强等优点,在载气、传感、分离和催化<sup>[13-14]</sup>等领域得到广泛应用。其中,基于MOFs纳米酶的比色法传感技术引起了相当大的关注<sup>[15-18]</sup>。目前,尚未见到基于适配体和MOF模拟酶应用于检测双酚A的研究。

研究拟结合适配体的高亲和力和低成本,以及Fe-MIL-101优异的过氧化物模拟酶活性,构建一种无标记适配体比色传感检测技术,以期简化检测步骤,降低检测成本,为牛奶及奶粉中BPA的快速检测提供技术支撑。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

牛乳和配方奶粉:市售;

BPA适配体<sup>[19]</sup>(5'-CCGGTGGGTGGTCAGGTGGGATAGCGTTCCGCGTATGGCCAGCGCATCACGGGTTCCGACCA-3'):生工生物工程(上海)股份有限公司;

BPA、双酚B(BPB)、双酚F(BPF)、双酚S(BPS)标准品:坛墨质检科技股份有限公司;

H<sub>2</sub>BDC、FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O:分析纯,上海麦克林生化科技股份有限公司;

N,N-二甲基甲酰胺(DMF):分析纯,生工生物工程(上海)股份有限公司;

3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色试剂盒、96孔-酶标板:生工生物工程(上海)股份有限公司;

试验用水为超纯水。

### 1.2 仪器与设备

扫描电镜(SEM):S-4800型,日本日立公司;

X-射线衍射仪(XRD):Bruker D8-AXS Focus型,德国布鲁克AXS有限公司;

傅里叶红外光谱仪(FTIR):Spectrum Two型,美国珀金埃尔默股份有限公司;

X射线光电子能谱仪(XPS):Escalab 250Xi型,美国赛默飞世尔科技公司;

酶标仪:Thermo Multiskan FC型,美国赛默飞世尔科技公司;

液相色谱—三重串联四极杆质谱仪:Agilent 6460型,美国安捷伦公司;

超纯水系统:Milli-Q EQ7000型,德国默克公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 检测原理 Fe-MIL-101具有过氧化物酶模拟活性,加入适配体后,适配体通过静电相互作用吸附到Fe-MIL-101表面,使Fe-MIL-101上的正电荷产生了静电屏蔽,进而抑制Fe-MIL-101模拟酶活性<sup>[20]</sup>。当检测体系中含有靶标BPA时,BPA与适配体发生特异性结合,适配体从Fe-MIL-101表面脱落,Fe-MIL-101恢复模拟酶活性。比色检测原理如图1所示。

1.3.2 Fe-MIL-101的制备及表征 Fe-MIL-101的合成参考文献<sup>[21]</sup>的方法并稍加修改。将0.206 g H<sub>2</sub>BDC和0.675 g FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O溶于15 mL DMF溶液中,溶解后得到黄色澄清溶液,转移至50 mL聚四氟乙烯反应釜中,110 °C加热20 h。自然冷却至室温,除去上清液,用乙醇和DMF洗涤以去除多余的反应物,在真空干燥箱中60 °C干燥过夜以除去孔道中残留的有机分子,最终获得产品Fe-MIL-101。

采用扫描电镜对Fe-MIL-101的形貌进行表征,用离

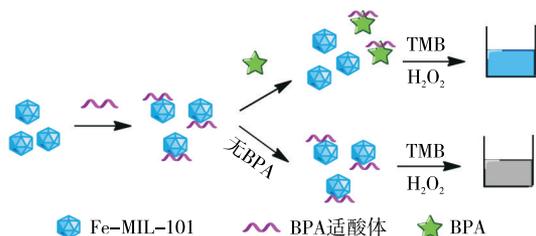


图 1 基于无标记适配体和 Fe-MIL-101 比色检测 BPA 示意图

Figure 1 Schematic diagram of the colorimetric detection of BPA based on label-free aptamer and Fe-MIL-101

子溅射仪对 Fe-MIL-101 材料喷金处理,然后采用扫描电镜拍照。采用傅里叶红外光谱仪对 Fe-MIL-101 的化学成分进行分析,扫描范围为  $400\sim 4\,000\text{ cm}^{-1}$ 。XRD 图谱在 X 射线衍射仪上完成,扫描范围为  $2\theta=10^\circ\sim 90^\circ$ ,扫描步长  $0.02^\circ$ ,扫描速率每步  $0.2\text{ s}$ 。

### 1.3.3 基于无标记适配体-MOF 模拟酶比色检测 BPA

Fe-MIL-101 用  $10\text{ mmol/L}$  PBS ( $137\text{ mmol/L}$  NaCl,  $2.7\text{ mmol/L}$  KCl,  $2\text{ mmol/L}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $10\text{ mmol/L}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.4) 分散并溶解,使其终质量浓度为  $1\text{ mg/mL}$ 。取  $100\text{ }\mu\text{L}$  Fe-MIL-101 加入酶标板反应孔中,加入  $10\text{ }\mu\text{L}$  适配体(终浓度  $150\text{ nmol/L}$ ),室温孵育  $8\text{ min}$ 。然后加入  $50\text{ }\mu\text{L}$  待测试样,室温孵育  $20\text{ min}$ 。每孔依次加入  $50\text{ }\mu\text{L}$  显色液(TMB- $\text{H}_2\text{O}_2$ ),反应  $20\text{ min}$ ,加入  $50\text{ }\mu\text{L}$  终止反应液。观察反应孔中溶液颜色变化,然后在  $652\text{ nm}$  处读取光密度值。

### 1.3.4 检测条件优化

(1) 适配体浓度:在 Fe-MIL-101 质量浓度  $1\text{ mg/mL}$ , Fe-MIL-10 与适配体温育时间  $10\text{ min}$ ,Fe-MIL-101 催化时间  $30\text{ min}$ ,BPA 与适配体结合时间  $30\text{ min}$ ,考察适配体浓度( $25, 50, 100, 150, 200, 300\text{ nmol/L}$ )对体系吸光度的影响。

(2) 温育时间:在 Fe-MIL-101 质量浓度  $1\text{ mg/mL}$ ,适配体浓度  $150\text{ nmol/L}$ ,Fe-MIL-101 催化时间  $30\text{ min}$ ,BPA 与适配体结合时间  $30\text{ min}$ ,考察 Fe-MIL-101 与适配体温育时间( $2, 4, 6, 8, 10, 12\text{ min}$ )对体系吸光度的影响。

(3) Fe-MIL-101 催化时间:在 Fe-MIL-101 质量浓度  $1\text{ mg/mL}$ ,适配体浓度  $150\text{ nmol/L}$ ,温育时间  $8\text{ min}$ ,BPA 与适配体结合时间  $30\text{ min}$ ,考察 Fe-MIL-101 催化时间( $5, 10, 20, 30, 40, 50\text{ min}$ )对体系吸光度的影响。

(4) BPA 与适配体结合时间:在 Fe-MIL-101 质量浓度  $1\text{ mg/mL}$ ,适配体浓度  $150\text{ nmol/L}$ ,温育时间  $8\text{ min}$ ,Fe-MIL-101 催化时间  $20\text{ min}$ ,考察靶标与适配体的结合时间( $10, 20, 30, 40, 50, 60\text{ min}$ )对体系吸光度的影响。

### 1.3.5 检测性能评价

(1) 检测限:用甲醇稀释 BPA 标准溶液,使其终质量

浓度分别为  $0.0, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 80.0, 160.0\text{ ng/mL}$ ,在优化条件下,按 1.3.3 的方法进行测定。以 BPA 标准溶液各浓度为横坐标,对应的光密度值为纵坐标,绘制标准曲线。基于 3 倍信噪比( $3\sigma/S$ )计算方法检出限(LOD)<sup>[22]</sup>,其中  $\sigma$  为 10 次空白样检测值的标准偏差, $S$  为线性斜率。

(2) 特异性:采用该方法测定相同质量浓度( $50\text{ ng/mL}$ )的 BPA、BPB、BPF、BPS 溶液,PBS 缓冲液代替 BPA 作为空白对照,每个试验重复 3 次。

(3) 重现性:由同一操作人员,使用同一仪器,采用 1.3.3 的方法测定 BPA 标准溶液( $50\text{ ng/mL}$ )8 次,记录吸光值,计算相对标准偏差(RSD)。

1.3.6 实际样品检测 提前用 HPLC-MS/MS 检测确认牛奶及奶粉样品中无 BPA 存在,检测方法参考文献[23]。称取牛奶或奶粉试样  $1.0\text{ g}$ (精确到  $0.01\text{ g}$ ),添加不同浓度的 BPA 标准品溶液,加入  $5\text{ mL}$  乙腈+甲醇混合溶液( $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{甲醇}}=6:4$ ),涡旋混匀,超声(频率  $90\%$ )提取  $10\text{ min}$ , $8\,000\text{ r/min}$  离心  $10\text{ min}$ ,取上清液。重复提取 2 次,合并上清液,用氮吹仪浓缩后,用甲醇定容至  $2\text{ mL}$ ,按 1.2.3 的方法检测,计算加标回收率和 RSD。每个试验重复 3 次。

### 1.4 数据处理

试验数据以平均值±标准偏差表示,采用单因素方差分析法分析试验数据,使用 Origin 7.5 软件绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 Fe-MIL-101 的表征

Fe-MIL-101 的扫描电镜表征结果如图 2(a)所示,制备的 Fe-MIL-101 呈现典型的八面体结构,颗粒尺寸大小较为均匀。图 2(b)为 Fe-MIL-101 的红外光谱图,Fe-MIL-101 的特征吸收峰分别出现在  $1\,589, 1\,504, 1\,378, 1\,157, 1\,017, 824, 744, 537\text{ cm}^{-1}$ ,与文献[18, 21, 24]报道基本一致,在  $1\,589, 1\,378\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰分别为—COOH 的不对称和对称振动; $1\,504\text{ cm}^{-1}$  处的峰属于 C=C 拉伸振动峰; $1\,157\text{ cm}^{-1}$  处吸收峰对应 O—C—O 拉伸振动。吸收峰  $1\,017, 744\text{ cm}^{-1}$  归属于 C—H 弯曲振动; $824\text{ cm}^{-1}$  吸收峰为苯环的面外弯曲振动, $537\text{ cm}^{-1}$  处吸收峰与 Fe—O 振动有关。Fe-MIL-101 的 XRD 谱图如图 2(c)所示,Fe-MIL-101 的特征衍射峰分别出现在  $9.1^\circ, 11.5^\circ, 17.2^\circ, 18.7^\circ$ ,分别对应晶面指数(100)、(101)、(200)、(201),与文献[18, 21]报道一致。采用 XPS 测定了 Fe-MIL-101 的化学组成和电子态,XPS 光谱如图 2(d)所示,Fe-MIL-101 中存在碳(C 1s)、氧(O 1s)和铁(Fe 2p)元素,分别在结合能  $285, 532, 712\text{ eV}$  处出现特征峰,与文献[18]报道一致。以上结果表明,Fe-MIL-101 制备成功。

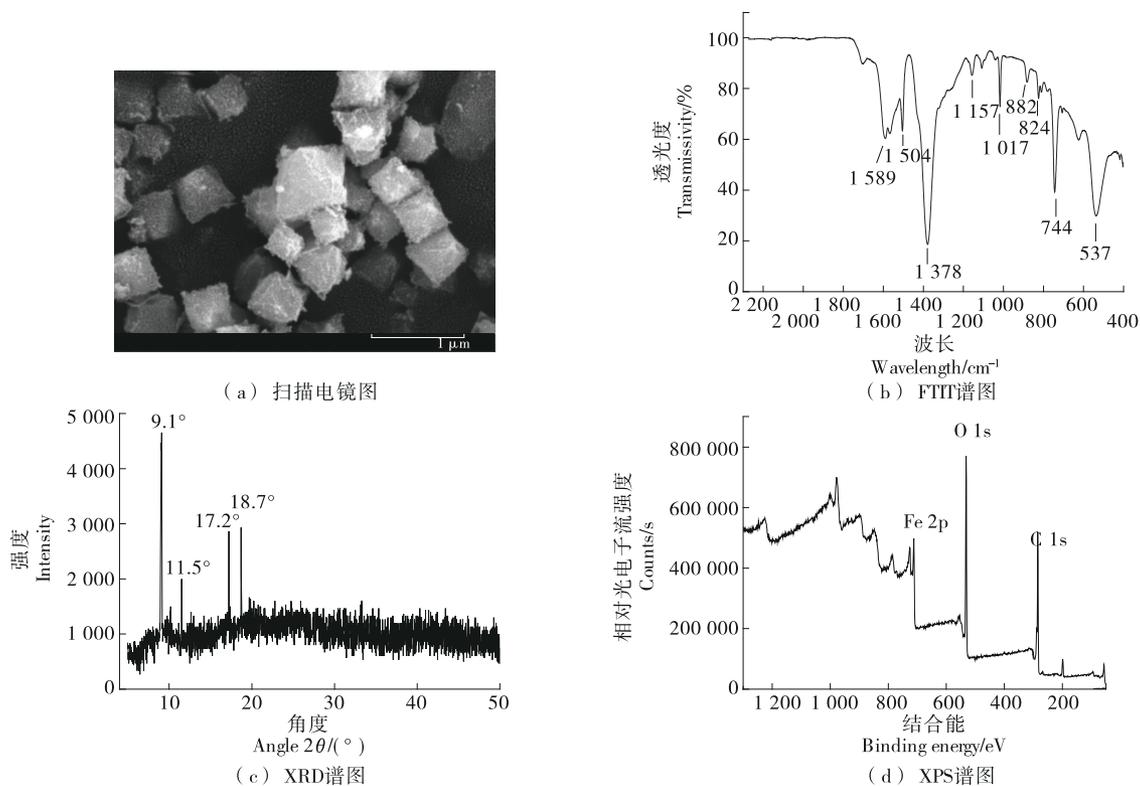


图2 Fe-MIL-101的扫描电镜图、FTIR谱图、XRD谱图和XPS谱图

Figure 2 SEM, FTIR, XRD, and XPS images of the Fe-MIL-101

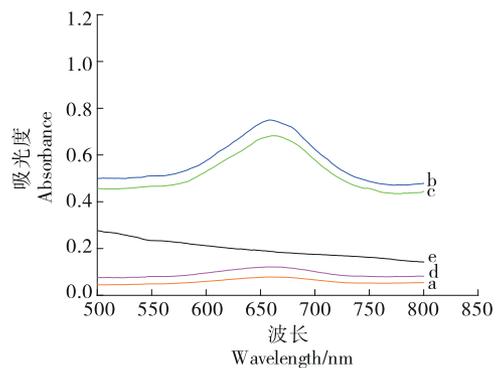
## 2.2 检测原理可行性验证

用酶标仪于500~800 nm范围对以下溶液进行全波长扫描:① 200  $\mu\text{L}$  TMB+ $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液;② Fe-MIL-101 (0.1 mg/mL)与TMB+ $\text{H}_2\text{O}_2$ 的混合溶液( $V_{\text{Fe-MIL-101}}:V_{\text{TMB+H}_2\text{O}_2}=1:1$ ),反应30 min;③ 100  $\mu\text{L}$  Fe-MIL-101与5  $\mu\text{L}$  适配体(终浓度150 nmol/L)孵育8 min,加入BPA标准溶液(终质量浓度80 ng/mL),混合后孵育30 min,加入100  $\mu\text{L}$  TMB+ $\text{H}_2\text{O}_2$ ,室温反应20 min;④ 100  $\mu\text{L}$  Fe-MIL-101与5  $\mu\text{L}$  适配体(终浓度150 nmol/L)混合,孵育30 min,加入100  $\mu\text{L}$  TMB+ $\text{H}_2\text{O}_2$ ,室温反应20 min;⑤ 200  $\mu\text{L}$  Fe-MIL-101(0.1 mg/mL)。由图3可以看出,TMB+ $\text{H}_2\text{O}_2$ 和Fe-MIL-101单独测定时,均无明显吸收峰,但两者混合并反应一段时间后,反应液颜色变为蓝色,在652 nm处吸光值达到0.74,说明Fe-MIL-101模拟酶的过氧化物活性较强。当检测体系加入适配体和靶标BPA时,反应溶液呈蓝色,吸光值与曲线b接近,说明适配体与BPA发生了结合。当检测体系有适配体而无BPA时,反应溶液在652 nm处无明显吸收峰,说明适配体吸附到Fe-MIL-101表面,抑制了其模拟酶活性。以上结果表明,研究设计的检测原理可行。

## 2.3 样品前处理条件优化

牛奶和奶粉基质成分复杂,含有大量蛋白质、脂肪等

物质。为了消除基质的干扰,在提取过程中要除去蛋白质。有研究<sup>[6]</sup>表明,乙腈去除蛋白的效果较好,但是双酚A的提取回收率较低(<30%),不太适用于牛乳和乳制品中BPA的提取。甲醇可作为溶剂提取双酚A<sup>[23]</sup>,但其无法有效去除蛋白质,而蛋白质会干扰适配体与靶标的结合。由图4可知,选择乙腈+甲醇混合物作为提取溶剂时



a. TMB+ $\text{H}_2\text{O}_2$  b. MIL-101 (Fe) + TMB+ $\text{H}_2\text{O}_2$  c. MIL-101 (Fe) + 适配体 + BPA + TMB+ $\text{H}_2\text{O}_2$  d. MIL-101 (Fe) + 适配体 + TMB+ $\text{H}_2\text{O}_2$  e. MIL-101 (Fe)

图3 不同条件下检测体系的可见光吸收光谱图  
Figure 3 Ultraviolet absorption spectra of detection systems under different conditions

回收率较高,当  $V_{乙腈}:V_{甲醇}=6:4$  时回收率最高,达到 87.6%。故后续试验选择乙腈+甲醇( $V_{乙腈}:V_{甲醇}=6:4$ )作为提取溶剂。

### 2.4 检测条件优化

采用单因素试验分别对配体浓度、Fe-MIL-101 吸附适配体时间、适配体与 BPA 结合时间、显色反应时间等检测条件进行优化。由图 5(a)可知,反应体系的吸光值( $A_{652\text{nm}}$ )随适配体浓度的增加逐渐降低,说明 Fe-MIL-101 的模拟酶活性逐渐降低,当适配体浓度达到 150 nmol/L 后,抑制作用趋于平稳。因此,BPA 适配体浓度选择 150 nmol/L。由图 5(b)可知,Fe-MIL-100 吸附适配体的数量随温育时间的增加而增加,其催化性能由于静电屏蔽作用而逐渐减弱,进而导致吸光值降低,当温育时间为 8 min 时,吸附达到平衡,故温育时间选择 8 min。由图 5(c)可知,反应体系吸光度随着催化时间的延长而增加,20 min 后趋于平稳,故催化时间选择 20 min。由图 5(d)可知,当待测靶标与适配体的结合时间  $>20$  min 后,吸光值无明显变化( $P>0.05$ ),因此,两者最佳结合时间为 20 min。

### 2.5 特异性分析

为评估研究所建方法的特异性,采用该方法检测

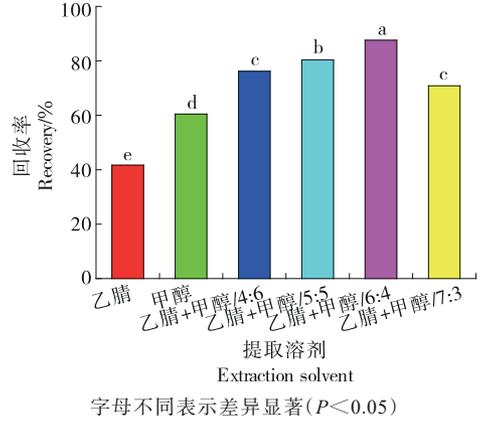


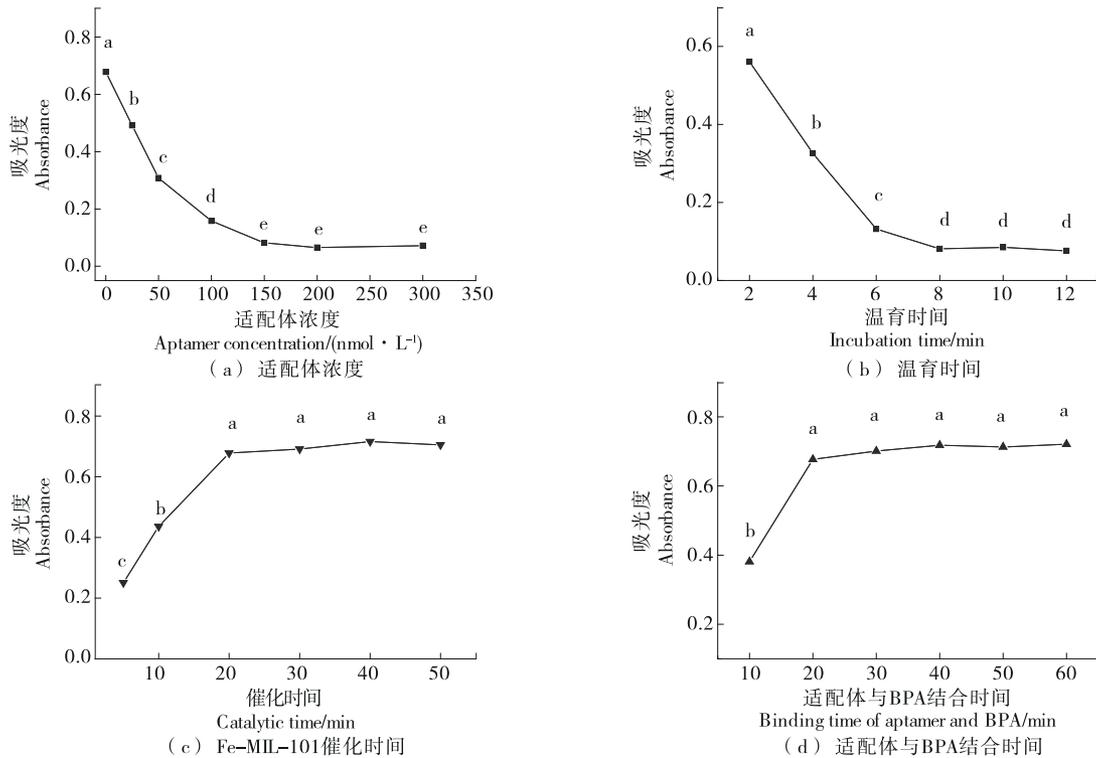
图 4 样品前处理方法对提取回收率的影响

Figure 4 Influence of sample pretreatment methods on extraction recovery

BPA 和结构类似物 BPB、BPF、BPS,结果如图 6 所示。适配体与 BPB、BPF、BPS 不结合,Fe-MIL-100 模拟酶活性被抑制,其吸光值与空白对照类似。表明该方法具有良好的特异性。

### 2.6 方法学考察

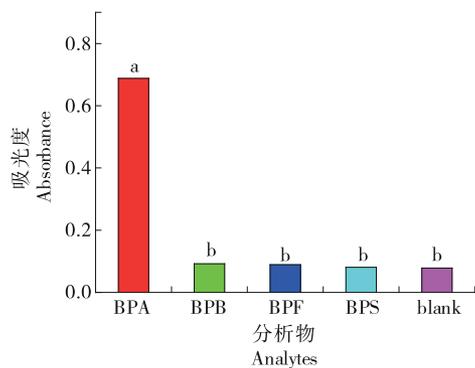
2.6.1 标准曲线和检出限 配制一系列浓度的 BPA 标准



字母不同表示差异显著( $P<0.05$ )

图 5 适配体浓度、吸附时间、Fe-MIL-101 催化时间、适配体与 BPA 结合时间对检测体系吸光度的影响

Figure 5 Effect of aptamer concentrations, adsorption time, Fe-MIL-101 catalytic time, and the binding time of aptamer and BPA on the absorbance of the detection system



字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ )

图6 特异性试验结果

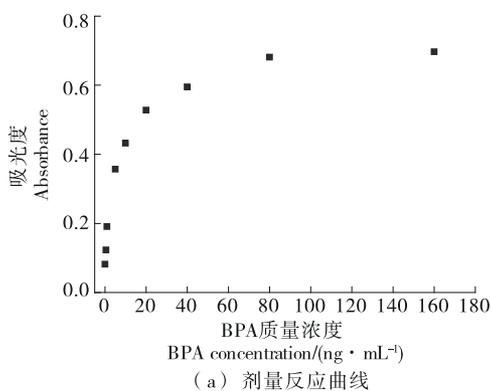
Figure 6 Specificity test results

溶液,在优化的试验条件下对BPA标准溶液进行检测,并绘制标准曲线,结果如图7所示。剂量反应曲线显示,随

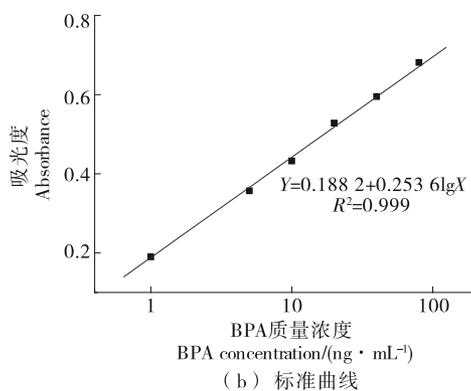
着BPA质量浓度的增加,反应溶液吸光值逐渐增加,说明更多的适配体与BPA结合,Fe-MIL-100表面的适配体数量减少,导致其催化活性逐渐增加。标准曲线显示,BPA在1~80 ng/mL质量浓度范围内与吸光值呈良好线性关系,线性回归方程为 $Y=0.1882+0.2536\lg X$ , $R^2=0.999$ ,检出限为0.15 ng/mL,肉眼可视化检出限为0.5 ng/mL。

2.6.2 重复性分析 重复性分析结果显示,研究所建方法的重复性RSD值为4.51%,说明研究所建方法具有较好的重复性。

2.6.3 精密度和回收试验 采用研究所建方法对阴性牛乳和配方奶粉样品进行加标回收试验,同时参考液相色谱—串联质谱法<sup>[23]</sup>检测BPA,结果如表1所示。BPA在样品中的加标回收率为83.6%~95.2%,RSD值为2.96%~7.45%,回收率与液相色谱—串联质谱法差异不明显。说明研究所建方法在实际样品检测中具有高的准确性与精密度。



(a) 剂量反应曲线



(b) 标准曲线

图7 比色适配体传感器的剂量反应曲线和标准曲线

Figure 7 Dose-response curve and calibration curve of colorimetric aptasensor

表1 精密度和回收试验结果<sup>†</sup>

Table 1 Results of tests for precision and recovery ( $n=3$ )

添加样品	添加量/ ( $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ )	研究所建方法			液相色谱—串联质谱法		
		检出量/( $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ )	回收率/%	RSD/%	检出量/( $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ )	回收率/%	RSD/%
牛乳	5	$4.35 \pm 0.16$	$87.0 \pm 3.10$	3.59	$4.32 \pm 0.21$	$86.4 \pm 4.20$	4.86
	20	$17.7 \pm 1.25$	$88.5 \pm 6.25$	7.06	$18.1 \pm 0.97$	$90.5 \pm 4.85$	5.36
	100	$94.4 \pm 4.74$	$94.4 \pm 4.74$	5.02	$92.5 \pm 5.40$	$92.5 \pm 5.40$	5.84
奶粉	5	$4.18 \pm 2.83$	$83.6 \pm 5.66$	6.78	$4.22 \pm 1.12$	$84.4 \pm 2.24$	2.65
	20	$17.2 \pm 0.51$	$86.0 \pm 2.55$	2.96	$18.5 \pm 1.66$	$92.5 \pm 8.30$	8.97
	100	$95.2 \pm 7.06$	$95.2 \pm 7.06$	7.45	$97.2 \pm 5.88$	$97.2 \pm 5.88$	6.04

## 2.7 方法比对

与仪器分析方法比较,研究所建方法灵敏度较高,不需要大型仪器;与免疫分析技术相比,具有识别分子易获得,成本低;与基于适配体的电化学和荧光分析技术相比,不需要专业仪器,不需要对适配体进行修饰,检测步

骤较为简单等优势(表2)。与基于天然酶标记的传统比色检测技术比较,采用Fe-MIL-101代替天然酶,提高了检测体系的稳定性,进一步降低了检测成本。

## 3 结论

根据目前尚无牛奶及奶粉中双酚A的国标检测方法

表 2 研究所建方法检测性能与现有检测技术比较

Table 2 Comparison of detection performance of the established method with that of existing detection techniques

检测方法	识别分子	检测样品	检测限	线性范围	回收率/%	检测时间/min	参考文献
研究所建方法	适配体	牛奶、奶粉	0.15 ng/mL	1~80 ng/mL	83.6~95.2	50	
液相色谱法	/	牛奶	2.1 ng/g	3.5~10 000 ng/g	80.07~85.53	/	[6]
液相色谱-质谱法	/	饮料、牛奶和奶粉	3 ng/mL	10~2 000 ng/mL	87.5	/	[23]
酶联免疫分析	抗体	矿泉水	0.43 ng/mL	1~50 ng/mL	82.83~101.94	150	[8]
纳米金比色检测	适配体	水	0.1 ng/mL	0.01~100 ng/mL	95.6~103.8	25	[25]
电化学传感器	适配体	河水	0.8 nmol/L	1~10 000 nmol/L	95.1~100.3	100	[26]
荧光检测	适配体	/	0.5 $\mu$ mol/L	0.5~1 000 $\mu$ mol/L	95~104	/	[27]
量子点荧光传感器	适配体	/	0.03~0.08 ng/mL	0.1~10 000 ng/mL	95~103	5	[28]

现状,以及现有双酚 A 检测技术存在的问题,该研究基于无标记适配体和 Fe-MIL-101 模拟酶,构建了一种比色适配体传感器,并对检测条件进行了优化,最后将其用于检测牛乳和配方奶粉中双酚 A。在最佳检测条件下,研究所建方法对双酚 A 的线性检测范围为 1~80 ng/mL,可视化检测限为 0.5 ng/mL,样品中加标回收率为 83.6%~95.2%。该方法不需要专业仪器,检测步骤简便,检测结果易读,而且具有高的准确性和低的检测成本。

#### 参考文献

- [1] ALONSO-MAGDALENA P, ROPERO A B, SORIANO S, et al. Bisphenol-A: a new diabetogenic factor? [J]. Hormones, 2010, 9: 118-126.
- [2] 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.  
WU H, SUN D, CAI Z P, et al. Advances in endocrine disrupting effects of bisphenol A [J]. Ecological Science, 2017, 36(3): 200-206.
- [3] SZYMANSKA K, GONKOWSKI S. Bisphenol A-induced changes in the enteric nervous system of the porcine duodenum [J]. Neurotoxicology, 2018, 66: 78-86.
- [4] RAHMAN M S, PANG W K, RYU D Y, et al. Multigenerational and transgenerational impact of paternal bisphenol A exposure on male fertility in a mouse model [J]. Human Reproduction, 2020, 35(8): 1 740-1 752.
- [5] SALIAN S, DOSHI T, VANAGE G. Perinatal exposure of rats to bisphenol A affects fertility of male off spring-an overview [J]. Reproductive Toxicology, 2011, 31: 359-362.
- [6] 田宏哲, 徐静. 高效液相色谱法测定牛奶中双酚 A [J]. 食品科技, 2012, 37(8): 286-289.  
TIAN H Z, XU J. Quantitative analysis of bisphenol A in milk samples by HPLC [J]. Food Science and Technology, 2012, 37(8): 286-289.
- [7] 聂鲲. 牛奶中双酚 A 残留 GC-ECD 测定 [J]. 中国乳品工业, 2015, 43(3): 60-61.  
NIE K. Determ bisphenol A in milk by GC-ECD [J]. China Dairy Industry, 2015, 43(3): 60-61.
- [8] 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.  
XU L, ZHANG Y, ZHU L X, et al. Preparation of monoclonal antibody for the detection of bisphenol a by enzyme-linked immunoassay [J]. Food Science, 2015, 36(20): 202-206.
- [9] TUERK C, GOLD L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase [J]. Science, 1990, 249: 505-510.
- [10] ELLINGTON A D, SZOSTAK J W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands [J]. Nature, 1990, 346(6 287): 818-822.
- [11] 高林晨萌, 叶华, 黄圣博, 等. 核酸适配体在食品危害物多靶标检测中的应用进展 [J]. 食品与机械, 2021, 37(4): 217-225.  
GAO L C M, YE H, HUANG S B, et al. Recent advances in simultaneous detection of food hazards on aptasensor [J]. Food & Machinery, 2021, 37(4): 217-225.
- [12] 郭圆斌, 栗坤. 核酸适配体在癌症诊断中的研究进展 [J]. 化学通报, 2021, 84(1): 40-46.  
GUO Y B, LI K. Research progress of aptamers in cancer diagnosis [J]. Chemistry, 2021, 84(1): 40-46.
- [13] LV M Z, ZHOU W, TAVAKOLI H, et al. Aptamer-functionalized metal-organic frameworks (MOFs) for biosensing [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2021, 176: 112947.
- [14] SAHAYARAJ A F, PRABU H J, MANIRAJ J, et al. Metal-organic frameworks (MOFs): the next generation of materials for catalysis, gas storage, and separation [J]. Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials, 2023, 33: 1 757-1 781.

- [15] 卢春霞, 刘长彬, 张振良, 等. 基于适配体-MOF模拟酶比色检测 bPAG9[J]. 分析测试学报, 2024, 43(5): 714-721.  
LU C X, LIU C B, ZHANG Z L, et al. A colorimetric detection of bPAG9 based on aptamer and peroxidase-like mimics of metal organic framework[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2024, 43(5): 714-721.
- [16] ZENG Y J, WANG M H, SUN Z W, et al. Colorimetric immunosensor constructed using 2D metal - organic framework nanosheets as enzyme mimics for the detection of protein biomarkers[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2022, 10: 450.
- [17] ZHANG J W, ZHANG H T, DU Z Y, et al. Water-stable metal-organic frameworks with intrinsic peroxidase-like catalytic activity as a colorimetric biosensing platform[J]. Chemical Communications, 2014, 50(9): 1 092-1 094.
- [18] LI X H, GUO W L, LIU Z H, et al. Fe-based MOFs for efficient adsorption and degradation of acid orange7 in aqueous solution via persulfate activation[J]. Applied Surface Science, 2016, 369: 130-136.
- [19] JO M, AHN J Y, LEE J, et al. Development of single-stranded DNA aptamers for specific bisphenol a detection[J]. Oligonucleotides, 2011, 21(2): 85-91.
- [20] HAN R, SUN Y, LIN Y, et al. A simple chemiluminescent aptasensor for the detection of  $\alpha$ -fetoprotein based on iron-based metal organic frameworks[J]. New Journal of Chemistry, 2020, 44: 4 099-4 107.
- [21] SKOBELEV I Y, SOROKIN A, KOVALENKO K A, et al. Solvent-free allylic oxidation of alkenes with O<sub>2</sub> mediated by Fe- and Cr-MIL-101[J]. Journal of Catalysis, 2013, 298: 61-69.
- [22] 卢春霞, 刘长彬, 周平, 等. 酶联适配体可视化检测牛妊娠相关糖蛋白 9(bPAG9)及其在奶牛早孕检测中的应用[J]. 农业生物技术学报, 2021, 29(7): 1 407-1 416.  
LU C X, LIU C B, ZOU P, et al. Enzyme-linked aptamer assay for visual detection of bPAG9 and its application for pregnancy diagnosis in dairy cows (*Bos taurus*) [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2021, 29(7): 1 407-1 416.
- [23] 静平, 张金斗, 朱文彬, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定饮料、牛奶和奶粉中双酚和种邻苯二甲酸酯[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(8): 2 462-2 469.  
JING P, ZHANG J D, ZHU W B, et al. Determination of bisphenol A(BPA) and 15 phthalate esters (PAEs) by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in beverage, milk and milk powder[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2014, 5(8): 2 462-2 469.
- [24] YU Z S, LI N, HU X S, et al. Highly efficient electrochemical detection of lead ion using metal-organic framework and graphene as platform based on DNAzyme[J]. Synthetic Metals, 2019, 254: 164-171.
- [25] MEI Z L, CHU H Q, 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.
- [26] 姜梦凡, 康天放, 鲁理平. 基于 Au-MoS<sub>2</sub> 和 hemin 的双酚 A 电化学适配体传感器研究[J]. 化学研究应用, 2019, 31(2): 261-270.  
JIANG M F, KANG T F, LU L P. Study on bisphenol A electrochemical aptasensor based on Au-MoS<sub>2</sub> and hemin[J]. Chemical Research and Application, 2019, 31(2): 261-270.
- [27] LIU L Y, ZHAO Q. A simple fluorescence anisotropy assay for detection of bisphenol A using fluorescently labeled aptamer [J]. Journal of Environmental Sciences, 2020, 97: 19-24.
- [28] CHANG S H, ROGER P, SALMI-MANI H, et al. Development of an aptamer-mimetic sensing probe based on functionalized amylose-CdSe quantum dots for bisphenol-a detection[J]. Sensors and Actuators B-Chemical, 2023, 390: 133998.