基于石墨烯-酪氨酸酶-壳聚糖快速检测 BPA 电化学酶传感器的研究与应用

顾愿愿[1]，潘道东[1,2]，孙杨赢[1]，曹锦轩[1]，曾小群[1]
（1. 宁波大学海洋学院食品系，浙江宁波 315211）（2. 南京师范大学食品科学与营养系，江苏南京 210097）

摘要：为了实现双酚 A 的快速痕量检测，研究制备了一种基于石墨烯的电化学生物传感器。本文通过化学还原法制备了石墨烯，并利用透射电镜(TEM)，选区电子衍射(SAED)对其结构和形貌进行表征。将石墨烯，酪氨酸酶及壳聚糖按照一定优化比例混合，构建了石墨烯-酪氨酸酶-壳聚糖修饰电极(GR-Tyr-CS/GCE)，循环伏安法表明该修饰电极具有良好的电化学特征。在 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲盐溶液(PBS, pH7.0)中，采用电流-时间法测得该传感器对双酚 A 的响应范围宽，且检测线低，其检测线性范围为 7.5×10^{-8}~2.5×10^{-6} mol/L，相关系数 R^2=0.996，检出限为 2.18×10^{-8} mol/L (S/N=3)。由稳定性，重现性及抗干扰性试验结果表明，该酶传感器具有良好的稳定性、重现性及选择专一性，本研究为实际样品中 BPA 残留提供了灵敏、快速、简便的检测方法。

关键词：双酚 A；石墨烯；电化学生物传感器
文章篇号：1673-9078(2014)12-210-214 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.12.035

Nanographene-tyrosinase-chitosan-based Electrochemical Enzyme Biosensor for Rapid Detection of Bisphenol A

GU Yuan-yuan[1], PAN Dao-dong[1,2], SUN Yang-ying[1], CAO Jin-xuan[1], ZENG Xiao-qun[1]
(1. Food Science Department of Marine Science School, Ningbo University, Ningbo 315211, China)
(2. Food Science & Nutrition Department of Naniing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: In this study, an electrochemical, graphene-based biosensor was developed for rapid detection of trace amounts of bisphenol A (BPA). Graphene was prepared by chemical reduction, and its structure and morphology were characterized by using transmission electron microscopy and selected area electron diffraction. Subsequently, graphene, tyrosinase, and chitosan were mixed in an optimized ratio to construct the graphene-tyrosinase–chitosan-modified electrode. Cyclic voltammetry showed that the modified electrode had good electrochemical characteristics. When tested with 0.1 mol·L-1 phosphate buffered saline (pH 7.0), a wide response range for the detection of BPA was obtained with this biosensor, with a low detection limit. The linear range was from 7.5 × 10-8 to 2.5 × 10-6 mol·L-1, the correlation coefficient R2 was 0.996, and the detection limit was 2.18 × 10-8 mol·L-1 (S/N = 3). The results of the stability, reproducibility, and interference tests indicated that the enzyme biosensor prepared in this study exhibited good stability, reproducibility, and high specificity for the detection of BPA. This study provides a sensitive, rapid, and simple method to detect BPA residues.

Key words: bisphenol A; graphene; electrochemical biosensor

双酚 A（Bisphenol A, BPA）即 2, 2-二(4-羟基苯基)丙烷，分子量：228，白色棱形结晶或针状结晶或片状、粉末，易溶于乙醇、丙酮等，几乎不溶于水。BPA 是一种具有雌激素活性的环境内分泌干扰物质（EDC），其通过食物链在人体内积累，引发人类、动物各种疾病，能导致人类、动物生殖细胞的畸变和繁殖率的下降，并能引起腹足类雄性个体的雌性化[1]。BPA 是聚碳酸酯和环氧树脂的重要单体，聚碳酸酯广泛应用于多种生活用品的制造，如：水杯、婴儿奶瓶、医疗用品和家用电器等，环氧树脂通常应用于食品包装材料的内涂层等。一系列 BPA 产品的使用，使得人类越发暴露在 BPA 环境中，相关研究表明对罐头食品或聚碳酸酯塑料罐头进行加热消毒及反复冲洗时，酸性的食品或饮料都会增加 BPA 的溶解释放[2]。

目前，有关 BPA 的检测手段主要集中在液相色谱、液相-质谱联用[3]、气相色谱、气相-质谱联[4~5]用等，尽

收稿日期：2014-05-21
基金项目：国家支撑计划（2012BAK08B01-2）；浙江省公益性项目（2014C32051）
作者简介：顾愿愿(1987-)，女，硕士研究生，研究方向：食品安全检测
通讯作者：潘道东(1964-)，男，教授，博士生导师，主要从事畜产品加工研究

管灵敏、准确，但是需要对样品进行繁琐的预处理、费时、成本高，需要专业技术人员维护，不适用于现场检测。由于电化学酶生物传感器操作简单，灵敏度高，选择性强的特性，检测成本低，样品前处理要求简单，使得酶生物传感器成为了一种理想的在线检测工具，并获得了极大的关注。

优越的生物传感材料是提高酶生物传感器催化活性、稳定性、检测限和灵敏度等的核心技术。化学还原法制备的薄层石墨烯克服了普通石墨烯众多缺陷的同时，具有较于普通石墨烯更胜一筹的更强吸附能力、更大的表面积、更多的催化位点和更优的导电性能以及更高的机械强度等优点[6]。此外，壳聚糖(CS)具有较好的吸附性及生物兼容性，石墨烯-壳聚糖复合物材料(GR-CS)，在保持酪氨酸酶(Tyr)活性的同时，加大了酶的负载量，并且加强了酶活性中心与电极间的联系，使电子得以迅速的由酶活性中心转移至电极表面，增强了电化学指示信号，继而实现高灵敏度检测。此方法制备的基于石墨烯的电化学生物传感器可实现对BPA的快速、灵敏检测。

1 材料与方法

1.1 材料

酪氨酸酶购自 Sigma 公司；鳞片石墨，80%水合肼、BPA、硼氢化钠、磷酸氢二钾($KH_2PO_4·2H_2O$)、磷酸二氢钾($KH_2PO_4·2H_2O$)，购自国药试剂有限公司。

1.2 主要仪器设备

JEOL2100 透射电子显微镜(TEM)，JEOL 电子株式会社，日本；电化学工作站 1030B，上海辰华仪器有限公司，中国；三电极体系：玻碳电极（工作电极）、甘汞电极（参比电极）、铂丝电极（对电极），上海辰华仪器有限公司，中国。

1.3 试验方法

1.3.1 石墨烯的制备

利用改进的 Improved Hummer's 法制备氧化石墨烯[7]，取 0.5 g 氧化石墨烯放于烧杯中加入 200 mL 去离子水，经超声 1 h 后可得到均匀分散的棕黄色氧化石墨烯胶体溶液，将获得的胶体溶液转移至微波炉中加热 1 min，趁热转移到 500 mL 的三颈瓶中，加入 2 g 硼氢化钠和 0.5 mL 80%的水合肼溶液，80 ℃条件下还原 2 h，最后得到黑色絮状沉淀，分别用去离子水，无水己醇多次洗涤，离心（8000 r/min，20 min）所得滤渣，-80 ℃真空冷冻干燥所得即为石墨烯。

1.3.2 GR-Tyr-CS/GCE 的制备

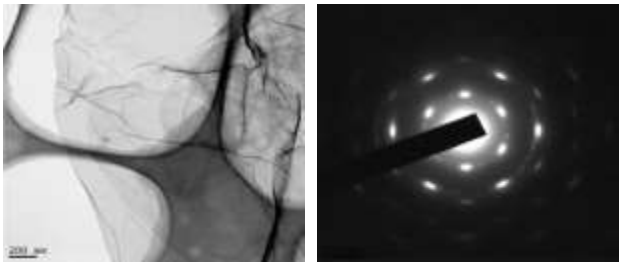
裸电极分别用去离子水、无水己醇超声清洗 5 min，再依次用粒径为 0.3 μm、0.05 μm 的氧化铝粉末在麂皮上抛光，去离子水冲洗干净，氮气吹干。取适量壳聚糖溶于 0.5%醋酸溶液中得到 1.5 mg/mL 的壳聚糖溶液，用氢氧化钠调节 pH 至 6.0 备用；分别取 100 μL 浓度为 3 mg/mL 石墨烯/金复合物均匀分散液，与浓度为 4.5 mg/mL 的酪氨酸酶溶液震荡混合 1 h，石墨烯与酪氨酸酶吸附完全后，再取 100 μL 1.5 mg/mL 的壳聚糖溶液，震荡混合 15 min，得到浓度比为：2:3:1 的石墨烯-酪氨酸酶-壳聚糖混合液；取 10 μL 石墨烯-酪氨酸酶-壳聚糖混合溶液并滴涂于玻碳电极表面，用烧杯覆盖，室温条件下干燥，得到 GR-Tyr-CS/GCE 的电极，4 ℃冰箱保存备用。制备完成的 GR-Tyr-CS/GCE 电极在 pH7.0 的 PBS 中活化 30 min，再浸入含适量 BPA 的 PBS 缓冲溶液中[8~10]，进行反应。

1.3.3 数据分析

由于酪氨酸酶催化 BPA 在电极表面发生氧化还原反应，BPA 氧化脱 H 生成邻苯二醌，邻苯二醌经电化学还原在电极表面生成相应的多元酚，基于以上机理，电化学酪氨酸酶生物传感器可用于 BPA 的检测。此反应过程中还原电流与 BPA 浓度呈正比关系，即：$Ip = kC + b$（Ip 表示还原电流，C 表示 BPA 浓度，k, b 为常数），根据还原电流的变化即可得到 BPA 浓度变化，并建立电流及待测物浓度关系。

2 结果与讨论

2.1 石墨烯的表征



a b

图 1 石墨烯的 TEM 图（a）和 SADE 图（b）

Fig.1 (a) TEM image of graphene; (b): SAED image of graphene

如图 1a 所示，石墨烯的表面呈平整、光滑，透明的薄片状，呈轻纱状结构，且局部出现褶皱、叠加等现象，这是因为氧化石墨烯在还原的过程中，使得其含氧官能团减少，导致石墨烯层与层之间由于范德华力的作用而容易团聚，片层间有所重叠，但是由于该还原法制备石墨烯期间超声波的使用，使得石墨烯片

相互分离，堆积程度明显减弱，石墨烯片层较少，即为薄层石墨烯。图 1b 所示选区电子衍射(SAED)图谱表明六元晶体结构即为石墨烯标准结构，同时表明该化学还原法成功制备所需石墨烯。

2.2 GR-Tyr-CS/GCE 的循环伏安特性

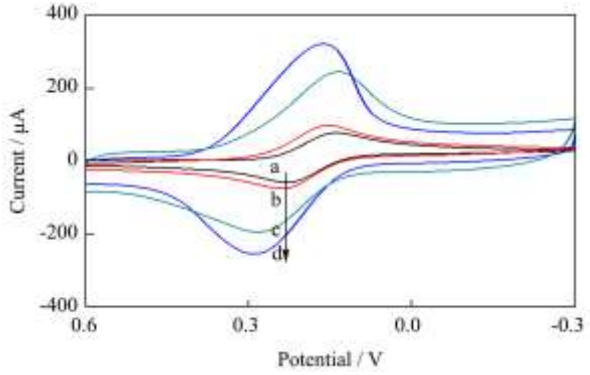


图 2 在工作电势为 0.6 V 条件下，a：CS/GCE；b：Bare GCE；c：GR-CS/GCE；d：GR-Tyr-CS/GCE 在 0.5 mol/L $K_3Fe(CN)_6$ 中的循环伏安图

Fig.2 Cyclic voltammograms of GR-Tyr-CS/GCE, GR-CS/GCE, Bare GCE in 0.5 mol L^{-1} $K_3Fe(CN)_6$ (0.1 M KCl) at a potential of 0.6 V

如图 2 所示，b 为裸电极在 0.5 M $K_3Fe(CN)_6$ 溶液中的伏安曲线图，表明裸电极打磨至本身内阻最佳值。曲线 a 为壳聚糖所修饰的电极（CS/GCE），由于壳聚糖作为有机物大分子阻碍了电子转移，导致电极表面阻值增加，进而使 CS/GCE 在 $K_3Fe(CN)_6$ 溶液中的氧化还原能力减弱，同时也说明被修饰电极修饰成功。曲线 c 为 GR-CS/GCE 的循环伏安曲线图，GR-CS/GCE 所表现的氧化还原电流较 CS/GCE 曲线所示的氧化还原电流明显增涨较大，是由于石墨烯具有良好的导电性及较大的表面积，扩大了载电量的同时也加快了电极表面电子的转移，使得 GR-CS/GCE 电极表现出优异的电化学特征。曲线 d 的氧化还原电流较曲线 c 较弱，但是大于曲线 b，是由于酪氨酸酶的加入，导致电极表面阻抗增加，电荷转移速度相对减弱同时表明 GR-Tyr-CS/GCE 电极修饰成功。

2.3 温度对 GR-Tyr-CS/GCE 的影响

由于温度对酶活性有较大影响，因此本实验考察将 GR-Tyr-CS/GCE 电极浸入不同温度含相同浓度 BPA 的 0.1 mol/L 的 PBS 缓冲溶液中，如图 2 所示，随着温度升高，GR-Tyr-CS/GCE 所对应的电流响应值越大。直至 30 ℃时，电流相应值达到最大，由于 30 ℃最接近酪氨酸酶(Tyr)的最适温度，所以电流响应值达到最大值；随着温度进一步升高，电解液的温度越来越远离酪氨酸酶(Tyr)的最适温度，所以电流响应值逐步减小。因此本实验选用电解液的温度为 30 ℃。

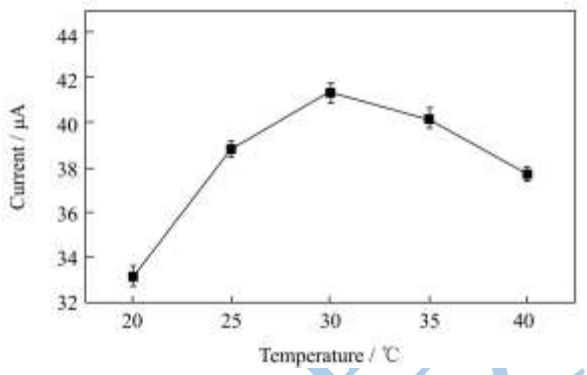


图 3 温度对 GR-Tyr-CS/GCE 的影响

Fig.3 Effect of temperature on the performance of GR-Tyr-CS/GCE

2.4 pH 对 GR-Tyr-CS/GCE 的影响

将 GR-Tyr-CS/GCE 电极浸入不同 pH 含相同浓度 BPA 的 0.1 mol/L 的 PBS 缓冲溶液中，由图 4 可知，电解液的 pH 对基于 GR-Tyr-CS/GCE 的生物传感器影响非常显著，当电解液 pH7.0 时，GR-Tyr-CS/GCE 电极所对应的电流响应值最大，因为酪氨酸酶的活性受 pH 影响较大，另外，BPA 在电极表面发生氧化还原反应，氧化脱 H 生成邻苯二醌，邻苯二醌在低电位作用下还原生成邻苯二酚，此反应过程中 BPA 先脱氢后得氢，因此，pH7.0 所得到的电流响应值最大。当电解液 pH>7.0 时，阻碍了 BPA 还原反应的进程，从而降低了氧化还原速率，导致响应电流逐步减小，因此，选用 pH7.0 作为本次实验电解液的最适 pH。

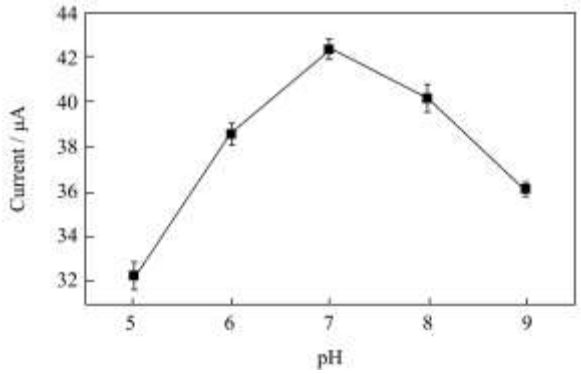


图 4 pH 对 GR-Tyr-CS/GCE 的影响

Fig.4 Effect of pH on the performance of GR-Tyr-CS/GCE

2.5 GR-Tyr-CS/GCE 对 BPA 的响应曲线

图 5 为 Bare GCE, GR-CS/GCE, GR-Tyr-CS/GCE 在 0.1 mol/L PBS 缓冲溶液（含 BPA）中的循环伏安图。由曲线 a 可知裸电极在含 BPA 的 0.1 mol/L PBS 缓冲溶液无氧化还原峰电流的产生，表明裸电极对 BPA 几乎

为检测能力；曲线 b 表明 GR-CS/GCE 电极教裸电极还原电流峰值有明显增加，是由于石墨烯的引入导致电极表面在电荷的增加及电子迁移速度的加快导致有明显的还原电流的产生；曲线 c 表明 GR-Tyr-CS/GCE 电极较 GR-CS/GCE 电极所产生的还原电流显著增加，还原峰电流也有较大增长，表明酪氨酸酶催化活性导致 BPA 在电极表面氧化还原能力加强，电极表面电荷量增加，表现在伏安特性曲线上则是还原电流显著增大，同时表明 GR-Tyr-CS/GCE 电极在 BPA 的检测上显示出优越的电化学特性，因此，本实验将 GR-Tyr-CS/GCE 电极作为以下研究的测试电极。

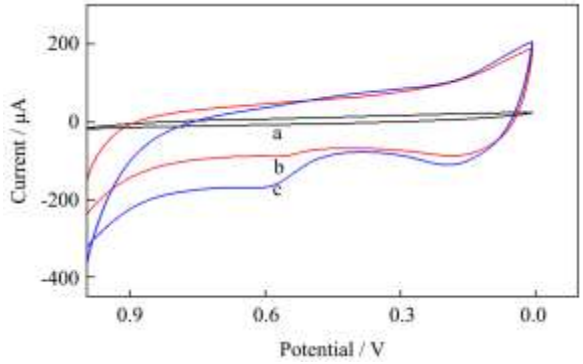


图 5 a：Bare GCE；b：GR-CS/GCE；c：GR-Tyr-CS/GCE 在 0.1 M PBS（含 BPA）的循环伏安电流响应曲线

Fig.5 Cyclic voltammograms of plain GCE (curve a), GR-CS/GCE (curve b), GR-Tyr-CS/GCE (curve c), in 0.1 M phosphate buffered saline (pH 7) at a scan rate of 0.1 V/s

2.6 生物传感器的重现性、稳定性

为了考察本方法制备的酪氨酸酶生物传感器的重现性，本文设计了如下检验方法，检测电位为 0.6 V，GR-Tyr-CS/GCE 电极平行测定 10 次 1.5 μmol/L BPA 缓冲溶液，其响应电流的相对标准偏差为 6.7%，该实验表明本方法制备的酪氨酸酶生物传感器具有较好的重现性。

为了进一步考察酪氨酸酶生物传感器的稳定性，将 GR-Tyr-CS/GCE 电极在 4 ℃条件下保存于 pH7.0 的 PBS 缓冲溶液中，在检测电位为 0.6 V 的条件下，考察该电极的电化学性能，连续 2 周对含 1.5 μmol/L BPA 的缓冲溶液进行检测，在第一周内，该电极所得到的响应电流值几乎无变化，而两周后，该电极所检测到的响应电流较初始值减小了 18.7%，即两周后 GR-Tyr-CS/GCE 电极仍旧保持 81.3%的活性，表明该传感器有极好的稳定性。

2.7 BPA 在 GR-Tyr-CS/GCE 上的电流响应分析

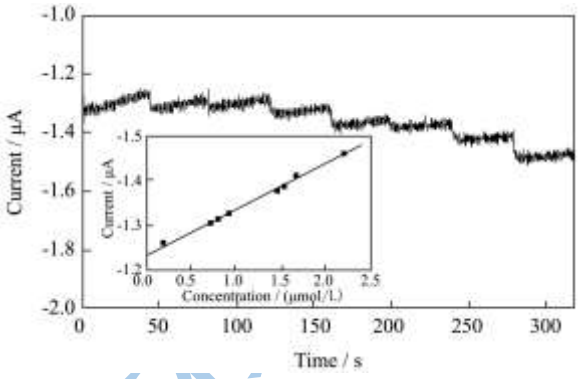


图 6 电极在 0.1 mol/L PBS 缓冲溶液（pH7.0）中，连续加入 0.1 mmol/L 20 μL，1 mmol/L 8 μL，0.1 mmol/L 10 μL 双酚 A 的电流－时间响应曲线和校正曲线

Fig.6 Chronoamperometric curve of the electrodes with subsequent addition of 20 μL of 0.1 mmol/L, 8 μL of 1 mmol/L, 10 μL of 0.1 mmol/L BPA in 0.1 mol/L PBS (pH 7.0) and the calibration curve

如图 6 所示，在优化的条件下，不断增加 BPA 的浓度，GR-Tyr-CS/GCE 电极的电流信号强度变化。电流信号强度与 BPA 浓度呈线性关系，BPA 的浓度线性范围为 7.5×10^{-8}~2.5×10^{-6} mol/L，其线性方程为：Ip = -0.097C -1.244，相关系数 R^2=0.996，检测限为：2.18×10^{-8} mol/L（信噪比 S/N=3）。表 1 所示为本方法与文献报道的方法相比较，从表 1 可以看出基于薄层石墨烯的电化学酶生物传感器检测优于其他方法检测，其检测限低，仪器简单，分析速度快。这表明 GR-Tyr-CS/GCE 电极可以显著的富集和检测环境中痕量的 BPA。

表 1 基于薄层石墨烯传感器与其他方法比较

Table 1 Comparison of the proposed method with other reported methods of BPA

检测方法	检测限/(mol/L)	线性范围/(mol/L)	文献号
HPLC	2.63×10^{-10}	4.50×10^{-10}~2.25×10^{-7}	江明等[3]
nanographene biosensor	3.30×10^{-8}	1.00×10^{-7}~2.00×10^{-6}	Wu L 等[11]
acetylene black paste biosensor caibon	6.00×10^{-8}	8.00×10^{-8}~1.00×10^{-5}	Deng P 等[12]
nanotubes biosensors	5.00×10^{-9}	1.00×10^{-8}~4.08×10^{-7}	Li Y 等[13]
本文方法	2.18×10^{-8}	7.50×10^{-8}~2.50×10^{-6}	

2.8 抗干扰实验分析

由于碳酸二苯酯与 BPA 是合成聚碳酸酯（PC）的前体物质，在 BPA 样品提取的同时，会有一定量的碳酸二苯酯溶出，因此，将一系列浓度的碳酸二苯酯添加到 1.5 μmol/L 的 BPA 溶液中，实验结果表明，BPA 与碳酸二苯酯共存的环境中，不影响 GR-Tyr-CS/GCE 电极对 BPA 检测，无明显干扰信号。此外，向含 1.5 μmol/L BPA 的 PBS 缓冲溶液中添加高于 BPA 浓度 20 倍的硝酸钾，柠檬酸钠，草酸钠，尿素，醋酸乙酯，碳酸二乙酯，正己烷，苯仍没有产生任何干扰信号。上述实验表明该生物传感器良好的选择性归因于酪氨酸酶对双酚 A 的生物催化特异性。

2.9 加标回收实验分析

针对 GR-Tyr-CS/GCE 传感器的的实际应用性能分析，本实验设计了对一次性塑料杯及有涂层牛奶盒的双酚 A 提取液进行了加标回收率的测定。实验结果见表 1。由表中数据可知该传感器对待测样品样品的加标回收率在 97.3%~106.1%之间。

表 2 双酚 A 的加标回收率实验

Table 2 Determination results of recovery

试样	加标浓度/(μg/g)	测定浓度/(μg/g)	回收率/%
塑料杯	3	2.97	99
	7	7.43	106.1
	10	10.37	103.7
牛奶盒	3	3.13	104.3
	7	6.89	98.4
	10	9.73	97.3

3 结论

本研究利用化学还原法制备了薄层石墨烯，构建了一种基于石墨烯的新型电化学酶传感器。由于石墨烯巨大的表面积、较好的生物相容性、高效电子传输性等，不仅可促进 Tyr 的固载，还可以实现电极表面的直接电子传输，提高了 BPA 的检测限和线性范围。本研究制得的电化学酶传感器痕量检测 BPA 具有良好的重现性和稳定性，线性范围较宽，检测限低等众多优势。这项工作在电化学酶生物传感器痕量检测 BPA 领域具有不可取代的地位。

参考文献

[1] 王佳,詹平.双酚 A 对机体影响及其机制的研究进展[J].预防医学情报杂志,2006,21(5):541-544
WANG Jia, ZHAN Ping. Research progress in the effect in the body and the mechanism of bisphenol A [J]. JPrev MedInf, 2006, 21(5): 541-544

[2] 胡向蔚,张文德,刘炎桥.食品罐内涂料中双酚 A 环氧衍生物的迁移及其检测[J].食品科学,2006,27(4):264-266
HU Xiang-wei, ZHANG Wen-de, LIU Yan-qiao. A review on migration survey and determination of bisphenol a and epoxy derivatives in food cans coating [J]. Chinese Food Science, 2006, 27(4): 264-266

[3] 江明,林怡,张江华,等.高效液相色谱法测定环境水中超痕量双酚 A[J].分析化学,2006:34
JIANG Ming, LIN Yi, ZHANG Jiang-hua, et al. Determination of ultra-trace bisphenol a in water samples by chromatography with large volume direct injection [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2006: 34

[4] Trenholm R A, Vanderford B J, Drewes J E, et al. Determination of household chemicals using gas chromatography and liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1190(1): 253-262

[5] García-Prieto A, Lunar L, Rubio S, et al. Decanoic acid reverse micelle-based coacervates for the microextraction of bisphenol A from canned vegetables and fruits [J]. Analytica Chimica Acta, 2008, 617(1): 51-58

[6] 杨全红,唐致远.新型储能材料-石墨烯的储能特性及其前景展望[J].电源技术,2009,4:241-244
YANG Quan-hong, TANG Zhi-yuan. New energy storage materials-energy storage properties and prospect of graphene [J]. Chinese Journal of Power Sources, 2009, 4: 241-244

[7] Marcano D C, Kosynkin D V, Berlin J M, et al. Improved synthesis of graphene oxide [J]. ACS nano, 2010, 4(8): 4806-4814

[8] 刘艳,牛卫芬.基于石墨烯-壳聚糖-辣根过氧化物酶的 H_2O_2 生物传感器的研制[J].分析试验室,2012,8:22
LIU Yan, NIU Wei-fen. A hydrogen peroxide biosensor based on graphene-chitosan-horseradish peroxidase nanocomposite [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2012, 8: 22

[9] 王传现,韩丽,颜妍,等.基于纳米金-石墨烯-壳聚糖复合物修饰电极的免疫传感器检测己烯雌酚[J].中国食品学报,2012,12(12):131-135
WANG Chuan-xian, HAN Li, YAN Yan, et al. An immunosensor for detection of diethylstilbestrol based on modified electrode with nano-gold-graphene-chitosan [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012, 12(12): 131-135

[10] Zhou K, Zhu Y, Yang X, et al. A novel hydrogen peroxide biosensor based on Au-graphene-HRP-chitosan biocomposites [J]. Electrochimica Acta, 2010, 55(9): 3055-3060

[11] Wu L, Deng D, Jin J, et al. Nanographene-based tyrosinase biosensor for rapid detection of bisphenol A [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2012, 35(1): 193-199

[12] Deng P, Xu Z, Li J, et al. Acetylene black paste electrode modified with a molecularly imprinted chitosan film for the detection of bisphenol A [J]. Microchimica Acta, 2013, 180(9-10): 861-869

[13] Li Y, Gao Y, Cao Y, et al. Electrochemical sensor for bisphenol a determination based on MWCNT/melamine complex modified GCE [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2012, 171: 726-733

现代食品科技