

电化学免疫传感器法快速测定粮油食品中的苯并(a)芘

王瑞鑫¹, 冯亚净¹, 李秀缺², 李书国¹

(1. 河北科技大学生工学院, 河北石家庄 050018) (2. 河北省食品检验研究院, 河北石家庄 050031)

摘要: 采用 2.0 G 聚酰胺-胺(PAMAM)、石墨烯(GS)和 1-丁基-3-甲基咪唑基四氟硼酸盐复合膜修饰玻碳电极(PAMAM/GS/IL/GCE), 包埋固定多环芳烃抗体, 构建了一种纳米免疫传感器, 用于快速测定粮油食品中的苯并(a)芘(BaP)。在 pH 为 7.0 含 1 mmol/L $K_3[Fe(CN)_6]$ 和 0.1 mmol/L KCl 的磷酸盐缓冲溶液中, 基于多环芳烃抗体与抗原之间的特异性免疫反应, 以 $K_3[Fe(CN)_6]$ 为探针, 利用循环伏安法和差分脉冲伏安法研究其免疫反应对传感器响应电流的影响。在优化实验条件下, 免疫传感器的峰电流随溶液中 BaP 浓度的增大而减小, 且峰电流与 BaP 浓度在 0.1~100 ng/mL 范围内呈线性关系, 其检测限为 0.03 ng/mL (S/N=3)。该免疫传感器的稳定性和重现性较好, 利用该法对玉米油和菜籽油等样品中的苯并(a)芘进行检测, 回收率在 94.46%~103.36%, 检测结果与 HPLC 法基本一致, 用于粮油食品中苯并(a)芘的快速检测是可行的。

关键词: 苯并(a)芘; 2.0 G 聚酰胺-胺; 石墨烯; 离子液体; 食品安全

文章编号: 1673-9078(2016)9-295-301

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.9.042

An Electrochemical Immunosensor for Rapid Quantification of Benzo(a)pyrene in Grain- and Oil-related Foods

WANG Rui-xin¹, FENG Ya-jing¹, LI Xiu-que², LI Shu-guo¹

(1. Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China)

(2. Hebei Food Inspection and Research Institute, Shijiazhuang 050031, China)

Abstract: A nanoimmunosensor for rapid quantification of benzo(a)pyrene (BaP) in food was constructed by modifying the glassy carbon electrode (GCE) with 2.0 G polyamidoamine (PAMAM), graphene (GS), and a 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate composite film and by immobilizing the antibody against polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on the surface of the GCE. On the basis of the specific immune reaction between the anti-PAH antibody and antigen, the effects of the immune response on the immunosensor response current were studied by cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry using $K_3[Fe(CN)_6]$ as the probe in phosphate buffer (pH=7.0) containing 1 mmol/L $K_3[Fe(CN)_6]$ and 0.1 mmol/L KCl. At optimized experimental parameters, the peak response current of the immunosensor decreased with the increasing BaP concentration, and the response current showed a linear relation with the concentration of BaP in the range 0.1–100 ng/mL, with a detection limit of 0.03 ng/mL (S/N=3). The prepared anti-PAH/PAMAM/GS/IL/GCE immunosensor showed excellent stability and reproducibility. The newly developed method was applied to analysis of BaP content in peanut and rapeseed oil samples, and the recovery rate was in the range of 94.46–103.36%. The results were generally consistent with those obtained by high-performance liquid chromatography (HPLC) method; therefore, the proposed method is feasible for rapid quantification of BaP in grain- and oil-related foods.

Key words: benzo(a)pyrene; 2.0 G polyamidoamine; graphene; ionic liquid; food safety

苯并(a)芘(BaP)是一种常见的具有致癌性、致畸性和致基因突变性的剧毒物质^[1]。BaP 是由一个苯环和

收稿日期: 2015-10-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20876165); 河北省食品药品安全科技项目计划项目(ZD2014011)

作者简介: 王瑞鑫(1992-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学与安全

通讯作者: 李书国(1969-), 男, 工学博士, 教授, 研究方向: 粮油食品安全技术

一个芘分子稠合而成的多环芳烃类化合物, 不溶于水, 能溶于正己烷等有机溶剂, 碱性环境下稳定, 而遇酸则不稳定^[2]。世界各国对粮油食品中 BaP 的含量进行严格的控制。欧盟国家出台了最为严格的限量标准为 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (油脂中)。我国根据 GB 2762-2012 规定油脂及其制品中 BaP 含量的限量标准为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[3]。因此建立检测速度快、灵敏度好和准确性高的 BaP 分析方法意义重大。

目前,检测 BaP 的方法主要有荧光法^[4-5]、高效液相色谱法^[6-8]、气相色谱-质谱法^[9-10]及酶联免疫吸附法^[11-12]等。上述方法各有优缺点,荧光法检测限低和灵敏度高,但存在背景干扰和光谱重叠等问题;高效液相色谱法和气相色谱-质谱法灵敏度高、精确度好,但存在操作繁琐和仪器昂贵等缺点;酶联免疫吸附法检测速度快,但检测精度不足。免疫传感器法通过将抗原/抗体间免疫反应信号转换为电化学信号,依据目标物不同浓度下信号的规律性变化完成检测,随着特异性抗体不断地被研发出来,凭借其检测灵敏度高和特异性好的优势,也成为 BaP 检测的一种方法,得到迅速发展。

本文以 BaP 为研究对象,采用 2.0 G 聚酰胺-胺、石墨烯和 1-丁基-3-甲基咪唑基四氟硼酸盐(一种离子液体)复合膜(PAMAM/GS/IL)修饰玻碳电极,将多环芳烃抗体经整代聚酰胺-胺分子表面的大量氨基固定在电极表面,制备了一种无标记的电流型免疫传感器。该免疫传感器利用具有大氨基的树枝状 PAMAM 大分子分散具有高比表面积和良好生物兼容性的离子液体来固定抗体,小尺寸的石墨烯粒子能给抗体提供更自由的取向,同时通过 PAMAM 分子中大量氨基增加了抗体在传感器表面的固定量,依据不同浓度的 BaP 与抗体结合后,免疫传感器峰电流与溶液中 BaP 的浓度呈线性关系来测定 BaP 的含量。本方法具有灵敏度高、检出限低、稳定性好和快速简便等优点,可用于食品中 BaP 的检测。

1 实验部分

1.1 仪器与设备

LK98B II 型微机电化学分析系统:天津兰力科化学电子技术有限公司;三电极系统(3 mm 玻碳圆盘电极为工作电极、铂丝电极为对电极、Ag/AgCl 电极为参比电极)、电解杯:上海 CHI 仪器公司;LC-10A 型高效液相色谱仪:日本岛津公司;FA 2204 型电子分析天平:上海菁海仪器有限公司;KQ 2200 型超声波清洗仪:昆山市超声仪器有限公司;TGL-10B 型高速台式离心机:上海安亭科学仪器厂;场发射扫描电镜(HITACHI S-4800-I 型):日本 Hitachi 公司;RE52CS-1 型旋转蒸发器:上海亚荣生化仪器厂;GZX-9070 MBE 型电热鼓风干燥箱:上海博讯实业有限公司医疗设备厂;HH-S6 型恒温水浴锅:北京科伟永兴仪器有限公司。

1.2 材料与试剂

聚酰胺-胺(2.0 G,末端官能团为氨基),威海晨源分子新材料有限公司;石墨烯(99%),北京德科岛金科技有限公司;对氨基苯甲酸(分析纯)、N-羟基琥珀酰亚胺(98%)、1-乙基(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(98%)、3,4-苯并芘(96%)和 1-丁基-3-甲基咪唑基四氟硼酸盐(97%),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;多环芳烃抗体, Santa Cruz 公司;牛血清白蛋白(96%),上海翊圣生物科技有限公司;N,N 二甲基甲酰胺(分析纯),天津市达森化工产品销售有限公司;正己烷(分析纯),天津市津东天正精细化学试剂厂;花生油、菜籽油购自石家庄市某农贸市场。

1.3 方法

1.3.1 PAMAM/GS/IL 修饰物的制备

将 0.01 g 聚酰胺-胺(PAMAM)溶解在 10 mL 甲醇中,制得聚酰胺-胺溶液,于 4 °C 储存。在 10 mL N,N 二甲基甲酰胺(DMF)中加入 0.01 g 石墨烯,超声处理 15 min,制得均匀分散的石墨烯悬浮液。取 5 mL 石墨烯悬浮液加入 5 mL 聚酰胺-胺溶液中,超声处理 30 min,使石墨烯均匀地分散在聚酰胺-胺溶液中,得到聚酰胺-胺-石墨烯悬浮液(PAMAM/GS)。取 200 μ L 1-丁基-3-甲基咪唑基四氟硼酸盐(IL)加入上述聚酰胺-胺-石墨烯悬浮液,超声处理 1 h,使离子液体均匀地分散在聚酰胺-胺-石墨烯中,得到聚酰胺-胺-石墨烯-离子液体修饰液(PAMAM/GS/IL),于 4 °C 储存,备用。

1.3.2 电化学免疫传感器的制备

将玻碳电极(GCE)用 Al₂O₃ 粉末(粒径 0.05 μ m)打磨抛光,至电极表面成镜面,再依次于硝酸溶液(体积分数为 50%),无水乙醇和去离子水中各超声处理 3 min, N₂ 吹干,备用。

免疫传感器的制备过程见图 1。利用三电极系统,即经预处理的玻碳电极为工作电极、Ag/AgCl 为参比电极、铂丝电极为辅助电极,在 -1.5~1.0 电位区间内,以 50 mV/s 的扫速在新配制的 1 mmol/L 对氨基苯甲酸溶液中进行循环伏安(CV)扫描 15 圈。冲洗玻碳电极,在电极表面滴加 5 μ L 新配制的 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和 1-乙基(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)混合溶液(其中 NHS 为 100 mmol/L, EDC 为 400 mmol/L),活化处理 2 h。在电极表面滴加 5 μ L PAMAM/GS/IL,通过 PAMAM 中氨基与电极表面经 EDC/NHS 活化后的羧基发生胺酸缩合反应的方式固定于电极表面。室温晾干,在电极表面滴加 5 μ L 多环芳烃抗体(anti-PAHs),37 °C 下孵育 2 h,

anti-PAHs 经 PAMAM 中氨基固定在修饰电极表面。最后在电极表面滴加 5 μL 1% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH 7.4), 4 $^{\circ}\text{C}$ 下封闭 30 min, 以消除非特异性吸附, 得到 PAMAM/GS/IL/anti-PAHs 修饰的 electrochemical immunosensor, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。

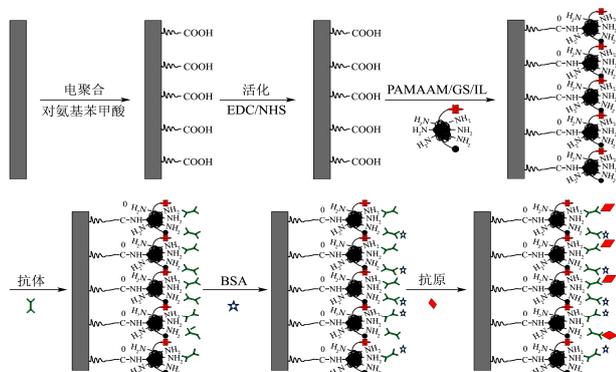


图 1 免疫传感器的制备及免疫过程

Fig.1 Construction of the immunosensor and the corresponding immune reaction

1.4 免疫传感器法测定 BaP 的标准曲线

在 PAMAM/GS/IL/anti-PAHs 修饰的玻碳电极表面分别滴涂不同浓度梯度 (0.1~100 ng/mL) 的 BaP 标准溶液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 30 min。采用三电极系统 (PAMAM/GS/IL/anti-PAH/GCE 为工作电极, Ag/AgCl 电极为参比电极, 铂丝电极为辅助电极), 于 1.0 mmol/L $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ +0.1 mol/L KCl+0.2 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) (pH=7.0) 进行电化学表征和检测分析。运用循环伏安法 (电压: -0.2~0.6 V, 扫描速度: 50 mV/s) 对于免疫传感器的制备步骤进行电化学表征, 运用差分脉冲伏安法 (电位: -0.2~0.6 V) 测定并记录不同浓度 BaP 的峰电流值 I_p , 分析 I_p 与相对应的 BaP 浓度间的关系, 并依据其线性关系对 BaP 浓度做标准曲线。

1.5 植物油样品中苯并(a)芘的测定

1.5.1 样品前处理

分别取 1 g 花生油、菜籽油样品, 置于 25 mL 烧杯中, 加入 10 mL 乙腈饱和正己烷, 超声处理 20 min, 充分溶解以后, 移至分液漏斗中, 用 25 mL 正己烷饱和和乙腈萃取三次, 合并下层乙腈层在 45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中旋转蒸发至干, 用乙腈: 四氢呋喃 (90:10) 溶剂分三次淋洗旋蒸瓶, 并定容至 1 mL, 接着移入 50 mL 离心管中, 样品提取液以 5000 r/min 离心 10 min, 取上清液经 0.45 μm 滤膜过滤后进行检测。

1.5.2 免疫传感器法测定

在制备好的纳米免疫传感器上滴加 2 μL 处理好

的样品提取液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 30 min, 然后利用差分脉冲伏安法测定免疫反应响应电流。每个样品测定三次, 取三次测定的电流值平均值作为该样品的免疫响应电流值, 将该免疫响应电流值代入 1.4 中得出的免疫响应电流与苯并(a)芘浓度的线性回归方程, 计算植物油样品中 BaP 的含量。

1.5.3 高效液相色谱法测定

色谱条件: C_{18} 柱(4.6 mm \times 250 mm), 粒径 5 μm ; 流动相为乙腈: 水 (90:10, V/V); 流速为 1.0 mL/min; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μL ; 激发波长为 384 nm, 发射波长为 406 nm^[13]。

准确称取 25 mg 苯并(a)芘标准品, 用甲醇溶解并定容于 100 mL 容量瓶中, 作为储备液保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下。使用前依据需求配成相应浓度梯度的标准溶液, 取 20 μL 标准溶液进样, 记录其 HPLC 图谱, 根据所得峰面积与对应的 BaP 浓度绘制标准曲线。分别取上述处理好的花生油、菜籽油样品提取液 20 μL , 进行 HPLC 检测, 每个样品测定三次, 取三次测定平均值作为该样品的图谱峰面积, 依据上述标准曲线计算样品中 BaP 浓度, 并与电化学检测方法的结果进行对比。

1.5.4 数据统计分析方法

以上测定均为三组平行实验, 结果取三组实验数据的平均值。运用 SPASS 18.0 软件进行数据统计分析, 采用单因素方差分析 (ANOVA) 进行显著性差异分析 ($p < 0.05$), 论文中的数据图利用 Origin Lab Origin Pro V9.0 软件绘制。

2 结果与分析

2.1 PAMAM/GS/IL 修饰电极的电化学表征

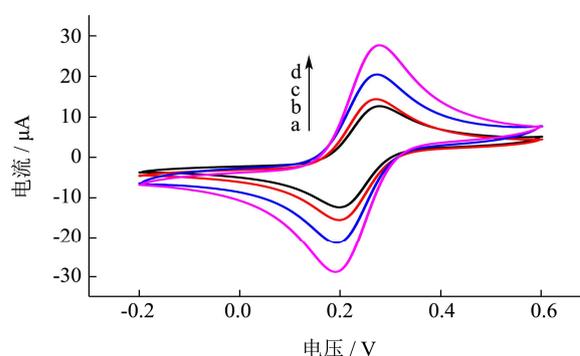


图 2 不同修饰电极的循环伏安图

Fig.2 Cyclic voltammograms of various modified electrodes

注: a. bare GCE; b. PAMAM/GCE; c. PAMAM/GS/GCE; d. PAMAM/GS/IL/GCE。

在 1.0 mmol/L $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ +0.1 mol/L KCl+0.2 mol/L PBS (pH=7.0) 的测试底液中, 采用循环伏安法

对裸玻碳 (a)、PAMAM/GCE (b)、PAMAM/GS/GCE (c) 和 PAMAM/GS/IL/GCE (d) 进行表征 (见图 2)。Fe(CN)₆^{3-/4-} 在裸玻碳电极上出现一对较好的氧化还原峰。当修饰 PAMAM 后, 氧化还原峰电流略微增加。当修饰 PAMAM/GS 后, 氧化还原峰电流明显增大, GS 的引入明显提高了电极的电化学响应, 这是由于 GS 粒子通过 PAMAM 固定在电极的表面, 具有突出电学性能的 GS 粒子相当于纳米尺寸的微电极, 可作为电子与电极之间电子传递的微通道。当电极的表面修饰了 PAMAM/GS/IL 后, 其氧化还原峰的电流进一步增大, 可根据 Randles-Sevcik 方程求出不同修饰过程中电极的电活性面积:

$$I_p = 2.69 \times 10^5 A D^{1/2} n^{3/2} \gamma^{1/2} C$$

其中 A 为有效电极面积 (cm²); I_p 阳极峰电流 (μA); D 为扩散系数 (7.6×10⁻⁶ cm²/s); n 为参与氧化还原反应的电子数 (n=1); γ 为电位变化速率 (0.05 V/s); C 为 K₃[Fe(CN)₆] 的浓度 (1 mmol/L)。

计算得, 裸玻碳电极和 PAMAM/GS/IL/GCE 的电活性面积分别为 0.075 cm² 和 0.17 cm²。由二者的电活性面积可知, 加入具有优良电化学性能的 GS 和 IL, 提高了修饰电极的电化学性能和稳定性, 从而提升了免疫传感器的灵敏度。

2.2 免疫反应的电化学表征

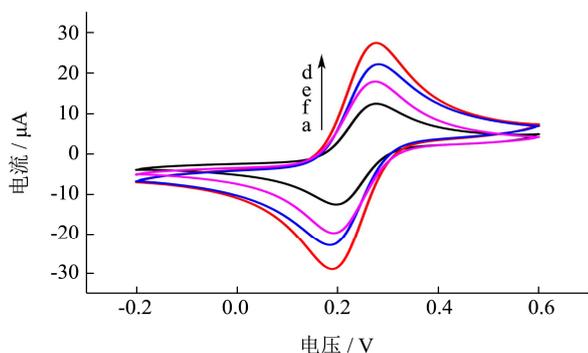


图 3 修饰电极免疫前后的循环伏安图

Fig.3 Cyclic voltammograms of the modified electrode before and after the immune reaction

注: a. bare GCE; d. PAMAM/GS/IL/GCE; e. anti-PAHs/PAMAM/GS/IL/GCE; f. BaP/anti-PAHs/PAMAM/GS/IL/GCE。

当在 PAMAM/GS/IL/GCE 表面滴加 anti-PAHs 以后, 氧化还原峰电流下降 (见图 3), 这是由于抗体作为蛋白质的绝缘性阻碍电子的传递, 这就说明 anti-PAHs 已经成功固定在电极表面上。在经 BSA 封闭后的 PAMAM/GS/IL/anti-PAHs/GCE 表面滴加 BaP 标准溶液后, anti-PAHs 和 BaP 发生特异性结合生成免疫复合物, 增加了电极表面的空间位阻, 从而使得

探针 Fe(CN)₆^{3-/4-} 的氧化还原峰电流进一步降低 (如图 3 中的 e 与 f 线), 这表明 anti-PAHs 和 BaP 的特异性免疫结合成功。

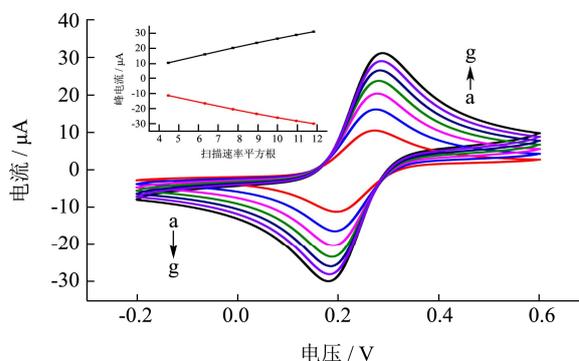


图 4 电化学免疫传感器在不同扫描速率下的循环伏安图

Fig.4 Cyclic voltammograms of the immunosensor at different scan rates

注: Scan rates, a~g 为 20、40、60、80、100、120 和 140 mV/s。

在 1.0 mmol/L K₃[Fe(CN)₆]+0.1 mol/L KCl+0.2 mol/L PBS (pH 7.0) 测试底液中, -0.2~0.6 V 电位范围内, 将 PAMAM/GS/IL/anti-PAHs/GCE 在不同扫描速率下 CV 扫描。如图 4 所示, 随着扫描速率的增加, 氧化还原峰电流均增加, 扫描得到的氧化峰和还原峰的电流值都分别与扫描速率的平方根成线性关系: 氧化峰 y=2.8201x-1.8419, 线性相关系数 R²=0.9984; 还原峰 y=-2.5485x-0.3695, 线性相关系数 R²=0.9973。说明该电极反应受扩散过程控制。

2.3 实验条件的优化

2.3.1 修饰液的配比和用量

修饰液的配比会对免疫传感器的性能造成影响, 按照 PAMAM 和 GS 的体积比为 0.5、1 和 2 配制 PAMAM/GS 的混合液 2 mL, 并添加 40 μL 1-乙基(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐, 分别取 5 μL 进行电极的修饰, 运用循环伏安法测定其电流大小, 经实验发现, PAMAM 和 GS 的体积比 1 时, 电流是最大的, 因此, 选择二者体积比为 1, 并添加 40 μL 1-乙基(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐作为修饰液的配比。PAMAM/GS/IL 修饰液的用量会影响电子的传递, 分别将 1、2、3、4、5 和 6 μL 的 PAMAM/GS/IL 复合物滴涂在经电聚合处理玻碳电极上, 采用 CV 法测定电流的大小。如图 5 所示, 氧化峰电流一开始逐渐增大, 当用量为 5 μL 时, 电流最大。然后随 PAMAM/GS/IL 用量的增加, 电流逐渐减小, 综合考虑选择修饰液的用量为 5 μL。

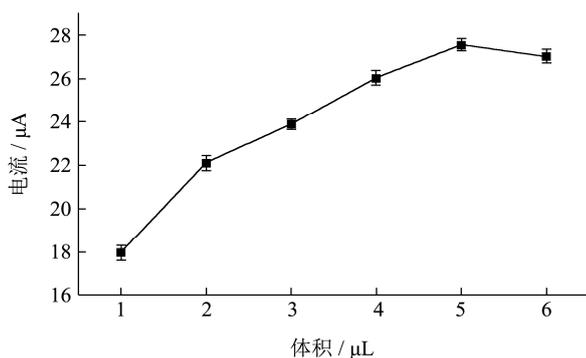


图5 修饰量对免疫传感器电流的影响

Fig.5 Effects of the volume of an added modifying solution on the response current of the immunosensor

2.3.2 电解质溶液 pH 对免疫传感器的影响

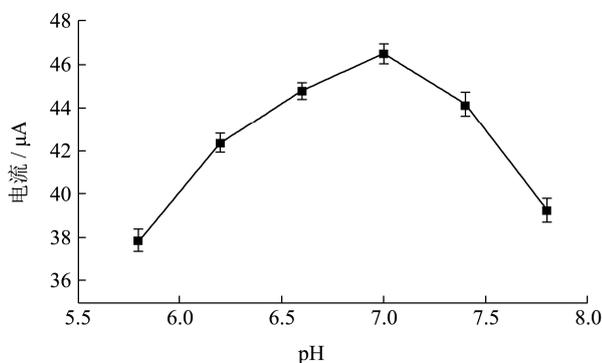


图6 pH 对免疫传感器 DPV 峰电流的影响

Fig.6 Effects of pH on the peak DPV current of the immunosensor

测试底液的 pH 对于抗体的活性和其在电极表面的固载量有重要影响。配制不同电解质溶液，采用 DPV 法测定不同 pH 的响应电流大小。如图 6 所示，在 5.8~7.0 范围内峰电流随 pH 值的增加而增大，在 pH 为 7.0 时达到最大，在 7.0~7.8 范围内峰电流随 pH 值的增加而减小，表明免疫传感器在检测体系 pH 为 7.0 左右时检测性能最好，这可能是因为在酸性或者碱性条件下，由于抗体中部分基团的质子化或解离导致抗体变性所致。因此，选择 pH 为 7.0 的电解质溶液配制测试底液。

2.3.3 温育时间与温度对免疫传感器的影响

多环芳烃抗体与抗原 (BaP 标准溶液) 的温育时间和温度对免疫传感器的性能有重要影响。在 PAMAM/GS/IL/anti-PAHs/GCE 表面滴加 2 μL 苯并(a)芘标准溶液，依次延长反应时间，采用 DPV 法测定其响应电流的大小。如图 7 所示，在 5~30 min 范围内峰电流随时间的增加而增大，说明抗原与抗体需要一定的时间，才能结合并形成稳定的免疫产物，当反应达到 30 min 后，峰电流的变化较小，表明固定的多环芳烃抗体与 BaP 的结合达到相对饱和的状态。所以

选取 30 min 为优化温育时间。在一定温度范围内，升温可以加速免疫复合物的形成，但升高温度增大了抗体失活的可能性。所以在优化温育时间的条件下，探究温育温度在 15~40 $^{\circ}\text{C}$ 范围内对免疫反应的影响。如图 8 所示，在 15~37 $^{\circ}\text{C}$ 温度范围内，响应电流随温度升高而增大，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 时达到最大值，当温度高于 37 $^{\circ}\text{C}$ 后，响应电流的值减少，这是由于高温破坏了免疫复合层，影响了免疫传感器的性能。所以选取 37 $^{\circ}\text{C}$ 为优化温育温度。

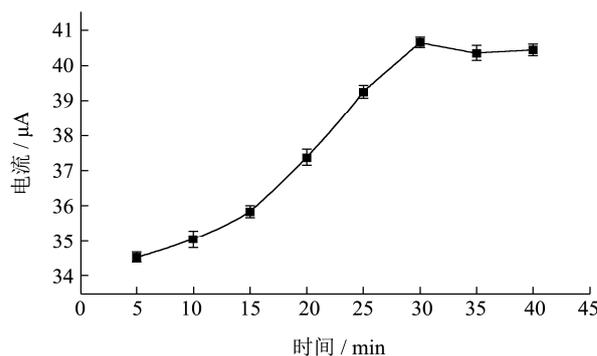


图7 温育时间对免疫传感器 DPV 峰电流的影响

Fig.7 Effects of incubation time on the peak DPV current of the immunosensor

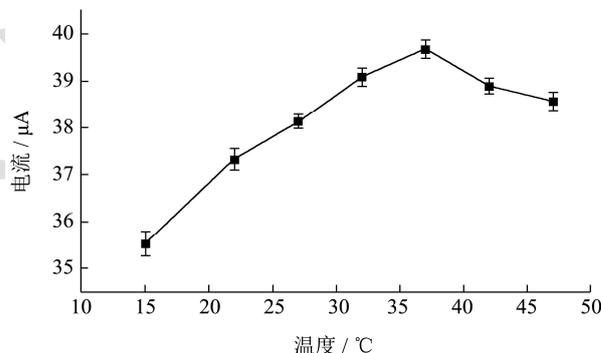


图8 温育温度对免疫传感器 DPV 峰电流的影响

Fig.8 Effects of incubation temperature on the peak DPV current of the immunosensor

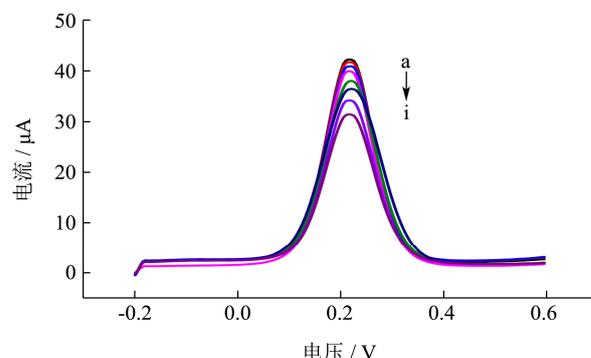


图9 BaP 浓度对免疫传感器响应电流的影响

Fig.9 Effects of BaP concentration on the DPV current of the immunosensor

注: a~i, 0.1、1、2.5、5、10、25、50、75 和 100 ng/mL。

2.4 免疫传感器对 BaP 的差分脉冲检测

配制系列浓度的 BaP 标准溶液, 按照 1.4 节的方法测得不同浓度标准溶液的 DPV 法响应电流值, 以所测不同浓度的峰电流为纵坐标, 抗原浓度为横坐标, 绘制 BaP 的标准曲线。如图 8 所示, 在 BaP 浓度范围为 0.1~100 ng/mL 时免疫反应电流 I_p 值随 BaP 浓度的增大而减小, 且 I_p 值与 C_{BaP} 之间的关系满足线性关系方程: $I_p = -0.0973C_{BaP} + 40.907$, 线性相关系数 $R^2 = 0.9920$, 其最低检测限为 0.03 ng/mL ($S/N=3$)。费世东等^[14]等采用戊二醛偶联固定抗原, 基于树枝状大分子 PAMAM 构建 BaP 免疫传感器, 其检测限为 5.05 ng/mL; 王春萍等^[15]等基于树枝状 SiO_2 纳米粒子构建 BaP 免疫传感器, 检测范围为 0.01~10 $\mu\text{mol/L}$, 检测限为 2.02 ng/mL。Chunyan Du^[16]等通过玻碳电极表面直接电化学检测苯并芘, 检测范围 20~1000 nmol/L,

检测限为 0.169 ng/mL。由此可见, 本研究构建的免疫传感器具有较好的灵敏度, 可作为一种快速测定 BaP 的方法。

2.5 免疫传感器的特异性、稳定性和重现性

在免疫传感器表面分别滴加 2 μL 苯并(a)芘标准溶液、2 μL 苯并(a)芘标和荧蒽标准溶液、2 μL 苯并(a)芘标和芴标准溶液, 其中苯并(a)芘、荧蒽和芴的浓度均为 75 ng/mL, 相同条件下孵育后测定差分脉冲响应电流值。在加入干扰物的条件下, 电流响应的变化不超过 5.63%, 说明该免疫传感器特异性较好。将制备好的免疫传感器连续扫描 20 圈, 电流响应仅下降 4.22%, 表明该免疫传感器的稳定性较好。分别制备同一批次 3 支免疫传感器和三个批次(每个批次 2 支)的免疫传感器, 进行 BaP 检测, 同一批次的电流变化率不超过 4.75%, 不同批次的电流变化率不超过 5.91%, 表明该传感器重现性较好。

表 1 样品中 BaP 含量测定的结果

Table 1 Results of measurement of BaP content in the samples

样品	加标量/(ng/mL)	测定值/(ng/mL)		回收率/%		相对标准偏差/%	
		本法	HPLC	本法	HPLC	本法	HPLC
花生油	0.00	2.16	2.25				
	5.00	6.85	7.62	95.62	105.14	2.59	2.73
	10.00	12.46	11.45	102.45	93.49	3.16	3.07
	20.00	21.56	23.06	96.82	102.71	2.95	2.65
菜籽油	0.00	1.51	1.49				
	5.00	6.01	6.01	95.47	92.54	2.36	2.24
	10.00	11.91	11.85	103.36	103.12	4.37	4.27
	20.00	20.32	20.61	94.46	95.87	3.45	3.55

2.6 样品中 BaP 的测定及加标回收实验

按照 1.5.1 节的方法处理样品, 得到样品提取液, 分别采用免疫传感器法和高效液相色谱法为检测方法检测花生油、菜籽油两种样品中 BaP 的含量, 并进行加标回收实验, 按照 1.5.4 节的方法, 计算其平均值和相对标准偏差, 结果如下表 1 所示, 二者基本一致, 免疫传感器法快捷方便。

3 结论

利用 2.0 G 聚酰胺-胺-石墨烯掺杂 1-丁基-3-甲基咪唑基四氟硼酸盐作为电极修饰材料, 制备了一种无标记的电流型免疫传感器。该免疫传感器利用具有大氨基的树枝状 PAMAM 大分子分散具有高比表面积的石墨烯和良好生物兼容性的离子液体来固定抗体, 石墨烯突出的导电性能和独特的粒子结构为免疫传感器

表面电子转移提供更多通道, 离子液体的引入进一步增强了传感器的稳定性, 同时通过 PAMAM 分子分散石墨烯和离子液体, 增加了多环芳烃抗体在免疫传感器上的固定量, 并保障了免疫传感器的稳定性。此外, 该传感器制作过程简单、灵敏度高、稳定性和重现性好, 可以实现对 BaP 的快速、简便、灵敏检测, 在食品安全监测方面具有潜在的应用价值。

参考文献

- [1] 史巧巧, 席俊, 陆启玉. 食品中苯并芘的研究进展[J]. 食品工业科技, 2014, 35(5): 379-382
SHI Qiao-qiao, XI Jun, LU Qi-yu. Research progress in benzopyrene in foods [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(5): 379-382
- [2] 宫哲, 王德慧, 赵德智, 等. 苯并(a)芘的分离与检测研究进展[J]. 化学通报, 2015, 78(9): 786-791

- GONG Zhe, WANG De-hui, ZHAO De-zhi, et al. Progress in separation and detection of benzo(a)pyrene [J]. *Chemistry*, 2015, 78(9): 786-791
- [3] 石龙凯,刘玉兰,王莹辉,等.油脂煎炸过程中多环芳烃含量的变化[J].现代食品科技,2015,31(4):311-315
- SHI Long-kai, LIU Yu-lan, WANG Ying-hui, et al. A study examining changes in polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) content of edible oils upon frying [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2015, 31(4): 311-315
- [4] 权美平,吴梦瑶.熏烤肉制品中苯并芘的危害及控制措施[J].氨基酸和生物资源,2012,34(3):66-68
- QUAN Mei-ping, WU Meng-yao. Hazardness and control measures of benzo(a)pyrene in smoked and roasted meat products [J]. *Amino Acids & Biotic Resources*, 2012, 34(3): 66-68
- [5] 刘兵戈,刘国琴,汪学德.植物油加工中苯并(a)芘的产生途径及控制措施[J].粮油食品科技,2014,22(2):47-51
- LIU Bing-ge, LIU Guo-qin, WANG Xue-de. Producing approaches of benzo(a)pyrene during processing vegetable oil and the control measures [J]. *Science and Technology of Cereals, Oils and Foods*, 2014, 22(2): 47-51
- [6] Mohammad H, Nasrin S, Morteza E, et al. Dendrimer-encapsulated and cored metal nanoparticles for electrochemical nanobiosensing [J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2014, 53: 137-149
- [7] Xue W, Xian-bo L, Ji-ping C. Development of biosensor technologies for analysis of environmental contaminants [J]. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 2014, 2: 25-32
- [8] Estefani'a L, Manuel R, Mario D. Spanish smoked meat products: Benzo(a)pyrene (BaP) contamination and moisture [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2015, 37, 97-94
- [9] 肖苏尧,车科,陈雪香,等.不同油茶籽油提取工艺中苯并(a)芘形成的溯源[J].现代食品科技,2012,28(2):156-159
- XIAO Su-yao, CHE Ke, CHEN Xue-xiang, et al. Tracing of benzopyrene in camellia oleifera oil made by different extraction methods [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2012, 28(2): 156-159
- [10] 胡加文,李天宝,王春利,等.固相萃取-液相色谱法测定方便面中苯并芘[J].化学分析量,2014,23(3):25-27
- HU Jia-wen, LI Tian-bao, WANG Chun-li, et al. Detection of benzopyrene in instant noodles by solid-phase extraction-high performance liquid chromatography [J]. *Chemical Analysis and Metarage*, 2014, 23(3): 25-27
- [11] Mou-hong L, Ying-ju L, Chuan-he L, et al. Sensitive immunosensor for benzo(a)pyrene detection based on dual amplification strategy of PAMAM dendrimer and amino-modified methylene blue/SiO₂ core-shell nanoparticles [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 26: 3761-3767
- [12] 王欣,周智慧,赵晓联.苯并(a)芘危害性及其检测技术[J].粮食与油脂,2011,3:48-49
- WANG Xin, ZHOU Zhi-hui, ZHAO Xiao-lian. The harm and its detection techniques of benzopyrene [J]. *Cereals Oils*, 2011, 3: 48-49
- [13] 杨琳,陈青俊,欧菊芳,等.高效液相色谱法快速测定植物油中苯并(a)芘含量[J].粮食与油脂,2012,7:34-36
- YANG Lin, CHEN Qing-jun, OU Ju-fang, et al. Fast determination of B(a)P in vegetable oil by HPLC [J]. *Cereals Oils*, 2012, 7: 34-36
- [14] 费世东,王春萍,刘英菊,等.基于 PAMAM 树枝状大分子构建苯并[a]芘电化学免疫传感器的研究[J].分析实验室,2014,33(8):875-879
- FEI Shi-dong, WANG Chun-ping, LIU Ying-ju, et al. Investigation on construction of an amperometric immunosensor for rapid detection of benzo(a)pyrene based on dendrimer-PAMAM [J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2014, 33(8): 875-879
- [15] Chun-ping W, Mou-hong L, Ying-ju L, et al. A dendritic nanosilica-functionalized electrochemical immunosensor with sensitive enhancement for the rapid screening of benzo(a)pyrene [J]. *Electrochimica Acta*, 2011, 56:1988-1994
- [16] Chun-yan D, Ya-qi H, Yun-chao L, et al. Electrochemical detection of benzo(a)pyrene in acetonitrile-water binary medium [J]. *Talanta*, 2015, 138: 46-51