

# 氧化镍-脂肪酶修饰丝网印刷电极测定二油酸甘油酯

郭春景, 叶永康

(合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽合肥 230009)

**摘要:** 利用电化学氧化沉积纳米氧化镍(NiO)于丝网印刷电极(SPE), 使用壳聚糖包埋法将脂肪酶固定在 NiO-SPE 上构建一种新的脂肪酶生物传感器用于测定二油酸甘油酯。以铁氰化钾作为电子媒介体, 在 1% Triton-X100, PBS (0.1 mol/L, pH 7.0) 体系中, 用循环伏安法 (CV) 表征了二油酸甘油酯在 Lipase-NiO-SPE 上的伏安行为, 并用 CV 检测二油酸甘油酯。在 0.04~180  $\mu\text{mol/L}$  范围内呈现良好线性关系( $R=0.993$ ), 检出限为 0.01  $\mu\text{mol/L}$ 。该方法简单、快速、准备、稳定, 可用于二油酸甘油酯含量的检测。

**关键词:** 生物传感器; 纳米氧化镍; 脂肪酶; 二油酸甘油酯; 伏安法

文章编号: 1673-9078(2012)7-875-877

## Detection of Dioglyceride Using NiO-lipase

### Modified Screen-printed Electrode

GUO Chun-jing, YE Yong-kang

(School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

**Abstract:** A new enzyme sensor for determination of dioglyceride was constructed by nano-nickel oxide modified through electrochemical oxidation sedimentary reaction on the screen-printed electrode (SPE) and lipase immobilized by chitosan. Using ferricyanide as the electron mediator, the CV behavior of dioglyceride on lipase-NiO-SPE were evaluated in the solution of 1% Triton-X100 and PBS buffer (0.1 mol/L, pH 7.0). A good linear relationship was obtained between dioglyceride ranging in 0.04~180  $\mu\text{mol/L}$  with cyclic voltammetry ( $R=0.993$ ) and detection limit of 0.01  $\mu\text{mol/L}$ . This method was simple, rapid, accurate, and steady for the determination of dioglyceride.

**Key words:** biosensor; nano-nickel oxide; dioglyceride; lipase; voltammetry

二油酸甘油酯含有两个油酸链的甘油酯分子, 是油脂在人体代谢过程的中间产物<sup>[1]</sup>。在医疗卫生、食品、化妆品、化工行业都具有广泛的应用前景<sup>[2-4]</sup>, 食用甘油二酯后不引起肥胖, 同时能抑制血清脂质的升高, 减少肥胖脂肪的蓄积, 可以用于预防和治疗高血脂症以及与高血脂症密切相关的心脑血管疾病, 是理想的油脂替代品<sup>[5]</sup>。

研究表明愈来愈多的疾病<sup>[6]</sup>与油脂不无关系, 因此食用油脂的精炼被提上日程。目前对甘油酯分析检测有很多传统的方法<sup>[7-8]</sup>, 然而电化学方法<sup>[9-11]</sup>测定方便、快捷、灵敏度高、经济和检测范围广等优点, 特别是在检测低浓度的甘油酯取得良好的效果。本文通过脂肪酶修饰丝网印刷电极, 将二油酸甘油酯水解使其发生氧化还原反应, 然后电子媒介体传递反应过程中的电子到电极表面, 引起电流值的变化, 通过利用不同浓度的二油酸甘油酯引起的电流值变化的差异以达到定量检测甘油酯的目的。

收稿日期: 2012-03-30

基金项目: 国家 863 科技计划项目 (2010AA101503)

通讯作者: 叶永康

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 研究对象

二油酸甘油酯 ( $\geq 99.0\%$ , Sigma)。

#### 1.1.2 主要试剂

脂肪酶 (Solarbio, Sigma L3126, 进口分装); 铁氰化钾和亚铁氰化钾 (分析纯, 天津市博迪化工有限公司); 其他试剂均为分析纯试剂, 实验所有的水均为二次蒸馏水。

#### 1.1.3 主要仪器

CHI660D 电化学工作站; 超声波清洗器; 磁力搅拌器; 石英亚沸高纯水蒸馏器。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 酶修饰电极的制备

##### 1.2.1.1 印刷丝网电极预处理

将印刷丝网电极依次用无水乙醇、稀硝酸和二次蒸馏水超声清洗约 15 min, 于冰箱内干燥。

##### 1.2.1.2 NiO-SPE 电极的制备

各取浓度均为 3 mL 0.5 mol/L 的柠檬酸和硝酸镍

混合作为电镀液,将SPE连接于电镀机器上进行电镀,即得到NiO-SPE,浸泡在pH 7.0的PBS缓冲溶液中于4℃冰箱里保存。

### 1.2.1.3 脂肪酶修饰丝网印刷电极

丝网印刷电极预处理后,取2 μL 0.1 mol/L 脂肪酶溶液在丝网印刷电极表面,4℃下冰箱自然干燥;制备好的酶电极浸泡在pH 7.0的PBS缓冲液中置于4℃冰箱里保存。

### 1.2.2 电化学沉积时间的优化

选择电沉积电压分别为1.5 V、2.0 V、2.5 V、3.0 V,选择最优的电压。

### 1.2.3 电化学沉积时间的选择

电沉积时间分别为5 min、10 min、15 min、20 min、25 min、30 min、45 min、60 min,确定最优的时间。

### 1.2.4 最适脂肪酶浓度的筛选

将10 mg/L 脂肪酶和2.5%壳聚糖以不同质量比例(0.5%、1%、3%、5%、7%)混合成酶液,取2 μL涂在NiO-SPE工作电极区域。

### 1.2.5 二油酸甘油酯的定量检测

在pH 7.0 PBS,铁氰化钾内加入不同浓度的二油酸甘油酯作为反应底液,用Lipase-NiO-SPE进行循环伏安响应检测其含量并制作标准曲线。

### 1.2.6 电极的稳定性

制备3支电极,每2 d拿出放到pH 7.0 PBS缓冲溶液,50 mmol/L 铁氰化钾,12.5 mg/L的DOG底液中进行循环伏安扫描。测完之后,二次水冲洗干净,电极保存在pH 7.0 PBS缓冲液中,4℃冰箱放置,保存12 d,并进行测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 二油酸甘油酯在脂肪酶修饰SPE上的循环伏安行为

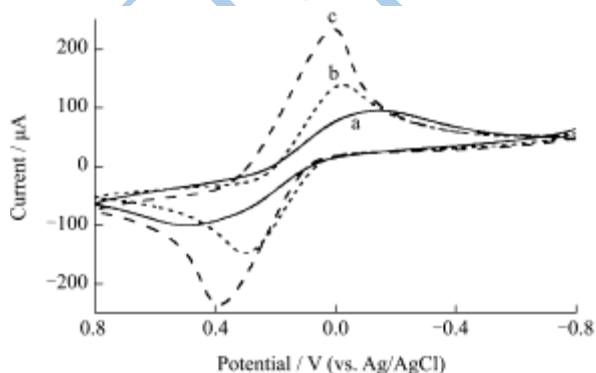


图1 SPE不同修饰方法的循环伏安曲线

Fig.1 The cyclic voltammograms of dioleoylglyceride on different method-modified SPE

注: a: 裸SPE; b: NiO-SPE; c: NiO-Lipase-SPE; 底液: pH

PBS+50 mmol/L 铁氰化钾+12.5 mg/L 二油酸甘油酯,pH7.0。

如图1,裸电极对底液中电子媒介体的电子转移阻力较大,无明显的峰电流出现。NiO-SPE使得反应得到改善,NiO-Lipase-SPE,电流显著增大了,并且峰形更加尖锐,说明该NiO-Lipase-SPE对二油酸甘油酯的电极反应具有催化作用。因此通过脂肪酶的修饰,可以显著增强检测信号,提高检测灵敏度。

### 2.2 电化学氧化沉积NiO的最适电沉积电压

由图2可知,电沉积电压为2.0 V时峰电流值最大,为最适电沉积电压,在3.0 V时峰形与其他差别较大,是电沉积时电极被击穿引起电极导电性下降。

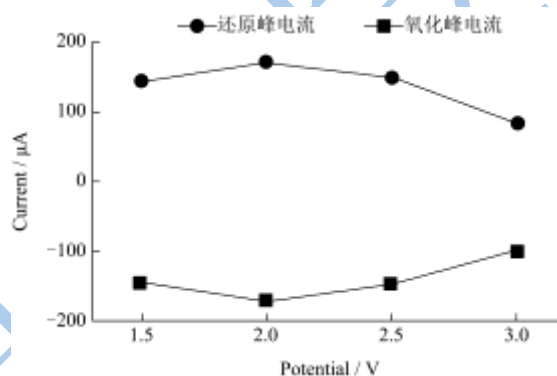


图2 电化学氧化沉积NiO电压的影响

Fig.2 Effect of applied electrochemical oxidation deposition voltage on CV values

注: 底液: pH 7.0 PBS, 50 mmol/L 铁氰化钾, 12.5 mg/L的DOG底液中进行循环CV扫描。

### 2.3 电化学氧化沉积NiO的最适电沉积NiO时间

其他条件不变的情况下,改变电沉积NiO时间,制备的电极在PBS缓冲液体系中进行CV扫描,得到Ip与电沉积NiO时间的关系,如图3。

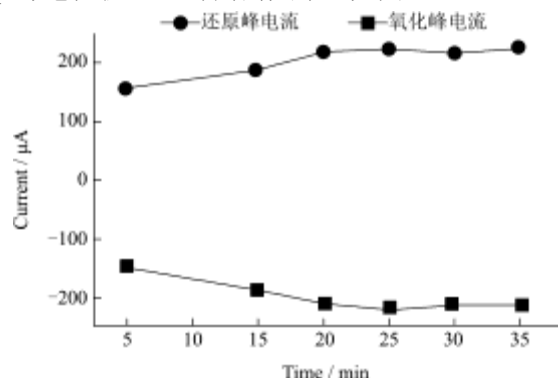


图3 电沉积时间的影响

Fig.3 Effect of electrochemical oxidation deposition time on CV values

注: 在2.0 V电沉积电压下电沉积,滴加酶液制备好电极。底液: pH 7.0 PBS+50 mmol/L 铁氰化钾, 12.5 mg/LDOG。

如图3,开始随着电沉积时间的延长,电极的最大峰电流值一直增加,而到达20 min后,Ip基本维持

不变, 电沉积过程达到稳态, 所以最适电沉积时间为 20 min。

### 2.4 最适修饰酶量的确定

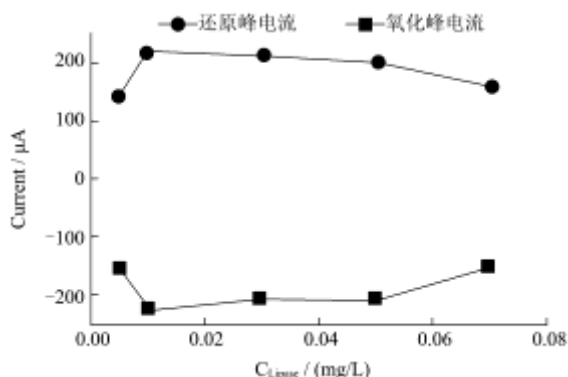


图 4 不同酶浓度下的氧化峰还原峰电流

Fig.4 Oxidation and reduction peak current at different lipase concentration on CV values

注: 底液: pH 7.0 PBS+50 mmol/L 铁氰化钾, 12.5 mg/L DOG。

由图 4 可知, 酶浓度范围控制在 1%~5% 以内时, 获得稳定且比较好的峰电流。

### 2.5 由循环伏安图得到的工作曲线

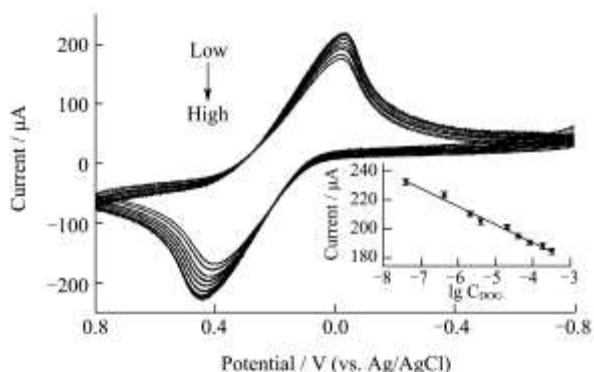


图 5 不同浓度二油酸甘油酯的循环伏安曲线

Fig.5 CV curves of different concentration of dioleglyceride

如图 5, 得到的峰电流值与二油酸甘油酯的浓度相关, 还原峰电流与浓度关系方程  $i_p(\mu A) = -1.282 \lg C$  (mol/L)+1.3898, R 为 0.993, 线性范围 0.04~180  $\mu\text{mol/L}$ , 检测限为 0.01  $\mu\text{mol/L}$ 。

### 2.6 电极的稳定性实验

在保存 12 d 时, 该脂肪酶修饰 SPE 传感器还保持有初始值的 84.4% 的电流响应能力, 能在较长的时间周期内保持酶的活性。

### 2.7 加标回收

向空白底液中加入 200  $\mu\text{L}$  实际样品, 测定  $I_{p1}$ , 然后向其中分别加入 1  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$  已知浓度的标准 DOG 溶液, 测定  $I_{p2}$ , 计算求出加标回收率 92.58%~100.03%, 在 90%~110% 范围内, 表明该脂肪

酶传感器对二油酸甘油酯的检测具有较好的准确性。

## 3 结论

本文利用电沉积纳米 NiO 修饰丝网印刷电极, 使用壳聚糖凝胶包埋法将脂肪酶固定在 NiO-SPE 上构建一种新的脂肪酶生物传感器用于测定二油酸甘油酯。在最优的反应条件下, 用循环伏安法表征了二油酸甘油酯在 Lipase-NiO-SPE 上的响应, 并用 CV 检测二油酸甘油酯。在 0.04~180  $\mu\text{mol/L}$  范围内呈现良好线性关系( $R=0.993$ ), 检出限为 0.01  $\mu\text{mol/L}$ , 该方法简单、快速、准备、稳定, 有效的用于二油酸甘油酯含量的检测。

## 参考文献

- [1] Soni M G, Kimura H, Burdock G A. Chronic study of diacylglycerol oil in rats [J]. Food and Chemical Toxicology, 2001, 39(4): 317-329
- [2] 孟祥河, 章银军, 毛忠贵. 甘油酯的分析方法 [J]. 中国油脂, 2004, 29(1): 44-46
- [3] Gunstone F D. Lipid synthesis and manufacture [M]. Boca Raton: CRC Press, 1999
- [4] 陈福明, 孙登文. 双甘酯的生产及应用 [J]. 中国油脂, 1997, 20(5): 49-51
- [5] Naito S, Watanabe H, Shimasaki H. Effect of dietary diacylglycerols on lipids metabolism in human: The suppressive effect of dietary diacylglycerols on the increase of the serum triglyceride [C]. The 16th International Congress of Nutrition, 1997
- [6] 吕心泉, 安辛欣, 苏燕泉. 谷氨酰胺酶在肉制品中的应用研究 [J]. 食品工业科技, 2002, (4): 86-88
- [7] 钟南京, 李琳, 李冰, 等. 甘油酯的液相色谱分析 [J]. 现代食品科技, 2010, 28(1): 123-126
- [8] 孔浩辉, 陈翠玲, 汪军霞, 等. 三乙酸甘油酯检测方法的研究 [J]. 现代食品科技, 2010, 26(2): 215-217
- [9] Niculescu M, Sigina S, Csoregi E. Glycerol dehydrogenase based amperometric biosensor for monitoring of glycerol in alcoholic beverages [J]. Analytical letters, 2003, 36(9): 1721-1737
- [10] 曹楚南, 张鉴清. 电化学阻抗谱导论 [M]. 北京: 科学出版社, 2002
- [11] Bradic Milena R, Ognjanovic Nevena D, Bezbradica Dejan I, et al. Synthesis of monoacylglyceride by enzymatic methods [J]. Hemijask Industrija, 2010, 64(5): 375-388