

分类号: O61
密 级: 公开

单位代码: 10363
学 号: 2220620117

题 目 固定化漆酶光热传感器的制备及其电化学传感性能研究

Title Synthesis of immobilized laccase photothermal sensors and their electrochemical performance

学生姓名: _____ 汪新月

指导教师: _____ 陈志明

专 业: _____ 化学

研究方向: _____ 新型催化材料合成与应用

论文答辩日期: 5 月 10 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：汪新月

日期：2025 年 5 月 10 日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在 _____ 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☒。

学位论文作者签名：

汪新月

指导教师签名：

陈志明

日期：2025 年 5 月 10 日

日期：2025 年 5 月 10 日

固定化漆酶光热传感器的制备及其电化学生物传感性能研究

摘要

漆酶是一种具有四个铜中心的氧化酶，广泛应用于生物修复、生物传感等领域。它来源广泛，存在真菌、细菌和植物中，对酚类化合物表现出特异性识别。然而，游离漆酶的操作效率不高，稳定性有限，阻碍了其在生物传感领域的应用。为了解决这些问题，漆酶固定化是一种可靠且有效的解决手段。然而，固定化可能导致漆酶活性降低，从而降低生物传感器的灵敏度。因此，为了提升生物传感器的灵敏度，本研究设计并制备了一种具有优良导电性和光热转换能力的载体材料，并基于此构建了一种用于快速、灵敏且可靠检测对苯二酚、邻苯二酚和肾上腺素的电化学漆酶传感器。同时，系统评估了该生物传感器的最佳 pH 值、抗干扰能力、耐储存稳定性和重现性。以下是具体的研究内容与结果：

1. 通过水热法合成 Carbon nanonets 粗产品，经过滤、纯化、离心处理后获得高纯度的 Carbon nanonets 溶液。随后，将该材料活化并与漆酶进行共价结合，成功制备出固定化漆酶的纳米材料，并进一步组装为固定化漆酶（Carbon nanonets-lac）电极。通过 TEM、

FT-IR 和 XPS 等手段对 Carbon nanonets 的形貌、结构及表面性质进行了详细表征。此外，系统对比分析了裸玻碳电极(GCE)、Carbon nanonets 修饰电极以及 Carbon nanonets-lac 修饰电极的电化学性能。循环伏安法(CV)和电化学阻抗谱(EIS)测试结果表明，Carbon nanonets 显著提升了电导率并降低了电子转移电阻，从而验证了 Carbon nanonets-lac 电极的成功构建。实验结果显示，该生物传感器在光照条件下的检测范围为 1-1000 μM ，黑暗条件下的检测范围为 10-1000 μM ，检测限分别为 0.14 μM (S/N=3，光照条件下)和 7.26 μM (S/N=3，黑暗条件下)。进一步的电化学反应研究表明，该生物传感器表现出优异的抗干扰能力、选择性、重现性和耐储存稳定性，具备在实际应用中可靠检测对苯二酚的能力。

2. 通过水热法合成了金纳米粒子(AuNPs)，并经巯基丙酸修饰获得羧基化复合材料。随后，将羧基化材料活化并与漆酶进行共价结合，成功制备出固定化漆酶的纳米材料，并最终组装为固定化漆酶 (AuNPs-lac) 电极。通过 TEM 和 FT-IR 等技术对 AuNPs 的形貌、结构及表面性质进行了全面表征。此外，系统对比分析了裸玻碳电极(GCE)、AuNPs 修饰电极以及 AuNPs-lac 修饰电极的电化学性能。CV 和 EIS 测试结果表明，AuNPs 显著增强了电极表面电导率并降低了电子转移电阻，从而验证了 AuNPs-lac 电极的成功构建。实验结果显示，该生物传感器在光照条件下的检测范围为 1-1000 μM ，黑暗条件下的检测范围同样为 1-1000 μM ，检测限分别为 0.04 μM (S/N=3，光照条件下)和 0.31 μM (S/N=3，黑暗条件下)。进一步的电

化学行为研究表明，该生物传感器表现出优异的抗干扰能力、选择性、重现性和耐储存稳定性，具备在实际应用中可靠检测邻苯二酚的能力。

3. 通过水热法合成 Carbon nanonets 粗产品，经纯化、离心处理后获得高纯度的 Carbon nanonets 溶液。随后，通过原位还原法将金纳米材料负载于 Carbon nanonets 上，成功制备出 Carbon nanonets-Au 复合材料。经巯基丙酸修饰获得羧基化复合材料，并将其活化后与漆酶进行共价结合，最终制备出固定化漆酶的纳米材料，并进一步组装为固定化漆酶（Carbon nanonets-Au-lac）电极。通过 TEM、FT-IR 和 XPS 等技术对 Carbon nanonets-Au 的形貌、结构及表面性质进行了全面表征。此外，系统对比分析了裸玻碳电极(GCE)、Carbon nanonets-Au 修饰电极以及 Carbon nanonets-Au-lac 修饰电极的电化学性能。CV 和 EIS 测试结果表明，Carbon nanonets-Au 显著增强了电导率并降低了电子转移电阻，从而验证了 Carbon nanonets-Au-lac 电极的成功构建。实验结果显示，该生物传感器在光照条件与黑暗条件下的检测范围均为 1-1000 μM ，检测限分别为 0.053 μM (S/N=3, 光照条件下)和 0.23 μM (S/N=3, 黑暗条件下)。进一步的电化学行为研究表明，该生物传感器表现出优异的抗干扰能力、选择性、重现性和耐储存稳定性，具备在实际应用中可靠检测肾上腺素的能力。

关键词：固定化漆酶，光热生物传感器，电化学，对苯二酚，邻苯二酚，肾上腺素

Synthesis of immobilized laccase photothermal sensors and their electrochemical performance

Abstract

Laccase is an oxidase characterized by the presence of four copper centers and is extensively utilized in bioremediation, biosensing, and various other applications. It is found in fungi, bacteria, and plants, exhibiting specific recognition for phenolic compounds. However, the operational efficiency of free laccase is relatively low, and its stability is limited, which poses challenges to its application in biosensing technologies. To address these limitations, the immobilization of laccase presents a reliable and effective solution. Nonetheless, it should be noted that immobilization may result in a decrease in laccase activity, consequently diminishing the sensitivity of biosensors. Therefore, to enhance the sensitivity of these biosensors, carrier materials with excellent electrical conductivity and photothermal conversion capabilities were designed and synthesized. The immobilized laccase sensors were subsequently developed for rapid, sensitive, and reliable photothermal

analysis of hydroquinone, catechol, and epinephrine. The optimal pH conditions as well as anti-interference ability, storage stability, and reproducibility of the biosensor were investigated. The specific work is as follows:

1. Carbon nanonets were synthesized using a hydrothermal method, and the crude product was purified through filtration and centrifugation in distilled water to obtain a carbon nanonet solution. The material was subsequently activated and covalently bound to laccase, resulting in the formation of laccase immobilized on carbon nanonet for the preparation of immobilized laccase (carbon nanonets-lac) electrodes. The morphology, structure, and surface properties of the carbon nanonets were characterized using transmission electron microscopy (TEM), Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR), and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). The electrochemical performances of glassy carbon electrodes (GCE), carbon nanonets, and carbon nanonets-lac were investigated. Cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) tests demonstrated that the incorporation of carbon nanonets enhanced conductivity while reducing electron transfer resistance, thereby confirming the successful construction of the carbon nanonet-lac electrode. It is found that the carbon nanonet-lac biosensor exhibited a favorable detection range from 1 to 1000 μM under light conditions and from 10 to 1000 μM in darkness, with detection

limits of 0.14 μM ($S/N = 3$) under light exposure and 7.26 μM ($S/N = 3$) in dark conditions. The electrochemical tests indicated that the carbon nanonets-lac biosensor exhibited excellent anti-interference capability, selectivity, reproducibility, and storage stability. The outstanding biosensing performance demonstrated that the carbon nanonets-lac biosensor is capable of reliably and effectively detecting hydroquinone in practical applications.

2. Au nanoparticles (AuNPs) were synthesized via a hydrothermal method. The AuNPs were modified with mercaptopropionic acid to obtain carboxylated AuNPs. The carboxylated AuNPs was activated and covalently bound to laccase to obtain laccase immobilized on AuNPs and prepare immobilized laccase (AuNPs-lac) electrodes. The morphology, structure, and surface properties of AuNPs were studied by TEM and FT-IR characterization methods. The electrochemical performance of GCE, AuNPs, and AuNPs-lac electrodes was investigated. CV and EIS tests showed that AuNPs enhanced the conductivity and reduced the electron transfer resistance, proving the successful construction of the AuNPs-lac electrode. It is found that the AuNPs-lac biosensor exhibited a good detection range (1-1000 μM under light and 1-1000 μM in the dark), with a detection limit of 0.04 μM ($S/N = 3$) under light and 0.31 μM ($S/N = 3$) in the dark. The electrochemical behavior of the laccase biosensor was investigated by electrochemical techniques such as cyclic voltammetry.

The results indicated that the AuNPs-lac biosensor exhibited excellent anti-interference ability, selectivity, reproducibility and storage stability. The superior biosensing performance demonstrated that the AuNPs-lac biosensor was capable of reliably and effectively detecting catechol in practical applications.

3. The crude product of carbon nanonets was synthesized using a hydrothermal method and subsequently purified through filtration and centrifugation in distilled water to obtain a solution of carbon nanonets. Following this, AuNPs was in-situ reduced and loaded onto the carbon nanonets, resulting in the formation of carbon nanonets-Au nanocomposites. After modification with mercaptopropionic acid, the carboxylated carbon nanonets-Au was activated and covalently bound with laccase to obtain laccase immobilized on carbon nanonets-Au nanocomposites, which was utilized for preparing the immobilized laccase (carbon nanonets-Au-lac) electrodes. The morphology, structure and surface properties of carbon nanonets-Au were studied by TEM, FT-IR and XPS characterization methods. The electrochemical performances of GCE, carbon nanonets-Au and carbon nanonets-Au-lac electrodes were investigated. CV and EIS tests showed that carbon nanonets-Au enhanced the conductivity and reduced the electron transfer resistance, proving the successful construction of the carbon nanonets-Au-lac electrode. The carbon nanonets-Au-lac biosensor exhibited a good

detection range (1-1000 μM under light and 1-1000 μM in the dark), with a detection limit of 0.053 μM ($S/N = 3$) under light and 0.23 μM ($S/N = 3$) in the dark. The electrochemical behavior of the laccase biosensor was investigated by electrochemical techniques such as cyclic voltammetry. The results indicated that the carbon nanonets-Au-lac biosensor exhibited excellent anti-interference ability, selectivity, reproducibility and storage stability. The superior biosensing performance demonstrated that the carbon nanonets-Au-lac biosensor was capable of reliably and effectively detecting adrenaline in practical applications.

KEY WORDS: Immobilized laccase, Photothermal biosensor, Electrochemistry, Hydroquinone, Catechol, Adrenaline

Wang Xinyue (Chemistry)

Supervised by Chen Zhiming

目录

摘要.....	IV
Abstract	VII
第 1 章 绪论	1
1.1 电化学传感器	1
1.1.1 电化学传感器的分类	1
1.2 电化学漆酶传感器	3
1.2.1 电化学漆酶传感器的制备方法	4
1.2.2 电化学漆酶传感器的实际应用	7
1.3 选题意义	10
第 2 章 Carbon nanonets-lac 光热传感器的制备及电化学传感性能研究	12
2.1 实验试剂及仪器	13
2.1.1 主要实验试剂	13
2.1.2 主要实验仪器	13
2.2 实验方案	13
2.2.1 Carbon nanonets 的制备	13
2.2.2 Carbon nanonets-lac 的合成	13
2.2.3 Carbon nanonets-lac 电极的制备	14
2.2.4 漆酶电极检测对苯二酚原理	14
2.3 结果与讨论	14
2.3.1 Carbon nanonets 的 TEM 表征及分析	14
2.3.2 Carbon nanonets 的 FT-IR 表征及分析	15
2.3.3 Carbon nanonets 的 XPS 表征及分析	16
2.3.4 Carbon nanonets 电化学性能表征	16
2.3.5 Carbon nanonets-lac 生物传感器实验条件优化	18
2.3.6 电极反应动力学研究	18
2.3.7 Carbon nanonets-lac 生物传感器的抗干扰性、耐储存稳定性、稳定性、重现性探究	19
2.3.8 Carbon nanonets-lac 生物传感器的响应性能	21

2.3.9 不同传感器检测对苯二酚的效果对比	22
2.3.10 Carbon nanonets-lac 生物传感器实际水样测定对苯二酚研究	22
2.4 小结	23
第 3 章 AuNPs-lac 光热传感器的制备及电化学传感性能研究	25
3.1 实验试剂及仪器	26
3.1.1 主要实验试剂	26
3.1.2 主要实验仪器	26
3.2 实验方案	26
3.2.1 AuNPs 的制备	26
3.2.2 AuNPs-lac 的合成	26
3.2.3 Carbon nanonets-lac 电极的制备	26
3.2.4 漆酶电极检测邻苯二酚原理	27
3.3 结果与讨论	27
3.3.1 AuNPs 的 TEM、EDX 表征及分析	27
3.3.2 AuNPs 的 FT-IR 表征及分析	28
3.3.3 AuNPs 的电化学性能表征及分析	29
3.3.4 AuNPs-lac 生物传感器实验条件优化	30
3.3.5 电极反应动力学研究	30
3.3.6 AuNPs-lac 生物传感器的抗干扰性、耐储存稳定性、重现性探究	31
3.3.7 AuNPs-lac 生物传感器的响应性能	32
3.3.8 不同传感器检测邻苯二酚的效果对比	33
3.3.9 AuNPs-lac 生物传感器实际水样测定邻苯二酚研究	33
3.4 小结	34
第 4 章 Carbon nanonets-Au-lac 光热传感器的制备及电化学传感性能研究	35
4.1 实验试剂及仪器	35
4.1.1 主要实验试剂	35
4.1.2 主要实验仪器	36
4.2 实验方案	36
4.2.1 Carbon nanonets 的制备	36
4.2.2 Carbon nanonets-Au 的制备	36
4.2.3 Carbon nanonets-Au-lac 的合成	36
4.2.4 Carbon nanonets-lac 电极的制备	37

4.2.5 漆酶电极检测肾上腺素原理.....	37
4.3 结果与讨论.....	38
4.3.1 Carbon nanonets-Au 的 TEM、EDX 表征及分析	38
4.3.2 Carbon nanonets 的 FT-IR 表征及分析.....	39
4.3.3 Carbon nanonets 的 XPS 表征及分析.....	40
4.3.4 Carbon nanonets-Au 电化学性能表征	41
4.3.5 Carbon nanonets-Au-lac 生物传感器实验条件优化	43
4.3.6 电极反应动力学研究.....	43
4.3.7 Carbon nanonets-Au-lac 生物传感器的抗干扰性、耐储存稳定性、稳定性、重现性探究.....	44
4.3.8 Carbon nanonets-Au-lac 生物传感器的响应性能.....	45
4.3.9 不同传感器检测肾上腺素的效果对比	46
4.3.10 Carbon nanonets-Au-lac 生物传感器实际水样测定肾上腺素研究.....	47
4.4 小结	48
总结与展望	49
参考文献.....	51
攻读学位期间发表的学术论文目录	61
致谢.....	62

第 1 章 绪论

1.1 电化学传感器

随着社会的发展，人们为了追求更加舒适方便的生活，制造合成了许多化合物。然而这些化合物的快速制造和合成，导致了危险的、难以分解的、有害的废物增加，这些新出现的化合物在自然水流的释放代表了新出现的环境污染物的重要组成部分^[1]。酚类化合物是这些环境污染物的重要组成部分，广泛存在于自然环境和人类生活，由于其具备较强的抗氧化能力、抗炎、抗菌等特性，常被用作医药、农药、塑料、食品等，并在很多化学工业中用作溶剂和前体^[2-4]。事实上，大部分酚类化合物具有毒性、致癌性、致畸性等，会引发一系列环境和人体健康问题。因此，快速、灵敏且准确地检测分析自然界和人类生活中的酚类化合物具有重要意义。然而，传统的检测方法如色谱法^[5, 6]、分光光度法^[7]和荧光探针^[8]存在仪器昂贵、手段复杂、成本高等不足，不适合日常使用。

近年来，电化学传感器发展迅速，在监测领域展现了巨大潜力。电化学传感器因其设计结构简单、设备使用方便、灵敏度高、响应速度快、选择性高、成本低等优点受到广泛关注^[9]。与比色法或荧光法相比，电化学传感器不受样品浊度和光路影响，更适合日常应用。

1.1.1 电化学传感器的分类

一般来说，电化学传感器主要包括生物识别元件和电化学换能器。根据生物识别过程，主要分为两大类：生物催化装置和亲和传感器^[10]。生物传感器有不同的识别元件材质，如酶、全细胞、组织切片等。不同的识别组分选择地识别分析目标分子^[11, 12]。其中，基于酶的生物传感器是最常见的。

电化学传感器分为多种类型，包括安培计、伏安计、阻抗计和电导计传感器，每种类型都基于独特的电化学原理来测量离子浓度、电流响应、电导率等参数。

(1)安培计传感器：安培计传感器是一种分析装置，通过检测特定电活性物质在恒定施加电位下在电极上氧化或还原所产生的电流，来量化特定电活性物质的浓度。施加到工作电位(WE)的恒定电压，诱导涉及目标分析物的电催化氧

化还原反应。在电化学反应中，电荷与转化物质的量之间的关系受法拉第电定律的支配。Marcela 等人^[13]利用二硫化钼作为二维材料修饰碳纸电极，再加上漆酶的固定化，开发出漆酶基安培生物传感器这一新型生物电极。所得生物电极对柠檬酸缓冲液中的对乙酰氨基酚的测定表现出良好的分析性能，灵敏度为 $108.3 \text{ nA}/\mu\text{M cm}^2$ ，LOD 为 $0.2 \mu\text{M}$ 。因此，这种生物电极的特性可以有效地用于开发一种监测工具，用于监测环境生物体排放值的变化，以研究该药物对水的污染。

(2)伏安传感器：伏安传感器是一种分析装置，通过检测随电位变化的电流响应来测量溶液的电化学特性。这些传感器背后的原理是在随时间变化的 WE 上施加电位，产生与电极表面分析物浓度相关的电流响应^[14]。产生的电流被监测并记录为伏安图，提供有关溶液中分析物的氧化还原行为和浓度的全面信息。有多种伏安法可用，包括循环伏安法(CV)、溶出伏安法(SV)、方波伏安法(SWV)、线性扫描伏安法(LSV)、差分脉冲伏安法(DPV)等。Fei 等^[15]利用 AuNP 修饰的丝网印刷碳电极(AuNP-SPCE)固定抗体，研制了一种用于沙门氏菌种类检测的三明治型电化学免疫传感器。用 CV 检测辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗产生的信号。Zhang 等人^[16]基于 MoS_2 纳米片和金纳米颗粒的纳米复合材料制造了一种新型漆酶基生物传感器，利用 DPV 电化学技术检测邻苯二酚。研究显示，AuNPs- MoS_2 复合材料显著提升了传感器性能：得益于其大比表面积、优异生物相容性、快速传质和协同催化作用，所制备的 AuNPs- MoS_2 -Lac/GCE 生物传感器表现出宽线性范围($2\text{-}2000 \mu\text{M}$)、低检测限($2 \mu\text{M}$)，且具有高选择性、良好稳定性和重现性，是一种极具应用前景的儿茶酚类化合物检测平台。

(3)电导型传感器：电导型传感器通过测量溶液的电导率来量化溶液中离子的总浓度。这些传感器通过在两个电极之间施加交流电而起作用，测得电导率与溶液中离子浓度及其迁移率成正比。电导率 κ (单位为 S/m)可以根据电极之间的电阻推导出来，公式为 $\kappa = L/(A \cdot R)$ ，其中 R 为测量电阻， A 为电极的表面积， L 为电极之间的距离^[17]。由于测量的灵敏度受到样品溶液电导率的阻碍，因此通常通过在带有酶的传感器和没有相同酶的传感器之间测试样品溶液来进行差分测量。Crispi 等人^[18]将 CDs 沉积在电导平台上形成敏感层，并进行了气体传感测试，显示出有希望选择性监测空气中 NO 的特性。Braiek 等^[19]提出了一种

基于互指电导薄膜平面电极的新型测钾传感器。该传感器在磷酸盐缓冲溶液以及含磷酸缓冲溶液的蔗糖溶液中的检测范围分别为 0.1-16 mM 和 0.1-8 mM, 检测限各为 0.03 mM 和 0.01 mM。值得注意的是, 蔗糖溶液能维持渗透压, 有效防止血液样品中红细胞溶血。Yu 等人^[20]演示了一种通过逐层自组装(LbL)制造的非酶仿生肾上腺素电容传感器, 该传感器成本低廉, 在电容检测真实斑马鱼脑样本中的肾上腺素标准品和肾上腺素方面具有高灵敏度和选择性。分子印迹肾上腺素传感器表现出 0.001-100 μM 之间的线性响应, 检测限(LOD)为 0.001 μM 。开发的传感器表现出高肾上腺素选择性和良好的重现性以及整体可靠性和有效性。该传感器成本低廉、响应稳定, 可实现生物体液中肾上腺素的准实时连续监测。

(4)阻抗型传感器: 阻抗型电化学传感器通过在工作电极(WE)和对电极(CE)间施加小幅交流电压(相对于参比电极施加交流电压), 以测量产生的交流, 从而确定电化学电池的阻抗。阻抗为复数, 包含实部(电阻)和虚部(电抗), 可通过两种方式呈现: (1)奈奎斯特图, 显示阻抗实部与虚部的关系; (2)波德图, 展示阻抗模值和相位角随频率的变化^[21]。这些图谱能反映电极界面特性及反应动力学信息。Mutreja 等人^[22]利用石墨烯-氧化石墨烯(G-GO)修饰的 SPCE 表面抗原, 研制了一种选择性灵敏的鼠伤寒沙门氏菌免疫传感器。阻抗响应信号的变化表明果汁中鼠伤寒沙门氏菌血清变异的浓度。

根据电极材料、检测底物和基底材料的不同, 选择不同类型的传感器。伏安型传感器适用于多种分析物检测和电化学机理研究, 常用于重金属、生物分子和有机化合物的检测, 但需要复杂的仪器配置, 频繁的校准可能受到电极污染的影响; 电导型传感器适用于气体传感、环境监测和生化分析, 特别适合移动或可穿戴传感器等小型化应用, 但其选择性较差, 易受温湿度等环境因素影响; 阻抗型传感器则特别适用于表面生物化学变化的检测, 如医学诊断和环境监测中的生物传感器和免疫传感器, 但其数据分析复杂且对温湿度敏感。安培型传感器用于生物、环境和工业样品中低浓度分析物的检测(如葡萄糖传感器和氧传感器), 具有灵敏度高、响应快、检测限低和可实现连续监测等优势^[23]。基于上述分析, 本研究选择开发安培型生物传感器。

1.2 电化学漆酶传感器

漆酶属于多铜氧化酶家族，活性中心含有多个铜原子，广泛应用于生物修复、生物传感等领域^[24]。漆酶通常作为需氧酶起作用，对多种底物表现出显著的催化活性。漆酶在植物、真菌、昆虫和细菌中具有多种功能，对酚类化合物具有特异性催化活性^[25,26]。特别关注的是，这一特性不仅在环境保护方面具有潜力，而且在酚类化合物的检测方面也具有广阔的应用前景^[24, 27]。

漆酶的催化机理已被广泛研究，其特征是生成自由基中间体。漆酶的催化过程始于四种等效还原底物的单电子氧化，包括芳香胺和脂肪胺和酚类。这种氧化导致有机自由基的形成，这些自由基最终将分子氧还原为两分子 H_2O ^[28]。漆酶的催化循环由一个四核铜簇组成，它也参与了水的形成。真菌漆酶通常在铜簇中区分三个不同的位点，每个位点在催化循环中都有特定的功能：“蓝 1 型铜位点(T1，又称蓝色铜位点)，“2 型铜位点(T2)，“3 型双核铜位点(T3)^[29, 30]。漆酶的化学反应以一个电子($1e^-$)的参与和四个还原底物分子的连续氧化为特征。同时，两个氧原子经历双电子还原($2 \times 2e^-$)形成它们各自的水分子^[31]。故上述过程的特点是催化交换四当量质子(4H^+)^[31]。漆酶反应可以从结构、机理和动力学的角度进行分析。从反应机制来看，该过程可理解为两个由内部电子转移(IET)步骤连接的半反应。位于 T1 Cu 和 T2 Cu/T3 Cu α /T3 Cu β 三核簇(TNC)位点的催化铜离子的存在促进了这一过程^[31]。

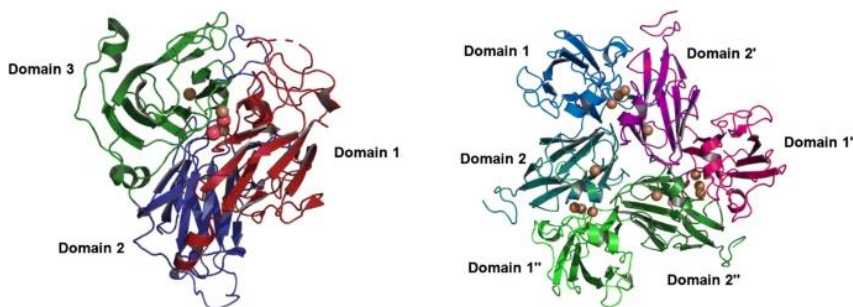


图 1-1 来自枯草芽孢杆菌 (PDB 1GSK) 的三结构域漆酶和来自天蓝色链霉菌(PDB 3CG8)的同源三聚体双结构域漆酶的卡通结构^[31]。

Fig.1-1. Cartoon structures of the three-domain laccase from *Bacillus subtilis* (PDB 1GSK) and the homotrimeric two-domain laccase from *Streptomyces coelicolor* (PDB 3CG8)^[31].

1.2.1 电化学漆酶传感器的制备方法

漆酶属于蛋白质，空间结构复杂，尽管其活性中心具有氧化还原活性，但

外围蛋白质结构域，会阻碍电子在电极上的转移。游离态漆酶对环境敏感，不稳定，容易失活。与游离状态的漆酶相比，固定化漆酶可以提高储存、温度和 pH 的稳定性。酶固定化包括酶在限定空间内的定位^[32]。固定化后，漆酶的导电性、操作稳定性和对环境胁迫的耐受性都得到了提高^[33]。在某些情况下，固定化漆酶相较于游离态漆酶，通常具有更好的耐高温、储存和可重用性等特性。并且适当的固定化可以显著改善酶的催化特性。因此酶的固定化是酶电极制备过程的关键，有效的酶固定化方法更是重中之重。目前生物传感器中常用的固定化方法包括包埋、吸附、共价结合、交联等。

1.2.1.1 包埋法

包埋是一种将酶或细胞包裹在纤维网络中的固定技术。它也可以被描述为将酶封装在支持材料中，或者具有网格结构，或者集成到聚合物膜中。通过仔细调整聚合物网络的孔径，可以防止酶泄漏，同时允许底物和产物的自由扩散。包埋法的优势在于，能够保持酶的天然构象，其劣势包括稳定性低、需要高浓度的酶、传质困难、孔径限制、酶渗出等。Li 等人^[34]将漆酶包封在 ZIF-90 中，制备了 ZIF-90/LAC 生物复合材料，其对邻苯二酚的检测表现出良好的线性响应，线性范围为 20-400 μM ，检出限低至 1.86 μM 。此外，该传感器兼具高选择性、良好重现性和稳定性。特别值得注意的是，所制备的生物催化膜对儿茶酚的降解效率(连续 5 次循环后仍保持 82.1%-93.4%)显著高于游离漆酶，已成功应用于酶膜反应器(EMR)，为含酚废水处理提供了新方案。Tang 等人^[35]首次用石墨化碳涂层碳化硼(GC@B4C)作介质，滴铸在泡沫镍(NF)上，再将漆酶通过壳聚糖包埋负载在 GC@B4C/NF 上，制造的 Lac/GC@B4C/NF 电极用于肾上腺素的安培检测。检测结果表明，Lac/GC@B4C/NF 电极线性范围宽(0.1 μM -2.6 mM)、检出限低(40 nM)、高灵敏度(76.05 $\mu\text{A mM}^{-1}$)、抗干扰能力强，对肾上腺素检测具有良好的稳定性。这项作为非金属碳化物在酶电化学生物传感器中的应用开辟了新途径。

1.2.1.2 吸附法

吸附固定是一种最简单、对酶活性影响最小的可逆固定技术，主要通过较弱的范德华力和疏水作用实现酶固定。与其它方法相比，具有成本低、操作简便、无需酶修饰等优势。然而基于物理吸附或离子结合的固定化方式在水介质

中有潜在的酶浸出的缺点。Li 等人^[36]成功制备了 ZnO 负载碳纳米纤维, 并以 ZnO/CNFs 静电吸附漆酶(Lac), 构建了一种新型生物传感器。该传感器对对苯二酚具有高效的电催化作用, 灵敏度为 $28.50 \mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$, 检测限达 9.50 nM ($S/N=3$), 线性范围为 $0.5\text{-}2.06 \mu\text{M}$, 具有良好的选择性和稳定性, 并且还成功地用于实际水样中对苯二酚的检测。Shumaila 等人^[37]构建和测试基于真菌漆酶和细菌过氧化氢酶的新型生物传感器, 对毒死蜱和活性红 195 (RR195)进行了监测。从真菌和细菌中获得部分纯化的漆酶和过氧化氢酶, 通过物理吸附将其固定在化学和热处理的碳毡(CF)电极上。通过伏安法分析, 对不同浓度的农药和染料在不同电压下产生的电信号(I)对酶活性的抑制进行了生物传感。污染物浓度的增加与电流响应降低显著相关。该生物传感器具有重复性好、稳定性好、检测限低、抗干扰性强等特点。

1.2.1.3 共价结合法

共价固定需要在酶和载体表面(载体键)或另一个蛋白质分子(无载体固定)上存在两个相互反应的化学基团。典型的共价固定策略是基于酶的氨基酸侧链中存在的表面官能团的反应性。胺和硫醇都是很好的亲核试剂, 是共价固定最广泛利用的残基。羧基需经活化方可与亲核试剂发生反应。共价结合法的热稳定性高、结合力强、酶稳定率高, 但操作复杂、成本较高, 以及需要酶化学修饰。Garcia-morales 等人^[38]报道了漆酶在活化 TiO_2 纳米颗粒上的共价固定化过程, 减少了漆酶显著构象变化, 增强了漆酶的稳定性。Guliya 等人^[39]利用合成漆酶纳米颗粒共价固定化技术, 制备了一种新型的金电极(LacNPs-AuE), 构建了一个安培型苯酚生物传感器。所构建的生物传感器具有较宽的线性范围($0.1\text{-}100 \mu\text{M}$ 和 $100\text{-}600 \mu\text{M}$), 检测限为 $0.3 \mu\text{M}$, 精密度高, 准确度高, 响应时间仅 3 s , 用自制的生物传感器对茶叶、酒精和药物的实际样品分析结果与分光光度法分析结果进行了比较, 表明了生物传感器的相似性, 证实了生物传感器的准确性。此外, 生物传感器的回收率高达 $92\%\text{-}98\%$, 也表明了生物传感器的准确性。

1.2.1.4 交联法

交联法是指通过使用双功能试剂(交联剂)来支持连接酶分子, 从而得到固定化漆酶。该方法可使酶稳定性提高、结合力强且可以无需载体, 但是酶分子扩散受限, 而且需使用交联剂进行化学修饰。Lin 等人^[40]将漆酶(Lac)通过戊二

醛交联固定在激光诱导石墨烯(LIG)电极上, 制备了一种简便的电化学生物传感平台, 用于检测没食子酸(GA)。在最佳条件下, LIG/lac 传感器对 GA 具有良好的催化活性, 对 GA 的线性检测范围为 0.1-20 mmol/L, 灵敏度高。此外, 该生物传感器对 GA 具有高特异性, 抗干扰能力强并且具有良好的再生性和储存稳定性, 为复杂样品中 GA 检测提供了便携解决方案。Lee 等人^[41]利用戊二醛与漆酶交联, 制备了表面改性电极 PVA/laccase-Au-NPs/Pt 来感应抗坏血酸(AA), 发现表面修饰电极 PVA/laccase-Au-NPs/Pt 在几种干扰试剂中表现出良好的选择性和良好的稳定性。

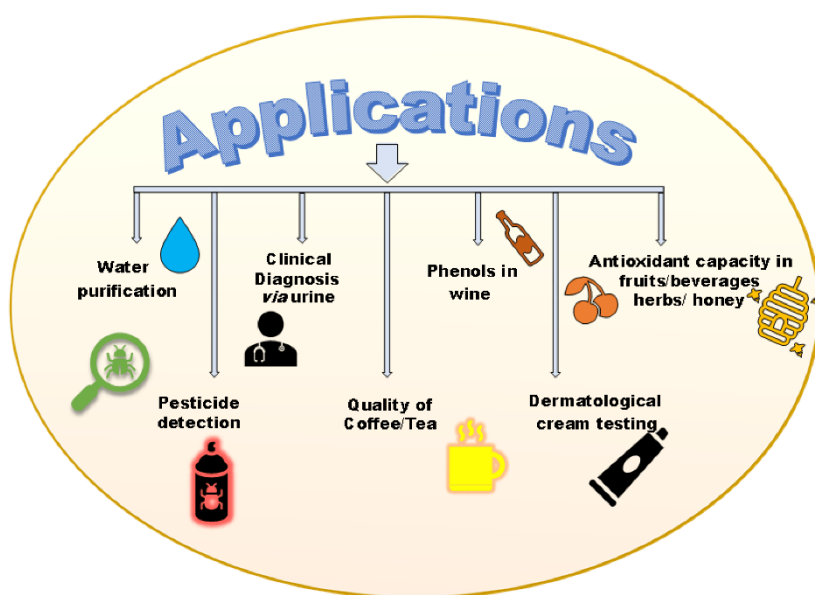


图 1-2 漆酶生物传感器的应用^[42]

Fig.1-2. Applications of Lac enzyme-based biosensors ^[42].

1.2.2 电化学漆酶传感器的实际应用

1.2.2.1 医学监测

压力作为人类生存不可避免的一部分, 与体内激素水平变化有关, 有时也会由体内酪氨酸(Tyr)浓度变化引起, 可能引发多种精神障碍, 如抑郁症、焦虑症、精神分裂症、创伤后应激障碍、睡眠障碍和甲状腺障碍。人体可通过药物或膳食补充酪氨酸。Dinu 等^[43]提出了一种用于定量药物中酪氨酸的新型酶传感器(Lacc/PPy/FeCN/SPCE)。Lacc/PPy/FeCN/SPCE 生物传感器是一种灵敏、高效的 Tyr 检测平台, 检测浓度范围为 $0.2-6 \times 10^{-6}$ M, 检测限为 2.29×10^{-8} M, 与非酶传感器和其他装置相比, 检测限显著低于常规方法。此外, 这种新的生物

传感器在一周内表现出良好的稳定性,并且在实际样品(即具有不同 Tyr 浓度的药物)上测试时具有可接受的回收率。该技术的进一步发展有望实现从婴幼儿期开始监测生物体液和食品中的 Tyr 水平,对相关疾病的早期预防具有重要意义。

血清素是一种存在于生物系统中的生物胺,在中枢神经系统中作为神经递质存在,在周围神经系统和胃肠道中作为激素存在,在人体内发挥多种生理功能,任何水平的紊乱,无论是过量还是不足,都会改变身体的平衡,引导致多种病理状态。Dăscălescu 等人^[44]研究了漆酶修饰的新型丝网印刷碳基电极(OMC-SPE/Lac)的电化学性能,用于三种不同厂家膳食补充剂中血清素的定量检测。在适当条件下,该传感器在 0.1-1.2 μM 的线性范围内,检测限为 316 nM,定量限为 948 nM。并且将 OMC-SPE/Lac 生物传感器的电化学性能与未修饰的传感器进行了比较,该结果凸显了生物传感器的优越性和酶在电检测中的重要作用。

多巴胺(DA)是儿茶酚胺类的有机化合物,是一种重要的神经递质,血液多巴胺水平异常可导致帕金森病等多种神经系统疾病。因此,准确检测 DA 含量对于鉴定生物体内的疾病至关重要。Wu 等人^[45]利用漆酶独特的生物催化活性和碳点优异的导电性,建立了一种碳点增强漆酶检测多巴胺(DA)的电化学传感器。结果表明,该传感器具有低检测限(0.08 μM)、宽线性范围(0.25 μM -76.81 μM)以及高灵敏度、可靠的重现性和稳定性。该传感器具有优异的选择性,可有效区分其它干扰物质。通过对人血清中 DA 的分析,验证了该方法在实际样品分析中的实用性。

1.2.2.2 环境监测

双酚 A(BPA)被广泛应用于生产聚碳酸酯塑料和环氧树脂,用于制造瓶子、厨房用具、电子设备、食品涂料、饮料包装、地板、粘合剂和油漆。然而,然而,BPA 的内分泌干扰特性及其对人类健康和环境的不利影响引起了人们的关注。Cincotto 等人^[46]在 PPyMCA/Sb₂O₅/rGO 和漆酶复合纳米结构修饰的玻碳电极上构建了用于双酚 A 测定的电化学生物传感器。该传感器在 0.1-1.0 μM 线性范围内的理论检测限为 9.9 nM,对差分脉冲伏安法测定双酚 A 具有良好的响应。该生物传感器在自来水中双酚 A 的检测中表现出良好的选择性,且对类似酚类化合物具有高选择性。该传感器在水中双酚 A 的测定中也表现出优异的性能,

回收率为 99.6%-101%，证实其在实际样品检测中的可靠性。

氯酚(CP)，一种广泛用于工业和家庭清洁活动的抗菌剂，通过人为活动进入环境，即使浓度极低，由于其在环境中的持久性和生物累积性，CP 也会对健康造成严重影响，如生殖功能障碍、肾脏损伤和癌症。因此，Quintanilla-Villanueva 等^[47]提出了一种将漆酶作为生物识别元件固定在薄膜金电极上来检测 CP 的电化学方法。研究团队对传感器的选择性、灵敏度和重现性进行了系统评估。在控制条件下，该传感器的检测范围为 2-10 mg/L，检测限和定量限分别为 0.14 和 0.48 mg L⁻¹。研究结果表明漆酶作为氯酚识别元素的前景，为环境监测提供了可靠工具。

儿茶酚(CC)作为一种典型的酚类污染物，广泛应用于精细化工和制药领域，但其释放到地表水和土壤中对生态环境和人体健康产生了有害影响。Wang 等^[48]以石墨化碳包覆碳化硼(GC@B₄C)和纳米金(AuNPs)分别作为电子转移促进剂和信号增强材料，研制了一种新型漆酶电化学生物传感器。通过原位电沉积在泡沫镍(NF)电极上制备 AuNPs 修饰层，壳聚糖将漆酶(Lac)和 GC@B₄C 颗粒固定在 AuNPs/NF 电极上。制备的 Lac/GC@B₄C/AuNPs/NF 电极对邻苯二酚(CC)的氧化表现出优异的电催化活性和快速的电子转移动力学。此外，该传感器具有宽线性范围(0.1-500 μM)、高灵敏度(157.3 μA mM⁻¹)、低检测限(25 nM)、良好的选择性、良好的稳定性和令人满意的重复性。

对壬基酚(PNP)是烷基酚聚氧基酸酯的代谢物，广泛用作油漆、洗涤剂、塑料、分散剂、表面活性剂、润湿剂等原料。由于 PNP 的高疏水性和难降解特性，在环境介质中持久存在。人体主要通过三种途径暴露于 PNP，环境和工业废物的直接排放、食用包装食品和生物累积。Jose 等人^[49]采用 AC/PAA/CFP 修饰电极并将漆酶固定在电聚合聚苯甲酸上，制备了一种高灵敏、高选择性的对壬基酚(PNP)检测传感器。测试结果显示，该生物传感器的低检出限和定量限分别为 1.74 nM 和 5 nM，线性动态范围为 5-250 nM。在干扰物存在的情况下，所研制的生物传感器对 PNP 的电化学检测具有良好的选择性，进一步验证了该传感器在自来水和湖水样品采集中的实用性。

1.2.2.3 食品安全监测

亚硝胺是一种威胁生物健康的致突变性物质，其快速准确检测具有重要意义

义。脱磷抑素(Dph)作为一种芳香族 N-亚硝胺,可通过竞争性抑制蛋白酪氨酸酶磷酸酶的活性。Shahtouri 等人^[50]实现了一种基于漆酶固定在 $\text{ZrO}_2\text{-}\beta\text{CyD-PANI}$ 纳米复合材料的新型电化学生物传感器,用于测定 Dph。 $\text{ZrO}_2\text{-}\beta\text{CyD-PANI}$ 纳米复合材料作为漆酶固定化平台,在安培型生物传感器中具有良好的电极导电性。性能测试显示, $\text{ZrO}_2\text{-}\beta\text{CyD-PANI/Lac/SPCE}$ 生物传感器在 0.05-100 nM 的浓度范围内对 Dph 具有快速响应(最佳响应时间为 15 s),检测限(LOD)为 0.029 nM,定量限(LOQ)为 0.098 nM,灵敏度高达 $234 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\mu\text{M}^{-1}$ 。该传感器具有良好的选择性和稳定性,重现性(RSD = 2.5%)和重复性(RSD = 2.27%),可用于麦芽饮料和奶粉样品的 Dph 检测,为食品中亚硝胺污染监测提供了可靠方法。

对香豆酸(PCA)具有抗氧化、抗菌和抗炎等多重生物活性,并作为化学产品或食品中使用的香料和香水的常规前体。该化合物广泛应用于保健品、制药等领域,如保健品、制药等。同样,PCA 还可作为生产生物可降解热塑性材料的原料。考虑到对香豆酸的生物学重要性,在各种食品或药品中检测对香豆酸是必要的。Bounegru 等人^[51]研制了一种新型酶促生物传感器,测定对香豆酸(PCA)的含量,其载体是酞菁钴和漆酶修饰的碳纳米纤维丝网印刷电极(CNF-CoPc-Lac/SPE),并以戊二醛为交联剂,采用滴铸-交联联用技术对传感器进行改性。生物传感器的响应显示 PCA 氧化还原过程非常稳定和敏感。研究人员采用循环伏安法和计时电流法,在 0.1-202.5 μM 的浓度范围内建立了对香豆酸的校准曲线。该传感器在 0.4-6.4 μM 的线性范围内获得最佳结果,检测限(LOD)和定量限(LOQ)值较低,分别为 0.483 μM 和 1.61 μM 。

1.3 选题意义

1991 年,国际纯粹与应用化学联合会(IUPAC)将化学传感器定义为“一种将化学信息(从样品中特定成分的浓度到完整的成分分析)转换为可用于分析的电信号的装置”。这些化学信息可以来自涉及分析物的化学反应,也可以来自被研究系统的物理性质。电化学传感器是在持续技术进步的推动下的多样化和不断发展的化学传感器世界中的一部分,通过检测化学反应产生的电信号实现分析。这些电压或电流信号可以转化为分析物的浓度,使其成为多种应用场景中的理想选择。而与传统检测手段相比,电化学传感器具有成本效益、响应时间短、

易于使用、低检测限和高灵敏度以及易于小型化等实用优势，同时始终提供可靠的分析结果。这些传感器用于各种领域，如医疗保健和诊断、环境监测和食品工业，以检测细菌、病毒、重金属、杀虫剂等。

漆酶是一种含多铜中心的氧化还原酶，是一种有效的生物催化剂，在生物修复和生物传感领域具有广泛应用。虽然漆酶可以利用分子氧作为电子受体氧化多种酚类和非酚类污染物，并且水是唯一的副产物，但是游离漆酶稳定性差、对环境敏感和使用条件相对严苛等，导致电化学传感器在稳定性、重复使用性和使用寿命等方面存在局限，进而阻碍在日常生活中的应用。酶固定化是解决上述问题的一个良好选择，虽然会将酶固定在一个限域空间内，可能会降低酶的灵活性以及空间位阻和扩散限制，但会增强酶的稳定性、重现性，甚至有时可以提高催化性能。一些漆酶通过固定在不同的材料框架上而提高了其检测以及降解药物的效率。研究者可根据载体材料的特性，选择合适且有效的固定方法，将漆酶固定化。碳基材料和金纳米粒子作为固定化漆酶的基底材料，制备简单，且前者表面具有丰富的官能团，后者表面易功能化，可以进行化学修饰获得羟基或羧基等官能团。二者导电性良好、生物相容性良好，具有优良的生物安全性。

本文设计构建了三种功能材料，即 Carbon nanonets、AuNPs 以及 Carbon nanonets-Au，并与漆酶固定，构建漆酶基安培生物传感器，利用载体材料的光热转换特性，进而增强固定化漆酶催化活性，从而进一步提高传感器检测灵敏度。所构建的生物传感器对醋酸缓冲液中的对苯二酚、邻苯二酚和肾上腺素这三种酚类物质检测方面表现出良好的分析性能以及宽检测范围、低检测限、强抗干扰能力、高选择性等，并且应用于实际水样的检测结果十分可靠。

第 2 章 Carbon nanonets-lac 光热传感器的制备及电化学传感性能研究

对苯二酚是一种常见的酚类异构体，广泛应用于染料、化妆品、农药等行业^[52-54]。由于其高毒性，即使少量也会对水生生态系统造成实质性破坏，导致人类各种疾病，并对肾、肺、肝等重要器官造成伤害^[55-57]。环境排放导致的人类暴露，可能造成一系列健康问题。传统的对苯二酚检测方法，如色谱法^[5, 6]、分光光度法^[7]和荧光探针^[8]，因其复杂、耗时、成本高、灵敏度低而闻名^[58, 59]。因此，迫切需要一种快速有效的对苯二酚检测方法。漆酶作为含四核铜簇的氧化酶，广泛应用于生物修复、生物传感等领域。其广泛分布于细菌、真菌和植物中，对酚类化合物表现出特定的活性^[25, 26]。漆酶能够催化分子氧参与的酚类化合物氧化反应生成水^[60, 61]。该催化特性不仅在环境保护方面具有潜力，而且在对苯二酚的检测方面也具有广阔的应用前景^[27, 58]。然而值得关注的是，在实际应用中游离漆酶的催化效率受限，稳定性有限，阻碍了其在生物传感领域的应用^[62-64]。通过电极表面固定化策略可显著提升生物传感器检测性能和耐用性^[58, 65]。然而，固定化可能导致漆酶活性降低，从而降低生物传感器的灵敏度。因此，合成具有较强催化活性的固定化漆酶是实现生物传感应用的必要条件。

碳基材料，如碳纳米纤维、碳纳米管、碳点和纳米复合材料，凭借其具有高导电性、成本效益和多用途的特殊属性，近年来已成为电极材料研究的主要焦点。特别值得关注的是，碳基材料具有将光能转化为热能的能力，从而提高了固定化漆酶的催化活性。基于上述特性，本研究设计了用于固定化漆酶的 Carbon nanonets 的合成。结果表明，Carbon nanonets 显著提高了漆酶的可操作性和耐久性。系统性能测试表明，Carbon nanonets-lac 生物传感器具有高灵敏度、对金属离子和有机化合物的耐受性强、优异的选择性和显著的储存稳定性，进一步研究表明 Carbon nanonets-lac 生物传感器具有作为快速检测对苯二酚的光热生物传感器的功能。

2.1 实验试剂及仪器

2.1.1 主要实验试剂

阿拉丁生化科技股份有限公司：铁氰化钾(AR)、亚铁氰化钾(ACS)、氯化钾(AR)、冰醋酸(99.7%)、三水合乙酸钠(GR)、对苯二酚(HPLC)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(98%)、N-羟基琥珀酰亚胺(98%)、甲酰胺(ACS)、乙腈(GR)、乙二胺(GC)、间苯二酚(AR)、邻氯苯酚(99%)、双酚 A(AR)、双酚 B(AR)、2,3-二氯苯酚(98%)、3,4-二氯苯酚(AR)、无水氯化钙(AR)、碳酸钠(AR)、硝酸铜水合物(AR)。

国药集团化学试剂有限公司：无水乙醇(AR)、异丙醇(AR)、丙酮(AR)、N,N-二甲基酰胺(AR)、六水合硝酸锌(AR)、六水合硝酸镁(AR)、九水合硝酸铬(AR)、硝酸铅(AR)。

北京百灵威科技有限公司：愈创木酚(99%)、甲苯(HPLC)。

广州番禺力强化工厂：柠檬酸(AR)。

2.1.2 主要实验仪器

透射电镜(FEI Talos F200S)、X 射线光电子能谱仪(XPS、Thermo ESCALAB 250Xi)、傅里叶红外光谱(FT-IR、Thermo Scientific Nicolet iS20)、辰华电化学工作站 CHI760E。

2.2 实验方案

2.2.1 Carbon nanonets 的制备

首先，将 312.5 mg 柠檬酸和 0.5 mL 乙二胺混合在 20 mL 甲酰胺中，于 25°C 搅拌 20 min，超声分散 10 min。随后，将混合物转移到反应釜的内衬中，在 180°C 下进行水热反应 4 小时。冷却至室温后，使用 0.22 μm 膜过滤，随后使用纤维素酯膜(分子量截止值为 500 Da)在去离子水透析纯化 12 小时，以去除未反应的甲酰胺和乙二胺。透析后的溶液 10000 rpm 离心 10 min，去除沉淀，4°C 保存为 Carbon nanonets 溶液。

2.2.2 Carbon nanonets-lac 的合成

在典型的合成中，将 5mg 的 EDC 和 NHS 添加到 2ml 的 Carbon nanonets 溶液中。在 25°C 下孵育 0.5 h，随后加入 200 μL 粗漆酶，在 25°C 下维持 1 h，最后收集得到 Carbon nanonets-lac，4°C 保存备用。

2.2.3 Carbon nanonets-lac 电极的制备

采用 0.3 μm 氧化铝粉打磨抛光玻碳电极表面(直径为 3 mm)，再置放在超纯水和乙醇中超声清洗，自然干燥。随后在玻碳电极(GCE)上沉积 6 μL Carbon nanonets-lac，并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥，制备了 Carbon nanonets-lac 电极。然后，将 2 μL 0.5 wt% Nafion 浇铸在 GCE 表面，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥。采用相同的方法制备了 Carbon nanonets-lac 电极。

2.2.4 漆酶电极检测对苯二酚原理

以对苯二酚为例，电极表面催化机理描述如下(图 2-1)：在 Carbon nanonets-lac 生物传感器表面施加光照，提高载体表面温度，进而增强漆酶活性。漆酶通过电子的转移来催化对苯二酚的氧化，生成 1,4-苯醌。而工作电极表面的高电导率有助于电子转移更容易的经过对苯二酚的氧化，还原后的漆酶通过与氧的相互作用重新形成氧化后的漆酶，并在此过程中产生水，整个过程反应为电流。

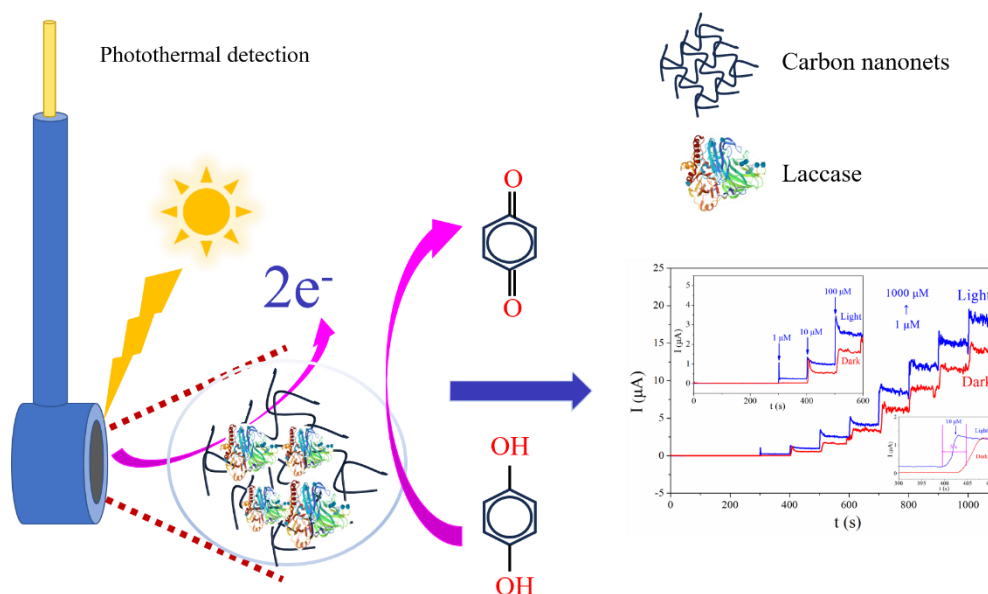


图 2-1 Carbon nanonets-lac 生物传感器对对苯二酚的电催化原理示意图

Fig. 2-1. Schematic diagram of electrocatalysis of hydroquinone by Carbon nanonets-lac biosensor.

2.3 结果与讨论

2.3.1 Carbon nanonets 的 TEM 表征及分析

用含有柠檬酸和乙二胺的甲酰胺溶液在 180 $^{\circ}\text{C}$ 下水热处理 4 h 制备 Carbon

nanonets。图 2-2a 为 Carbon nanonets 的典型 TEM 图像，表明样品为直径为 11-18 nm。在图 2-2b 中没有观察到晶格条纹，表明 Carbon nanonets 在本质上是无定形的。

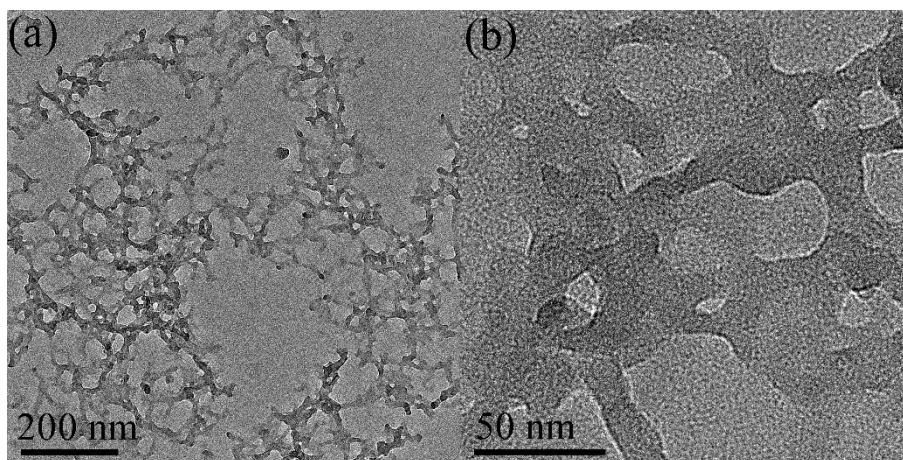


图 2-2 (a)和(b) Carbon nanonets 的 TEM

Fig. 2-2. (a) and (b) TEM of N-doped carbon nanonets.

2.3.2 Carbon nanonets 的 FT-IR 表征及分析

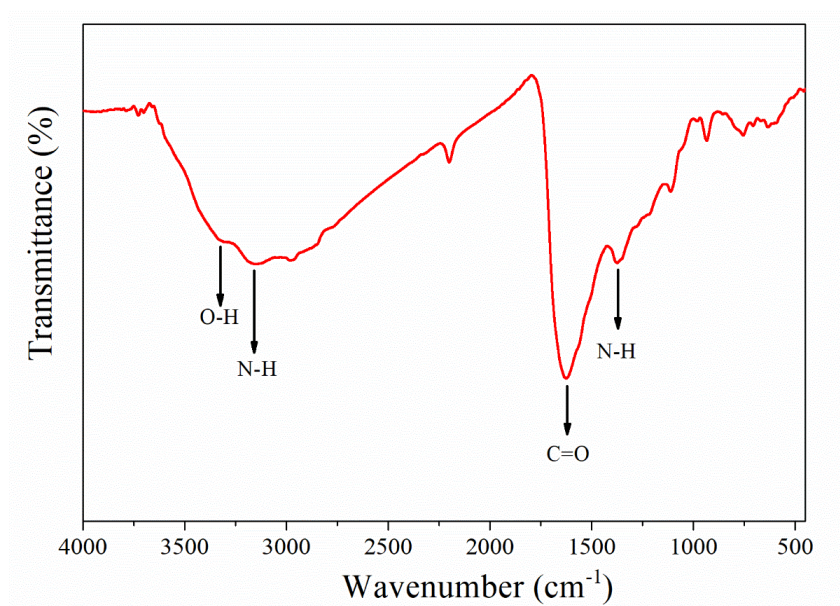


图 2-3 Carbon nanonets 的 FT-IR 谱图

Fig. 2-3. FT-IR spectrum of Carbon nanonets.

利用傅里叶变换红外光谱(FT-IR)分析了 Carbon nanonets 的表面信息。如图 2-3 所示，在 3325 和 3183 cm^{-1} 处观察到吸收峰，表示 O-H 和 N-H 拉伸振动。

1643 和 1380 cm^{-1} 处的强吸收带分别归因于 -COO- 和 N-H 带中 C=O 的拉伸模式, 表明 Carbon nanonets 具有羧基功能化^[66, 67]。

2.3.3 Carbon nanonets 的 XPS 表征及分析

通过 XPS 分析进一步证实了 Carbon nanonets 中羧基的存在。XPS 全光谱包含三个主要的 Carbon nanonets 峰(图 2-4a), 分别显示了 C 1s、O 1s 和 N 1s 的存在。Carbon nanonets 的 C 1s 谱(图 2-4b)在 284.5、285.5 和 287.1 eV 处有三个峰, 这可以归因于 C=C 、 C-N/C-OH 和 C=O 键中的 C 原子^[66, 67]。在 N 1s 光谱(图 2-4c)中, 分别在 398.7、399.6 和 401.3 eV 处发现了对应于 C=N 、 C-N 和 N-H 键^[66]中的 N 原子的峰。在 531.7 eV 和 530.5 eV 下, O 1s 峰可以看作是 O 在 C-OH 和 C=O 中的共同贡献^[66, 68]。这些结果表明, Carbon nanonets 是由 C、N 和 O 组成的, 表面有羧基。

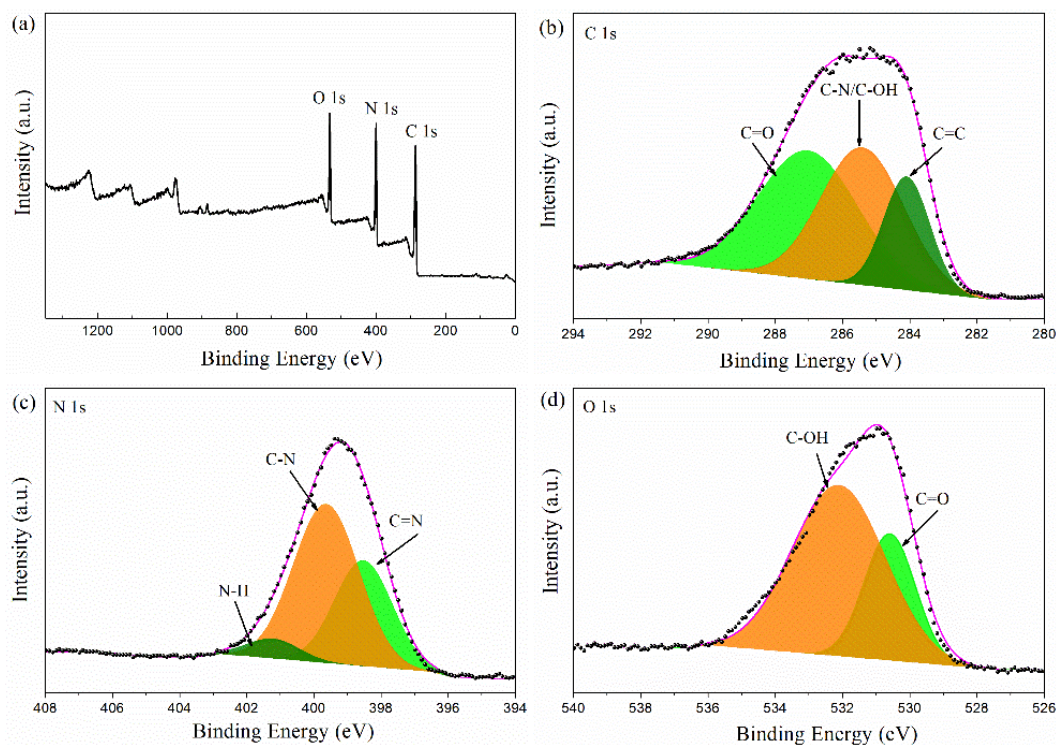


图 2-4 Carbon nanonets 的 XPS 光谱。(a)全谱图, (b-d)C 1s、N 1s 和 O 1s 的高分辨率 XPS 光谱。

Fig.2-4. XPS spectra of Carbon nanonets. (a) complete survey, and (b-d) high-resolution XPS spectra of C 1s, N 1s, and O 1s.

2.3.4 Carbon nanonets 电化学性能表征

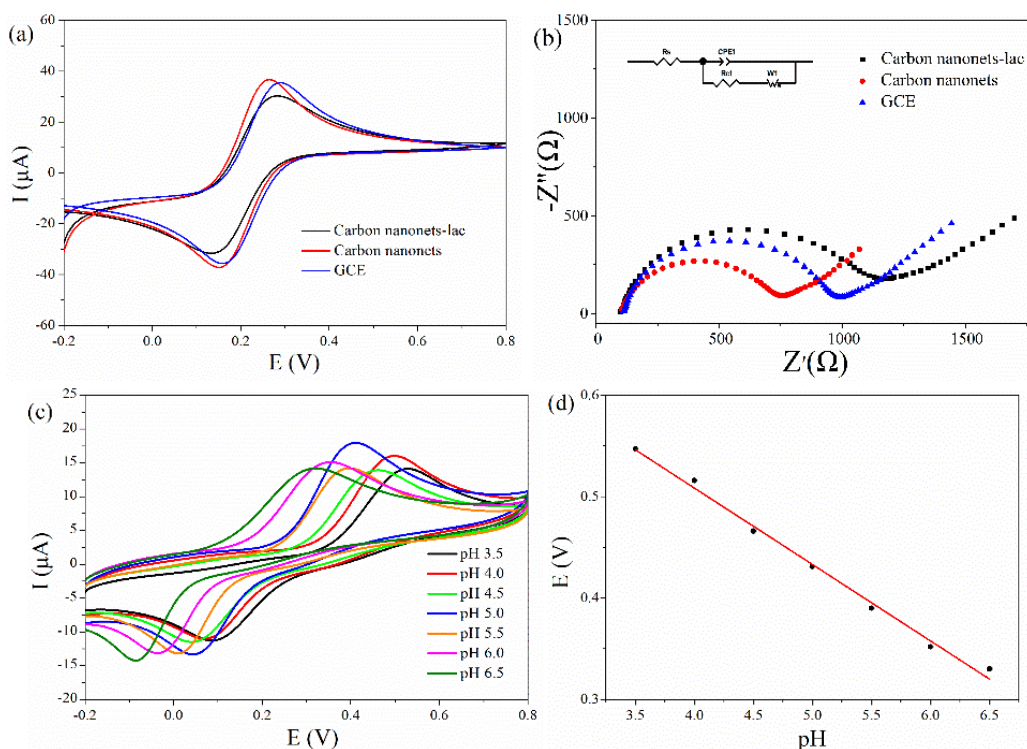


图 2-5 (a) GCE、Carbon nanonets 和 Carbon nanonets-lac 电极的 CV 曲线和(b) Nyquist 图 (在含 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 的 0.1 M KCl 溶液中测量), (c) Carbon nanonets-lac 电极在 0.2 M 含 500 μM 对苯二酚的醋酸缓冲溶液中的 CV 曲线, (d) 氧化峰电位随 pH 值的变化图。扫描速率: $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

Fig. 2-5. (a) CV curves and (b) Nyquist plots of GCE, Carbon nanonets, and Carbon nanonets-lac electrodes (measurement in a 0.1 M KCl solution containing 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$), (c) CV curves of Carbon nanonets-lac electrode in a 0.2 M acetic acid buffer solution containing 500 μM hydroquinone, and (d) the plot of the oxidation peak potentials versus pH values. Scan rate: $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

循环伏安法(CV)用于研究 GCE、Carbon nanonets 和 Carbon nanonets-lac 在含有 0.1 M KCl 的 5 mM $[\text{KFe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 氧化还原介质溶液中的电子转移行为(图 2-5a)。如图 2-5a 所示, GCE、Carbon nanonets 和 Carbon nanonets-lac 的 CV 曲线显示了它们的电化学性能, 表明铁氰化物配合物中存在 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ 氧化还原对。在 GCE 表面观察到一对氧化还原峰, 阳极峰电流(I_{pa})为 $41.02 \mu\text{A}$, 峰电位差(ΔE_p)为 0.130 V。Carbon nanonets 粒子修饰 GCE 表面后, I_{pa} 略有升高, ΔE_p 略

有降低($I_{pa} = 41.53 \mu A$, $\Delta E_p = 0.114 V$), 这是由于 Carbon nanonets 粒子增强了 GCE 表面的电导率。相反, 使用 Carbon nanonets-lac 导致 I_{pa} 降低, ΔE_p ($I_{pa} = 35.86 \mu A$, $\Delta E_p = 0.148 V$) 升高, 这是由于漆酶分子阻断了电子转移的活性位点, 导致电子在电极界面的转移受阻^[67]。

采用电化学阻抗谱(EIS)测试进一步研究了生物传感器的电化学性能, 以评估电子转移^[56]。典型的奈奎斯特图包含半圆形和线性部分。较高频率下的半圆直径反映了电阻值(R_{ct}), 表示电子转移过程, 而较低频率下的线性截面与扩散过程有关。相应的等效电路如图 2-5b 的插图所示。图 2-5b 显示了 GCE、Carbon nanonets 和 Carbon nanonets-lac 的 EIS 状态。与裸 GCE 的电荷转移电阻(R_{ct})约为 822.6Ω 相比, Carbon nanonets 电极的 R_{ct} 降至 604.3Ω 左右, 表明由于 Carbon nanonets 的电导率较高, 电子转移电阻较低。Carbon nanonets-lac 电极的 R_{ct} 值增加到约 935.4Ω , 表明固定在 Carbon nanonets 纳米材料上的漆酶分子电导率较差。上述结果证明了 Carbon nanonets-lac 电极的成功构建。

2.3.5 Carbon nanonets-lac 生物传感器实验条件优化

使用 Carbon nanonets-lac 生物传感器确定检测对苯二酚的最佳 pH, 如图 2-5c 所示。随着 pH 值的增加, 生物传感器的氧化电流逐渐升高, 在 pH 值为 5.0 时达到峰值, 随后在 5.0-6.5 范围内下降。图 2-5d 显示了氧化峰电位与 pH 值增加之间的强烈线性相关性, 表明质子在生物传感器的初级反应过程中有重要作用, 其中包括固定化漆酶以催化氧还原为水。

2.3.6 电极反应动力学研究

通过电极反应动力学研究电活性物质的扩散速率, 对生物传感器具有重要意义。因此, 在含有 $500 \mu M$ 对苯二酚的 $0.2 M$ 醋酸缓冲溶液($pH = 5.0$)中, 以不同的扫描速率进行了 Carbon nanonets-lac 的 CV 测试。图 2-6a 显示了氧化还原峰值电流随扫描速率的增加而增加, 并且峰值电流与扫描速率的平方根直接相关。图 2-6b 所示的拟合结果表面阳极和阴极的峰值电流模式与扫描速率呈现良好的线性关系($I_{pa} = 1.05v^{1/2} + 0.21$, $R^2 = 0.996$; $I_{pc} = -1.07v^{1/2} + 0.65$, $R^2 = 0.999$), 其中 I_{pa} 和 I_{pc} 分别表示阳极峰和阴极峰电流值(μA), v 表示扫描速率($mV \cdot s^{-1}$)。线性相关性表明, 扩散过程控制着 Carbon nanonets-lac 电极表面的电活性物质。

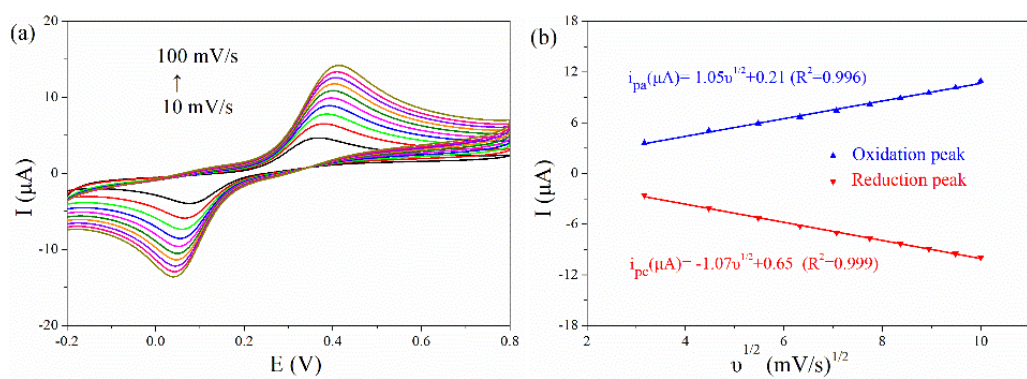
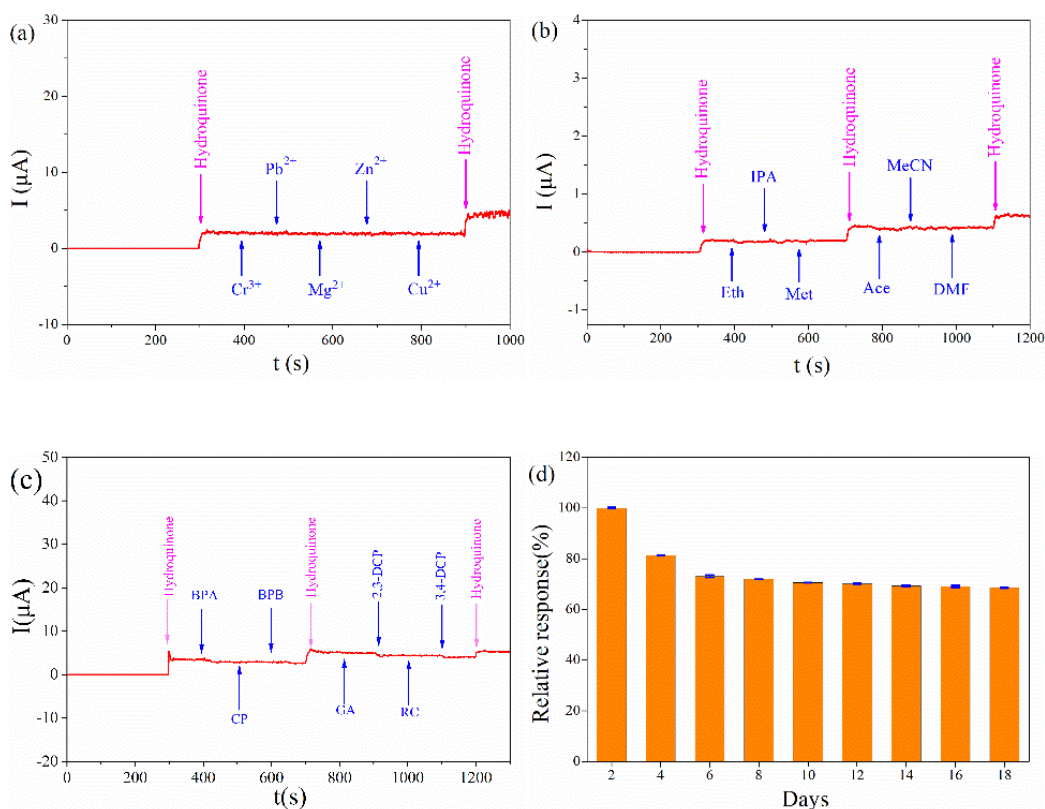


图 2-6 (a)在含 500 μM 对苯二酚的 0.2 M 醋酸缓冲溶液($\text{pH} = 5.0$)中 10-100 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ 不同扫描速率下 Carbon nanonets-lac 生物传感器的 CV 曲线, (b)峰值电流与扫描速率平方根的关系曲线。

Fig. 2-6. (a) CV curves of Carbon nanonets-lac biosensor in 0.2 M acetic acid buffer solution ($\text{pH} = 5.0$) containing 500 μM hydroquinone at various scan rates of 10-100 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, and (b) the plot of the peak current versus square root of the scan rates.

2.3.7 Carbon nanonets-lac 生物传感器的抗干扰性、耐储存稳定性、稳定性、重现性探究



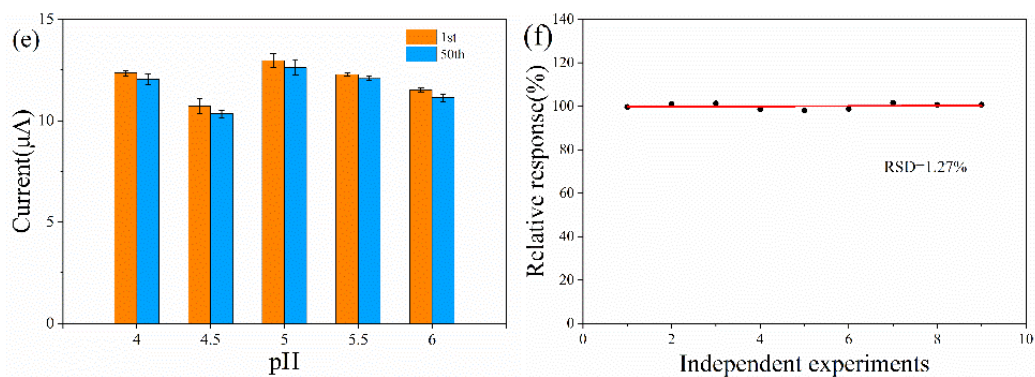


图 2-7 Carbon nanonets-lac 生物传感器(a)金属离子耐受性, (b) 有机溶剂耐受性, (c)抗干扰性, (d)储存稳定性(4°C储存), (e)在不同 pH 下扫描 50 次后的稳定性, (f)重现性。

Fig. 2-7. Carbon nanonets-lac biosensor (a) resistance to metal ions, (b) resistance to organic solvents, (c) resistance to interference, (d) storage stability (4°C storage), (e) stability after 50 scans at different pH, (f) reproducibility.

一般来说, 生物传感器经常受到对苯二酚样品中污染物的影响。为了评估 Carbon nanonets-lac 的耐久性, 通过向体系引入典型干扰物, 研究了金属离子和有机化合物对 Carbon nanonets-lac 生物传感器的抑制作用。如图 2-7a 所示, 在醋酸缓冲液(30 mL)中加入 200 μM Cr^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} , 对正在进行的反应没有明显影响, 说明这些添加的金属离子对反应没有阻碍作用。此外, 将 10 μL 乙醇(Eth)、异丙醇(IPA)、甲醇(Met)、丙酮(Ace)、乙腈(MeCN)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)依次添加到含有 200 μM 对苯二酚的 30 mL 醋酸缓冲溶液中, 对电流响应没有显著影响。这些结果表明, Carbon nanonets-lac 对有机化合物具有良好的耐受性。Carbon nanonets-lac 生物传感器的特殊抗性归因于 Carbon nanonets 的保护作用, 从而增强了漆酶的稳定性和对添加污染物的抵抗力。

为了评估 Carbon nanonets-lac 的抗干扰能力和选择性, 分别加入 200 μM 对苯二酚、双酚 A (BPA)、邻氯苯酚(CP)、双酚 B (BPB)、愈创木酚(GA)、2,3-二氯苯酚(2,3-DCP)、间苯二酚(RC)和 3,4-二氯苯酚(3,4-DCP)于 30 mL 醋酸缓冲液中, 并连续搅拌, 如图 6c 所示。Carbon nanonets-lac 在引入对苯二酚后表现出快速而敏感的反应。相反, 干扰剂的加入并没有引起明显的安培响应。每次重新引入对苯二酚后, Carbon nanonets-lac 生物传感器都表现出迅速而敏感的反应。这些结果表明, Carbon nanonets-lac 生物传感器具有优异的抗干扰性和高选择性。

此外, Carbon nanonets-lac 的储存稳定性令人满意, 18 天后其初始活性仍保持 68.4%, 如图 2-7d 所示。在 pH 为 4.0-6.0 的范围内, 循环 50 次后 CV 的氧化峰电流下降了 1.68%-3.51%(图 2-7e), 表明 Carbon nanonets-lac 生物传感器具有良好的稳定性。优异的电化学性能表明, Carbon nanonets-lac 生物传感器在实际应用中为对苯二酚的检测提供了一种可靠的方法。此外, 对于以相同方式制备的 9 个独立传感器, 对苯二酚检测的相对标准偏差仅为 1.27%(见图 2-7f)。综合上述结果证实, 基于 Carbon nanonets 的漆酶传感器在对苯二酚检测中具有良好的选择性、稳定性和重复性。

2.3.8 Carbon nanonets-lac 生物传感器的响应性能

图 2-8a 展示了连续添加对苯二酚的 Carbon nanonets-lac 在光照和黑暗条件下的安培反应对比。Carbon nanonets-lac 生物传感器在加入对苯二酚后表现出快速响应(在 5 s 内), 突出了该生物传感器的有效性。值得注意的是, 由于 Carbon nanonets 通过光热转换提高了表面温度, 从而增强了催化活性, 因此在光照条件下的电流响应超过了在黑暗条件下的响应。在光照和黑暗条件下, Carbon nanonets-lac 生物传感器的电流与对苯二酚浓度之间的线性关系如图 2-8b 所示。在黑暗条件下, 在 10 μM -1000 μM 的检测范围内, 检测限为 7.26 μM ($S/N = 3$), 而在光照条件下, 在 1 μM -1000 μM 的检测范围内, 检测限为 0.14 μM ($S/N = 3$), 表明通过光热检测 Carbon nanonets-lac 生物传感器提高了灵敏度。

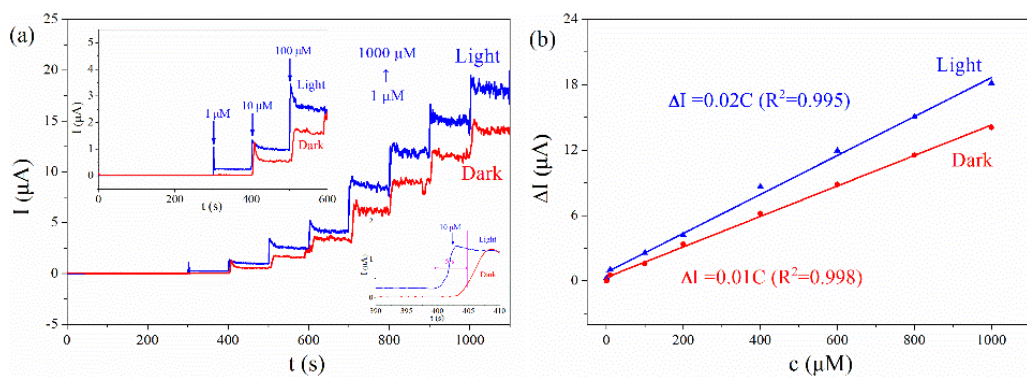


图 2-8 (a)Carbon nanonets-lac 生物传感器对对苯二酚的安培响应, (b)相应的校准图。

光源: 980 nm 激光, $1 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$

Fig. 2-8. (a) Amperometric responses of Carbon nanonets-lac biosensor to hydroquinone, and (b) the corresponding calibration plot. Light. Source: 980 nm laser, $1 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$

2.3.9 不同传感器检测对苯二酚的效果对比

表 2-1 比较了 Carbon nanonets-lac 与其他已报道传感器对苯二酚的检测性能。结果表明, Carbon nanonets-lac 的线性范围和检测限与已有的传感器相当。这一发现表明, Carbon nanonets-lac 可以作为一种有效的光热生物传感器用于对苯二酚的检测。

表 2-1 对苯二酚传感器的比较

Table 2-1 Comparison of hydroquinone sensors.

sensors	Analytic method	Linear range (μM)	Detection limit (μM)	Ref.
MIL-101(Cr)-rGO	Electrochemistry	4-1000	0.66	[69]
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{COF}@\text{HRP}$	Electrochemistry	0.5-300	0.12	[70]
PANI/CuCNFs-Lac	Electrochemistry	0.50-110	0.24	[56]
Cu-MOF-GN/GCE	Electrochemistry	1-1000	0.59	[52]
TpBD-COF	Electrochemistry	1-2000	0.31	[71]
PANI/MG-Lac/GCE	Electrochemistry	0.4-337.2	2.94	[58]
CotA/thGP/AuNPs/GCE	Electrochemistry	1.6-409.6	0.3	[65]
Lac-PB/PANI/CC	Electrochemistry	0.25-900	0.25	[57]
Pt-MoS ₂ /SiO ₂	Colorimetry	0.5-9	0.242	[72]
Van-Pd ₂ NPs	Colorimetry	1-100	0.323	[73]
Si QDs	fluorescence	6-100	2.63	[74]
Si NPs	Colorimetry	2.5-27	0.68	[75]
Carbon nanonets-lac	Electrochemistry	1-1000	0.14	This work

2.3.10 Carbon nanonets-lac 生物传感器实际水样测定对苯二酚研究

通过对我校自来水和芜湖长江三号桥长江水样进行光热分析, 评价了 Carbon nanonets-lac 生物传感器的实际应用。表 2-2 为 Carbon nanonets-lac 生物传感器的检测结果, 显示自来水和长江水中最初不存在对苯二酚。在加入不同浓度的对苯二酚后, Carbon nanonets-lac 生物传感器显示出可检测的对苯二酚含量水平。对苯二酚的相对标准偏差(RSD)为 1.41%-8.48%, 加样回收率为 99.4%-

101.25%。这些结果表明，Carbon nanonets-lac 生物传感器适用于实际水样中对苯二酚的光热检测。

表 2-2 Carbon nanonets-lac 生物传感器光热法测定水样中对苯二酚

Table 2-2 Photothermal determination of hydroquinone in real water samples by Carbon nanonets-lac biosensor.

Sample	Added (μM)	Found (μM)	RSD (%)	Recovery (%)
Tap Water	0	Not detected	/	/
	5	5.05	3.53	101.0
	10	10.12	8.48	101.2
	15	14.91	6.36	99.4
Yangtze River Water	0	Not detected	/	/
	5	5.04	2.83	100.8
	10	9.98	1.41	99.8
	15	15.06	4.24	100.4

2.4 小结

本工作介绍了将漆酶固定在 Carbon nanonets 用于对苯二酚的光热检测。通采用水热法合成 Carbon nanonets 粗产品，经纯化、离心处理后获得高纯度的 Carbon nanonets 溶液，通过共价结合与漆酶固定。Carbon nanonets 显著提升漆酶的操作稳定性和耐久性。此外实验结果表明，Carbon nanonets-lac 生物传感器

对金属离子和有机化合物具有优异的耐受性，并且具有显著的储存稳定性。**Carbon nanonets** 的光热效应使得固定化漆酶作为快速检测对苯二酚的生物传感器有效地发挥作用。安培检测表明，与黑暗环境相比，光照显著提高了生物传感器检测的灵敏度。**Carbon nanonets-lac** 生物传感器具有 $0.14\ \mu\text{M}$ ($S/N = 3$) 的低检测限和 $1\text{-}1000\ \mu\text{M}$ 的宽响应范围。最重要的是，**Carbon nanonets-lac** 生物传感器在自来水和长江水样的光热分析中显示出可靠的结果，表明其在实际水样对苯二酚检测中的环保应用潜力。

第 3 章 AuNPs-lac 光热传感器的制备及电化学传感性能研究

环境中的污染物正在威胁着生态系统。水生环境是几乎所有形式的工业、制药和其他污染物的最终归宿，这些污染物对生物产生了巨大的不利影响^[76, 77]。邻苯二酚，也被称为儿茶酚或 1,2-二羟基苯，是一种工业污染物，广泛应用于工业生产，包括杀虫剂、香料和香水^[78]。邻苯二酚还广泛用于照相显影剂^[79]的生产，作为毛皮染料的显影剂^[80]，在橡胶、医药、化妆品、纺织、石油化工等领域作为抗氧化剂的中间体^[81]。人体通过皮肤吸收会可引发类似苯酚中毒症状，会导致湿疹性皮炎，甚至引起更明显的抽搐。在动物实验中，大量邻苯二酚可引起中枢神经系统抑郁和血压长期升高，这可能是由于周围血管收缩所致^[82]。值得注意的是，邻苯二酚可以通过各种途径进入人体，包括饮用水和水生食品，所以它在天然水源中的存在对人体健康构成严重威胁，发达国家已实施严格的法规，禁止在某些产品中使用邻苯二酚。因此，现在有必要密切关注水环境中邻苯二酚的含量，特别是饮用水中的邻苯二酚。邻苯二酚对肝脏、中枢神经系统有毒，并能破坏 DNA 复制，会对全球人类和环境健康构成重大风险^[83]。因此，方便、准确地检测水资源中的邻苯二酚，可以有效避免其对的有害影响。电分析法具有成本低、操作方便等优点，是一种比较可靠的检测方法。基于各种纳米材料的仿生电化学传感器已被开发用于邻苯二酚检测^[78, 81, 84]，但这些传感器的抗干扰能力较差。鉴于此，基于酶的电化学生物传感器由于其良好的底物特异性而受到越来越多的关注^[85]。

贵金属材料，如金、银、钯以及纳米复合材料，由于其具有高导电性和多功能特性，一直以来都是电极材料研究的主要焦点。值得注意的是，金银等材料具有等离子效应，可加强将光能转化为热能，从而提高了固定化漆酶的催化活性。在此，本文设计了用于固定化漆酶的 AuNPs 的合成。结果表明，AuNPs 显著提高了漆酶的操作稳定性和耐久性。测量表明，AuNPs-lac 生物传感器具有高灵敏度、对金属离子和有机化合物的耐受性强、优异的选择性和显著的储存稳定性。此外，还建立了 AuNPs-lac 生物传感器作为快速检测邻苯二酚的光热生物传感器的功能。

3.1 实验试剂及仪器

3.1.1 主要实验试剂

阿拉丁生化科技股份有限公司：铁氰化钾(AR)、亚铁氰化钾(ACS)、氯化钾(AR)、冰醋酸(99.7%)、三水合乙酸钠(GR)、邻苯二酚(AR)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(98%)、N-羟基琥珀酰亚胺(98%)、四氯合金酸溶液(23.5%-23.8%)、对硝基苯酚(HPLC)、间苯二酚(AR)、邻氯苯酚(99%)、双酚B(AR)、2,3-二氯苯酚(98%)、硫酸锰(AR)、吡啶(ACS)、三乙胺(AR)、四氢呋喃(AR)、无水柠檬酸钠(AR)。

国药集团化学试剂有限公司：环己烷(AR)、三氯甲烷(AR)、四氯化碳(AR)、六水合硝酸钴(AR)、六水合硝酸镁(AR)、十八水合硫酸铝(AR)、六水合硝酸铈(AR)。

上海麦克林生化科技有限公司：3-巯基丙酸(99%)。

北京百灵威科技有限公司：愈创木酚(99%)。

3.1.2 主要实验仪器

透射电镜(FEI Talos F200S)、Mapping (FEI Talos F200S)、傅里叶红外光谱(天津港东 FT-IR-850)、辰华电化学工作站 CHI760E。

3.2 实验方案

3.2.1 AuNPs 的制备

向两颈烧瓶内加入 50 mL 超纯水以及 5 μ L 四氯合金酸溶液，持续加热搅拌。煮沸 5 min 后，滴加 1.875 mL 1 wt%柠檬酸三钠，继续反应 15 min，得到 AuNPs 溶液。

3.2.2 AuNPs-lac 的合成

取 2 mL AuNPs 溶液，加入 20 μ L 20 mM 巯基丙酸溶液，30 $^{\circ}$ C振荡 1 h，即可获得所述功能化 AuNPs 纳米材料。向经巯基丙酸修饰的 AuNPs 溶液中加入 40 mg EDC 和 NHS，30 $^{\circ}$ C反应 1 h，即可获得所述功能化 AuNPs 纳米材料。向所获功能化 AuNPs 纳米材料中加入 200 μ L 漆酶溶液，漆酶活性为 130 U/mL,于 30 $^{\circ}$ C振荡 1 h，即可获得 AuNPs 固定化漆酶。

3.2.3 Carbon nanonets-lac 电极的制备

采用 0.3 μ m 氧化铝粉打磨抛光玻碳电极表面(直径为 3 mm)，再置放在超纯

水和乙醇中超声清洗，自然干燥。随后在玻碳电极(GCE)上沉积 6 μL AuNPs-lac，并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥，制备了 AuNPs-lac 电极。然后，将 2 μL 0.5 wt% Nafion 浇铸在 GCE 表面，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥。采用相同的方法制备了 AuNPs 电极。

3.2.4 漆酶电极检测邻苯二酚原理

以邻苯二酚为例，电极表面催化机理描述如下(图 3-1)：在 AuNPs-lac 生物传感器表面施加光照，提高载体表面温度，进而增强漆酶活性。漆酶通过一个电子的转移来催化对苯二酚的氧化，生成 1,2-苯醌。而工作电极表面的高电导率有助于电子转移更容易的经过邻苯二酚的氧化，还原后的漆酶通过与氧的相互作用重新形成氧化后的漆酶，并在此过程中产生水，整个过程反应为电流。

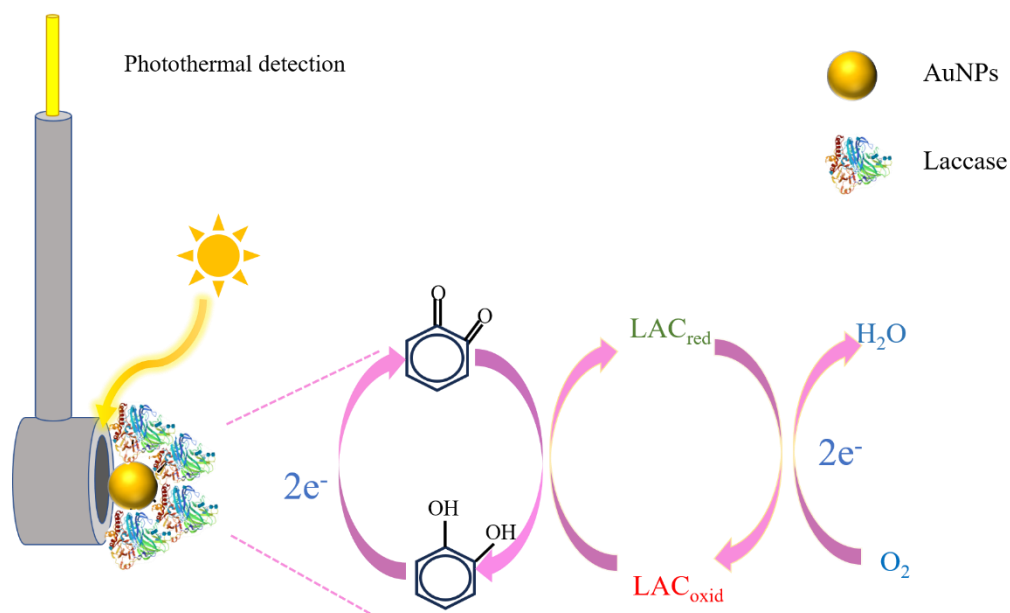


图 3-1 AuNPs-lac 生物传感器对邻苯二酚的电催化原理示意图

Fig. 3-1. Schematic diagram of electrocatalysis of catechol by AuNPs-lac biosensor.

3.3 结果与讨论

3.3.1 AuNPs 的 TEM、EDX 表征及分析

通过 TEM 测试探究 AuNPs 的形貌与结构、大小。如图 3-2(a)所示，AuNPs 整体呈球形，大小大致均一，平均直径约为 20 nm。图 3-2(b)是 Au 原子的元素映射图，显示了 Au 原子的存在。以上可以证明我们成功地合成了 AuNPs。

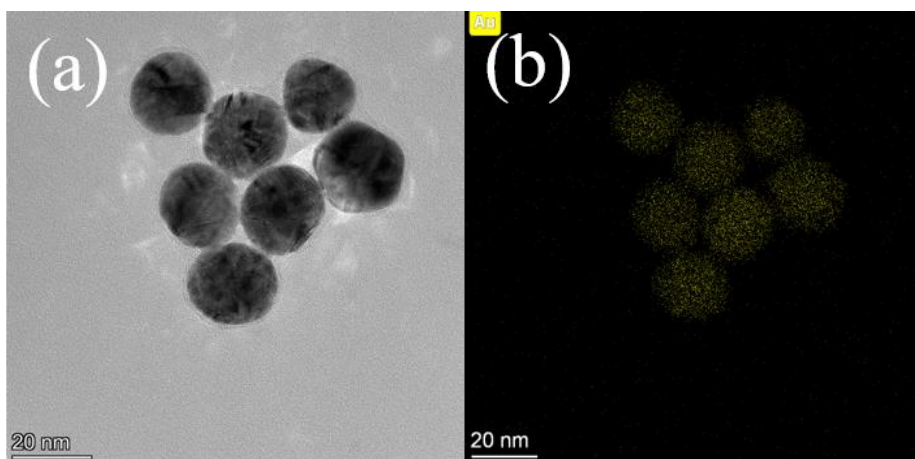


图 3-2 AuNPs 的(a)TEM 和(b)EDX

Fig. 3-2. AuNPs (a) TEM and (b) EDX.

3.3.2 AuNPs 的 FT-IR 表征及分析

通过 FTIR 光谱表征进一步研究 AuNPs 纳米粒子表面信息。通过对比 AuNPs 和 AuNPs-Lac 的 FTIR 光谱,如图 3-3 所示,观察到酰胺 I 在 1570 cm^{-1} (N-H, 弯曲振动)和酰胺 II 在 1647 cm^{-1} (C=O, 拉伸)的特征吸收带,以及羧酸盐在 1440 cm^{-1} 的对称拉伸振动,而上述特征峰的出现已被报道为蛋白质通过赖氨酸侧链^[86]固定,说明漆酶已被固定在 AuNPs 上。

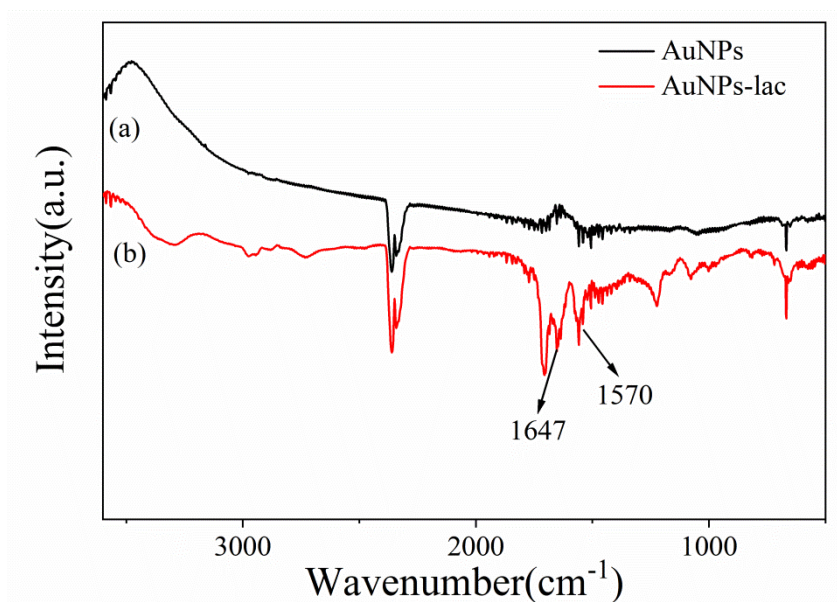


图 3-3 (a)AuNPs 和(b)AuNPs-lac 的 FT-IR 谱图

Fig. 3-3. FT-IR spectrum of (a)AuNPs and (b)AuNPs-lac.

3.3.3 AuNPs 的电化学性能表征及分析

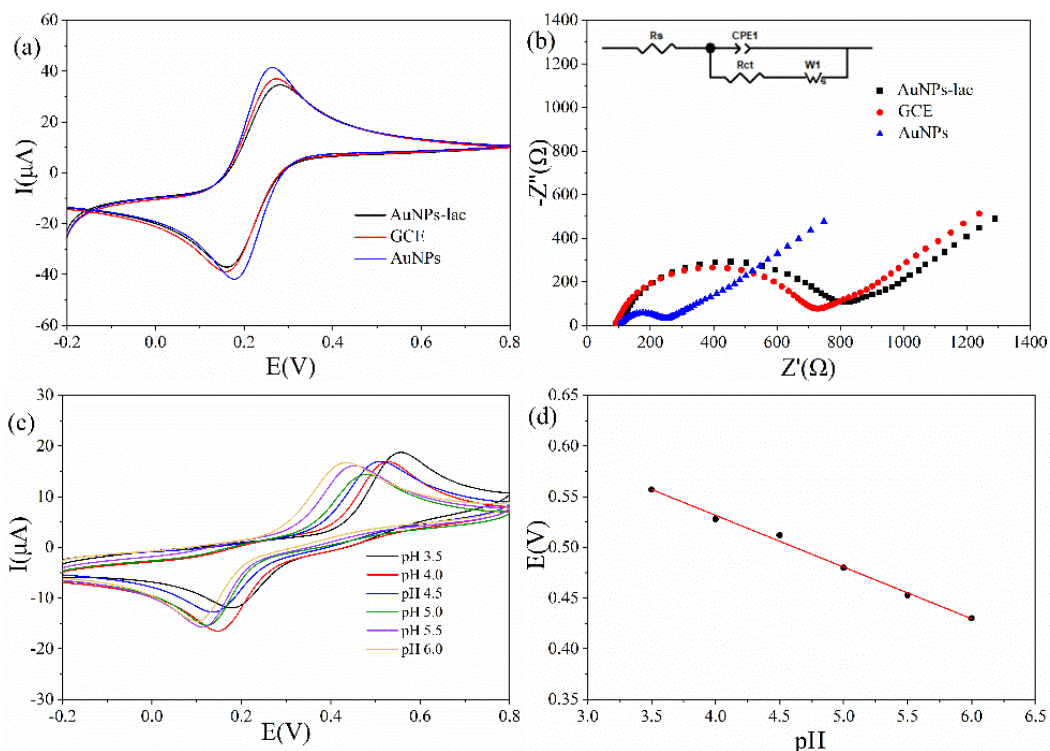


图 3-4 (a) AuNPs、GCE 和 AuNPs-lac 电极的 CV 曲线和(b) Nyquist 图(在 5 mM $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 和 0.1 M KCl 溶液中测量), (c) AuNPs-lac 电极在 0.2 M 含 600 μM 邻苯二酚的醋酸缓冲溶液中的 CV 曲线, (d)氧化峰电位随 pH 值的变化图。扫描速率: 100 $mV \cdot s^{-1}$ 。

Fig. 3-4. (a) CV curves and (b) Nyquist plots of AuNPs, GCE, and AuNPs-lac electrodes (measurement in a 0.1 M KCl solution containing 5 mM $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$), (c) CV curves of AuNPs-lac electrode in a 0.2 M acetic acid buffer solution containing 600 μM catechol, and (d) the plot of the oxidation peak potentials versus pH values. Scan rate: 100 $mV \cdot s^{-1}$.

为了探究修饰电极的电催化特性, 采用了循环伏安(CV)和电化学阻抗谱(EIS)进行表征。图 3-4a 对比展示了 AuNPs-lac、GCE 和 AuNPs 电极在含有 0.1 M KCl 的 5 mM $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 溶液中进行的 CV 测试。GCE 对应的 CV 曲线的阳极峰值电流为 42.30 μA , 阴极峰值电流为 -43.25 μA , 峰值电位差(ΔE_p)为 0.117 V。与使用 AuNPs 修饰电极相比, CV 扫描显示 I_{pa} (47.00 μA)和 I_{pc} (-47.72 μA)增加。另外, 由于阳极峰值电流的负电位移和阴极峰值电流的正电位移, 观察到 ΔE_p 值减小至 0.085 V。AuNPs-lac 的电流峰随后下降, 这是由于

漆酶的非导电性质和交联剂阻碍了电子转移过程, 表明酶固定在金纳米粒子中[50]。

在含有 5 mM $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 的 0.1 M KCl 溶液中, 对各修饰电极进行 EIS 测量。测试结果以 Nyquist 图的形式展示在图 3-4b 中。结果表明, GCE 具有较高的 Rct 值(727 Ω), 在裸电极上沉积 AuNPs 后, 由于加速了界面电子转移, 电荷转移电阻(Rct)降低约为 300 Ω , 然而, 将 AuNPs-lac 固定在电极表面后, Rct 值(845.4 Ω)有所增加。这是由于固定化酶具有较高的电子传递阻力和较弱的导电性[50]。CV 结果也证实了这一点。这些结果表明我们已经成功地将漆酶固定在 AuNPs 上。

3.3.4 AuNPs-lac 生物传感器实验条件优化

在含有 600 μM 邻苯二酚的 0.2M 醋酸缓冲溶液中, 通过 CV 系统研究 pH 对生物传感器的影响。这些溶液的 pH 值范围为 3.5-6.0。从图 3-4c 可以看出, 漆酶生物传感器在 pH=3.5 时呈现最大氧化峰电流值, 高于该 pH 时氧化峰电流逐渐下降。这种现象源于在该 pH 范围内, 电流响应最大的邻苯二酚氧化还原过程发生得更快。图 3-4d 显示了阳极峰电位与 pH 值增加之间具有强线性相关性, 表明质子在生物传感器的初级反应过程中有重要作用, 其中包括固定化漆酶以催化氧还原为水。

3.3.5 电极反应动力学研究

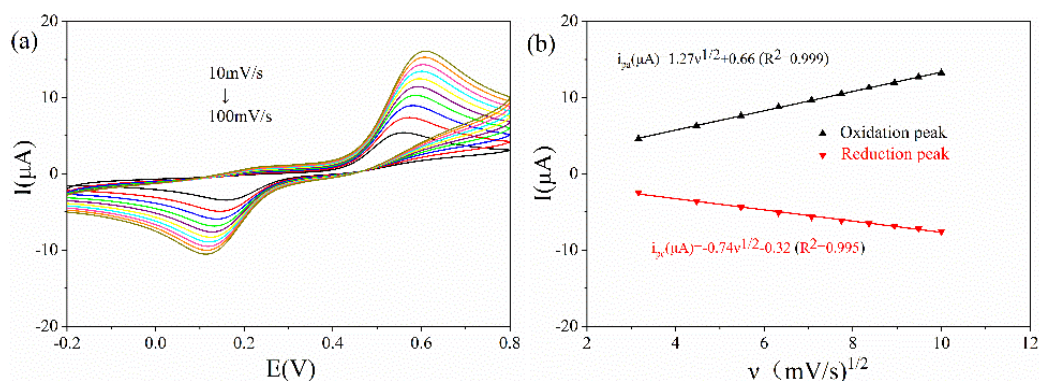


图 3-5 (a)在含 600 μM 邻苯二酚的 0.2 M 醋酸缓冲溶液(pH = 3.5)中 10-100 $mV \cdot s^{-1}$ 不同扫描速率下 AuNPs-lac 生物传感器的 CV 曲线, (b)峰值电流与扫描速率平方根的关系曲线。

Fig. 3-5. (a) CV curves of AuNPs-lac biosensor in 0.2 M acetic acid buffer solution (pH = 3.5) containing 600 μM catechol at various scan rates of 10-100 $mV \cdot s^{-1}$, and (b) the plot of the peak current versus square root of the scan.

为了研究邻苯二酚在 AuNPs-lac 生物传感器上的电化学反应机理, 通过 CV 在 0.2 M (pH = 3.5) 含有 600 μM 邻苯二酚(扫描速率 10-100 mV s^{-1})的醋酸缓冲溶液(pH = 3.5)中研究了动力学性质和电极界面的控制因素。如图 3-5a 所示, 随着扫描速率从 10 mV s^{-1} 到 100 mV s^{-1} 的增加, 峰值电流逐渐增强, 而氧化还原峰电位分别向正负方向移动。从图 3-5b 可以看出, 氧化峰和还原峰的峰值电流与扫描速率的平方根呈线性关系($I_{pa}=1.27v^{1/2}+0.66$, $R^2=0.999$; $I_{pc}=-0.74v^{1/2}-0.32$, $R^2=0.995$), 证实邻苯二酚的电化学氧化是一个线性扩散过程。

3.3.6 AuNPs-lac 生物传感器的抗干扰性、耐储存稳定性、重现性探究

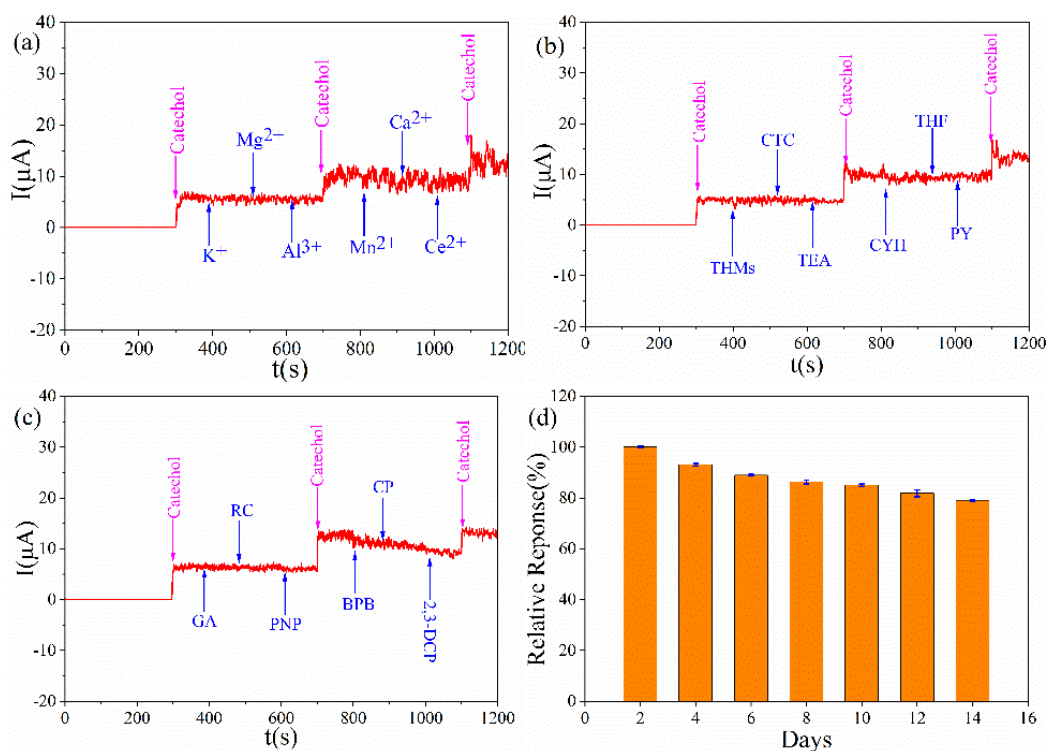


图 3-6 AuNPs-lac 生物传感器(a)金属离子耐受性, (b) 有机溶剂耐受性, (c)抗干扰性, (d)储存稳定性(4°C储存)。

Fig. 3-6. AuNPs-lac biosensor (a) resistance to metal ions, (b) resistance to organic solvents, (c) resistance to interference, (d) storage stability (4°C storage).

为了评估生物传感器对潜在干扰的响应的选择性, 通过 I-t 测量含有邻苯二酚和金属离子或有机物的二元溶液来进行评价。如图 3-6a 所示, 在 0.2 M 醋酸缓冲溶液依次加入 200 μM K^+ 、 Mg^{2+} 、 Al^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ce^{4+} , 对正在进行的

反应无明显变化,说明这些添加的金属离子无阻碍作用。另外,如图 3-6b,向 0.2 M 醋酸溶液中添加 16 μL 三氯甲烷(THMs)、四氯化碳(CTC)、三乙胺(TEA)、环己烷(CYH)、四氢呋喃(THF)、吡啶(PY),对电流响应无明显影响。这些结果表明, AuNPs-lac 对于有机化合物具有良好的耐受性。

为了评估 AuNPs-lac 的抗干扰能力和选择性,分别向 40 mL 醋酸缓冲液中加入 200 μM 邻苯二酚、愈创木酚(GA)、间苯二酚(RC)、对硝基苯酚(PNP)、双酚 B(BPB)、氯酚(CP)、2,3-二氯苯酚(2,3-DCP),并连续搅拌,如图 3-6c 所示。AuNPs-lac 在引入邻苯二酚后表现出快速而灵敏的反应。相反,干扰剂的加入并没有引起明显的安培响应。每次重新引入邻苯二酚后, AuNPs-lac 生物传感器都表现出迅速而灵敏的反应。这些结果表明, AuNPs-lac 生物传感器具有优异的抗干扰性和高选择性。此外, AuNPs-lac 的储存稳定性令人满意,14 天后其初始活性仍保持 79.1%,如图 3-6d 所示。优异的电化学性能表明, AuNPs-lac 生物传感器在实际应用中为邻苯二酚的检测提供了一种可靠的方法。

3.3.7 AuNPs-lac 生物传感器的响应性能

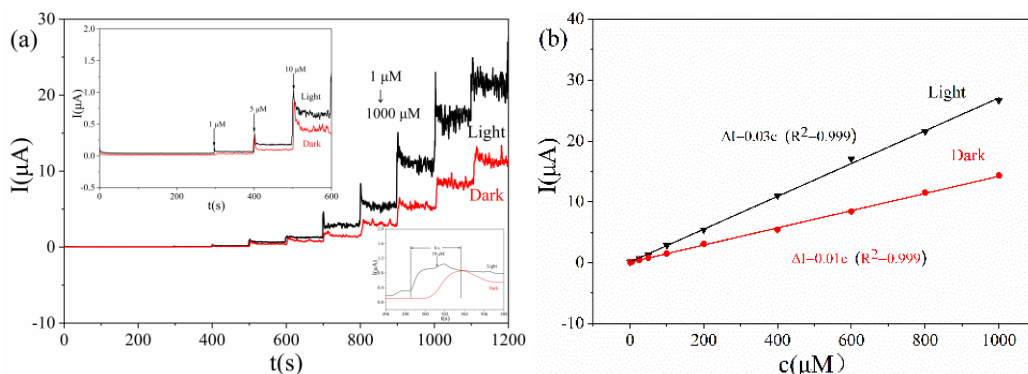


图 3-7 (a) AuNPs-lac 生物传感器对邻苯二酚的安培响应, (b)相应的校准图。光源: 980 nm 激光, $1 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$

Fig. 3-7. (a) Amperometric responses of AuNPs-lac biosensor to catechol, and (b) the corresponding calibration plot. Light. Source: 980 nm laser, $1 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$

图 3-7a 展示了连续添加邻苯二酚的 AuNPs-lac 在光照和黑暗条件下的安培反应对比。AuNPs-lac 生物传感器在加入邻苯二酚后表现出快速响应,突出了该生物传感器的有效性。此外,由于 AuNPs 通过光热转换提高了表面温度,从而增强了催化活性,因此在光照条件下的电流响应超过了在黑暗条件下的响应。

在光照和黑暗条件下, AuNPs-lac 生物传感器的电流与邻苯二酚浓度之间的线性关系如图 3-7b 所示。在黑暗条件下, 在 1 μM -1000 μM 的检测范围内, 检测限为 0.31 μM ($S/N = 3$), 而在光照条件下, 在 1 μM -1000 μM 的检测范围内, 检测限为 0.04 μM ($S/N = 3$), 表明通过光热检测 AuNPs-lac 生物传感器提高了灵敏度。

3.3.8 不同传感器检测邻苯二酚的效果对比

表 3-1 比较了 AuNPs-lac 与其他已报道传感器邻苯二酚的检测性能。结果表明, AuNPs-lac 的线性范围和检测限与已有的传感器相当。这一发现表明, AuNPs-lac 可以作为一种有效的光热生物传感器用于邻苯二酚的检测。

表 3-1 邻苯二酚传感器的比较

Table 3-1 Comparison of catechol sensors.

sensors	Analytic method	Linear range (μM)	Detection limit (μM)	Ref.
Lac/AP-rGOs/Chit/GCE	Electrochemistry	15-700	7	[87]
FYSSns-2-Lac/GCE	Electrochemistry	12.5-450	1.6	[88]
Lac- α -Fe ₂ O ₃ NC-CPE	Electrochemistry	8-800	4.28	[89]
Lac-Nafion ECNFs/GCE	Electrochemistry	1-1300	0.63	[90]
AuNP-MoS ₂ -Lac/GCE	Electrochemistry	2-2000	2	[16]
Lac/GC@B4C/AuNPs/NF	Electrochemistry	0.1-500	0.025	[48]
Ag-TiO ₂ /FGG	Electrochemistry	0.4-300	0.16	[91]
AuNPs-lac	Electrochemistry	1-1000	0.04	This work

3.3.9 AuNPs-lac 生物传感器实际水样测定邻苯二酚研究

表 3-2 AuNPs-lac 生物传感器光热法测定水样中邻苯二酚

Table 3-2 Photothermal determination of catechol in real water samples by AuNPs-lac

biosensor.				
Sample	Added (μM)	Found (μM)	RSD (%)	Recovery (%)
Yangtze River Water	0	Not detected	/	/

5	5.04	2.8	100.8
10	10.00	0	100.0
15	14.98	1.4	99.87

为了测试 AuNPs-lac 传感器测定邻苯二酚的实用性,对芜湖长江三号桥长江水样进行光热分析。为确保结果的准确性,采用了标准的加入法。通过在测试样品溶液中逐步引入已知数量的标准(邻苯二酚),并确保响应测量。回收率结果如表 3-2 所示,邻苯二酚的相对标准偏差(RSD)为 1.4%-2.8%,加样回收率为 99.87%-100.8%。验证了所提出的传感器在定量测试水样中邻苯二酚含量方面的准确性和可靠性,从而肯定了其在实际应用中的适用性。

3.4 小结

本工作介绍了将漆酶固定在 AuNPs 上用于邻苯二酚的光热检测。采用水热法合成 AuNPs 溶液,再经羧基化后与漆酶共价固定。AuNPs 提高了漆酶的操作稳定性和耐久性。实验结果表明,AuNPs-lac 生物传感器对金属离子和有机化合物具有优异的耐受性,并且具有显著的储存稳定性。AuNPs 的光热效应使得固定化漆酶作为快速检测对苯二酚的生物传感器显著提高检测性能。安培检测表明,与黑暗环境相比,光照显著提高了生物传感器检测的灵敏度。AuNPs-lac 生物传感器具有 $0.04\text{ }\mu\text{M}$ ($S/N = 3$)的低检测限和 $1\text{-}1000\text{ }\mu\text{M}$ 的宽响应范围。实际应用验证显示,AuNPs-lac 生物传感器在长江水样的光热分析中显示出可靠的结果,表明其在实际水样邻苯二酚检测中的环保应用潜力。

第4章 Carbon nanonets-Au-lac 光热传感器的制备及电化学传感性能研究

肾上腺素(EP)是一种重要的神经递质,对神经系统和糖原代谢有重要影响^[92-95]。它可以通过增加肝脏中的糖原分解和细胞中的脂肪代谢来提高血糖水平,为身体提供更多能量,从而加快心率、呼吸和血流量^[96-98]。许多疾病与肾上腺素浓度密切相关,如高血压、精神分裂症、阿尔茨海默病、帕金森病^[99-102]。研究表明,生物体液和神经组织中肾上腺素浓度是许多疾病的重要诊断依据,因此开发一种有效的肾上腺素含量监测方法至关重要^[103-105]。目前,已经报道了多种肾上腺素检测方法,如极谱法、毛细管电泳、光动力法、高效液相色谱法、流动进样法、质谱法^[106-114]。这些方法已经成功地用于肾上腺素的检测,但它们仍然存在一些不可避免的缺点,如仪器昂贵且体积大,检测方法耗时长,实验条件要求高^[115-118]。相比之下,电化学传感技术以其便携方便、操作简单、响应速度快等优点在众多检测方法中脱颖而出^[118]。

碳基材料与贵金属材料,由于二者具有高导电性和多用途的特殊属性,一直以来都是电极材料研究的主要焦点。值得注意的是,碳基材料与贵金属材料都具有光热转换特性。因此,二者的复合可协同增强彼此的导电性还可以提升将光能转化为热能的效率,从而提高了固定化漆酶的催化活性。基于此,本研究开发了用于固定化漆酶的 Carbon nanonets-Au 的合成。结果表明,Carbon nanonets-Au 显著提高了漆酶的操作稳定性和耐久性。性能测试显示,Carbon nanonets-Au-lac 生物传感器具有高灵敏度、对金属离子和有机化合物的耐受性强、优异的选择性和显著的储存稳定性。此外,进一步构建了 Carbon nanonets-Au-lac 生物传感器作为快速检测肾上腺素的光热生物传感器的功能。

4.1 实验试剂及仪器

4.1.1 主要实验试剂

阿拉丁生化科技股份有限公司:铁氰化钾(AR)、亚铁氰化钾(ACS)、氯化钾(AR)、冰醋酸(99.7%)、三水合乙酸钠(GR)、甲酰胺(ACS)、乙二胺(GC)、无水柠檬酸钠(AR)、四氯合金酸溶液(23.5%-23.8%)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙

基)碳二亚胺盐酸盐(98%)、N-羟基琥珀酰亚胺(98%)、乙腈(GR)、乙二醇(GC)、肾上腺素盐酸盐(98%)、尿酸(99%)、无水氯化钙(AR)、硫酸锰(AR)。

国药集团化学试剂有限公司：乙酸乙酯(AR)、丙酮(AR)、二氯甲烷(AR)、脲(AR)、葡萄糖(AR)、甘氨酸(AR)、L-色氨酸(BR)、N,N-二甲基甲酰胺(AR)、六水合硝酸锌(AR)、六水合氯化钴(AR)、六水合硝酸镍(AR)、硝酸铅(AR)、七水合硫酸镁(AR)、氯化钠(AR)。

上海麦克林生化科技有限公司：3-巯基丙酸(99%)。

北京百灵威科技有限公司：谷氨酸(98%)、DL-天冬氨酸(98%)。

广州番禺力强化工厂：柠檬酸(AR)。

4.1.2 主要实验仪器

透射电镜(FEI Talos F200S)、X 射线光电子能谱仪(XPS、Nexsa G2X)、傅里叶红外光谱(FT-IR、Thermo Scientific Nicolet iS20)、辰华电化学工作站 CHI760E。

4.2 实验方案

4.2.1 Carbon nanonets 的制备

首先，将 312.5 mg 柠檬酸和 0.5 mL 乙二胺混合在 20 mL 甲酰胺中，于 25°C 搅拌 20 min，超声分散 10 min。随后，将混合物转移到反应釜的内衬中，在 180°C 下进行水热反应 4 小时。冷却至室温后，使用 0.22 μm 膜过滤，随后使用纤维素酯膜(分子量截止值为 500 Da)在去离子水中透析纯化 12 小时，以去除未反应的甲酰胺和乙二胺。透析后的溶液 10000 rpm 离心 10 min，去除沉淀，4°C 保存为 Carbon nanonets 溶液。

4.2.2 Carbon nanonets-Au 的制备

向两颈烧瓶内加入 10 mL Carbon nanonets 溶液、40 mL 超纯水以及 5 μL 四氯合金酸溶液，持续加热搅拌，煮沸 5 min 后，滴加 1.875 mL 1 wt% 柠檬酸三钠，继续反应 15 min，得到 Carbon nanonets-Au 纳米材料。

4.2.3 Carbon nanonets-Au-lac 的合成

取 2 mL Carbon nanonets-Au 纳米材料，加入 20 μL 20 mM 巯基丙酸溶液，30°C 振荡 1h，即可获得所述羧基化 Carbon nanonets-Au 纳米材料。将巯基丙酸修饰的 Carbon nanonets-Au 纳米材料加入 40 mg EDC 和 NHS，30°C 反应 1h，即

可获得所述功能化 Carbon nanonets-Au 纳米材料。再向所获功能化 Carbon nanonets-Au 纳米材料中加入 200 μ L 漆酶溶液, 漆酶活性为 130 U/mL, 于 30 $^{\circ}$ C 振荡 1 h, 即可获得 Carbon nanonets-Au 固定化漆酶。

4.2.4 Carbon nanonets-lac 电极的制备

采用 0.3 μ m 氧化铝粉打磨抛光玻碳电极表面(直径为 3 mm), 再置放在超纯水和乙醇中超声清洗, 自然干燥。随后在玻碳电极(GCE)上沉积 6 μ L Carbon nanonets-Au-lac 溶液, 并在 4 $^{\circ}$ C 下干燥, 制备了 Carbon nanonets-Au-lac 电极。然后, 将 2 μ L 0.5 wt% Nafion 浇铸在 GCE 表面, 在 4 $^{\circ}$ C 下干燥。采用相同的方法制备了 Carbon nanonets-Au 电极。

4.2.5 漆酶电极检测肾上腺素原理

以肾上腺素为例, 电极表面催化机理描述如下(图 4-1): 在 Carbon nanonets-Au-lac 生物传感器表面施加光照, 提高载体表面温度, 进而增强漆酶活性。漆酶通过电子的转移来催化肾上腺素的氧化, 生成肾上腺素醌。而工作电极表面的高电导率有助于电子转移更容易的经过肾上腺素的氧化, 还原后的漆酶通过与氧的相互作用重新形成氧化后的漆酶, 并在此过程中产生水, 整个过程反应为电流。

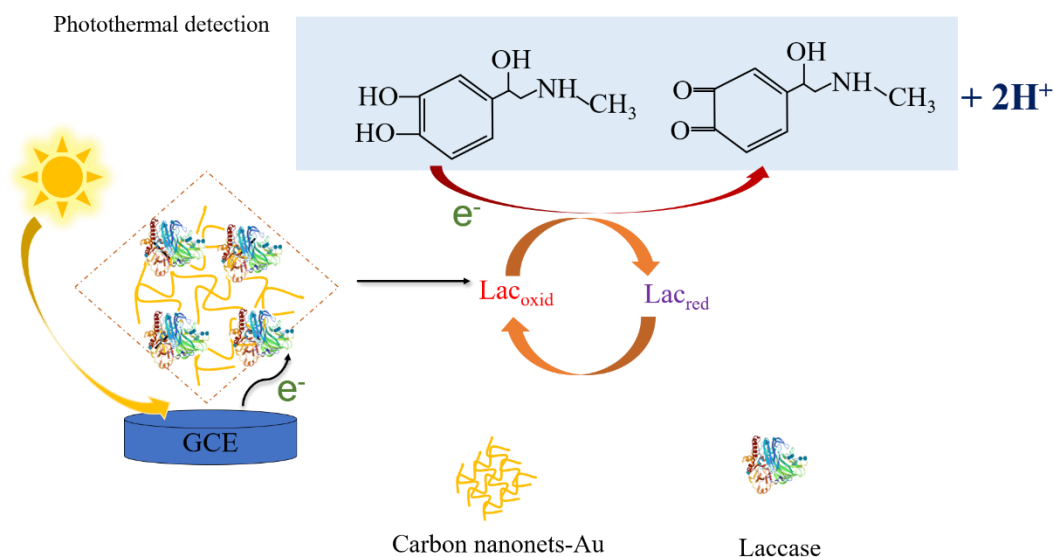


图 4-1 Carbon nanonets-Au-lac 生物传感器对肾上腺素的电催化原理示意图

Fig. 4-1. Schematic diagram of electrocatalysis of epinephrine by Carbon nanonets-Au-lac biosensor.

4.3 结果与讨论

4.3.1 Carbon nanonets-Au 的 TEM、EDX 表征及分析

通过 TEM 测试探究 Carbon nanonets-Au 的形貌与结构、大小。图 4-2a 为 Carbon nanonets-Au 的典型 TEM 图像，表明样品为直径为 10-20 nm。在图 4-2b 中没有观察到晶格条纹，而 AuNPs 作为无定形纳米颗粒分布在 Carbon nanonets 上，所以经过 TEM 分析，表明 Carbon nanonets-Au 在本质上是无定形的。Carbon nanonets-Au 的 EDX 图像如 4-3 所示，表明 C、N、O 和 Au 原子的存在，证实了 Carbon nanonets-Au 纳米复合材料的成功合成。

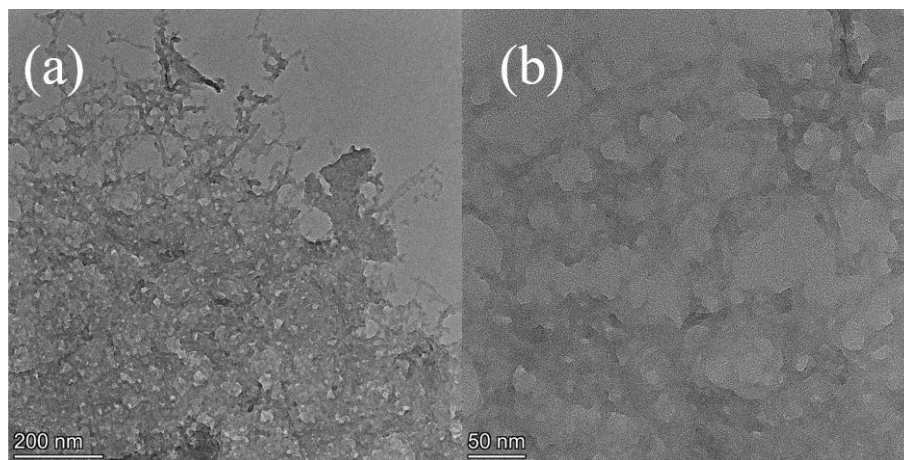
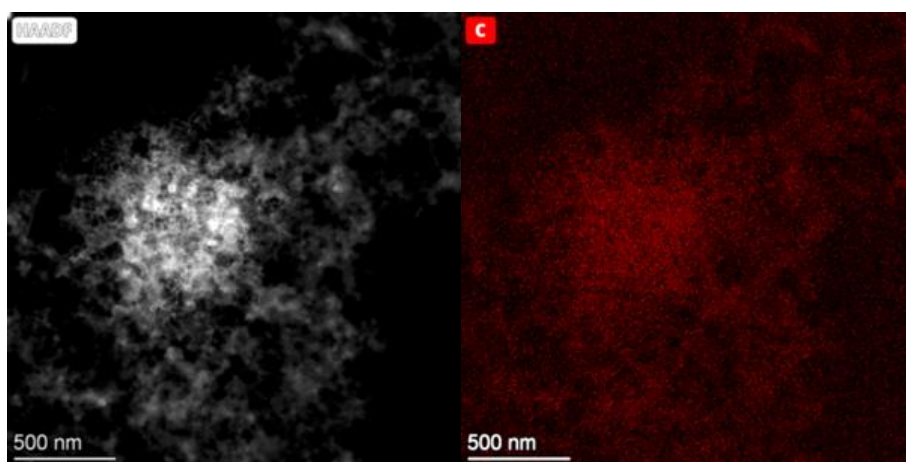


图 4-2 Carbon nanonets-Au 的(a)和(b)TEM

Fig. 4-2. Carbon nanonets-Au (a) and (b) TEM.



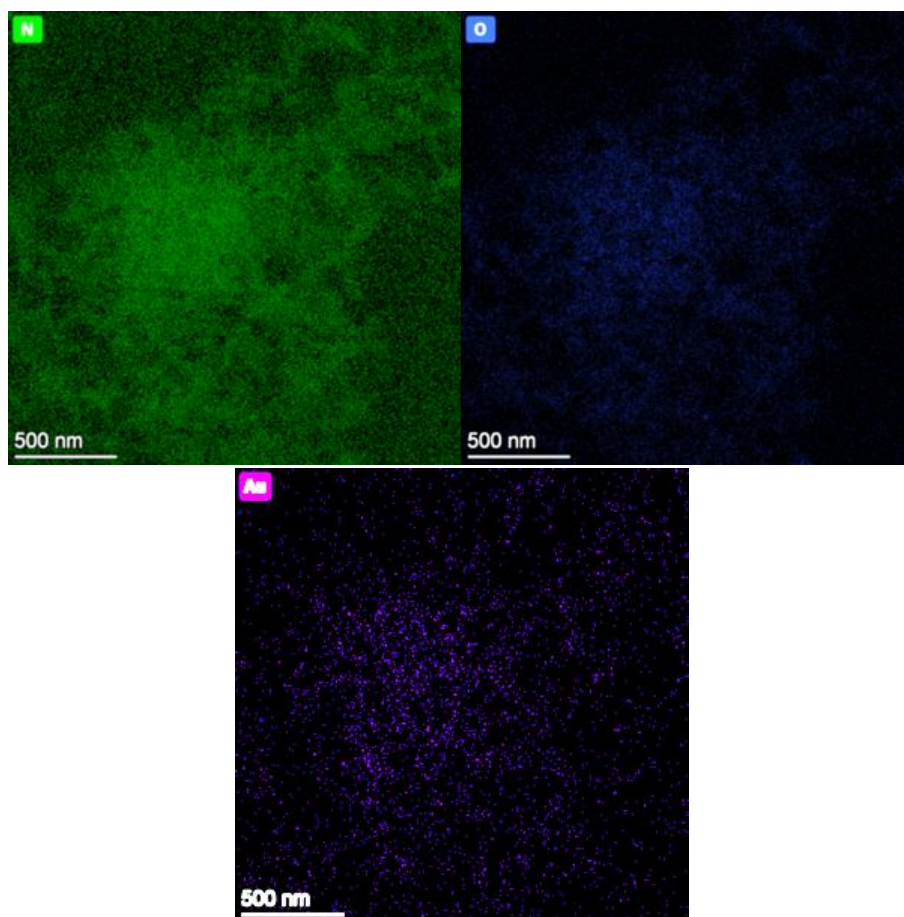


图 4-3 Carbon nanonets-Au 的 EDX

Fig. 4-3. EDX of Carbon nanonets-Au.

4.3.2 Carbon nanonets 的 FT-IR 表征及分析

通过 FT-IR 光谱进一步分析 Carbon nanonets、Carbon nanonets-Au 以及 Carbon nanonets-Au-lac 表面的官能团。如图 4-4 所示，FTIR 分析表明在 1641 和 1382 cm^{-1} 处附近的强吸收带分别归因于 -COO- 和 N-H 带中 C=O 的拉伸模式，在 3400-3100 cm^{-1} 处具有 O-H 和 N-H 拉伸振动的特征吸收带，表明 Carbon nanonets-Au 表面含有羧基。图 4-4c 显示新增了 2971 cm^{-1} (-C-H 键的拉伸)、1711 cm^{-1} (-C-O 键的拉伸) 等漆酶特征峰^[37, 39]，证实漆酶成功地固定在 Carbon nanonets-Au 复合纳米材料上。

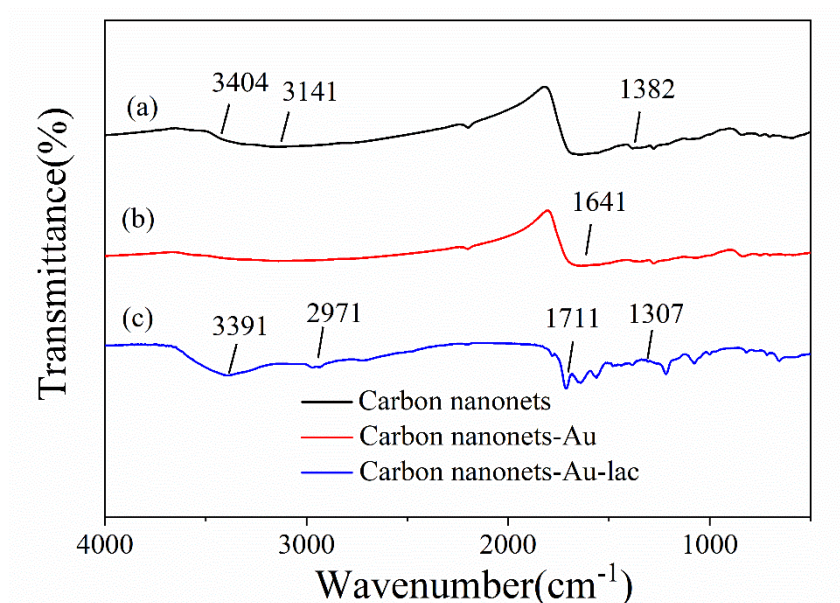


图 4-4 (a)Carbon nanonets (b)Carbon nanonets-Au 和 (c) Carbon nanonets-Au-lac 的 FT-IR 谱图

Fig. 4-4. FT-IR spectrum of (a) Carbon nanonets, (b) Carbon nanonets-Au and (c) Carbon nanonets-Au-lac.

4.3.3 Carbon nanonets 的 XPS 表征及分析

通过 XPS 分析进一步分析了 Carbon nanonets-Au 纳米复合材料中元素 C、N、O 和 Au 的组成。XPS 分析显示, Carbon nanonets-Au 的 C 1s 谱(图 4-5a)在 284.67、285.58 和 287.35 eV 处有三个峰, 分别归属于 C=C、C-N/C-OH 和 C=O 键中的 C 原子^[119]。在 N 1s 光谱(图 4-5b)中, 分别在 398.72、399.75 和 399.88 eV 处发现了对应于 C=N、C-N 和 N-H 键中的 N 原子的峰^[119, 120]。在 531.06 eV 和 532.70 eV 下, O 1s 峰可以看作是 O 在 C-OH 和 C=O 中的共同贡献^[119]。在 Au 4f 光谱中, 分别位于 83.73、84.50 和 87.31 以及 88.19 eV 处的特征峰对应于 Au 4f_{7/2} 和 Au 4f_{5/2}, 同时 Au 4f_{7/2} 处出现两个特征峰, 表明 Au(0)和 Au(1)同时存在^[121]。与 2.3.3 节 Carbon nanonets 的 XPS 数据对比表明 Carbon nanonets 的 XPS 分析数据相符, 这些结果表明, Carbon nanonets-Au 是由 C、N、O 和 Au 组成的。

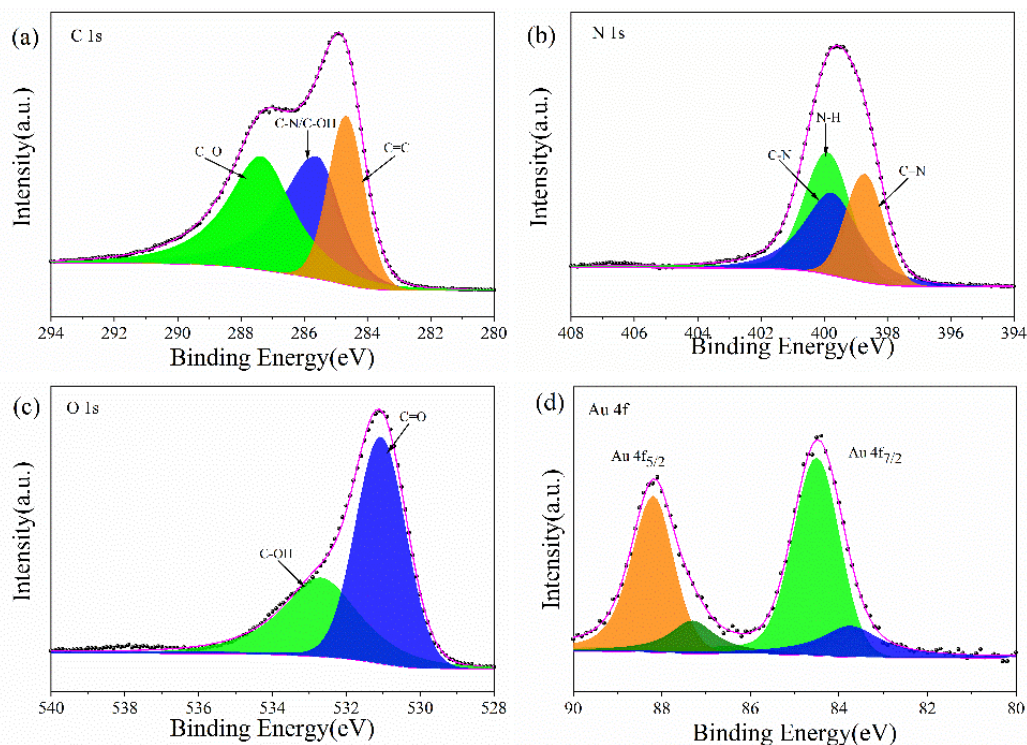


图 4-5 Carbon nanonets-Au 的 XPS 光谱。(a-d)C 1s、N 1s、O 1s 和 Au 4f 的高分辨率 XPS 光谱。

Fig.4-5. XPS spectra of Carbon nanonets-Au. (a-d) high-resolution XPS spectra of C 1 s, N 1 s, O 1 s and Au 4f.

4.3.4 Carbon nanonets-Au 电化学性能表征

利用循环伏安法(CV)研究修饰电极的电化学行为。图 4-6a 显示了 GCE、Carbon nanonets-Au 和 Carbon nanonets-Au-lac 修饰电极在含有 0.1 M KCl 的 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 中的 CV 曲线，每个电极都具有优异的氧化还原可逆性。在 GCE 表面观察到一对氧化还原峰，阳极峰电流(I_{pa})为 40.51 μA ，峰电位差(ΔE_p)为 0.112 V。Carbon nanonets 粒子修饰 GCE 表面后， I_{pa} 略有升高， ΔE_p 略有降低($I_{pa} = 50.00 \mu\text{A}$, $\Delta E_p = 0.079 \text{ V}$)，归因于 Carbon nanonets-Au 粒子加速了电子转移并提高了生物传感器的电催化性能。相比之下，使用 Carbon nanonets-Au-lac 导致 I_{pa} 降低， ΔE_p 升高($I_{pa} = 44.07 \mu\text{A}$, $\Delta E_p = 0.110 \text{ V}$)，这是因为漆酶充当非导电蛋白，影响电子转移^[58]。

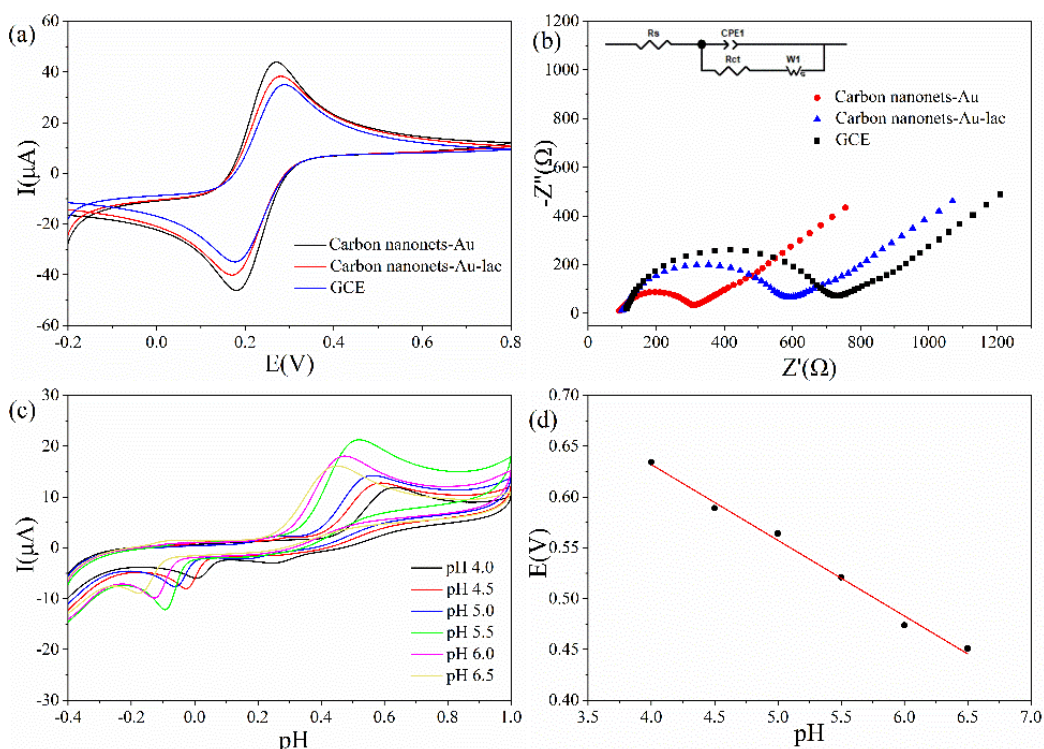


图 4-6 (a) GCE、Carbon nanonets-Au 和 Carbon nanonets-Au-lac 电极的 CV 曲线和(b) Nyquist 图(在 0.1 M 含 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 的 KCl 溶液中测量), (c) Carbon nanonets-Au-lac 电极在 0.2 M 含 400 μM 肾上腺素的醋酸缓冲溶液中的 CV 曲线, (d)氧化峰电位随 pH 值的变化图。扫描速率: $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

Fig. 4-6. (a) CV curves and (b) Nyquist plots of GCE, Carbon nanonets, and Carbon nanonets-lac electrodes (measurement in a 0.1 M KCl solution containing 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$), (c) CV curves of Carbon nanonets-Au-lac electrode in a 0.2 M acetic acid buffer solution containing 400 μM epinephrine, and (d) the plot of the oxidation peak potentials versus pH values. Scan rate: $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

利用电化学阻抗谱(EIS)技术研究了电极表面的电荷输运和电导率^[122]。图 4-6b 显示了 GCE、Carbon nanonets-Au 和 Carbon nanonets-Au-lac 修饰电极在含有 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 的 0.1 M KCl 溶液中的 Nyquist 图。等效电路拟合显示 GCE、Carbon nanonets-Au 和 Carbon nanonets-Au-lac 电极的电荷转移电阻(R_{ct})分别为 586、205 和 461 Ω 。与 GCE 电极相比, Carbon nanonets-Au 电极的 R_{ct} 值比它的 R_{ct} 值小, 表明电极表面与 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 探针之间的电子传递速率增强, 说明 Carbon nanonets-Au 纳米复合材料具有良好的导电性。由于漆酶的绝缘性,

Carbon nanonets-Au-lac 电极的 R_{ct} 值相对于 Carbon nanonets-Au 较大,证实了在修饰步骤中添加分子在电极表面产生了绝缘层。从 R_{ct} 分析中推断,界面电子转移中的屏障表明酶在 Carbon nanonets-Au 电极表面的组装,说明漆酶已经成功固定在 Carbon nanonets-Au 表面。

4.3.5 Carbon nanonets-Au-lac 生物传感器实验条件优化

酶的电催化活性高度依赖于周围环境的 pH 值,不同的 pH 值影响酶与基质之间的有效相互作用,并且 pH 值的变化也会影响肾上腺素与酶的结合或电极表面的电子转移动力学。高酸性或碱性条件可能导致电极材料腐蚀或降解,这会影响生物传感器的可靠性^[123]。为了研究 pH 值对电化学电位传感器性能的影响,系统测试了含有 400 μM 肾上腺素的不同 pH 值的醋酸缓冲溶液。数据分析显示,随着 pH 值的增加,生物传感器的氧化电流呈连续上升趋势,在 pH 值为 5.5 时达到峰值,随后在 5.5-6.5 范围内下降。因此, pH 值为 5.5 被确定为最佳 pH 条件,后续实验均在此 pH 值下进行(图 4-6c)。图 4-6d 显示了氧化峰电位与 pH 值增加之间的强烈线性相关性,表明质子在生物传感器的初级反应过程中有重要作用,其中包括固定化漆酶以催化氧还原为水。

4.3.6 电极反应动力学研究

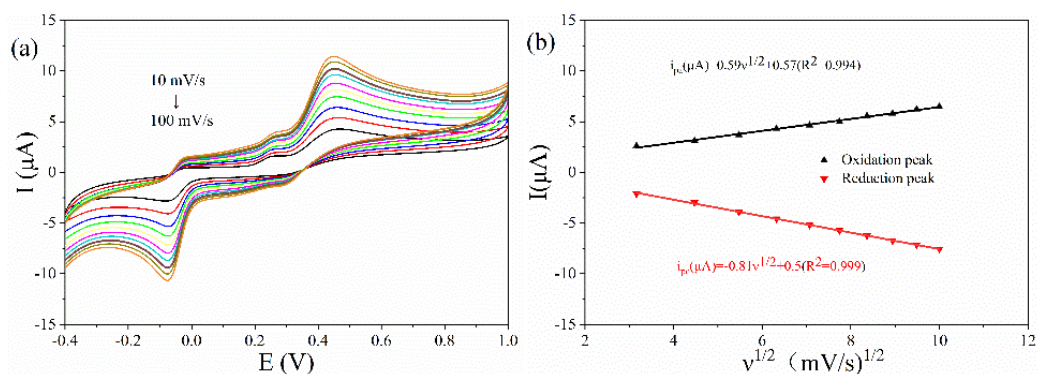


图 4-7 (a)在含 400 μM 肾上腺素的 0.2 M 醋酸缓冲溶液(pH = 5.5)中 10-100 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ 不同扫描速率下 Carbon nanonets-Au-lac 生物传感器的 CV 曲线, (b)峰值电流与扫描速率平方根的关系曲线。

Fig. 4-7. (a) CV curves of Carbon nanonets-Au-lac biosensor in 0.2 M acetic acid buffer solution (pH = 5.5) containing 400 μM epinephrine at various scan rates of 10-100 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, and (b) the plot of the peak current versus square root of the scan rates.

为了进一步研究肾上腺素的电氧化动力学,采用循环伏安法在含 400 μM 肾上腺素的 0.2 M 醋酸缓冲溶液 (pH 5.5) 中进行测量,扫描速率范围为 10-100 mV/s。如图 4-6a 所示,氧化还原峰电流响应随扫描速率的升高而增大,阳极峰电位向正方向移动,而相应的阴极峰电位向负方向移动。图 4-6b 所示的拟合结果显示了阳极和阴极的峰值电流模式与扫描速率之间的相关性($I_{pa} = 0.59v^{1/2} + 0.57$, $R^2 = 0.994$; $I_{pc} = -0.81v^{1/2} + 0.50$, $R^2 = 0.999$), 其中 I_{pa} 和 I_{pc} 分别表示阳极峰和阴极峰电流值(μA), v 表示扫描速率($\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$)。线性相关表明肾上腺素在 Carbon nanonets-Au-lac 电极上的电氧化是一个扩散控制过程^[124]。

4.3.7 Carbon nanonets-Au-lac 生物传感器的抗干扰性、耐储存稳定性、稳定性、重现性探究

一般来说,生物传感器经常受到肾上腺素样品中污染物的影响。为了评估 Carbon nanonets-Au-lac 的耐久性,通过将污染物引入检测系统,研究了金属离子和有机化合物对 Carbon nanonets-Au-lac 生物传感器的抑制作用。如图 4-8a 所示,在醋酸缓冲液(40 mL)中加入 200 μM Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Pb^{2+} , 对肾上腺素电氧化反应没有明显影响,说明这些添加的金属离子对反应没有阻碍作用。此外,将 16 μL 乙二醇(EG)、乙腈(MeCN)、二氯甲烷(DCM)、丙酮(Ace)、乙酸乙酯(EtOAc)、N, N-二甲基甲酰胺(DMF)依次添加到含有 200 μM 肾上腺素的 40 mL 醋酸缓冲溶液中,对电流响应没有显著影响。这些结果表明,Carbon nanonets-Au-lac 对有机化合物具有良好的耐受性。Carbon nanonets-Au-lac 生物传感器的优异抗干扰性能归因于 Carbon nanonets-Au 的保护作用,从而增强了漆酶的稳定性和对添加污染物的抵抗力。

为了评估 Carbon nanonets-Au-lac 的抗干扰能力和选择性,将 200 μM 肾上腺素(EP)、尿酸(UA)、葡萄糖 (GL)、尿素 (U)、谷氨酸(Glu)、甘氨酸(Gly)、色氨酸(Trp)和天冬氨酸(ASP)依次引入 40 mL 醋酸缓冲液中,并连续搅拌,如图 4-8c 所示。Carbon nanonets-Au-lac 在引入肾上腺素后表现出快速而敏感的反应。相反,干扰剂的加入未引发显著电流信号,进一步验证了传感器的抗干扰能力。每次重新引入肾上腺素后,Carbon nanonets-Au-lac 生物传感器都表现出迅速而敏感的反应。这些结果表明,Carbon nanonets-Au-lac 生物传感器具有优异的抗干扰性和高选择性。此外,Carbon nanonets-Au-lac 的储存稳定性令人满意, 14

天后其初始活性仍保持 88.1%，如图 4-8d 所示。对于以相同方式制备的 8 个独立传感器，肾上腺素检测的相对标准偏差仅为 2.23%(见图 4-8e)。这些结果表明，基于 Carbon nanonets-Au 的漆酶传感器在肾上腺素检测中具有良好的选择性、稳定性和重复性。

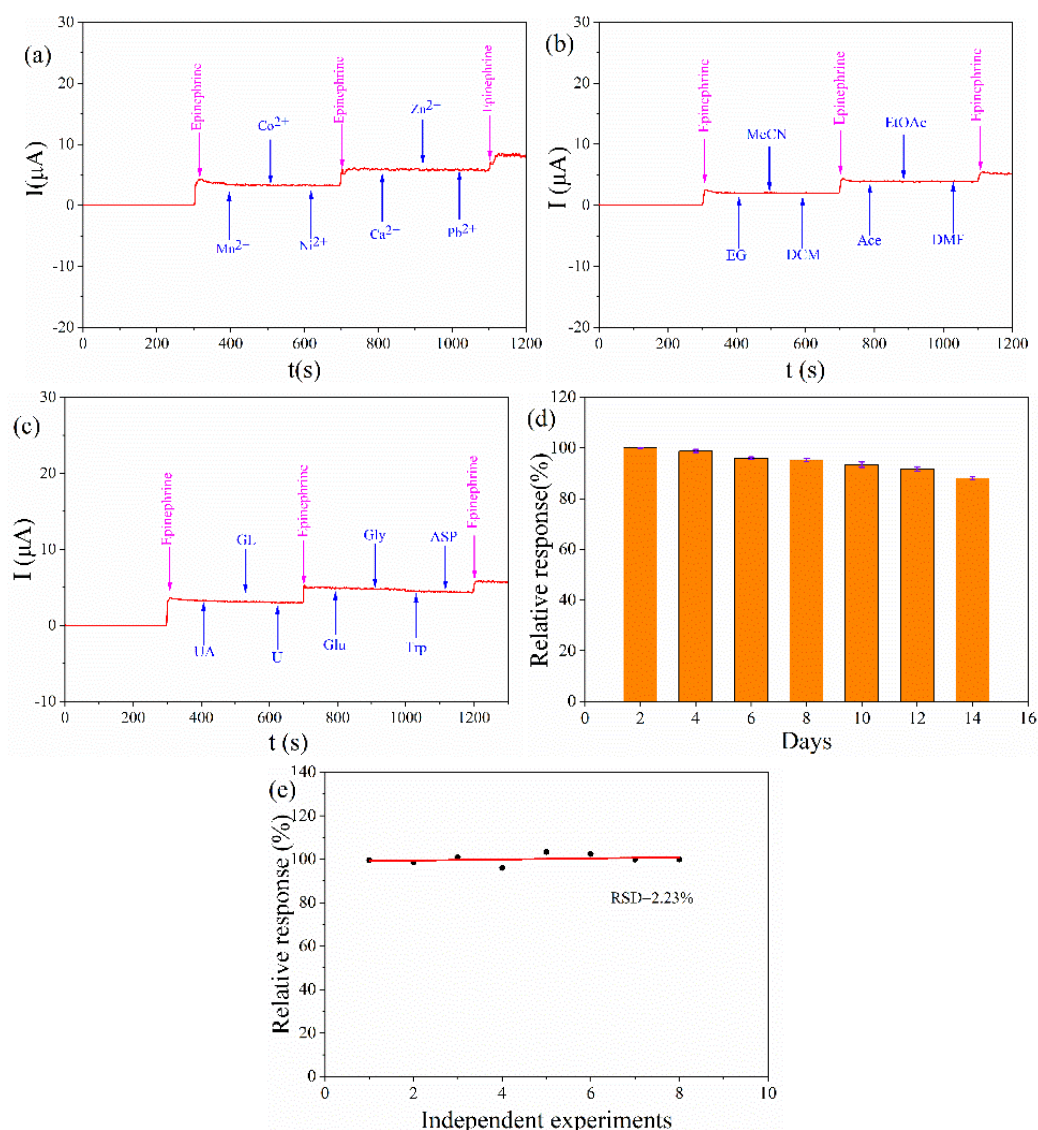


图 4-8 Carbon nanonets-Au-lac 生物传感器(a)金属离子耐受性, (b)有机溶剂耐受性, (c)抗干扰性, (d)储存稳定性(4℃储存), (e)重现性。

Fig. 4-8. Carbon nanonets-Au-lac biosensor (a) resistance to metal ions, (b) resistance to organic solvents, (c) resistance to interference, (d) storage stability (4℃ storage), (e) reproducibility.

4.3.8 Carbon nanonets-Au-lac 生物传感器的响应性能

采用安培法(计时电流法, I-t 曲线)评估 Carbon nanonets-Au-lac 对肾上腺素

的响应。图 4-9a 所示为连续添加肾上腺素的 Carbon nanonets-Au-lac 在光照和黑暗条件下的安培反应对比。Carbon nanonets-Au-lac 生物传感器在加入肾上腺素后表现出快速响应，突出了该生物传感器的有效性。值得注意的是，由于 Carbon nanonets-Au 通过光热转换提高了表面温度，从而增强了催化活性，因此在光照条件下的电流响应超过了在黑暗条件下的响应。在光照和黑暗条件下，Carbon nanonets-Au-lac 生物传感器的电流与肾上腺素浓度之间的线性关系如图 4-9b 所示。在 1-1000 μM 的线性范围内，黑暗和光照条件下的检测限分别为 0.23 μM 和 0.053 μM ($S/N = 3$)，表明通过光热检测 Carbon nanonets-Au-lac 生物传感器提高了灵敏度。

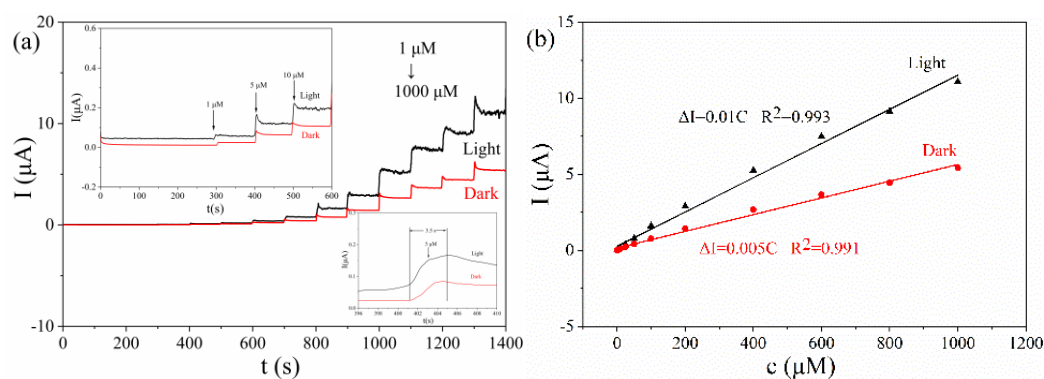


图 4-9 (a)Carbon nanonets-Au-lac 生物传感器对肾上腺素的安培响应，(b)相应的校准图。

光源：980 nm 激光， $1 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$

Fig. 4-9. (a) Amperometric responses of Carbon nanonets-Au-lac biosensor to epinephrine, and (b) the corresponding calibration plot. Light. Source: 980 nm laser, $1 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$

4.3.9 不同传感器检测肾上腺素的效果对比

表 4-1 比较了 Carbon nanonets-Au-lac 与其他已报道传感器肾上腺素的检测性能。结果表明，Carbon nanonets-Au-lac 的线性范围和检测限与已有的传感器相当，说明肾上腺素传感器的成功开发。

表 4-1 肾上腺素传感器的比较

Table 4-1 Comparison of epinephrine sensors.

sensors	Analytic method	Linear	Detection	Ref.
		range (μM)	limit (μM)	
MoS ₂ /MW-CNTs/GCE	Electrochemistry	9.9-137.9	3	[125]

MGO/GCE	Electrochemistry	100-600	0.13	[126]
APT-BDD	Electrochemistry	1-100	0.27	[127]
GCE/PANI/NiO	Electrochemistry	50-1000	0.05	[128]
NiO-rGO/GCE	Electrochemistry	50-1000	10	[129]
Au-MWCNT-PANI-TiO ₂	Electrochemistry	4.9-76.9	0.16	[130]
Lac/GC@B4C/NF	Electrochemistry	0.1-2600	0.04	[35]
Carbon nanonets-Au-lac	Electrochemistry	1-1000	0.053	This work

4.3.10 Carbon nanonets-Au-lac 生物传感器实际水样测定肾上腺素研究

通过对人工配置的尿液进行光热分析,评价了 Carbon nanonets-Au-lac 生物传感器的实际应用。表 4-2 为 Carbon nanonets-Au-lac 生物传感器的检测结果,显示人工尿液中最初不存在肾上腺素。在加入不同浓度的肾上腺素后, Carbon nanonets-Au-lac 生物传感器显示出可检测的肾上腺素含量水平。肾上腺素的相对标准偏差(RSD)为 2.12%-3.53%,加样回收率为 99.5%-100.6%。这些结果表明, Carbon nanonets-Au-lac 生物传感器适用于实际水样中肾上腺素的光热检测。

表 4-2 Carbon nanonets-Au-lac 生物传感器光热法测定人工尿液中肾上腺素

Table 4-2 Photothermal determination of epinephrine in synthetic urine samples by Carbon nanonets-Au-lac biosensor.

Sample	Added (μM)	Found (μM)	RSD (%)	Recovery (%)
Synthetic Urine	0	Not detected	/	/
	5	5.03	2.12	100.6
	10	9.95	3.53	99.5
	15	14.97	2.12	99.8

4.4 小结

本工作介绍了将漆酶固定在 Carbon nanonets-Au 上用于肾上腺素的光热检测。通过水热法合成 Carbon nanonets 粗产品，经过滤、纯化、离心处理后获得高纯度的 Carbon nanonets 溶液，再将金原位还原负载在 Carbon nanonets，最后经羧基化后与漆酶共价固定。Carbon nanonets-Au 提高了漆酶的可操作性和耐久性。实验结果表明，Carbon nanonets-Au-lac 生物传感器对金属离子和有机化合物具有优异的耐受性，并且具有显著的储存稳定性。Carbon nanonets-Au 的光热效应使得固定化漆酶作为快速检测肾上腺素的生物传感器有效地发挥作用。安培检测表明，与黑暗环境相比，光照显著提高了生物传感器检测的灵敏度。该生物传感器具有 $0.053\ \mu\text{M}$ ($S/N = 3$) 的低检测限和 $1\text{-}1000\ \mu\text{M}$ 的宽响应范围。最重要的是，Carbon nanonets-Au-lac 生物传感器在人工尿液的光热分析中显示出可靠的结果，表明其在实际水样肾上腺素检测中的医学应用潜力。

总结与展望

漆酶是一种具有四个铜中心的氧化酶，广泛应用于生物修复、生物传感等领域。该酶广泛分布于细菌、真菌和植物中，对酚类化合物表现出特定的活性。然而在实际应用中，游离漆酶的操作效率不高，稳定性有限，阻碍了其在生物传感领域的应用。通过电极表面固定化策略可显著提升生物传感器工作效率和耐用性，然而，固定化可能导致漆酶活性降低，从而降低生物传感器的灵敏度。因此，开发同时保持高活性和稳定性的固定化漆酶是实现生物传感应用的必要条件。本研究设计开发了三种具有良好导电性和光热转换能力的载体材料，建立了一种快速有效地用于光热增强检测酚类化合物的漆酶基安培传感器。主要内容如下：

(1) 通过水热法合成 Carbon nanonets 粗产品，经系列纯化处理(过滤、离心等)获得高纯度的 Carbon nanonets 溶液并与漆酶固定化，成功制备出固定化的漆酶纳米材料，并进一步组装为漆酶电极。该 Carbon nanonets 生物传感器对对苯二酚具有响应快速(5 s 达到稳态)的特点，同时具有优异的灵敏度、对金属离子和有机化合物的良好耐受性、优异的选择性和储存稳定性。得益于 Carbon nanonets 优异的光热转换效应，Carbon nanonets-lac 生物传感器经系统验证可作为用于对苯二酚检测的光热生物传感器。Carbon nanonets-lac 生物传感器在光照下具有高灵敏度的电流响应，检测限低至 $0.14\ \mu\text{M}$ ($S/N = 3$)，响应范围为 $1\text{--}1000\ \mu\text{M}$ 。此外，在实际应用验证方面 Carbon nanonets-lac 生物传感器在自来水和长江水样的光热分析中表现出可靠的性能，突出了其在检测实际水样中有毒化合物污染方面的实际应用价值。

(2) 利用水热法合成了金纳米粒子(AuNPs)，并与漆酶进行共价结合，成功制备出固定化的漆酶纳米材料，并进一步组装为漆酶电极。该 AuNPs 生物传感器对邻苯二酚具有快速响应的特点，同时具有优异的灵敏度、对金属离子和有机化合物的良好耐受性、优异的选择性和储存稳定性。得益于 AuNPs 优异的光热效应，AuNPs -lac 生物传感器经系统验证可作为用于邻苯二酚检测的光热生

物传感器。Carbon nanonets-lac 生物传感器在光照下具有高灵敏度的电流响应，检测限低至 $0.04\ \mu\text{M}$ ($S/N = 3$)，响应范围为 $1\text{-}1000\ \mu\text{M}$ 。此外，AuNPs-lac 生物传感器在自来水和长江水样的光热分析中表现出可靠的性能，突出了其在检测实际水样中有毒化合物污染方面的实际应用价值。

(3) 通过水热法合成 Carbon nanonets 粗产品，经系列纯化处理(过滤、离心等)后获得高纯度的 Carbon nanonets 溶液。随后，通过原位还原法将金纳米材料负载于 Carbon nanonets 上，成功制备出 Carbon nanonets-Au 复合材料，并与漆酶结合，最终制备出固定化的漆酶纳米材料，并进一步组装为漆酶电极。该 Carbon nanonets-Au 生物传感器对肾上腺素具有快速响应的特点，同时具有优异的灵敏度、对金属离子和有机化合物的良好耐受性、优异的选择性和储存稳定性。得益于 Carbon nanonets-Au 优异的光热效应，Carbon nanonets-Au-lac 生物传感器被经系统验证可作为用于肾上腺素检测的光热生物传感器。Carbon nanonets-Au-lac 生物传感器在光照下具有高灵敏度的电流响应，检测限低至 $0.053\ \mu\text{M}$ ($S/N = 3$)，响应范围为 $1\text{-}1000\ \mu\text{M}$ 。此外，Carbon nanonets-Au-lac 生物传感器在人工尿液的光热分析中表现出可靠的性能，突出了其在检测实际水样中神经递质方面的实际应用价值。

综上所述，以上三种不同材料载体固定化漆酶，均可有效改善游离漆酶存在的不足，提高了酶的稳定性、催化活性以及耐储存稳定性。通过载体材料固定化漆酶用于酚类化合物的光热检测,载体材料提高了漆酶的操作稳定性和使用寿命。基于不同载体的固定化策略使漆酶生物传感器对金属离子和有机化合物具有优异的耐受性，并且具有显著的储存稳定性。载体材料的光热效应使得固定化漆酶作为快速检测酚类化合物的生物传感器检测性能有了显著提升。安培检测表明，与黑暗环境相比，光照显著提高了生物传感器检测的灵敏度。固定化漆酶生物传感器具有低检测限和宽响应范围。实际应用验证表明，固定化漆酶生物传感器在真实水样的光热分析中显示出可靠的结果，证实了该技术在真实水样酚类化合物检测中的应用潜力。

参考文献

- [1] Bilal M, Rasheed T, Nabeel F, et al. Hazardous contaminants in the environment and their laccase-assisted degradation-A review [J]. J Environ Manage, 2019, 234: 253-64.
- [2] Adav S S, Chen M-Y, Lee D-J, et al. Degradation of phenol by *Acinetobacter* strain isolated from aerobic granules [J]. Chemosphere, 2007, 67(8): 1566-72.
- [3] Calace N, Nardi E, Petronio B M, et al. Adsorption of phenols by papermill sludges [J]. Environmental Pollution, 2002, 118(3): 315-9.
- [4] Liu S, Wang J, Huang W, et al. Adsorption of phenolic compounds from water by a novel ethylenediamine rosin-based resin: Interaction models and adsorption mechanisms [J]. Chemosphere, 2019, 214: 821-9.
- [5] Malinowski S, Wardak C, Jaroszyńska-Wolińska J, et al. New electrochemical laccase-based biosensor for dihydroxybenzene isomers determination in real water samples [J]. Journal of Water Process Engineering, 2020, 34: 101150.
- [6] Evli S, Uygun D A. Amperometric biosensor based on immobilized laccase onto Cys-Ag@Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for selective catechol detection [J]. Journal of Applied Electrochemistry, 2023, 53(8): 1687-700.
- [7] Sirajuddin, Bhanger M I, Niaz A, et al. Ultra-trace level determination of hydroquinone in waste photographic solutions by UV-vis spectrophotometry [J]. Talanta, 2007, 72(2): 546-53.
- [8] Patil S K, Patil S A, Vadiyar M M, et al. Tailor-made dicationic ionic liquid as a fluorescent sensor for detection of hydroquinone and catechol [J]. Journal of Molecular Liquids, 2017, 244: 39-45.
- [9] Li X, Ping J, Ying Y. Recent developments in carbon nanomaterial-enabled electrochemical sensors for nitrite detection [J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2019, 113: 1-12.
- [10] Ronkainen N J, Halsall H B, Heineman W R. Electrochemical biosensors [J]. Chemical Society Reviews, 2010, 39(5): 1747-63.
- [11] Banerjee P, Bhunia A K. Mammalian cell-based biosensors for pathogens and toxins [J]. Trends in Biotechnology, 2009, 27(3): 179-88.
- [12] Kara P, Erzurumlu Y, Kirmizibayrak P B, et al. Electrochemical aptasensor design for label free cytosensing of human non-small cell lung cancer [J]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2016, 775: 337-41.
- [13] Herrera-Domínguez M, Lim K, Aguilar-Hernández I, et al. Detection of Acetaminophen in Groundwater by Laccase-Based Amperometric Biosensors using MoS₂ Modified Carbon Paper Electrodes [J]. Sensors, 2023, 23(10): 4633.
- [14] Lopez-Tellez J, Ramirez-Montes S, Ferreira T A, et al. Application of Voltammetric Sensors for Pathogen Bacteria Detection: A Review [J]. Chemosensors, 2022, 10(10):424.
- [15] Fei J, Dou W, Zhao G. A sandwich electrochemical immunosensor for

- Salmonella pullorum and Salmonella gallinarum based on a screen-printed carbon electrode modified with an ionic liquid and electrodeposited gold nanoparticles [J]. *Microchimica Acta*, 2015, 182(13): 2267-75.
- [16] Zhang Y, Li X, Li D, et al. A laccase based biosensor on AuNPs-MoS₂ modified glassy carbon electrode for catechol detection [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2020, 186: 110683.
- [17] Baranwal J, Barse B, Gatto G, et al. Electrochemical sensors and their applications: a review [J]. *Chemosensors*, 2022, 10(9):363.
- [18] Crispi S, Nocito G, Nastasi F, et al. Development of a novel C-dots conductometric sensor for NO sensing [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2023, 390: 133957.
- [19] Braiek M, Djebbi M A, Chateaux J-F, et al. A conductometric sensor for potassium detection in whole blood [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2016, 235: 27-32.
- [20] Dhanjai, Yu N, Mugo S M. A flexible-imprinted capacitive sensor for rapid detection of adrenaline [J]. *Talanta*, 2019, 204: 602-6.
- [21] Lazanas A C, Prodromidis M I. Electrochemical Impedance Spectroscopy—A Tutorial [J]. *ACS Measurement Science Au*, 2023, 3(3): 162-93.
- [22] Mutreja R, Jariyal M, Pathania P, et al. Novel surface antigen based impedimetric immunosensor for detection of Salmonella typhimurium in water and juice samples [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 85: 707-13.
- [23] Madadelahi M, Romero-Soto F O, Kumar R, et al. Electrochemical sensors: Types, applications, and the novel impacts of vibration and fluid flow for microfluidic integration [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2025, 272.
- [24] Brondani D, De Souza B, S. Souza B, et al. PEI-coated gold nanoparticles decorated with laccase: A new platform for direct electrochemistry of enzymes and biosensing applications [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 42: 242-7.
- [25] Noreen S, Perveen S, Shafiq N, et al. Laccase-loaded functionalized graphene oxide assemblies with improved biocatalytic properties and decolorization performance [J]. *Environmental Technology & Innovation*, 2021, 24: 101884.
- [26] Uygun M, Asunción-Nadal V D L, Evli S, et al. Dye removal by laccase-functionalized micromotors [J]. *Applied Materials Today*, 2021, 23: 101045.
- [27] Ademakinwa A N. A heat-resistant intracellular laccase immobilized via cross-linked enzyme aggregate preparation: Characterization, application in bisphenol A removal and phytotoxicity evaluation [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 419: 126480.
- [28] Bassanini I, Ferrandi E E, Riva S, et al. Biocatalysis with Laccases: An Updated Overview [J]. *Catalysts*. 2021, 11(1):26.
- [29] Kolyadenko I, Scherbakova A, Kovalev K, et al. Engineering the catalytic properties of two-domain laccase from streptomyces griseoflavus Ac-993 [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022; 23(1):65.
- [30] Zovo K, Pupart H, Van Wieren A, et al. Substitution of the methionine axial ligand of the T1 copper for the fungal-like phenylalanine ligand (M298F) causes local structural perturbations that lead to thermal instability and reduced catalytic

- efficiency of the small laccase from streptomyces coelicolor A3(2) [J]. ACS Omega, 2022, 7(7): 6184-94.
- [31] Arregui L, Ayala M, Gómez-Gil X, et al. Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation [J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 200.
- [32] Sheldon R A, Van Pelt S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how [J]. Chemical Society Reviews, 2013, 42(15): 6223-35.
- [33] Bilal M, Anh Nguyen T, Iqbal H M N. Multifunctional carbon nanotubes and their derived nano-constructs for enzyme immobilization-A paradigm shift in biocatalyst design [J]. Coordination Chemistry Reviews, 2020, 422: 213475.
- [34] Li D, Cheng Y, Zuo H, et al. Dual-functional biocatalytic membrane containing laccase-embedded metal-organic frameworks for detection and degradation of phenolic pollutant [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2021, 603: 771-82.
- [35] Tang H, Cui M, Zhang M, et al. A graphitized carbon@boron carbide-mediated laccase-based amperometric biosensor for epinephrine detection [J]. Bioelectrochemistry, 2024, 155: 108591.
- [36] Li D, Yang J, Zhou J, et al. Direct electrochemistry of laccase and a hydroquinone biosensing application employing ZnO loaded carbon nanofibers [J]. RSC Advances, 2014, 4(106): 61831-40.
- [37] Rafaqat S, Raqba, Ali N, et al. Validating role of different enzymes (laccases and catalases) based voltammetric biosensors in detection of pesticide and dye [J]. Materials Chemistry and Physics, 2022, 290: 126545.
- [38] García-Morales R, García-García A, Orona-Navar C, et al. Biotransformation of emerging pollutants in groundwater by laccase from *P. sanguineus* CS43 immobilized onto titania nanoparticles [J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2018, 6(1): 710-7.
- [39] Guliya H, Lata S, Chaudhary R. Amperometric biosensor based on synthesised laccase nanoparticles covalently anchored onto gold electrode for phenol quantification in real samples [J]. Journal of Nanoparticle Research, 2024, 26(10): 225.
- [40] Lin X, Zhou Y, Lei Z, et al. Facile electrochemical biosensing platform based on laser induced graphene/laccase electrode for the effective determination of gallic acid [J]. Processes, 2023, 11(7):2048.
- [41] Lee Y-G, Liao B-X, Weng Y-C. Ascorbic acid sensor using a PVA/laccase-Au-NPs/Pt electrode [J]. RSC Advances, 2018, 8(66): 37872-9.
- [42] Verma S, Thakur D, Pandey C M, et al. Recent prospects of carbonaceous nanomaterials-based laccase biosensor for electrochemical detection of phenolic compounds [J]. Biosensors, 2023, 13(3):305.
- [43] Dinu A, Apetrei C. Quantification of tyrosine in pharmaceuticals with the new biosensor based on laccase-modified polypyrrole polymeric thin film [J]. Polymers, 2022, 14(3):441.
- [44] Dăscălescu D, Apetrei C. Development of a novel electrochemical biosensor based on organized mesoporous carbon and laccase for the detection of serotonin

- in food supplements [J]. *Chemosensors*, 2022, 10(9):365.
- [45] Wu R, Yu S, Chen S, et al. A carbon dots-enhanced laccase-based electrochemical sensor for highly sensitive detection of dopamine in human serum [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2022, 1229: 340365.
- [46] Cincotto F H, Fernandes J O, Travassos A C O, et al. Sensitive electrochemical biosensor for bisphenol A based on laccase immobilized on polypyrrole-3-carboxylic/Sb₂O₅/reduced graphene oxide hybrid nanomaterial [J]. *Electroanalysis*, 2023, 35(11).
- [47] Quintanilla-Villanueva G E, Luna-Moreno D, Sánchez-Álvarez A, et al. Electrochemical approach to detection of chlorophene in water catalyzed by a laccase modified gold electrode [J]. *Chemosensors*, 2021, 9(4):82.
- [48] Wang S, Cui M, Tang H, et al. Gold nanoparticles-amplified laccase-based electrochemical biosensor using graphitized carbon@boron carbide as electron transfer promoter [J]. *Microchemical Journal*, 2024, 207: 111976.
- [49] Jose S, Thadathil D A, Ghosh M, et al. Enzyme immobilized conducting polymer-based biosensor for the electrochemical determination of the eco-toxic pollutant p-nonylphenol [J]. *Electrochimica Acta*, 2023, 460: 142591.
- [50] Shahtouri M G, Fooladi E, Marrazza G, et al. Development of laccase electrochemical biosensor for detection of Dephostatin using ZrO₂/β-cyclodextrin/Polyaniline nanocomposite [J]. *Microchemical Journal*, 2025, 210: 112930.
- [51] Bounegru A V, Apetrei C. Development of a novel electrochemical biosensor based on carbon nanofibers-cobalt phthalocyanine-laccase for the detection of p-coumaric acid in phytoproducts [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(17):9302.
- [52] Li J, Xia J, Zhang F, et al. An electrochemical sensor based on copper-based metal-organic frameworks-graphene composites for determination of dihydroxybenzene isomers in water [J]. *Talanta*, 2018, 181: 80-6.
- [53] Hu C, Huang H, Sun H, et al. Simultaneous analysis of catechol and hydroquinone by polymelamine/CNT with dual-template molecular imprinting technology [J]. *Polymer*, 2022, 242: 124593.
- [54] Liu Z, Liao D, Yu J, et al. An electrochemical sensor based on oxygen-vacancy cobalt-aluminum layered double hydroxides and hydroxylated multiwalled carbon nanotubes for catechol and hydroquinone detection [J]. *Microchemical Journal*, 2022, 175: 107216.
- [55] Topping D C, Bernard L G, O'donoghue J L, et al. Hydroquinone: Acute and subchronic toxicity studies with emphasis on neurobehavioral and nephrotoxic effects [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2007, 45(1): 70-8.
- [56] Fu Y, An Q, Ni R, et al. Preparation of polyaniline-encapsulated carbon/copper composite nanofibers for detection of polyphenol pollutant [J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2018, 559: 289-96.
- [57] Shan Y, Han Y, Yao X, et al. A novel Prussian blue/PANI nanostructure-based biosensor for ultrasensitive determination of trace hydroquinone [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2023, 393: 134137.

- [58] Lou C, Jing T, Zhou J, et al. Laccase immobilized polyaniline/magnetic graphene composite electrode for detecting hydroquinone [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 149: 1130-8.
- [59] Kadam A A, Saratale G D, Ghodake G S, et al. Recent Advances in the Development of Laccase-Based Biosensors via Nano-Immobilization Techniques [J]. *Chemosensors*, 2022, 10(2):58.
- [60] Barbhuiya N H, Misra U, Singh S P. Biocatalytic membranes for combating the challenges of membrane fouling and micropollutants in water purification: A review [J]. *Chemosphere*, 2022, 286: 131757.
- [61] Zhu Q, Song J, Liu Z, et al. Photothermal catalytic degradation of textile dyes by laccase immobilized on Fe₃O₄@SiO₂ nanoparticles [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2022, 623: 992-1001.
- [62] Chen Z, Oh W-D, Yap P-S. Recent advances in the utilization of immobilized laccase for the degradation of phenolic compounds in aqueous solutions: A review [J]. *Chemosphere*, 2022, 307: 135824.
- [63] Maity T, Jain S, Solra M, et al. Robust and reusable laccase mimetic copper oxide nanozyme for phenolic oxidation and biosensing [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2022, 10(4): 1398-407.
- [64] Artico M, Roux C, Peruch F, et al. Grafting of proteins onto polymeric surfaces: A synthesis and characterization challenge [J]. *Biotechnology Advances*, 2023, 64: 108106.
- [65] Zhang Y, Lv Z, Zhou J, et al. Amperometric biosensors based on recombinant bacterial laccase cotA for hydroquinone determination [J]. *Electroanalysis*, 2020, 32(1): 142-8.
- [66] Wu X, Wu L, Cao X, et al. Nitrogen-doped carbon quantum dots for fluorescence detection of Cu²⁺ and electrochemical monitoring of bisphenol A [J]. *RSC Advances*, 2018, 8(36): 20000-6.
- [67] Vercelli B, Donnini R, Ghezzi F, et al. Nitrogen-doped carbon quantum dots obtained hydrothermally from citric acid and urea: The role of the specific nitrogen centers in their electrochemical and optical responses [J]. *Electrochimica Acta*, 2021, 387: 138557.
- [68] Liu L, Anwar S, Ding H, et al. Electrochemical sensor based on F,N-doped carbon dots decorated laccase for detection of catechol [J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2019, 840: 84-92.
- [69] Wang H, Hu Q, Meng Y, et al. Efficient detection of hazardous catechol and hydroquinone with MOF-rGO modified carbon paste electrode [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2018, 353: 151-7.
- [70] Sun X, Xie Y, Chu H, et al. A highly sensitive electrochemical biosensor for the detection of hydroquinone based on a magnetic covalent organic framework and enzyme for signal amplification [J]. *New Journal of Chemistry*, 2022, 46(24): 11902-9.
- [71] Xin Y, Wang N, Wang C, et al. Electrochemical detection of hydroquinone and catechol with covalent organic framework modified carbon paste electrode [J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2020, 877: 114530.

- [72] Zhu X, Xue Y, Hou S, et al. Highly selective colorimetric platinum nanoparticle-modified core-shell molybdenum disulfide/silica platform for selectively detecting hydroquinone [J]. *Advanced Composites and Hybrid Materials*, 2023, 6(4): 142.
- [73] Gao S, Liu K, Ji X, et al. Biocompatible palladium nanoparticles prepared using vancomycin for colorimetric detection of hydroquinone [J]. *Polymers*, 2023, 15(14):3148.
- [74] Liu Y, Wang Q, Guo S, et al. Highly selective and sensitive fluorescence detection of hydroquinone using novel silicon quantum dots [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 275: 415-21.
- [75] Yuan X, Wang B, Yan C, et al. A rapid and simple strategy for discrimination and detection of catechol and hydroquinone by fluorescent silicon nanoparticles [J]. *Microchemical Journal*, 2020, 158: 105263.
- [76] Alam A U, Deen M J. Bisphenol A electrochemical sensor using graphene oxide and β -cyclodextrin-functionalized multi-walled carbon nanotubes [J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(7): 5532-9.
- [77] Luo H, Lin X, Peng Z, et al. Rapid and sensitive detection of bisphenol A based on self-assembly [J]. *Micromachines*, 2020, 11(1):41.
- [78] Hareesha N, Manjunatha J G, Raril C, et al. Electrochemically polymerized glutamine-activated graphite paste surface as a green biosensor for sensitive catechol detection in water samples [J]. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 2023, 34(6): 533.
- [79] Indrajith Naik E, Sunil Kumar Naik T S, Pradeepa E, et al. Design and fabrication of an innovative electrochemical sensor based on Mg-doped ZnO nanoparticles for the detection of toxic catechol [J]. *Materials Chemistry and Physics*, 2022, 281: 125860.
- [80] Lobo C C, Bertola N C, Contreras E M. Stoichiometry and kinetic of the aerobic oxidation of phenolic compounds by activated sludge [J]. *Bioresource Technology*, 2013, 136: 58-65.
- [81] Karim M N, Lee J E, Lee H J. Amperometric detection of catechol using tyrosinase modified electrodes enhanced by the layer-by-layer assembly of gold nanocubes and polyelectrolytes [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 61: 147-51.
- [82] Bennett G F. Sittig's Handbook of toxic and hazardous chemicals and carcinogens [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2002, 94(2): 203-4.
- [83] Rao H, Liu Y, Zhong J, et al. Gold nanoparticle/chitosan@N,S Co-doped multiwalled carbon nanotubes sensor: fabrication, characterization, and electrochemical detection of catechol and nitrite [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2017, 5(11): 10926-39.
- [84] Lete C, Lupu S, Lakard B, et al. Multi-analyte determination of dopamine and catechol at single-walled carbon nanotubes-Conducting polymer-Tyrosinase based electrochemical biosensors [J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2015, 744: 53-61.
- [85] Malinowski S, Wardak M, Wardak C. Effect of modification of a laccase-based

- p>electrochemical biosensor with carbon nanotubes on signal separation of dihydroxybenzene isomers [J].
- Langmuir*
- , 2024, 40(7): 3472-85.
- [86] Schartner J, Güldenhaupt J, Mei B, et al. Universal method for protein immobilization on chemically functionalized germanium investigated by ATR-FTIR difference spectroscopy [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(10): 4079-87.
- [87] Zhou X-H, Liu L-H, Bai X, et al. A reduced graphene oxide based biosensor for high-sensitive detection of phenols in water samples [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2013, 181: 661-7.
- [88] Zheng Y, Wang D, Li Z, et al. Laccase biosensor fabricated on flower-shaped yolk-shell SiO₂ nanospheres for catechol detection [J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2018, 538: 202-9.
- [89] Sarika C, Shivakumar M S, Shivakumara C, et al. A novel amperometric catechol biosensor based on α -Fe₂O₃ nanocrystals-modified carbon paste electrode [J]. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2017, 45(3): 625-34.
- [90] Li D, Pang Z, Chen X, et al. A catechol biosensor based on electrospun carbon nanofibers [J]. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 2014, 5: 346-54.
- [91] Ramya R, Nathiya D, Thivya P, et al. Functionally anchored Ag-TiO₂ nanoparticles on guar gum based nanocomposite for simultaneous determination of hydroquinone, catechol, resorcinol and nitrite [J]. *Microchemical Journal*, 2021, 170: 106734.
- [92] Dayton M A, Brown J C, Stutts K J, et al. Faradaic electrochemistry at microvoltammetric electrodes [J]. *Analytical Chemistry*, 1980, 52(6): 946-50.
- [93] Clark M G, Colquhoun E Q, Rattigan S, et al. Vascular and endocrine control of muscle metabolism [J]. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 1995, 268(5): E797-E812.
- [94] Goyal R N, Bishnoi S. A novel multi-walled carbon nanotube modified sensor for the selective determination of epinephrine in smokers [J]. *Electrochimica Acta*, 2011, 56(6): 2717-24.
- [95] Lei P, Zhou Y, Zhu R, et al. Facile synthesized ultrathin Ni₆MnO₈@C nanosheets: excellent electrochemical performance and enhanced electrocatalytic epinephrine sensing [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2021, 326: 128863.
- [96] Mak C H, Liao C, Fu Y, et al. Highly-sensitive epinephrine sensors based on organic electrochemical transistors with carbon nanomaterial modified gate electrodes [J]. *Journal of Materials Chemistry C*, 2015, 3(25): 6532-8.
- [97] Zhao Y, Zhao S, Huang J, et al. Quantum dot-enhanced chemiluminescence detection for simultaneous determination of dopamine and epinephrine by capillary electrophoresis [J]. *Talanta*, 2011, 85(5): 2650-4.
- [98] Beitollahi H, Sheikhshoaei I. Electrocatalytic oxidation and determination of epinephrine in the presence of uric acid and folic acid at multiwalled carbon nanotubes/molybdenum(vi) complex modified carbon paste electrode [J]. *Analytical Methods*, 2011, 3(8): 1810-4.
- [99] Dong W, Ren Y, Bai Z, et al. Synthesis of tetrahedral Au-Pd core-shell nanocrystals and reduction of graphene oxide for the electrochemical detection

- p>of epinephrine [J].
- Journal of Colloid and Interface Science*
- , 2018, 512: 812-8.
- [100] Anithaa A C, Asokan K, Sekar C. Voltammetric determination of epinephrine and xanthine based on sodium dodecyl sulphate assisted tungsten trioxide nanoparticles [J]. *Electrochimica Acta*, 2017, 237: 44-53.
- [101] Shaikshavali P, Madhusudana Reddy T, Venu Gopal T, et al. A simple sonochemical assisted synthesis of nanocomposite (ZnO/MWCNTs) for electrochemical sensing of Epinephrine in human serum and pharmaceutical formulation [J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2020, 584: 124038.
- [102] Thanh T D, Balamurugan J, Tuan N T, et al. Enhanced electrocatalytic performance of an ultrafine AuPt nanoalloy framework embedded in graphene towards epinephrine sensing [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 89: 750-7.
- [103] Wierzbicka E, Szultka-Młyńska M, Buszewski B, et al. Epinephrine sensing at nanostructured Au electrode and determination its oxidative metabolism [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2016, 237: 206-15.
- [104] Izaoumen N, Bouchta D, Zejli H, et al. The Electrochemical Behavior of Neurotransmitters at a Poly (Pyrrole- β -Cyclodextrin) Modified Glassy Carbon Electrode [J]. *Analytical Letters*, 2005, 38(12): 1869-85.
- [105] Shankar S S, Shereema R M, Rakhi R B. Electrochemical determination of adrenaline using mXene/graphite composite paste electrodes [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 10(50): 43343-51.
- [106] Ferreira F D P, Silva L I B, Freitas A C, et al. High performance liquid chromatography coupled to an optical fiber detector coated with laccase for screening catecholamines in plasma and urine [J]. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216(42): 7049-54.
- [107] Silva L I B, Ferreira F D P, Freitas A C, et al. Optical fiber biosensor coupled to chromatographic separation for screening of dopamine, norepinephrine and epinephrine in human urine and plasma [J]. *Talanta*, 2009, 80(2): 853-7.
- [108] Kojima E, Kai M, Ohkura Y. Determination of tryptophan in human serum by high-performance liquid chromatography with pre-column fluorescence derivatization using phenylglyoxal [J]. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1993, 612(2): 187-90.
- [109] Goyal R N, Rana A R S, Chasta H. Electrochemical and peroxidase-catalyzed oxidation of epinephrine [J]. *Electrochimica Acta*, 2012, 59: 492-8.
- [110] Kharitonov A B, Shipway A N, Willner I. An Au Nanoparticle/Bisbipyridinium Cyclophane-Functionalized Ion-Sensitive Field-Effect Transistor for the Sensing of Adrenaline [J]. *Analytical Chemistry*, 1999, 71(23): 5441-3.
- [111] Akyilmaz E, Turemis M, Yasa İ. Voltammetric determination of epinephrine by White rot fungi (*Phanerochaete chrysosporium* ME446) cells based microbial biosensor [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 26(5): 2590-4.
- [112] Shahrokhian S, Saberi R-S. Electrochemical preparation of over-oxidized polypyrrole/multi-walled carbon nanotube composite on glassy carbon electrode and its application in epinephrine determination [J]. *Electrochimica Acta*, 2011, 57: 132-8.

- [113] Salimi A, Banks C E, Compton R G. Abrasive immobilization of carbon nanotubes on a basal plane pyrolytic graphite electrode: application to the detection of epinephrine [J]. *Analyst*, 2004, 129(3): 225-8.
- [114] Pradhan T, Jung H S, Jang J H, et al. Chemical sensing of neurotransmitters [J]. *Chemical Society Reviews*, 2014, 43(13): 4684-713.
- [115] Tsunoda M. Recent advances in methods for the analysis of catecholamines and their metabolites [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006, 386(3): 506-14.
- [116] Chu M Y, Jiao J, Zhu W, et al. A polyoxometalate based electrochemical sensor for efficient detection of L-cysteine [J]. *Tungsten*, 2022, 4(2): 138-48.
- [117] Chu M Y, Li F B, Gao N, et al. Construction of a Coronal Polyoxometalate-based Composite Film for Determination of Nitrite [J]. *Chemical Journal of Chinese Universities-Chinese*, 2022, 43(1).
- [118] Chu M, Bai Z, Zhu D, et al. A β -nicotinamide adenine dinucleotide electrochemical sensor based on polyoxometalate built by the combination of electrodeposition and self-assembly [J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2022, 907: 116083.
- [119] Afshary H, Amiri M, Bezaatpour A, et al. Electrochemiluminescence sensor based on N-doped carbon quantum dots for determination of ceftazidime in real samples [J]. *Journal of The Electrochemical Society*, 2022, 169(2): 026523.
- [120] Zuo J, Shen Y, Wang L, et al. Flexible electrochemical sensor constructed using an active copper center instead of unstable molybdenum carbide for simultaneous detection of toxic catechol and hydroquinone [J]. *Microchemical Journal*, 2023, 187: 108443.
- [121] Fang X-W, Chang H, Wu T, et al. Green synthesis of carbon quantum dots and carbon quantum dot-gold nanoparticles for applications in bacterial imaging and catalytic reduction of aromatic nitro compounds [J]. *ACS Omega*, 2024, 9(22): 23573-83.
- [122] Hossein Mashhadizadeh M, Heydarzad M. Development of novel electrochemical sensor based on Co-Fe layered double hydroxide for simultaneous determination of Hydroquinone, Catechol, and Resorcinol [J]. *Microchemical Journal*, 2024, 206: 111437.
- [123] Verma R, Yadav S K, Singh K R B, et al. Laccase-conjugated nanostructured ZnFe₂O₄/rGO-modified electrode-based interfaces for electrochemical impedance monitoring of adrenaline: a promising biosensor for management of neurodegenerative disorders [J]. *ACS Applied Bio Materials*, 2023, 6(12): 5842-53.
- [124] Mariyappan V, Sundaresan R, Chen S-M, et al. Ultrasensitive electrochemical sensor for the detection of carbamazepine based on gadolinium vanadate nanostructure decorated functionalized carbon nanofiber nanocomposite [J]. *Chemosphere*, 2022, 307: 135803.
- [125] Kumar S, Awasthi A, Sharma M D, et al. Functionalized multiwall carbon nanotube-molybdenum disulphide nanocomposite based electrochemical ultrasensitive detection of neurotransmitter epinephrine [J]. *Materials Chemistry*

- And Physics, 2022, 290.
- [126] Sen K, Ali S, Singh D, et al. Development of metal free melamine modified graphene oxide for electrochemical sensing of epinephrine [J]. Flatchem, 2021, 30.
 - [127] Pinar P T, Yardim Y, Sentürk Z. Individual and simultaneous electroanalytical sensing of epinephrine and lidocaine using an anodically pretreated boron-doped diamond electrode by square-wave voltammetry [J]. Diamond And Related Materials, 2020, 101.
 - [128] Uwaya G E, Wen Y P, Bisetty K. A combined experimental-computational approach for electrocatalytic detection of epinephrine using nanocomposite sensor based on polyaniline/nickel oxide [J]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2022, 911.
 - [129] Ramu A G, Umar A, Ibrahim A A, et al. Synthesis of porous 2D layered nickel oxide-reduced graphene oxide (NiO-rGO) hybrid composite for the efficient electrochemical detection of epinephrine in biological fluid [J]. Environmental Research, 2021, 200: 111366.
 - [130] Tsele T P, Adekunle A S, Fayemi O E, et al. Electrochemical detection of Epinephrine using Polyaniline nanocomposite films doped with TiO_2 and RuO_2 Nanoparticles on Multi-walled Carbon Nanotube [J]. Electrochimica Acta, 2017, 243: 331-48.

攻读学位期间发表的学术论文目录

文章：

(1) Xinyue Wang, Li Liu, Binbin Jiang, et al. Synthesis of the immobilized laccase on N-doped carbon nanonets for photothermal detection of hydroquinone [J].

Microchemical Journal, 2025, 208: 112432.

(2) Zhaofei Liu, Xinyue Wang, Yuhang Wei, et al. Photothermal enhanced biosensing platform of Fe₃O₄@ CS-Au-Lac for dopamine detection[J]. Microchemical Journal,

2024,198: 110094.

发明专利：

(1) 陈志明，刘肇菲，卫雨航，汪新月，谢围围，汪春梅. 磁性纳米粒子修饰的多巴胺光热酶电极、制备方法及应用. 专利号：ZL 2023105532051.

(2) 陈志明，汪新月，崇庆阳，尹心悦，刘莉，李现府，汪春梅. 碳材料修饰的肾上腺素光热酶电极、制备方法及应用. 申请号：202510539366.4

致谢

时光荏苒，白驹过隙，这两个词开头虽然老套，但用在此处却是再恰当不过了。时间仿佛按了加速键，不知不觉间，三年研究生生涯已然悄摸走进尾声，从踏入学校的茫然局促，到如今的从容镇定，我也在一步步成长。

在这三年里，我十分感谢陈志明教授对我的谆谆教导，在科研道路上给予我很大帮助，在我实验迷失方向时会及时给出指示，调整实验方法，重新整理思路，找准方向，继续往后推进。在陈老师的指导下，我顺利完成了关于实验内容的梳理以及论文的撰写。本文也是得以陈老师的帮助才能顺利完成。

我要对我的家人表示真心的感谢，在我的身后默默地支持我、包容我，使得我能够顺利完成学业。感谢我的师姐刘肇菲、张莉莉，师兄卫雨航，同门兼室友谢围围，师弟崇庆阳，师妹尹心悦，千千万万个人中我们相遇在此，缘分妙不可言，祝愿我们都有光明的未来。感谢我的室友许若倩、谢围围、朱亚婷，有你们在，宿舍温暖如家。感谢我的朋友王心如、董舒婷、荣叶、代曼曼、何雪萍，一直以来陪伴在我身边，为我排忧解难。感谢我的同学们，这三年给予我很多帮助。

青山不改，绿水长流，在未来的生活里，这段时光我会一直铭记于心，伴随我继续前进。

作者：汪新月

2025年3月9日