



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102320589 A

(43) 申请公布日 2012. 01. 18

(21) 申请号 201110132554. 3

(22) 申请日 2011. 05. 20

(71) 申请人 天津大学

地址 300072 天津市南开区卫津路 92 号天津大学

(72) 发明人 许鑫华 侯红帅 郭美卿

(74) 专利代理机构 天津市北洋有限责任专利代理事务所 12201

代理人 王丽

(51) Int. Cl.

C01B 31/02 (2006. 01)

G01N 27/26 (2006. 01)

G01N 27/327 (2006. 01)

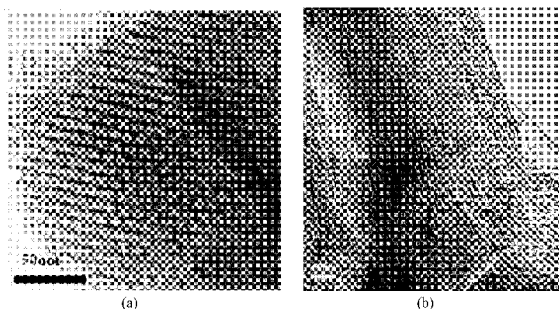
权利要求书 2 页 说明书 4 页 附图 4 页

### (54) 发明名称

掺杂氮原子的有序介孔碳的制备及其在固定化漆酶传感器的制备和应用

### (57) 摘要

本发明涉及掺杂氮原子的有序介孔碳的制备及其在固定化漆酶传感器的制备和应用。将 SBA-15 和纯苯胺溶解到溶有过硫酸铵的盐酸中, 真空干燥; 将过硫酸铵溶解到盐酸中, 并将其加入前面干燥的混合物中, 真空干燥; 将制备的混合物在氮气气氛保护下碳化; 将得到的产品用 40wt% 的氢氟酸浸泡, 然后过滤, 洗涤, 干燥至恒重。N-OMC 修饰金电极的制备: 将 Au 电极打磨抛光, 经蒸馏水冲洗、超声后, 置于 pH 为 5.0 的 PBS 溶液中经循环伏安扫描活化 10 圈, 取酸化的 N-OMC 加入到已配制好的 1.0-2.0mg/mL 的漆酶溶液中, 搅拌, 离心分离, 去除上层清液。N-OMC 修饰的固定化漆酶金电极对邻苯二酚具有良好的电催化活性, 宽的线性响应范围以及高的灵敏度和选择性。



1. 一种掺杂氮原子的有序介孔碳的制备,其特征是步骤如下:

1) 将 0.3-0.8g SBA-15 和纯苯胺加入到过硫酸铵含量为 0.5-0.8wt. % 的 500mL 0.5-1.2M 盐酸中,充分搅拌溶解,使纯苯胺充分分散于介孔硅中,并使其在 SBA-15 的孔道里发生聚合,然后 80-120°C 下真空干燥 10-15h;

2) 将 2.0-4.0g 的过硫酸铵加入到 40-60mL 1M 盐酸中搅至溶解均匀,然后将其加入第一步干燥的混合物中,使苯胺聚合完全,然后 35°C -50°C 下真空干燥 20-25h;

3) 将上述 2) 制备的混合物在流量为 90-110mL/min 的氮气气氛保护下,以 3-10°C /min 的升温速率升至 900-1000°C 碳化 6-10h;

4) 将得到的产品用 35wt% -45wt% 的氢氟酸浸泡过夜以除去硅模板,然后再过滤,分别用乙醇、去离子水洗涤,80-120°C 干燥至恒重即得到掺杂氮原子的有序介孔碳。

2. 权利要求 1 的掺杂氮原子的有序介孔碳在固定化漆酶传感器的制备,其特征是步骤如下:

1) 掺杂氮原子的有序介孔碳的酸化处理

将 700-900mg 的掺杂氮原子的有序介孔碳加入到 80-100mL 浓硫酸 (98wt. %) 和 20-40mL 硝酸 (68wt. %) 混合溶液中,用超声波处理 15-30min 后,在 50-70°C 水浴中加热搅拌 1h,采用 0.22  $\mu$ m 的微孔滤膜过滤,除去酸液,用去离子水洗涤至弱酸性,最后在 50-70°C 下真空干燥,得到酸化的掺杂氮原子的有序介孔碳;

2) 电极的预处理

用粒径为 0.5 ~ 2.0  $\mu$ m 的氧化铝粉将金电极在麂皮上打磨抛光,经二次蒸馏水冲洗、超声后,置于 pH 为 5.0 的磷酸盐缓冲液中经循环伏安扫描活化 10 圈;

3) 掺杂氮原子的有序介孔碳修饰金电极的制备

配制 0.2-1.5mg/ml N-OMC 的二甲基甲酰胺溶液,取 10  $\mu$ L 溶液滴加到处理好的直径为 2mm 的 Au 电极表面,室温干燥后即得 N-OMC 修饰 Au 电极,即掺杂氮原子的有序介孔碳 /Au 电极;

4) 掺杂氮原子的有序介孔碳固定化漆酶

取 2-5mg 酸化的掺杂氮原子的有序介孔碳加入到 2-5mL 已配制好的 0.5-1.5mg/mL 的漆酶溶液,并在 3-6°C 下搅拌 20-25h 以保证酶的充分固定于载体材料上,离心分离,去除上层清液后就得到掺杂氮原子的有序介孔碳固定化的漆酶。

3. 权利要求 2 的掺杂氮原子的有序介孔碳在固定化漆酶传感器的应用,其特征是用于环境保护方面检测 / 监测有毒物质的电子设备中。



## 掺杂氮原子的有序介孔碳的制备及其在固定化漆酶传感器的制备和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及掺杂氮原子的有序介孔碳的制备及其在固定化漆酶传感器的制备和应用。

### 背景技术

[0002] 漆酶传感器可以方便快速地检测废水中的酚类、芳香胺类、有机磷化合物以及二恶英等有毒物质,具有广阔的应用前景。因此,研究高传感性能(如高灵敏度、快速响应、宽检测线以及低检测线等)的漆酶传感器在环境监测和检测方面具有十分重要的意义。

[0003] 直接电化学酶电极是将酶分子直接吸附固定到电极表面,是酶的氧化还原活性中心与电极直接“交流”,能够更快地进行电子传递。但是酶通常具有较大的分子量,酶分子的电活性中心深埋在分子的内部,且在电极表面吸附后易发生变形甚至失活,所以酶与电极间难以直接进行电子转移。介孔碳材料的出现为酶直接电化学提供了新的机遇,由于其本身具有优良的机械性能、化学稳定性以及生物相容性,且其良好的电活性以及纳米尺寸产生的表面效应,使其表面原子具有很高的反应活性,既能为酶提供一个能保持其生物活性的优良微环境,防止生物分子的流失,又能为电子的有效传递提供有序的纳米通道,从而为制备一系列高性能的传感器提供了广阔的前景。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供掺杂氮原子的有序介孔碳(N-OMC)的制备及其固定化漆酶的生物传感器的应用。

[0005] 本发明在实际监测等领域具有广泛的研究前景。

[0006] 本发明掺杂氮原子的有序介孔碳(N-OMC)漆酶生物传感器的制备方法包括的步骤:

[0007] 掺杂氮原子的有序介孔碳(N-OMC)的合成:

[0008] 1) 将 0.3-0.8g SBA-15 和纯苯胺加入到过硫酸铵含量为 0.5-0.8wt.% 的 500mL 0.5-1.2M 盐酸中,充分搅拌溶解,使纯苯胺充分分散于介孔硅中,并使其在 SBA-15 的孔道里发生聚合,然后 80-120°C 下真空干燥 10-15h;

[0009] 2) 将 2.0-4.0g 的过硫酸铵加入到 40-60mL 1M 盐酸中搅至溶解均匀,然后将其加入第一步干燥的混合物中,使苯胺聚合完全,然后 35°C -50°C 下真空干燥 20-25h;

[0010] 3) 将上述 2) 制备的混合物在流量为 90-110mL/min 的氮气气氛保护下,以 3-10°C /min 的升温速率升至 900-1000°C 碳化 6-10h;

[0011] 4) 将得到的产品用 35wt% -45wt% 的氢氟酸浸泡过夜以除去硅模板,然后再过滤,分别用乙醇、去离子水洗涤,80-120°C 干燥至恒重即得到 N-OMC。

[0012] 掺杂氮原子的有序介孔碳在固定化漆酶的生物传感器的制备方法:

[0013] 1) N-OMC 的酸化处理

[0014] 将 700-900mg 的 N-OMC 加入到 80-100mL 浓硫酸 (98wt. %) 和 20-40mL 硝酸 (68wt. %) 混合溶液中,用超声波处理 15-30min 后,在 50-70℃ 水浴中加热搅拌 1h,采用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤,除去酸液,用去离子水洗涤至弱酸性,最后在 50-70℃ 下真空干燥,得到酸化的 N-OMC;

[0015] 2) 电极的预处理

[0016] 用粒径为 0.5 ~ 2.0 μm 的氧化铝 (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 粉将金 (Au) 电极在麂皮上打磨抛光,经二次蒸馏水冲洗、超声后,置于 pH 为 5.0 的磷酸盐缓冲液 (PBS 溶液) 中经循环伏安扫描活化 10 圈;

[0017] 3) N-OMC 修饰金电极的制备

[0018] 配制 0.2-1.5mg/ml N-OMC 的二甲基甲酰胺 (DMF) 溶液,取 10 μL 溶液滴加到处理好的直径为 2mm 的 Au 电极表面,室温干燥后即得 N-OMC 修饰 Au 电极,即 N-OMC/Au 电极;

[0019] 4) N-OMC 固定化漆酶

[0020] 取 2-5mg 酸化的 N-OMC 加入到 2-5mL 已配制好的 0.5-1.5mg/mL 的漆酶 (Lac) 溶液,并在 3-6℃ 下搅拌 20-25h 以保证酶的充分固定于载体材料上,离心分离,去除上层清液后就得到 N-OMC 固定化的漆酶。

[0021] 将制备的 N-OMC 固定化漆酶修饰的金电极用于环境保护方面检测 / 监测有毒物质的电子设备中。

[0022] 本发明 N-OMC 固定化漆酶修饰的金电极能显示出良好的直接电化学行为,在室温 25 ± 2℃, pH = 5.0 的磷酸盐缓冲溶液,工作电压为 +0.45V vs SCE 的实验条件下,N-OMC 固定化漆酶修饰的金电极 (N-OMC+Lac/PVA/Au 电极) 表现出良好的传感性能,其对底物邻苯二酚的线性检测范围是 0.39 ~ 9.35 μM,选择灵敏度为 0.09659A/M (n = 26),表观米氏常数  $K_M^{app}$  为 6.4293 μM,时间约为 23s,检测限为 0.159 μM (S/N = 3);此外,该漆酶传感器还具有良好的重复性和稳定性。因此,掺杂氮原子的有序介孔碳 N-OMC 有望成为一种新型的固定化酶的材料,在实际监测等领域具有广泛的研究前景。

## 附图说明

[0023] 图 1 实施例 1 制备的掺杂氮原子的有序介孔碳 (N-OMC) 的透射电镜照片,(a) 平行于孔轴方向,(b) 垂直于孔轴方向。

[0024] 图 2 实施例 2 制备的酸化的 N-OMC(a) 和 N-OMC+Lac(b) 的扫描电镜图。

[0025] 图 3 实施例 3 制备的 N-OMC+Lac/PVA/Au 电极在不含邻苯二酚 (a) 与含 0.05mM 邻苯二酚 (b) 的 pH = 5.0PBS 缓冲液中的 CV 曲线;扫速为 50mV/s。

[0026] 图 4 实施例 4 的 N-OMC+Lac/PVA/Au 电极的计时电流响应曲线 (a) 和稳态电流响应曲线 (b)。

[0027] 图 5 实施例 4 的 N-OMC+Lac/PVA/Au 电极的催化响应电流 - 浓度关系曲线 (a) 和 Lineweave-Burk 曲线 (b);+0.45V vs SCE。

## 具体实施方式

[0028] 实施例 1

[0029] 将 0.5g SBA-15 和 2.5g 纯苯胺加入到过硫酸铵含量为 0.6wt. % 的 500mL 1M 盐

酸中,充分搅拌溶解,使纯苯胺充分分散于介孔硅中,并使其在 SBA-15 的孔道里发生聚合,然后 100℃下真空干燥 12h;将 3.0g 的过硫酸铵加入到 50mL 1M 盐酸中搅至溶解均匀,然后将其加入前面干燥的混合物中,使苯胺聚合完全,然后在 40℃下真空干燥 24h;将上述制备的混合物在流量为 100mL/min 的氮气气氛保护下,以 5℃/min 的升温速率升至 950℃碳化 6h;最后,将得到的产品用 40wt% 的氢氟酸浸泡过夜以除去硅模板,然后过滤,分别用乙醇、去离子水洗涤,100℃干燥至恒重即得到 N-OMC。将制得的 N-OMC 做透射电子显微镜 (TEM) 分析,如图 1 所示,在平行于孔轴的方向,可以看到孔呈规则的六角型结构,孔径大约为 4.2nm,在垂直于孔轴的方向,可以看到孔道有序线性排布,形成均一有序的二维有序六角介孔结构,N-OMC 是 SBA-15 结构较好的复制品。

#### [0030] 实施例 2

[0031] 将 800mg N-OMC 加入到 90mL 98wt% 的浓硫酸和 30mL 68wt% 的硝酸混合溶液中,用超声波处理 20min 后,在 60℃水浴中加热搅拌 1h,采用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤,除去酸液,用去离子水洗涤至弱酸性,最后在 60℃下真空干燥,得到酸化的 N-OMC。取 4mg 酸化的 N-OMC 加入到 4mL 已配制好的 1.0mg/mL 的 Lac 溶液中,并在 4℃下搅拌 24h 以保证酶的充分固定于载体材料上,离心分离,去除上层清液后就得到 N-OMC 固定化的漆酶。将制得的酸化 N-OMC 和 N-OMC 固定化的漆酶做扫描电子显微镜 (SEM) 分析,如图 2 所示,可以看出加入酶之前,酸化的 N-OMC 的表面很疏松,加入漆酶后,材料的表面变得更紧密些,证明漆酶负载在 N-OMC 的孔道中。

#### [0032] 实施例 3

[0033] 用粒径均匀的 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 粉将 Au 电极在麂皮上打磨抛光,经二次蒸馏水冲洗、超声后,置于 pH 为 5.0 的 PBS 溶液中经循环伏安扫描活化 10 圈。将实施例 2 中制备的 N-OMC 固定化的漆酶的复合物与 4mL 预先配备好的 0.1% 的聚乙烯醇 (PVA) 溶液混合均匀,制备 1.0mg/ml 的 Lac+N-OMC/PVA 溶液,然后用微量移液器取该混合液 10 μL 均匀地覆盖在预先处理好的 Au 电极,室温下静置 2h,即得到 Lac+NOMC/PVA/Au 电极。

[0034] 将制得的 N-OMC+Lac/PVA/Au 电极在不含邻苯二酚与含 0.05mM 邻苯二酚的 pH = 5.0PBS 缓冲液中分别做的 CV 曲线分析。电化学测试采用三电极测试体系为:铂 (Pt) 丝 (直径为 1mm) 为对电极,饱和甘汞电极为参比电极,以 N-OMC+Lac/PVA/Au 电极为工作电极,设定工作电压为 -0.2-0.9V 进行循环伏安扫描。结果表明,N-OMC+Lac/PVA/Au 电极在不含邻苯二酚与含 0.05mM 邻苯二酚的 pH = 5.0 的 PBS 缓冲液中有明显的不同,当待测溶液中不含有污染物邻苯二酚时,漆酶电极上没有发生明显的氧化还原反应;而当加入邻苯二酚之后,在 0.3V 附近能看到一对明显的氧化还原峰,即说明邻苯二酚在修饰电极表面能进行直接的电化学反应,同时证明固定化材料具有很好的生物相容性,漆酶在 N-OMC 载体上保持很好的电催化活性。

#### [0035] 实施例 4

[0036] 电化学测试采用三电极测试体系:Pt 丝 (直径为 1mm) 为对电极,饱和甘汞电极为参比电极,以 N-OMC+Lac/PVA/Au 电极为工作电极,设定工作电压 +0.45V 进行循环伏安扫描。在相对饱和甘汞电极电位 (SCE) 下测定修饰电极的不同浓度邻苯二酚底液中的响应电流,做响应电流 - 浓度曲线和 Lineweave-Burk 曲线。如图 4 与 5 所示。

[0037] 结果表明, N-OMC+Lac/PVA/Au 传感器的线性响应范围为 0.39 ~ 9.35 μM,选择灵

敏度为  $0.09659 \text{ A/M}$  ( $n = 26$ ), N-OMC 修饰的漆酶电极的选择灵敏度很高,而这说明氮原子的掺入提高了 N-OMC 的电子传递速率,而且氮原子改善了介孔碳与漆酶的结合,提高了传感器的稳定性。从  $1/I-1/C$  图中所得直线的斜率和截距即可得到 N-OMC+Lac/PVA/Au 电极的表观米氏常数  $K_M^{app}$  为  $6.4430 \mu \text{ M}$ 。检测限可由公式  $3\sigma b/m$  求得,  $m$  指  $1/I-1/C$  图中直线斜率的倒数,  $\sigma b$  指一定信噪比下空白信号的标准偏差,因此计算得出构建的 N-OMC+Lac/PVA/Au 漆酶传感器对邻苯二酚的检测限分别为  $0.159 \mu \text{ M}$  ( $S/N = 3$ ), 响应时间为  $23 \text{ s}$ 。

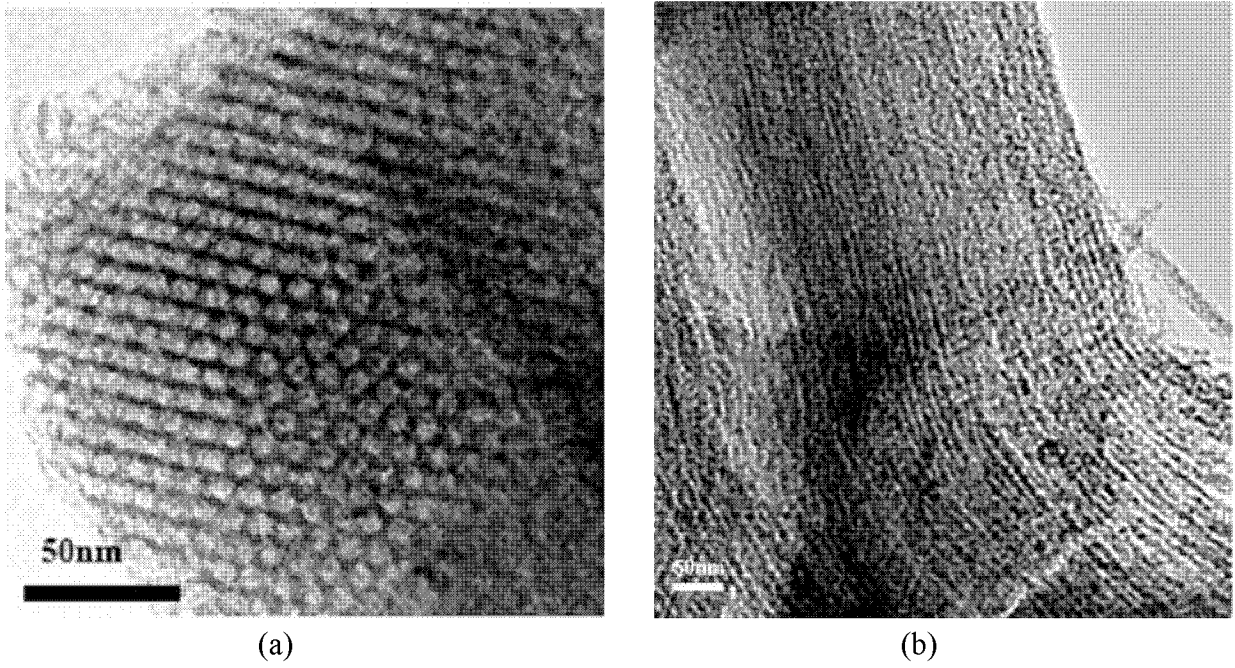


图 1

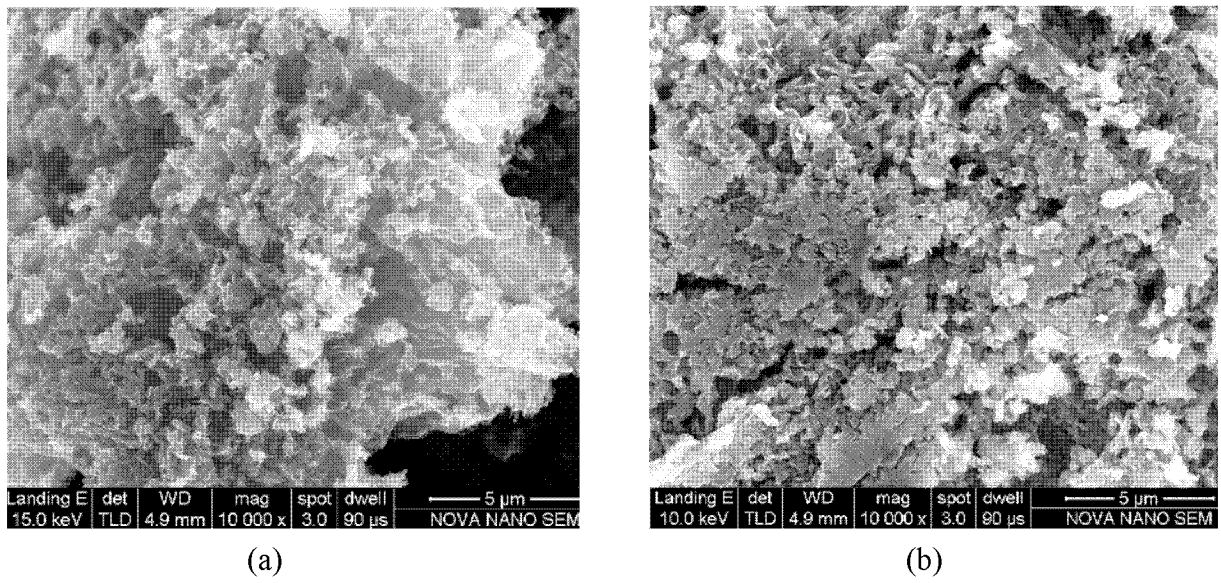
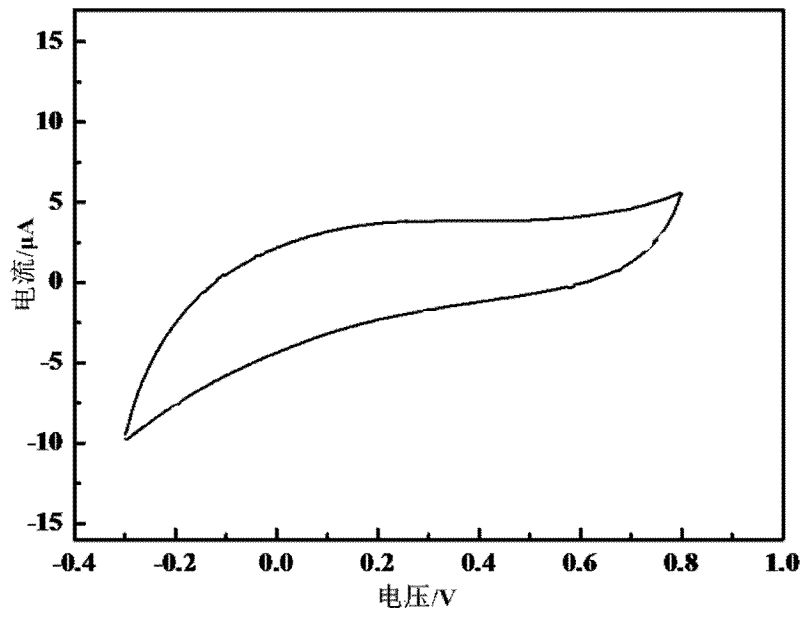
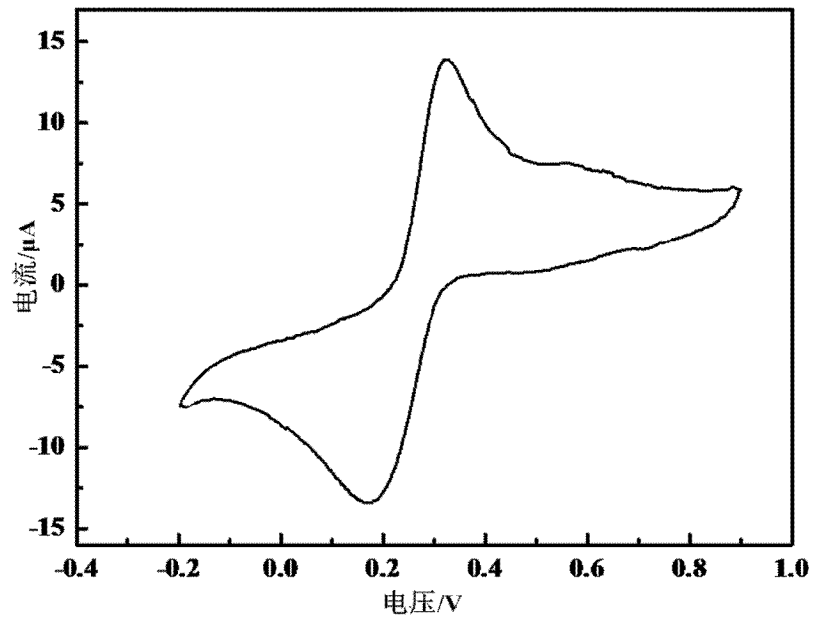


图 2





(a)



(b)

图 3

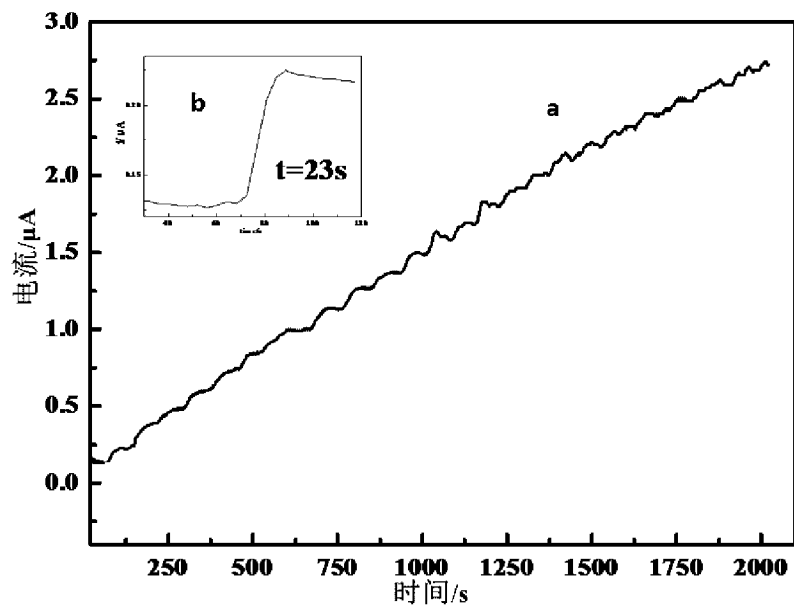
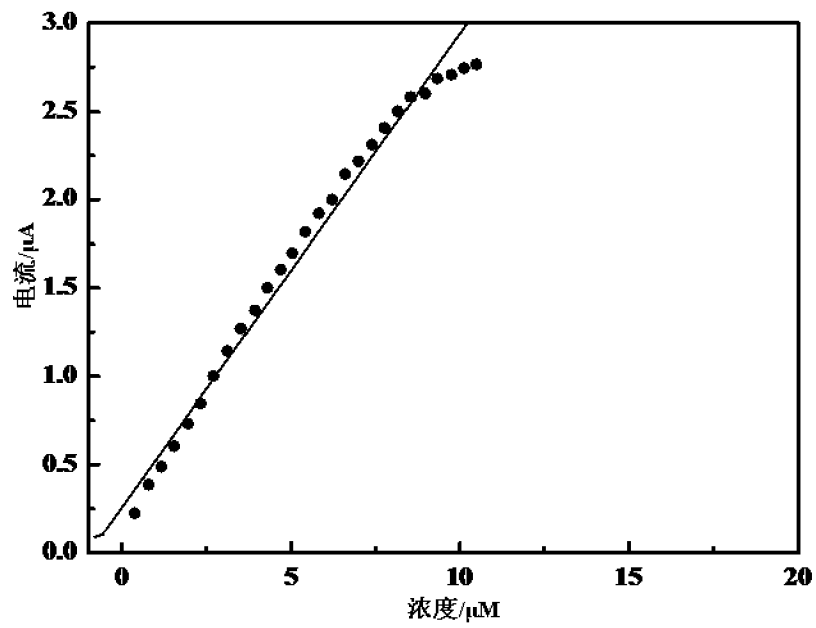
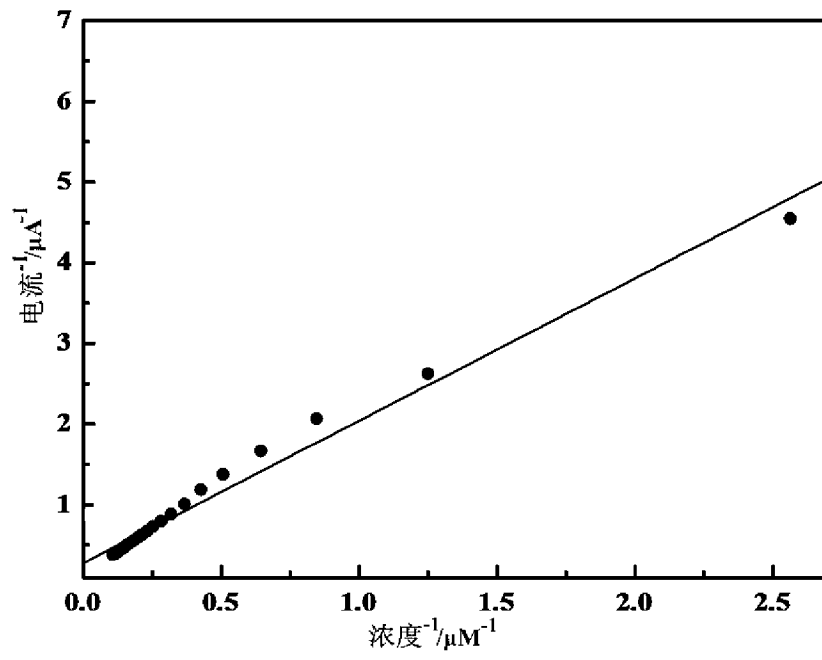


图 4



(a)



(b)

图 5