

# 碳纳米管-壳聚糖复合物免疫传感器检测牛奶中的青霉素

李建龙, 潘道东, 朱浩嘉, 刘鹭

(宁波大学海洋学院, 浙江宁波 315211)

**摘要:** 建立了一种高灵敏度阻抗电化学免疫分析法测定青霉素的方法。利用层层自组装技术将多壁碳纳米管(MWCNTs), 壳聚糖(CS), 和HRP标记青霉素抗体(HRP-Ab<sup>\*</sup>)共固定于玻碳电极表面, 利用HRP可以催化H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的还原进一步促进对苯二酚的氧化, 从而引起阻抗的变化, 然后根据电流的变化从而实现了牛奶中青霉素的定量测量。对于牛奶样品, 需要盐析以除去其蛋白质和脂肪, 同时对缓冲液的pH、免疫温度和时间都进行了优化。实验表明, 在优化条件下, 该传感器的响应电流与青霉素的浓度在0.05~5 μg L<sup>-1</sup>范围内有较好的线性关系, 相关系数为0.9853, 检测限是1.05 μg/L。最后, 通过和酶联免疫法(ELISA)对比, 可知该法测定青霉素灵敏度高, 重复性好, 特异性高, 可适用于检测牛奶样品中的青霉素残留。

**关键词:** 碳纳米管; 壳聚糖; 青霉素; 电化学免疫传感器

文章编号: 1673-9078(2013)9-2294-2299

## Determination of Penicillin in Milk by the Nanocomposite Immunosensor (MWCNTs-CS)

LI Jian-long, PAN Dao-dong, ZHU Hao-jia, LIU Lu

(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract:** An amperometric immunosensor with enhanced sensitivity was successfully developed by co-immobilization of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs), Chitosan (CS), and HRP labeled penicillin polyclonal antibody (HRP-Ab<sup>\*</sup>) on glassy carbon electrode using a layer-by-layer assembly technique. HRP can catalyze the reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to promote the oxidation of hydroquinone, causing the changes in impedance, thus realizing the quantitative detection of penicillin according to the current changes. The milk samples were pretreated by salting out to remove the protein and fat. And the effects of pH of buffer solution, immune temperature and time were investigated. Under optimized conditions, the current response of the sensor showed a good linear relationship with the concentration of penicillin in 0.05~5.00 μg/L, with the correlation coefficient of 0.9853 and the detection limit of 1.05 μg/L. This method was fast, simple and reliable, with high sensitivity, specificity compared to enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). It was proved to be suitable for detection of penicillin residues in milk samples.

**Key words:** multi-walled carbon nanotubes; CS; penicillin; Electrochemical immunosensors

青霉素是一种β-内酰胺类抗生素, 广泛应用于禽类和医学中治疗牛乳腺炎和预防细菌感染, 然而由于人类的不合理使用, 经常会导致家禽和其他的生物组织中青霉素的大量残留, 特别是在食品中会对人类造成潜在的危害。首先, 青霉素含量超标会对人畜肠道的微生物产生抗药性, 引起菌群失调, 从而引发过敏反应等一系列疾病<sup>[1]</sup>。其次, 采用青霉素预防和治疗奶牛

中疾病后, 其体内会产生抗生素累积。长期食用含有过量青霉素的牛奶, 将会给人的脏器带来不可逆转的损害, 特别对以牛奶为主要食品的儿童来说, 更是危害巨大。因此, 牛奶中青霉素的检测非常重要。

对牛奶中的青霉素的检测已经有许多方法。具体的检测有微生物法<sup>[2]</sup>、高效液相色谱法<sup>[3]</sup>、质谱法<sup>[4]</sup>、免疫荧光法<sup>[5]</sup>、电导法<sup>[6]</sup>等, 这些方法在灵敏度和专一性上都可以很好的对青霉素进行定性和定量, 但是也存在衍生化、萃取和纯化等操作, 使得其耗时耗力、步骤繁琐从而不适合实际应用。因此, 电化学免疫传感器应运而生, 它既结合了传统的抗原抗体的特异性, 又结合了电化学的低成本、高度灵敏性及其快速响应性, 从而在食品<sup>[7]</sup>、医学方面有其巨大的应用价值。

收稿日期: 2013-05-10

基金项目: 国家科技支撑计划(2012BAK08B01); 宁波市创新团队(2012B82017); 宁波市人事局人才基金(ZX2012000380)

作者简介: 李建龙(1988-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全与检测

通讯作者: 潘道东(1964-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 畜产品加工及质量控制技术研究

碳纳米管因其具有良好的电化学性能和大的比表面积,在电化学生物传感器的研制中得到广泛的研究,因此利用碳纳米管修饰电极研制电化学免疫传感器也得到人们的关注<sup>[8]</sup>。

对苯二酚是一种活泼的电子媒介体,有比较稳定的氧化还原峰,此外,它还具有其他的电子媒介体所没有的优势-HRP(辣根过氧化物酶)可以催化过氧化氢的还原进而催化对苯二酚的氧化,进而引起电流变化。因此,我们通过检测电流信号的变化进而测定青霉素的含量。本文利用层层自组合法将辣根过氧化物酶(HRP)标记的青霉素抗体、壳聚糖、碳纳米管键合到玻碳电极表面,制成了一种新型的电流型阻抗免疫传感器,并对其电化学性质及影响因素做了研究和探讨。该方法具有操作简易、响应速度快、灵敏度高、稳定性强、重现性好和检出限低等优点。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和试剂材料

CHI660B 电化学工作站,上海辰华仪器公司;实验采用三电极:玻碳电极为工作电极,饱和甘汞电极(SCE)为参比电极(文中电位均相对于SCE),大面积铂丝为对电极;SB5200双频超声波清洗机,宁波新芝生物科技有限公司;移液器(ependorf,规格1 mL,100  $\mu$ L,10  $\mu$ L等等);青霉素G粉末(Amresco,1000 ng);CS501-SP型超级数显恒温器,重庆四达实验仪器有限公司;DHG-9108A型电热恒温鼓风干燥机,上海精密实验设备有限公司;H2500-R-2型离心机,长沙湘仪离心机仪器有限公司。

0.02 M pH 7.0 PBS溶液(由磷酸氢二钠和磷酸二氢钠配制)、对苯二酚、青霉素抗体2 mg ( $Ab^*$ ,1 mg/mL北京奥博森生物技术有限公司)和REAGEN Beta-内酰胺类药物ELISA试剂盒(北京奥博通科科技有限公司)、光明牛奶((含有 $\geq 2.9\%$ 蛋白质( $m/m\%$ )和 $\geq 3.3\%$ 脂肪( $m/m$ ),超市购买)、牛血清蛋白(BSA);所以实验用水均为超纯水(Milli-Q型水纯化系统(美国Millipore公司))。

碳纳米管(MWCNTs,外径20~30 nm,内径5~10 nm,长度10~30  $\mu$ m, $>100$  S/cm,纯度 $>95\%$ ,Cheap Tubes Inc.)参照He pingli<sup>[9]</sup>的方法对多壁碳纳米管(MWCNTs)羧基化,来提高他们在水中的溶解性。具体方法如下:将15 mg的多壁碳纳米管加入到20 mL  $H_2SO_4:HNO_3(3:1, V/V)$ 混合溶液中超声8 h,混合物通过PVDF微孔过滤膜(孔径0.22  $\mu$ m)真空过滤,之后用超纯水多次洗涤直到滤液为中性。羧基化的MWCNTs

分散到水溶液中超声备用。青霉素抗体分散在0.02 M pH 7.0 PBS中。1%壳聚糖溶液(CS)通过溶解一定量的壳聚糖于2% HAc中,最后用NaOH调节溶液pH为4.7。

### 1.2 传感器制备及其表征

青霉素阻抗免疫传感器通过使用层层自组合法在玻碳电极表面形成。首先,取10  $\mu$ L 1 mg/mL羧基化的碳纳米管(MWCNTs)滴加在玻碳电极(GCE)表面;待溶剂蒸干后,电极用0.02 M pH 7.0 PBS除去未结合的MWCNTs。然后,取10  $\mu$ L 1 mg/mL 1%壳聚糖溶液滴加在上述电极上;待溶剂蒸干后,电极用0.02 M pH 7.0 PBS 洗涤干净。最后,取10  $\mu$ L 1 mg/mL辣根过氧化物酶标记的青霉素抗体(HRP- $Ab^*$ )滴加在上述玻碳电极(GCE)表面;之后在4 $^{\circ}$ C冰箱中浮育过夜,电极在用0.02 M pH 7.0 PBS去除去未结合的HRP- $Ab^*$ ;最后取10  $\mu$ L 0.2% BSA滴加在玻碳电极表面2 h,以除去非特异性吸附。这样青霉素阻抗免疫传感器制备完毕,将其保存在4 $^{\circ}$ C冰箱中备用。不同修饰电极的表面特性用扫描电镜S-3400(SEM)表征。

### 1.3 样品制备和传感器测定

生物传感器用于检测PBS溶液或者牛奶中的青霉素G。PBS溶液中的直接进行电化学测试。牛奶样品需要盐析处理以除去蛋白质和脂肪,参照武海<sup>[10]</sup>的方法做了少量修改如下:在牛奶样品中加入已知量的青霉素,然后加入适量硫酸铵(6 g/20 mL牛奶),于4  $^{\circ}$ C以8000 r/min离心30 min,滤取其上清液用于传感器测定。

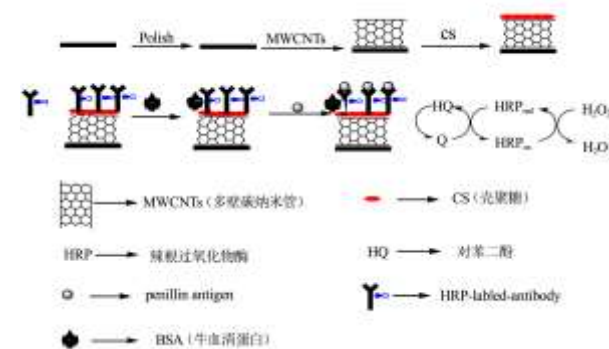


图1 免疫传感器的组装和检测

Fig.1 Procedure for assembly and detection of the immunosensor

阻抗免疫传感器在CHI 660B电化学工作站上进行(上海辰华仪器有限公司)。实验用三电极系统:实验室制备电极为工作电极;Ag/AgCl为参比电极;铂丝电极为对电极。实验在5 mL pH 7.0 PBS(含有2 mM对苯二酚)溶液中进行循环伏安测定。取10  $\mu$ L含有

青霉素的 PBS 溶液或者含有青霉素的牛奶样品进行循环伏安法测定。传感器的组装及其测定过程如下图 1 所示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 传感器的组装

传感器通过层层自组装技术制备，即在玻碳电极上固定MWCNTs，壳聚糖，HRP-Ab\*。根据青霉素抗体对抗原特异性结合，从而引起阻抗的变化，其中HRP可以催化H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的还原<sup>[11]</sup>进而催化对苯二酚的氧化还原，从而引起电流变化，因此可以根据电流变化确定青霉素的浓度。

起初，阻抗免疫传感器是通过戊二醛等交联剂将MWCNTs和HRP-Ab\*偶联起来，但是有文献表明这种方法制备的传感器具有稳定性差等缺点，因此本文利用层层自组装技术制备，即将MWCNTs与壳聚糖相结合，利用壳聚糖的成膜能力结合生物大分子于玻碳电极表面。壳聚糖是一种天然的聚电解质，具有较好的生物相容性和极好的成膜能力和极好的粘附性<sup>[12]</sup>，带负电的MWCNTs通过物理吸附在GCE上。壳聚糖的pKa为6.3，在pH 4.7的醋酸溶液中要质子化带正电，所以带负电的MWCNTs可以和带正电的壳聚糖形成稳定的复合物。青霉素酶（Ab\*）的等电点为5.4，在pH 7.0的PBS溶液中带负电，因此可以和MWCNTs-CS复合物牢固的结合，同时HRP酶在pH 7.0活性最大，这也HRP在中性和碱性溶液中活力最大相一致<sup>[13]</sup>。

### 2.2 传感器的表征

传感器的外貌图通过SEM观察。如图2，GCE被MWCNTs覆盖后呈绑带状均匀分散（a）。然后，沉积上壳聚糖后，表面表现粗糙和更加光滑（b）。等加上青霉素酶抗体后，表面表现的更加粗糙，并且有一些突起（c）。这些明显的外貌特性显示传感器的成功组装。

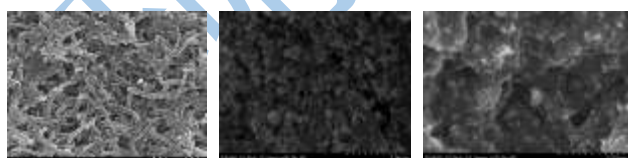


图 2 传感器的扫描电镜图

Fig.2 SEM images of MWCNT(a), MWCNT-CS(b), MWCNT-CS-penicillinase(c) modified GCE

### 2.3 免疫条件优化

#### 2.3.1 扫面速率的影响

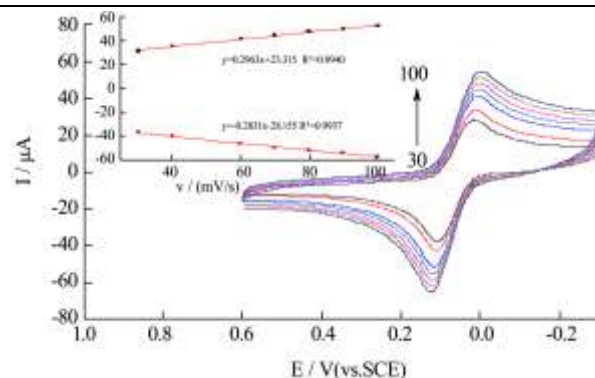


图 3 传感器在 0.02 M pH 7.0 PBS (含 2 mM 对苯二酚) 溶液中不同扫描速率下的 CV 图及其峰电流与扫面速率的关系图  
Fig.3 Cyclic voltammograms of immunosensor in 0.02 M PBS solution (pH 7.0) containing 2 mM hydroquinone at different scan rates

Inset: Plot of peak current vs scan rate: 30, 40, 60, 80, 90, 100 mV/s.

图3是传感器在0.02 M pH 7.0 PBS (含2 mM对苯二酚) 溶液不同扫描速度下的循环伏安图。由图3可知，峰电流之比 $i_{pa}/i_{pc} \approx 1$ ，峰电位在低扫描速率下基本不变， $\Delta E_p$ 约为210 mV，且可逆性良好。氧化峰和还原峰电流随着扫面速率的增加而增加（见图3插图），相关系数分别为0.9940、0.9937，这表明此电极反应呈现表面波性质。

#### 2.3.2 传感器对青霉素抗原的响应

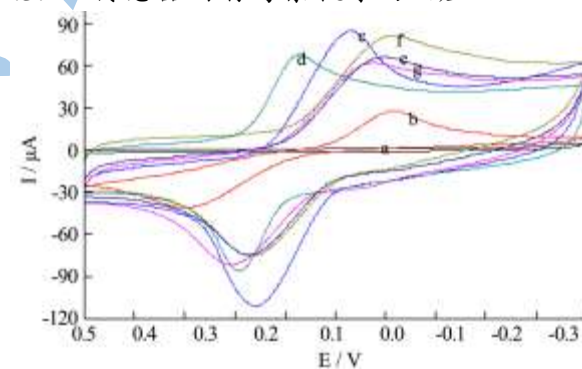


图 4 不同修饰电极在 K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 中的响应

Fig.4 The responses of different modified electrodes in 0.02 M PBS solution (pH 7.0)

注：(a) bare GCE, (b) a+2 mM Hydroquinone, (c) b+MWCNTs, (d) c+CS, (e) d+HRP-Ab\*, (f) e+5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (g) f+1 μg/L Ag.

图4是不同修饰电极在0.02 M PBS溶液中对青霉素抗原的响应。曲线a是裸玻碳电极的CV图，基本上没有氧化还原峰出现，当加上2 mM对苯二酚后可以看出在-0.094 v和0.260 v处有一对可逆的氧化还原峰（曲线b），当电极上沉积碳纳米管之后，还原峰和氧化峰的电流量明显偏大，这是由于碳纳米管的强导电性，同时说明



碳纳米管成功吸附在电极表面(曲线c),当电极上结合壳聚糖时,还原峰和氧化峰电流均变小,这是因为壳聚糖是生物大分子,阻碍了对苯二酚的氧化还原(曲线d)。当电极温育上适量抗体后,还原峰电流继续下降,因为抗体是生物蛋白质,会阻碍对苯二酚的还原(曲线e)。当溶液中加入2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>后,还原峰电流增加而氧化峰减少,这是因为标记在抗体上的HRP对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的还原有催化作用(曲线f)。当电极温育1 μg/L青霉素抗原后,电流明显减小(曲线g),说明抗原抗体形成了免疫复合物,阻碍了电子传输,导致电流进一步下降,因此说明传感器对青霉素抗原具有较好的免疫性响应。

### 2.3.3 缓冲液 pH 的影响

众所周知,缓冲液的pH对阻抗免疫传感器会产生较大的影响。为了找出最适宜的pH,免疫传感器在不同pH(5.5~8.0)的0.02 M PBS中进行循环伏安法测定(CV)。结果发现,从5.5到7.0时候电流响应会一直增加,当pH进一步增加时响应电流减小(见图5),结果显示pH在7.0时电流响应最大。同时,pH在7.0~8.0范围内变动时,电流又随之下降,这与HRP在中性和碱性时酶的活性最大。因此,综合考虑,我们选择pH 7.0作为最优的pH。

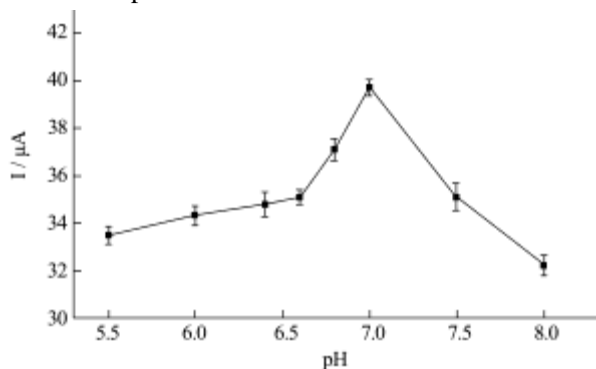


图 5 pH 对免疫传感器的影响

Fig.5 Effect of pH on CV peak current in PBS solution containing 2 mM Hydroquinone and 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### 2.3.4 免疫温度的影响

众所周知,孵育温度对于抗原抗体的特异性结合也是一个关键因素。我们研究了 15~50℃时抗原抗体免疫复合物对传感器的响应电流的影响(图6显示),可知在 15~30℃时电流迅速增大。因为此时青霉素酶及其 HRP 酶的活性随着温度的增加而迅速增大,所以免疫电流迅速增大。在 30℃趋于稳定,之后电流又随之减小。这主要是因为高温时 HRP 可能逐渐失活,导致 HRP 催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的还原进而催化对苯二酚的氧化还原能力减弱,所以电流急剧下降。综上所述,我们选择 30℃作为最佳的孵育温度。

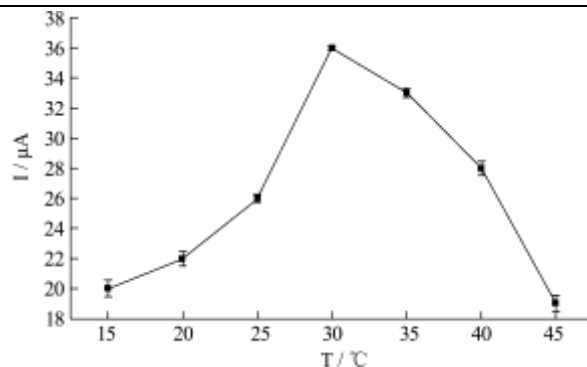


图 6 温度对免疫传感器的影响

Fig.6 Effect of temperature on CV peak current in PBS solution (pH 7.0) containing 2 mM Hydroquinone and 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### 2.3.5 免疫时间的影响

我们研究了免疫复合物形成时间对实验的响应电流。图7显示免疫修饰电极浸入到 1 μg/L 青霉素抗原中分别吸附 5、8、10、12、15、20、25 和 30 min 后电流的变化,可见响应电流随着时间的延长迅速下降在 20 min 时候最小之后趋于平稳,说明 20 min 时抗体和抗原的结合已经达到饱和,同时响应电流最小,之后再增加时间电流基本不再变化。因此,本实验选择 20 min 作为最佳的温育时间。

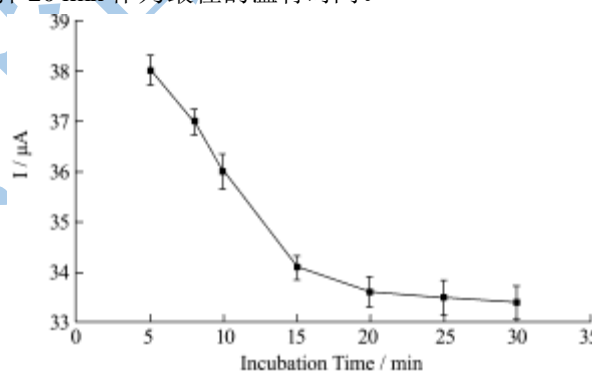


图 7 温育时间对免疫传感器的影响

Fig.7 Effect of incubation time on CV peak current in PBS solution (pH 7.0) containing 2 mM Hydroquinone and 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

## 2.4 标准曲线的测定

由于青霉素抗原与电极表面的青霉素抗体形成了抗原抗体免疫复合物,从而阻碍了电子传输,因此会导致响应电流减小,以还原峰电流对青霉素的浓度作图,从而得到青霉素标准溶液的标准曲线。由图8看出,当青霉素抗原浓度在 0.05~5.00 μg/L 范围时,传感器的电流对青霉素浓度有较好的线性关系,其线性方程为:  $y = -1.3043x + 19.682$ , 相关系数为 0.9853。以 20 次空白溶液的标准偏差的 3 倍除以灵敏度后,得检测限为 1.05 μg/L, 低于欧盟规定的 4 μg/L<sup>[14]</sup>。

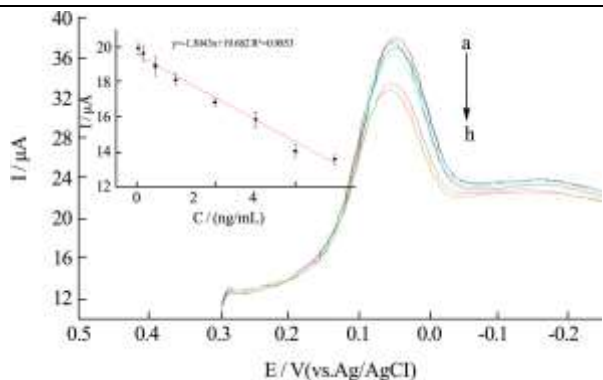


图8 免疫传感器对青霉素浓度的线性关系图

Fig.8 The linear relationship between reductive peak current and the penicillin concentration in ranges of 0.05-5.00  $\mu\text{g/L}$

注: (a)0.05、(b)0.2、(c)0.5、(d)1、(e)2、(f)3、(g)4、(h)5。

## 2.5 牛奶中青霉素的检测

在牛奶样品中分别加入适量的青霉素标液, 经过预处理后分别配制成 1  $\mu\text{g/L}$ 、2  $\mu\text{g/L}$ 、3  $\mu\text{g/L}$  的青霉素样品, 用所制备的免疫传感器进行检测。同时, 对这三个浓度进行 ELISA 测定, 其测定结果如下表所示。由下表 1 可知, 此方法和 ELISA 测定的结果没有明显差异, 说明此传感器可以实现对实际样品中青霉素的检测。

表 1 牛奶中青霉素的检测结果 (n=4)

Table 1 Determination results of penicillin in milk

样品	青霉素/( $\mu\text{g/L}$ )					
	此方法	ELISA	此方法 RSD/%	添加量	检测量	回收率/%
1	0.90	0.93	3.20	1.00	1.86	98.40
2	0.95	0.92	3.80	2.00	2.83	97.60
3	0.93	0.96	4.32	3.00	3.73	95.70

## 2.6 重复性和稳定性

分别同一批制备的 3 支电极测定对 1  $\mu\text{g/L}$  的青霉素标液, 测定其传感器的重现性。测定的响应电流分别为: 37.76、38.27、36.91, 免疫传感器的分析内相对标准偏差为 5%, 说明传感器重现性较好。

采取同一支电极测定不同浓度的青霉素标液。结果表明, 传感器的分析内相对标准偏差小于 4%, 说明此传感器具有较好的重现性。

另外, 将制备的传感器保存于 4  $^{\circ}\text{C}$  的冰箱中, 20 天后测定 1  $\mu\text{g/L}$  的青霉素, 响应电流仅仅下降了 4%, 说明此传感器具有较好的稳定性。

## 2.7 特异性

在 PBS 溶液中分别加入相同浓度的其他抗生素, 分别为氨苄青霉素、链霉素、罗红霉素、克林霉素、

头孢噻夫, 和青霉素对比, 其影响分别为青霉素电流响应的 10%、5.6%、6.3%、7% 和 2.5%, 结果显示上述添加的其他物质对青霉素的检测影响比较小, 由此说明传感器具有较好的特异性。

## 3 结论

本论文证明了 MWCNTs 增强青霉素免疫传感器的灵敏度, 从而更好的对青霉素进行定量检测。在优化的条件下传感器电极的检测限是 1.05  $\mu\text{g/L}$ , 低于欧盟的 4  $\mu\text{g/L}$ , 而且与其他的免疫传感器相比, 这个免疫传感器具有制备简单、响应时间短、灵敏度高等优点。同时它也容易受到牛奶中其他物质的干扰。通过和 ELISA 方法对比可知, 本文制备的传感器和 ELISA 测定的结果没有明显差异, 但是此传感器制备简单, 操作方便, 同时具有快速响应, 灵敏度高特性, 所以可以满足牛奶中青霉素的快速痕量检测等要求。

## 参考文献

- [1] Švorc L, Sochr J, Rievaj M, et al. Voltammetric determination of penicillin V in pharmaceutical formulations and human urine using a boron-doped diamond electrode [J]. *Bioelectrochemistry*, 2012, 88: 36-41
- [2] 丁志刚, 王静, 高红梅. 抗生素残留检测技术的研究进展 [J]. *食品与发酵工业*, 2005, 31(6): 112-116  
Ding Z G, Wang J, Gao H M. Research Advance on Detection Technique of Residual Antibiotics [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2005, 31(6): 112-116
- [3] Norouzi P, Ganjali MR, Daneshgar P, et al. Development of fast Fourier transformation continuous cyclic voltammetry as a highly sensitive detection system for ultra trace monitoring of penicillin V [J]. *Analytical Biochemistry*, 2007, 360: 175-181
- [4] 蔡丽萍, 刘树彬, 李梅. 液相色谱/质谱对动物源性食品中残留抗生素的检测 [J]. *河北化工*, 2010, 33(2): 60-62  
Cai L P, Liu S B, Li M. Liquid Chromatography- Mass Spectrometry to Residue Determination of Antimicrobials in Animal Derived Food [J]. *Hebei Chemical*, 2010, 33(2): 60-62
- [5] Alhama J, Romero-Ruiz A, López-Barea J. Metallothionein quantification in clams by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection after monobromobimane derivatization [J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1107: 52-58
- [6] Chen HC, Chang TC. Detection of Penicillin G in Milk Using a Conductimetric Method [J]. *Journal of Dairy Science*,

- 1994, 77(6): 1515-1520
- [7] 汤俊琪, 庞广昌, 王景川. 电化学免疫传感器在食品安全检测中的应用进展[J]. 理化检测, 2011, 47: 986-992  
Tang J Q, Pang G C, Wang J C. Progress of Application of Electrochemical In immuno-sensors in Detections for Food Safety [J]. Physical and Chemical, 2011, 47: 986-992
- [8] Sartori ER, Vicentini FC, Fatibello-Filho O. Indirect determination of sulfite using a polyphenol oxidase biosensor based on a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes and gold nanoparticles within a poly(allylamine hydrochloride) film [J]. Talanta, 2011, 87: 235-242
- [9] He P, Wang Z, Zhang L, et al. Development of a label-free electrochemical immunosensor based on carbon nanotube for rapid determination of clenbuterol [J]. Food Chemistry, 2009, 112(3): 707-714
- [10] 武海, 杨维, 马洁. 电化学免疫传感器测定牛奶中的青霉素 [J]. 化学通报, 2008, 5: 394-397  
Wu H, Yang W, Ma J. Determination of Penicillin in Milk by the Electrochemical Immunosensor [J]. Chinese Journal of Chemistry, 2008, 5: 394-397
- [11] Wu Y Z, Gan N, Hu F T, et al. A Sandwich-type Amperometric Immunosensor Based on One-dimensional Assembly of Magnetic DNA Nanoprobes [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2011, 39(1): 1634-1640
- [12] Yang L, Xiong H, Zhang X, et al. A novel tyrosinase biosensor based on chitosan-carbon-coated nickel nanocomposite film [J]. Bioelectrochemistry, 2012, 84: 44-48
- [13] 陈绪胃, 李建平, 俞建国. 新型磁性纳米金修饰过氧化氢生物传感器的研制[J]. 分析测试学报, 2008, 27(4): 396-400  
Chen X Z, Li J P, Yu J G. Development of a Novel Magnetic Nano Gold Modified Hydrogen Peroxide Biosensor [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2008, 27(4): 396-400
- [14] Thavarungkul P, Dawan S, Kanatharana P, et al. Detecting penicillin G in milk with impedimetric label-free immunosensor [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2007, 23(5): 688-694