

# 碳纳米管/乙酰胆碱酯酶电化学生物传感快速检测有机磷农药残留

杜平

(滨州学院化学工程系, 山东滨州 256603)

**摘要:** 有机磷属于神经毒物, 能够抑制血液和组织中乙酰胆碱酯酶 (AChE) 的活性。水溶液中的氯化硫代乙酰胆碱 (ATCl) 在 AChE 催化下水解形成巯基胆碱 (TCl), TCl 在电极表面氧化, 可以检测到较大的电流信号。有机磷的存在, 降低 AChE 活性的同时, 使得催化水解产生的 TCl 电化学信号减小。鉴于此原理, 研究构建了碳纳米管/聚 4-(2,5-二噻吩-1-吡咯)苯胺/乙酰胆碱酯酶电化学传感器 (AChE/p-DSPAB/FMWNTs), 对溶液的有机磷进行定量分析。电极 MWNTs 修饰量为  $1.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 电极 AChE 固载量为 1.5 U。最佳条件下, 以  $3.0 \text{ ng}/\text{mL}$  氯化硫代乙酰胆碱 (ATCl) 为底物, 在  $5.0 \text{ mL } 50 \text{ mmol}/\text{L}$  PBS ( $\text{pH}=7.0$ ) 溶液中, 采用微分脉冲伏安法进行测定, 电位增量  $0.006 \text{ V}$ 、脉冲幅度  $0.05 \text{ V}$ 、脉冲宽度  $0.1 \text{ V}$ 、脉冲间隔  $0.1 \text{ s}$ 。传感器对有机磷检测线性范围为  $3.00 \text{ ng}/\text{mL} \sim 90.00 \text{ ng}/\text{mL}$ , 最低检测限为  $1.00 \text{ ng}/\text{mL}$  ( $S/N=3$ )。与高效液相色谱法相比, 该法具有简便、准确、快速、样品预处理简单等优点。

**关键词:** 多壁碳纳米管; 导电聚合物; 乙酰胆碱酯酶; 电化学生物传感器; 农药残留

文章编号: 1673-9078(2015)11-284-289

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.11.043

## Rapid Determination of Organic Phosphorus Pesticide Residue by a Carbon Nanotube/Acetylcholinesterase Electrochemical Biosensor

DU Ping

(Department of Chemical Engineering of Binzhou University, Binzhou 256603, China)

**Abstract:** Organic phosphorus is a type of neurotoxin capable of inhibiting the activity of acetylcholinesterase (AChE) in the blood and tissues. During AChE catalysis, acetylthiocholine chloride (ATCl) was hydrolyzed to thiol choline (TCl) in aqueous solution, and TCl was oxidized on the surface of the electrode, thus enabling the detection of large current signals. However, both AChE activity and TCl electrochemical signals produced by hydrolysis decreased in the presence of organic phosphorus. Based on this principle, a new biosensor for the quantitative determination of organic phosphorus was constructed by immobilizing functionalized multi-wall carbon nanotubes (FMWCNTs), p-DSPAB, and AChE on the surface of carbon-paste electrodes. The content of MWNTs was  $1.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  and the AChE load on the modified electrode was 1.5 U. Under optimal conditions, the measurement of organic phosphorus by differential-pulse voltammetry was performed in  $5.0 \text{ mL}$  of  $50 \text{ mmol}/\text{L}$  PBS ( $\text{pH } 7.0$ ) solution using  $3.0 \text{ ng}/\text{mL}$  ATCl as the substrate. The detection parameters were as follows: pulse increment,  $0.006 \text{ V}$ ; pulse amplitude,  $0.05 \text{ V}$ ; pulse width,  $0.1 \text{ V}$ ; and pulse interval,  $0.1 \text{ s}$ . According to the change in the response current and the concentration of organic phosphorus, the biosensor offered a linear range of  $\sim 3.00\text{--}90.00 \text{ ng}/\text{mL}$  for the detection of organic phosphorus, and the detection limit was  $1.00 \text{ ng}/\text{mL}$  ( $S/N=3$ ). Compared with HPLC, this method has the advantages of simplicity, rapidity, sensitivity, and accuracy in the determination of organic phosphorus.

**Key words:** acetylcholinesterase; conductive polymer; electrochemical biosensor; functionalized multi-walled carbon nanotubes; pesticide residue

在我国, 有机磷农药品种多, 毒性高, 作为农业

收稿日期: 2015-01-10

基金项目: 山东省高校科技发展计划项目 (2012GGX10206); 滨州市科技发展计划项目 (2013ZC1603); 滨州学院科研基金项目 (2009Y02, BZXYG1515, 801001021408)

作者简介: 杜平 (1980-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 电化学生物传感器

杀虫剂, 被广泛的应用于防治植物病、虫、害。大量使用导致有机磷其在农产食品中残留和累积。长期食用含有有机磷残留超标的食品, 不仅能够抑制人体内乙酰胆碱酯酶的活性, 导致乙酰胆碱积聚引起烟碱样症状以及中枢神经系统症状, 严重时可能因呼吸麻痹而导致死亡<sup>[1]</sup>。因此, 针对久效磷农药残留建立快速、灵敏、高选择性的痕量分析检测方法有着重要的意义。

近年来,众多全球学者致力于研究建立一种能够监测环境中有机磷的高效分析方法。目前,农药残留的检测方法主要有表面等离子共振、质谱、高效液相色谱、气相色谱等<sup>[2-5]</sup>。这些传统的方法在农药残留检测方面具有较好的灵敏度、精密度和可靠性。但是这些检测方法检测不仅耗时长,成本高、对仪器检测人员的要求较高,不适合实时、实地快速监控。水溶液中乙酰胆碱酯酶能够对氯化乙酰胆碱进行催化水解,生成电活性物质硫代胆碱,产生明显的电流。而有机磷农药残留的存在,对乙酰胆碱酯酶的酶催化活性产生抑制作用,降低酶活性的同时,使得催化水解产生的电化学信号减小。因此乙酰胆碱酯酶电化学生物传感由于其仪器操作简单、测定速度快、检测灵敏度高特点在食品中农药残留快速检测方面受到了广泛关注<sup>[6]</sup>。将乙酰胆碱酯酶有效固定在修饰电极的表面,通过抑制前后电化学催化水解生成硫代胆碱产生的电流的变化,来间接实现有机磷含量的检测。本研究利用功能化的多壁碳纳米管、4-(2,5-二噻吩-1-吡咯)苯胺导电聚合物(poly-DSPAB)修饰电极,固定乙酰胆碱酯酶,制备了一种能够对有机磷农药残留实现实时、实地、快速测定的新型的电化学生物传感器。同时,该生物传感器还实现了实际蔬菜样品中久效磷农药残留的高灵敏检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器和试剂材料

CHI660C电化学工作站,上海辰华仪器公司;三电极系统:碳糊电极(3 mm)为工作电极,Ag/AgCl电极为参比电极,铂丝为对电极。日本岛津LC-6A高效液相色谱仪、岛津紫外可见分光光度检测器SPD-6AV、C18色谱柱、数据处理装置C-R3A。乙酰胆碱酯酶(Acetylcholinesterase, AChE, 518 U/mg, Sigma试剂);氯化硫代乙酰胆碱(ATCI);有机磷标准品(科密欧试剂);多壁碳纳米管(北京瑞安碳材料有限公司);1,4-二(2-噻吩)-1,4-丁二酮(Sigma);1,4-二氨基苯(Sigma);1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDC,上海国药集团有限公司);N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,上海博奥生物科技有限公司);实验过程中所用的水均为超纯水。

### 1.2 2,4-(2,5-二噻吩-1-吡咯)苯胺的制备

根据文献<sup>[7]</sup>,以丙酸为催化剂,在溶液中利用1,4-二(2-噻吩)-1,4-丁二酮和1,4-二氨基苯为反应物,合成制备,之后将反应后的混合溶液经柱层析处理后,

得到所需要的浅黄色4-(2,5-二噻吩-1-吡咯)苯胺(DSPAB)固体粉末。

### 1.3 修饰电极的制备

依次用0.3 μm、30 nm Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>粉末抛光后预处理后的碳糊电极,在进一步打磨后,依次用去离子水、1:1乙醇溶液、1:1 HNO<sub>3</sub>溶液超声清洗。彻底洗涤后,经0.1 mol/L的硫酸溶液中进行电化学伏安法活化,直至获得稳定的循环曲线为止,氮气环境下干燥备用。称取1 mg多壁碳纳米管(MWNTs)放入100 mL烧杯,量取10 mL DMF液加入烧杯混合后超声30 min,得到黑色的功能化多壁碳纳米管(FMWNTs)悬浮液。移去上述悬浮液10 μL悬滴于电极表面,室温下自然晾干,用0.1 mol/L磷酸盐缓冲液(pH 8.0)彻底冲洗干净(扫描电镜图如图1)。将上述电极浸入1.0 mol/L NaOH溶液中于1.5 V电压下扫描150 s,对电极上修饰的多壁碳纳米管进行羧基化处理,取出电极用去离子水进行冲洗。将修饰电极浸入含有制备的DSPAB单体和0.1 mol/L氯酸钠、氯酸锂和丙烯腈混合电解液中于-0.5 V~1.2 V电压范围内进行循环伏安扫描,实现了p-DSPAB在电极表面的修饰,二次去离子水冲洗后,自然晾干。再次悬滴3.0 μL AChE(1.5U, 0.1 M EDC和0.4 M NHS的PBS缓冲溶液, pH=7.0),静置,过夜放置自然晾干。制备好的修饰电极放在4 °C冰箱中保存备用。

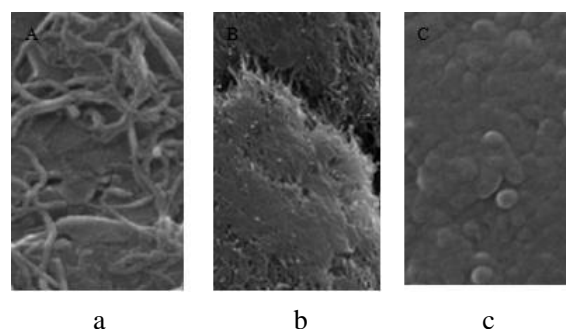


图1 修饰电极表面扫描电镜图

Fig.1 SEM picture of the modified electrode

注: a: FMWNTs/CPE; b: p-DSPAB/FMWNTs/CPE; c: AChE/p-DSPAB/FMWNTs/CPE。

### 1.4 实验方法

以氯化硫代乙酰胆碱(ATCI)碱为底物,溶液中的ATCI在电极表面乙酰胆碱酯酶(AChE)催化下水解形成巯基胆碱(TCI),接着TCI在电极表面被氧化,在这一过程中该传感器可以检测到较大的电流信号;当溶液中存在一定浓度的有机磷农药时,由于AChE的活性受到抑制,从而导致传感器对ATCI的响应电流

减小。测定中将修饰电极经pH=7.0的PBS缓冲溶液冲洗去除未交联的AChE后,在磁力搅拌下,将插入5.0 mL 50 mmol/L的PBS电解池中,进行微分脉冲伏安测定。待测定电流曲线趋于平稳后,将一定量的ATCL注入电解液中,待电流相应再次趋于平稳后,记录电流大小 $I_0$ ;将电极取出后,再洗浸入不同含有有机磷农药的溶液中,抑制10 min,将电极清洗后,再次插入上述ATCL电解液中,观察电流变化,待平稳后记录为 $I_1$ 。基于有机磷含量根据传感器与有机磷发生反应前后电流值的变化( $\Delta I=I_0-I_1$ )而测得<sup>[7]</sup>。

## 1.5 高效液相色谱法(HPLC)测定有机磷含量

HPLC分析条件:采用甲醇-水为流动相,甲醇:水(V:V)=70:30;流速为1.0 mL/min;柱温室温;检测波长为254 nm;进样量为10  $\mu$ L;保留时间为8.20 min。样品浓度计算:以峰面积值—有机磷浓度绘制标准曲线,根据标准曲线方程,计算样品中有机磷胺的浓度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 传感器的自组装

一般而言,为保证传感器制备和测定中固载酶的活性、电极的稳定性和灵敏度,电极的修饰中通常采用共价键合<sup>[8]</sup>、化学交联<sup>[9]</sup>、静电<sup>[10]</sup>和物理吸附<sup>[11]</sup>等方法。研究利用 FMWNTs、p-DSPAB 修饰电极,固定 AChE,制备了一种能够实现对有机磷农药残留高效测定的新型的电化学生物传感器(如图2)。MWNTs 具有纳米尺寸的特殊管状结构,表面积大,良好的导电和生物兼容性<sup>[12]</sup>,在电极修饰中增加了固定和修饰生物活性分子的电极表面积<sup>[13]</sup>。其 $\pi$ - $\pi$ 键和疏水作用,使得碳纳米管能够与一些芳香族化合物相互结合<sup>[14]</sup>。导电聚合物电聚合简单,导电性好,环境性质稳定,最重要的可以通过电聚合中能够通过优化自身的结构和电学性质,在电极修饰中为生物分子提供一个导电性、稳定性和附着性良好的固载平台。FMWNTs 和导电聚合物 p-DSPAB 在电极上的修饰,既发挥了碳纳米管的结构优势,降低了电子的扩散,加快了电子在电极上的传递效率,提高了电极的检测灵敏度;又进一步巩固了电极的机械稳定性,实现了两者在电极修饰中协同和亲和。此外,实验中制备的导电聚合物上大量的氨基和功能化的多壁碳纳米管所提供的大量羧基,均能够通过共价键合作用实现 AChE 在修饰电极

上的大量稳定固载,通过有机磷对于 AChE 的活性抑制,而导致的氧化电流大小的变化,实现有机磷含量的直接电化学检测。

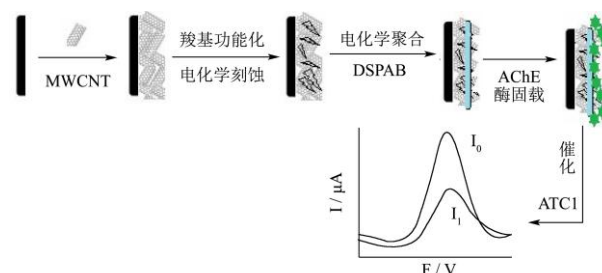


图2 电化学生物传感器的组装

Fig.2 Assembly of the electrobiosensor

### 2.2 传感器的电化学表征

对制备电极在含有 5.0 mol/L  $K_3Fe(CN)_6$  和 0.1 mol/L KCl 的溶液中进行循环伏安表征,扫描电位为 -0.25 V~1.0 V,扫描速度为 100 mV/s,见图3所示。曲线1为CPE裸电极的循环伏安曲线,具有良好的氧化还原峰。曲线2为FMWNTs/CPE修饰的电极的循环伏安曲线,峰电流明显增大,表明FMWNTs在碳糊电极表面的吸附,不但增大了电极表面的有效表面积,同时使得电极表面的导电性明显增强。曲线3为修饰电极表面电化学聚合后的电极(p-DSPAB/FMWNTs/CP),与曲线2相比,电流信号连续增大,氧化还原峰电流值明显减小,表明导电聚合物和碳纳米管在电极表面的修饰,协同加快了电子的传递速率。曲线4是固定了AChE的酶修饰电极,生物酶分子在电极上的固定,使得曲线的 $i_{pa}$ 和 $i_{pc}$ 分别较曲线3明显变小,结果说明AChE已成功有效的固定在了修饰电极上。

交流阻抗法是在频率变化过程中测量电极表面阻抗的方法,通过测定电极表面修饰各种物质前后表面阻抗的变化,可以成功实现生物传感器的设计表征。图4为不同修饰电极在 $K_3Fe(CN)_6$ 和KCl溶液中的获得的交流阻抗图。曲线a(CPE)在高频部分出现很小的半圆,表明铁氰化钾较容易到达电极表面发生氧化还原反应。曲线b近似一条直线,表明此时电极有良好的导电性,证明了电极上多壁碳纳米管的修饰,能够加快电子有效的传递速度和电极的导电性。曲线c为p-DSPAB/FMWNTs/CP修饰电极的交流阻抗图,在高频部分出现了非常明显的半圆,说明导电聚合物的修饰降低了修饰电极的有效表面积。固定了AChE后曲线d,说明不导电生物分子的存在阻碍了电荷在电极表面的有效传递。图4与图3结果一致,说明了电化学修饰电极已成功完成。

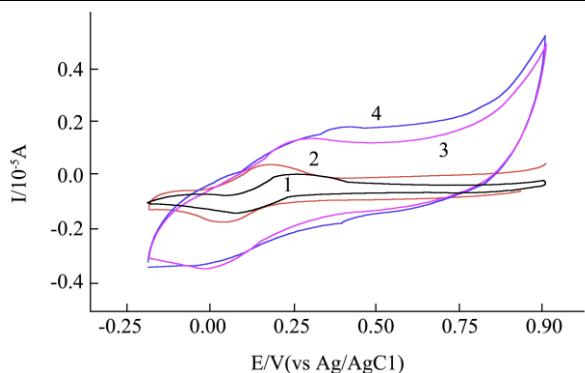


图3 不同修饰电极在 5.0 mol/L  $K_3Fe(CN)_6$  和 0.1 mol/L KCl 溶液中的循环伏安图

Fig.3 CV picture of different modified electrodes in 5.0 mol/L  $K_3Fe(CN)_6$  and 0.1 mol/L KCl solution

注: (1) CPE; (2) FMWNTs/CPE; (3) p-DSPAB/FMWNTs/CPE; (4) AChE/p-DSPAB/FMWNTs/CPE.

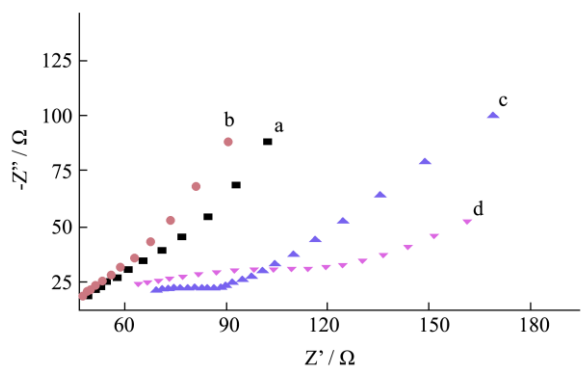


图4 不同修饰电极在 5.0 mol/L  $K_3Fe(CN)_6$  和 0.1 mol/L KCl 溶液中的交流阻抗图

Fig.4 Typical Nyquist plots of different modified electrodes in 5.0 mol/L  $K_3Fe(CN)_6$  and 0.1 mol/L KCl solution

注: (a) CPE; (b) FMWNTs/CPE; (c) p-DSPAB/FMWNTs/CPE; (d) AChE/p-DSPAB/FMWNTs/CPE.

## 2.3 测定条件优化

### 2.3.1 扫描圈数的优化

导电聚合物的在修饰电极上的聚合厚度能够影响修饰电极的电化学响应。厚度太薄,容易降低修饰电极的牢固度和稳定性;厚度太大,会阻碍电荷在电极上的扩散和传递,导致修饰电极上较低电子迁移率。因此,在-0.5 V~1.2 V电压范围内,保持其它参数不变,分别对修饰电极进行了15、25、35、45圈的循环伏安聚合,考察了其对修饰电极在 $K_3Fe(CN)_6$ 和 0.1 mol/L KCl溶液中电流响应的影响。结果表明,电流信号随着扫描次数的增加,在25圈时达到最大,之后随着次数的增加,电流信号逐渐降低,故选择25圈作为电化学聚合的最佳扫描圈数。

### 2.3.2 缓冲溶液 pH 值的影响

考虑到 pH 值对生物酶的稳定性和催化活性的影响,考察了 pH 5.5~8.0 范围内,50 mmol/L 的 PBS 溶液对传感器测定响应电流差值的影响(如图 5 所示)。随着溶液 pH 的增大,修饰电极电流相应差值  $\Delta I$  逐渐增大;当 PBS 的 pH 值高于 7.0 后,  $\Delta I$  随着 pH 的升高而逐渐减小。结果表明,在 pH 值为 7.0 的 PBS 缓冲溶液中,传感器对有机磷表现出了最佳的检测效果。故实验中 pH=7.0 作为 PBS 缓冲溶液的酸度值。

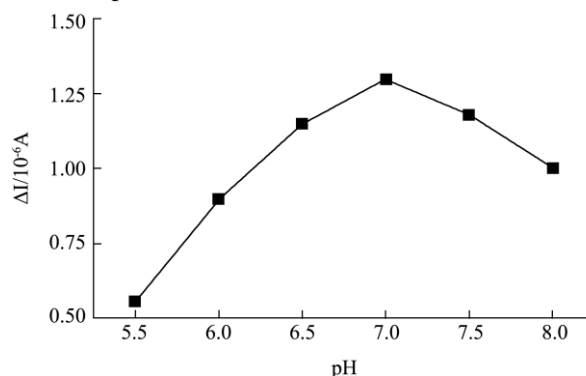


图5 不同测定 pH 对传感器测定效果的影响(底物浓度为: 3.0 ng/mL)

Fig.5 Effects of the detection pH value on the prepared biosensor (substrate concentration: 3.0 ng/mL)

### 2.3.3 抑制时间的影响

有机磷对生物酶 AChE 的抑制时间也是影响传感器检测性能的重要因素。在所选择的的最佳反应条件下,考察了 2~15 min 内,抑制时间对传感器响应电流差值的影响(如图 6)。结果表明,随着抑制时间的延长,传感器检测到的响应电流差值  $\Delta I$  逐渐增大,抑制时间达到 10 min 后,电流相应差值  $\Delta I$  几乎不再变化,说明 AChE 在 15 min 时,其活性已经被有机磷几乎抑制完全。所以,选择 10 min 作为有机磷对制备传感器的最佳抑制时间。

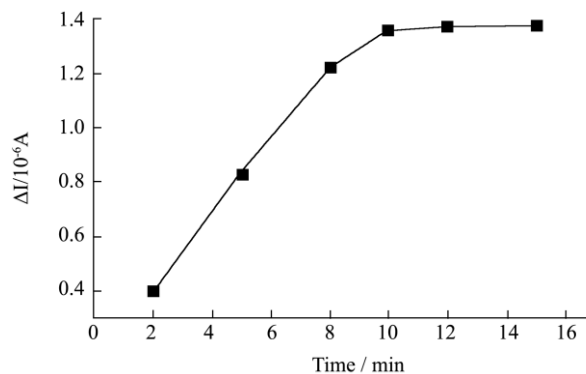


图6 有机磷对传感器的抑制时间对测定效果的影响

Fig.6 Influence of inhibition time on the biosensor in permanent phosphorus

注: 底物浓度为: 3.0 ng/mL。

## 2.4 标准曲线的测定

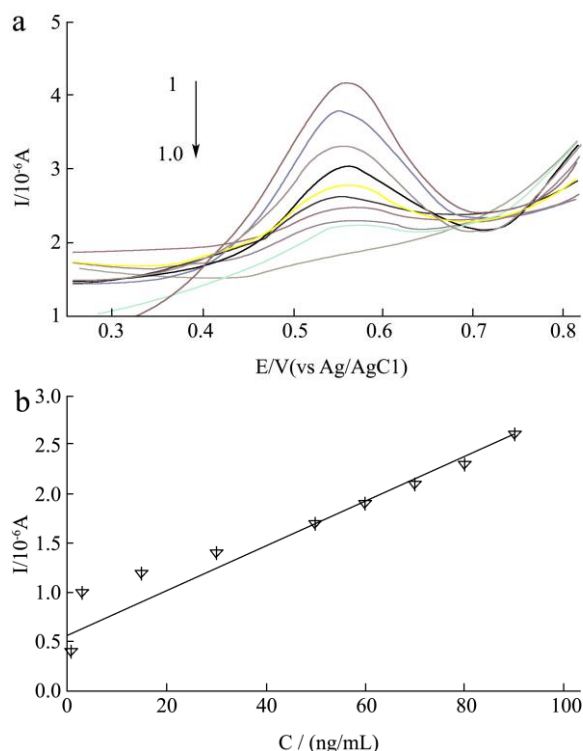


图7 DPV峰电流对有机磷浓度的线性关系图

Fig.7 Linear correlation of the DPV and the concentration of permanent phosphorus

注: 由上而下: 0、1.0、3.0、15.0、30.0、50.0、60.0、70.0、80.0、90.0 ng/mL。

以氯化硫代乙酰胆碱(ATCI)为底物,当溶液中存在一定浓度的有机磷农药时,由于乙酰胆碱酯酶的活性受到抑制,从而导致传感器对ATCI的响应电流减小。实验中,首先pH=7.0 PBS对有机磷标准品进行稀释,以配置0.8 ng/mL、5.0 ng/mL、20.0 ng/mL、30.0 ng/mL、40.0 ng/mL、50.0 ng/mL、60.0 ng/mL、70.0 ng/mL、80.0 ng/mL等一系列浓度的有机磷溶液。在选定的最佳条件下,以ATCI为底物,进行微分脉冲伏安(DPV)检测并记录,如图7所示。从图中可以看出,随着有机磷浓度的增大,ΔI值逐渐增大,且在3.0 ng/ml~90.0 ng/mL范围内,ΔI与有机磷浓度呈良好的线性关系,线性回归方程为:ΔI=0.01523C+0.9536,相关系数为γ=0.9956,检测限为1.0 ng/mL(S/N=3)。

## 2.5 蔬菜样品中有机磷含量的测定

用蒸馏水对市场上购买的韭菜、菠菜和黄瓜等蔬菜样品,进行清洗,洗净后晾干。分别称取1.0 g蔬菜样品,粉碎后转移至离心管中,加入1.0 mL的缓冲溶液,超声、离心后取上层清液进行直接测定。实验采

用标准加入法,利用制备的修饰电极对菠菜样品所含的有机磷浓度进行了检测,如表1所示,其回收率在97.33%~103.14%,相对标准偏差为3.11%~4.83%。同时将电化学生物传感器对上述三种蔬菜样品的检测结果与HPLC检测结果进行了对比,如表2所示。结果表明电化学传感器法测得的蔬菜中有机磷残留含量与HPLC法测定的结果具有良好的一致性,且电化学传感器法测定有机磷简便、快速,灵敏度高。

表1 菠菜样品中的有机磷残留含量检测结果(n≥3)

Table 1 Detection of pesticide residues in Bocai vegetable

样品	samples			
	添加量 (ng/mL)	检出量 (ng/mL)	RSD (%)	回收率 (%)
	0.00	-	-	-
菠菜	15.00	14.60	3.11	97.33
	35.00	36.10	3.90	103.14
	95.00	93.40	4.83	98.32

表2 电化学生物传感器法和HPLC法测定蔬菜中有机磷残留的结果比较

Table 2 Comparison of the detection between the electrobiosensor and HPLC for three vegetable samples

样品	传感器结果		HPLC结果	
	(μg/kg, x±SD)	RSD (%)	(μg/kg, x±SD)	RSD (%)
菠菜	2.51±0.20	1.21	2.71±0.50	2.23
韭菜	3.76±0.15	1.45	3.52±0.22	1.37
黄瓜	2.66±0.12	1.60	2.53±0.23	2.06

## 2.6 传感器的稳定性和重复使用率

相同底物浓度下,同一根修饰电极进行微分脉冲伏安检测,15 d内,峰电流信号几乎保持不变。将制备的修饰电极在4°C下保存45 d后,进行电化学检测,检测信号为初始峰电流的70.50%,说明酶在修饰电极上的成功实现交联固定,使得传感器表现出了良好的稳定性和较长的使用寿命。将一定量的含有机磷、硫醚和硫醇等农药注入电解液中,相同条件下,检测电流为初始峰电流的99.6%,结果表明传感器具有良好的选择性和抗干扰性。

## 3 结论

本文基于有机磷农药对乙酰胆碱酯酶的抑制作用,利用多壁碳纳米管、聚苯胺类衍生物在碳糊电极表面固载乙酰胆碱酯酶,制备了新型的电化学生物传感器用于农药残留中有机磷的高效、快速直接电化学检测。多壁碳纳米管和导电聚合物在电极表面的修饰,不仅为酶分子的固定提供了一个优质的修饰平台,而

且促进了电子在乙酰胆碱酯酶活性位点和电极之间的迁移;同时导电聚合物提供的氨基和生物酶通过形成酰胺基发生交联作用,使得酶在电极表面的固载更加牢固、稳定。在最优条件下,利用制备的传感器对有机磷进行检测的线性范围为3.00 ng/mL~90.00 ng/mL,最低检测限为1.00 ng/mL(S/N = 3)。该传感器灵敏度高、具有良好的选择性和稳定性,该方法为电化学生物传感器在食品中农药残留的快速检测拓展了方向。

### 参考文献

- [1] Raghu P, Reddy T M, Reddaiah K, et al. Acetylcholinesterase based biosensor for monitoring of malathion and acephate in food samples: a voltammetric study [J]. Food Chemistry, 2014, 142:188-196
- [2] Li X H, Chen G Y, Yang L B, et al. Multifunctional au-coated TiO<sub>2</sub> nanotube arrays as recyclable SERS substrates for multifold organic pollutants detection [J]. Advanced Functional Materials, 2010, 20: 2815-2824
- [3] Ye J, Wu J, Liu We P, et al. Enantioselective separation and analysis of chiral pesticides by high performance liquid chromatography [J]. Trends in Analytical Chemistry, 2009, 28(10): 1148-1163
- [4] 孙翔宇,杜国荣,马婷婷,等.RP-HPLC 法同时测定葡萄酒、果酒、果醋中 16 种单体酚的含量[J].现代食品科技, 2014, 30(12):201-209  
SUN Xiang-yu, DU guo-rong, MA Ting-ting, et al. Simultaneous determination of the contents of 16 types of monophenols in wine, fruit wine, and fruit vinegar by RP-HPLC [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(12): 201-209
- [5] Fang G Z., Chen W, Yao Y P, et al. Multi-residue determination of organophosphorus and organochlorine pesticides in environmental samples using solid-phase extraction with cigarette filter followed by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Separation Science, 2012, 35(4): 534-540
- [6] Wu S, Huang F F, Lan Xiaoqin, et al. Electrochemically reduced graphene oxide and Nafion nanocomposite for ultralow potential detection of organophosphate pesticide [J]. Sensors and Actuators B, 2013, 177: 724-729
- [7] Zhao Y, Zhang W, Chen H, et al. Direct electrochemistry of horseradish peroxidase at carbon nanotube powder microelectrode [J]. Sens Actuators B, 2002, 87(1): 168-172
- [8] Solna R, Dock E, Christenson A, et al. Amperometric screen-printed biosensor arrays with co-immobilised oxidoreductases and cholinesterases [J]. Anal. Chim. Acta, 2005, 528: 9-19
- [9] Curruli A, Drugulescu S, Cremisini C, et al. Enzyme amperometric probes for choline and choline esters assembled with nonconducting electrosynthesized polymers [J]. Electroanalysis, 2001. 13, 236-242
- [10] Zhao Y, Zhang Y, Lin Y, et al. The vital function of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au nanocomposites for hydrolase biosensor design and its application in detection of methylparathion [J]. Nanoscale, 2013, 5, 1121-1126
- [11] Palchetti I, Cagnini C, Carlo M D, et al. Determination of anticholinesterase pesticides in real samples using a disposable biosensor [J]. Anal. Chim. Acta, 1997, 337, 315-321
- [12] Gao C, Guo Z, Liu L H, et al. The new age of carbon nanotubes: an updated review of functionalized carbon nanotubes in electrochemical sensors [J]. Nanoscale, 2012, 4, 1948-1963
- [13] Wang J, Deo R P, Poulin P, et al. Carbon nanotube fiber microelectrodes [J]. J. Am. Chem. Soc., 2003, 25, 14706-14707
- [14] Yan Y, Zhang M, Gong L, et al. Adsorption of methylene blue dye onto carbon nanotubes: a route to an electrochemically functional nano-structure and its layer-by-layer assembled nanocomposite [J]. Chem. Mater., 2005, 17, 3457-3463