

# 血红蛋白/纳米金-还原氧化石墨烯复合物修饰电极 对食品中亚硝酸盐的快速电化学传感检测

徐后传, 丁顺, 操小栋, 叶应旺, 叶永康, 孙汉巨

(合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽合肥 230009)

**摘要:** 本文利用牛血红蛋白(hemoglobin, Hb)与纳米金-还原氧化石墨烯(gold nanoparticles-reduced Graphene Oxide, AuNPs-rGO)结合修饰的玻碳电极对亚硝酸盐进行检测, 通过血红蛋白对亚硝酸根( $\text{NO}_2^-$ )进行还原得到高铁血红蛋白和 $\text{NO}_3^-$ 所产生的直接电子转移信号来对 $\text{NO}_2^-$ 进行定性和定量的检测。将 AuNPs-rGO 复合物修饰在玻碳电极表面, 干燥后再将 Hb 修饰上去形成 Hb/AuNPs-rGO/GCE 传感器, 在上述修饰的电极上涂上 80  $\mu\text{L}$  浓度为 0.5% 的 Nafion, 干燥后形成 Nafion 膜, 即形成 Nafion/Hb/AuNPs-rGO/GCE 传感器。通过研究发现, 该电极对亚硝酸盐进行循环伏安法(cyclic voltammetry, CV)检测时有良好的选择性和灵敏度, 且具有较宽的线性检测范围: 0.5  $\mu\text{M}$ ~100  $\mu\text{M}$ , 峰电流与硝酸盐浓度符合线性方程:  $I_p = 0.0369C(\text{NO}_2^-) + 0.2245$  ( $R = 0.9918$ ), 最低检测限为 0.1  $\mu\text{M}$ , 该方法简单、快速、灵敏, 可用于环境和食品中的亚硝酸盐的检测。

**关键词:** 血红蛋白; 亚硝酸盐; 还原氧化石墨烯; 纳米金; 生物传感器

文章编号: 1673-9078(2015)11-319-323

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.11.048

## Rapid Detection of Nitrite in Food Using the Electrode Modified by Hemoglobin/Gold Nanoparticle-reduced Graphene Oxide Composite

XU Hou-chuan, DING Shun, CAO Xiao-dong, YE Ying-wang, YE Yong-kang, SUN Han-ju

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

**Abstract:** Nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) was detected by a glassy carbon electrode (GCE) modified by hemoglobin (Hb) with gold nanoparticle-reduced graphene oxide (AuNPs-rGO) composite. The qualitative and quantitative detection of nitrite were conducted using the signal of a direct electron transfer generated from methemoglobin and  $\text{NO}_3^-$  that were produced by the redox reaction between hemoglobin and nitrite. The GCE surface was modified by AuNPs-rGO composites to produce AuNPs-rGO/GCE, which was modified by Hb after drying to form an Hb/AuNPs-rGO/GCE biosensor. After the modified electrode was coated with 80  $\mu\text{L}$  of 0.5% Nafion to form a Nafion film, the Nafion/Hb/AuNPs-rGO/GCE biosensor was finally obtained. The results showed that the biosensor had good selectivity and sensitivity when cyclic voltammetry method was used to detect nitrites, with a relative wide linear range from 0.5 to 100  $\mu\text{M}$ . The relationship between peak current and the nitrite concentration could be described by the linear equation of  $I_p = 0.0369C(\text{NO}_2^-) + 0.2245$  ( $R = 0.9918$ ), and the limit of detection was 0.1  $\mu\text{M}$ . This method is simple, rapid, sensitive and can be used for nitrite detection in food and environmental samples.

**Key words:** hemoglobin; nitrite; reduced graphene oxide; gold nanoparticles; biosensor

亚硝酸盐(Nitrite)是人体强致癌物质亚硝胺的一种重要前体物质<sup>[1,2]</sup>, 它广泛存在于环境、饮料、和食品中, 特别是作为食品防腐剂添加在食品中。因而, 对亚硝酸盐的检测就显得格外重要。目前, 亚硝酸盐

收稿日期: 2015-01-20

基金项目: 安徽省科技厅项目(XC2014AKKG011, XC2014AKKG012)

作者简介: 徐后传(1989-), 男, 硕士研究生, 研究方向为农产品质量与安全

通讯作者: 操小栋(1976-), 女, 博士, 讲师, 研究方向为生物电化学分析及传感; 叶永康(1973-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为生物电化学分析及传感

的分析和检测方法有很多, 如分光光度法<sup>[3,4]</sup>、色谱分析法<sup>[5,6]</sup>、毛细管电泳<sup>[7]</sup>、化学发光<sup>[8]</sup>和电化学分析<sup>[9-14]</sup>等。其中电化学方法相较于其他方法来说具有方便、快速、经济、灵敏度高、检测范围广等优点, 在亚硝酸盐的检测中具有一定的优势。Cancino 等人<sup>[12]</sup>利用一种碳纤维电极修饰上一层树枝状的聚阳离子和酞菁镍的复合物膜进行一氧化氮的检测, 检测限低至 5.5  $\mu\text{M}$ 。Marlinda 等人<sup>[13]</sup>使用花状的氧化锌复合还原氧化石墨烯修饰玻碳电极检测亚硝酸盐, 在 10  $\mu\text{M}$ ~8 mM 之间有很好的线性关系, 检测限低至 33  $\mu\text{M}$ 。孟等人<sup>[14]</sup>使用氧化锆纳米粒子在碳纳米管修饰电极上的电

沉积的方法进行亚硝酸盐的检测,该方法可以检测浓度低至 0.5  $\mu\text{M}$  的亚硝酸盐。这些电化学方法均取得了成功且具有良好的效果,可以应用在实际的样品检测中。

血红蛋白是血液中的一种重要的呼吸蛋白,因为其低成本和商业可用性等特点使其电化学行为已被广泛研究<sup>[15-17]</sup>,这些研究对于血红蛋白和电极间的电子转移机制已经有了相当的理解,且医学上已经证明,亚硝酸盐易与血红蛋白反应生成高铁血红蛋白,从而形成美丽的色泽,故亚硝酸盐常用于食品的保色与防腐。纳米金(gold nanoparticles, AuNPs)和还原氧化石墨烯(reduced graphene oxide, rGO)作为新型的材料正受到越来越多的关注,其中 AuNPs 可以为氧化还原蛋白提供类似于天然系统中的微环境且可以在吸附作用下保留蛋白的生物活性<sup>[18,19]</sup>。rGO 具有极好的导电和力学性能,附着在电极表面时可以大大增加电极的比表面积,提高电极的吸附效率。本文利用 AuNPs 和 rGO 的复合物对电极进行修饰,在为血红蛋白提供类似天然的微环境以外,还大大地提高了血红蛋白的吸附效率,增加了电极的灵敏度。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要设备与仪器

电化学工作站(CHI660D),上海辰华仪器有限公司;石英亚沸高纯水蒸馏器(SYZ-550型);超声波清洗器(KQ118),昆山超声仪器有限公司;pH计(Delta320),梅特勒-托利多(上海)有限公司;三电极体系:玻碳工作电极(GCE, CHI),铂丝对电极和 Ag/AgCl 参比电极(南京中科电极有限公司)。

### 1.2 材料与试剂

亚硝酸钠(AR),乙酸(AR),(国药集团);三水合乙酸钠(AR),(汕头西陇化工);牛血红蛋白,(Worthington Biochemical Corporation);石墨烯,(南京吉仓纳米科技有限公司);氯金酸,(上海三爱思试剂有限公司);壳聚糖,Nafion,(Sigma-Aldrich);其他试剂均为分析纯,试验用水均为亚沸二次蒸馏水。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 AuNPs-rGO 的制备

取 3 mg 的氧化石墨烯加入到 2 mL 的二次蒸馏水中,超声 24 h 得到石墨烯,再透析 7 d 以除去石墨烯中多余的盐后备用。取 2 mL 处理过的石墨烯加入到 20 mL 壳聚糖溶液(10 mg/mL)中搅拌 10 min,随

后加入 100  $\mu\text{L}$  浓度为 10 mg/mL 的  $\text{HAuCl}_4$ , 125  $^\circ\text{C}$  油浴还原 24 小时,冷却后即得到 AuNPs-rGO 复合物,在 4  $^\circ\text{C}$  下储藏备用。

#### 1.3.2 修饰电极的制备

玻碳电极清洗后依次用 0.3, 0.05  $\mu\text{m}$  的  $\text{Al}_2\text{O}_3$  粉末抛光至镜面,依次用 1:1 硝酸、乙醇和二次水超声清洗,氮气吹干后备用。将 80  $\mu\text{L}$  制备好的 AuNPs-rGO 超声处理后均匀涂抹在干燥的玻碳电极表面,封闭干燥;然后将 80  $\mu\text{L}$  Hb 溶液均匀涂布在修饰电极表面,4  $^\circ\text{C}$  下干燥后在该电极上均匀涂布 80  $\mu\text{L}$  0.5% 的 Nafion 溶液,4  $^\circ\text{C}$  下干燥后即得到 Nafion/Hb/AuNPs-rGO/GCE 电极。

#### 1.3.3 样品的处理

样品来自于传统市场或摊贩贩卖的腊肉加工制品,按国标 GB5009.33-2010 进行预处理<sup>[20]</sup>。称取试样匀浆 2 g (精确至 0.01 g),以 80 mL 水洗入 100 mL 容量瓶中,超声 30 min,每 5 min 振摇一次,保持固相完全分离。于 75  $^\circ\text{C}$  水浴中放置 5 min,取出放置至室温,加水稀释至刻度。溶液经滤纸过滤后,取部分溶液于 10000 r/min 离心 15 min,上清液备用。

#### 1.3.4 亚硝酸盐的电化学检测

在电解池中加入不同 pH 值的醋酸盐缓冲液,通氮除氧 5 min。然后将亚硝酸盐标准品或者实际样品加入到缓冲液中,待充分混合后进行电化学检测。

#### 1.3.5 数据分析

试验中所得数据均为 CHI660D 电化学工作站采集,转换格式后使用 OriginPro 8 SR3 软件进行数据处理与分析。以各优化条件与所测峰电流的平均值和标准偏差作图。通过对各数据图进行分析,得出相应结论。

## 2 结果与讨论

### 2.1 修饰电极对于亚硝酸盐的电化学响应

在修饰电极中,各部分的结合主要是靠静电吸附作用完成的,rGO 作为一种具有强吸附性的物质,在电极组装过程中发挥了重要作用,通过静电吸附作用,rGO 作为桥梁将 Hb 固定在电极上形成 Hb/AuNPs-rGO/GCE 传感器。但是由于 Hb 是大分子物质,仅依靠 rGO 的静电吸附作用是不够的,在液体环境下依然存在脱落的情况,需要利用 0.5% 的阳离子通透剂 Nafion 与 rGO 之间的静电吸附作用将其包裹其中,形成 Nafion/Hb/AuNPs-rGO/GCE 传感器。

利用循环伏安法考察  $\text{NO}_2^-$  在不同未修饰和修饰的电极上的伏安行为如图 1 所示:a 为 GCE, b 为

AuNPs-rGO/GCE, c 为 Nafion/AuNPs-rGO/GCE, d 为 Nafion/Hb/AuNPs-rGO/GCE。可见,  $\text{NO}_2^-$  在未修饰 GCE (a) 上几乎没有响应, 而在 b 和 c 电极上在 -674 mV 有还原峰出现, 表明  $\text{NO}_2^-$  可以在 AuNPs-rGO 复合物上被还原, 且 Nafion 膜对还原电流影响并不大; 当  $\text{NO}_2^-$  在 d 电极上有 Hb 情况下于 -615 mV 出现明显的催化还原峰, 电流要远大于其它修饰电极, 表明在修饰界面上主要是 Hb 催化  $\text{NO}_2^-$  反应。AuNPs-rGO 复合物为 Hb 提供了非常有效的具有良好生物亲和性的微环境, Nafion 膜对于  $\text{NO}_2^-$  和 Hb 之间的电子传递虽然有一定的阻碍作用, 但可以较长时间维持 Hb 在 AuNPs-rGO 复合物上, 显示出更好的稳定性和持续性。

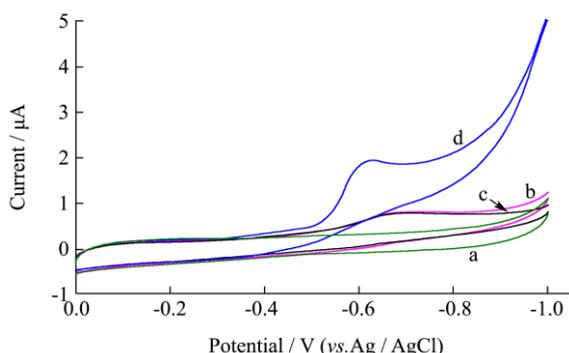


图 1  $\text{NO}_2^-$  在不同的修饰电极上的循环伏安响应

Fig.1 Cyclic voltammetric responses of different modified electrodes in the presence of 10  $\mu\text{M}$  nitrite

注: a 为裸 GCE, b 为 AuNPs-rGO/GCE 传感器, c 为 Nafion/AuNPs-rGO/GCE 传感器, d 为 Nafion/Hb/AuNPs-rGO/GCE 传感器。检测底液为含有 10  $\mu\text{M}$  亚硝酸钠的醋酸盐溶液。

## 2.2 检测底液 pH 的优化

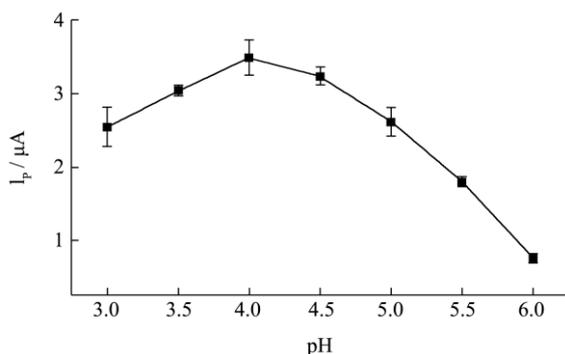


图 2 缓冲底液 pH 的影响

Fig.2 Effect of buffer pH

利用循环伏安法优化在不同 pH 值的醋酸盐缓冲液 (0.2 M) 中修饰电极对  $\text{NO}_2^-$  测定的影响。图 2 可以看出, 在 pH 4 的醋酸盐缓冲底液中, 50  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_2^-$

在 Nafion/Hb/AuNPs-rGO/GCE 的还原峰电流最大, 故选择 pH 4 为最适测定 pH。

## 2.3 Hb 修饰量的优化

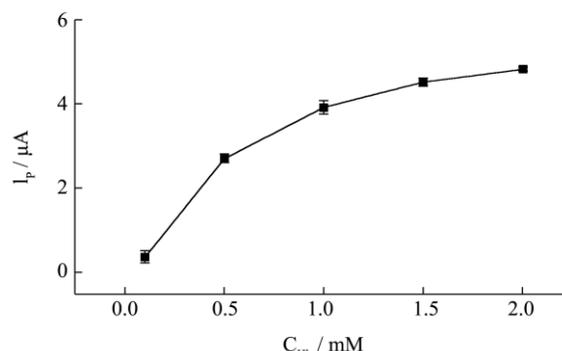


图 3 修饰 Hb 浓度的影响

Fig.3 Influence of the Hb concentration

优化了 Hb 修饰量对电极响应的影。配制不同浓度的 Hb 溶液, 分别取 80  $\mu\text{L}$  Hb 溶液修饰电极后, 测定同一浓度  $\text{NO}_2^-$  (50  $\mu\text{M}$ ), 结果由图 3 可见, 随着 Hb 浓度的增加,  $\text{NO}_2^-$  在修饰电极上的催化还原峰电流也随之增加, 但超过 1 mg/mL 后增长幅度趋缓, 综合试验需求和经济性考虑, 试验选用浓度为 1 mg/mL 的 Hb 溶液制备  $\text{NO}_2^-$  传感器。

## 2.4 修饰电极的 electrochemical impedance spectra 及 $\text{NO}_2^-$ 在传感

界面上的伏安行为

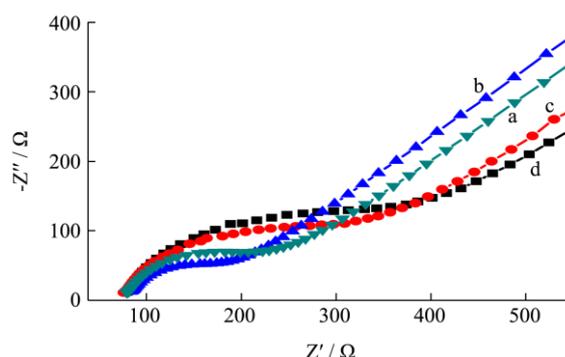


图 4 不同类型电极的交流阻抗图谱

Fig.4 AC impedance spectra of different electrodes

注: a 为裸 GCE, b 为 AuNPs-rGO/GCE 传感器, c 为 Nafion/AuNPs-rGO/GCE 传感器, d 为 Nafion/Hb/AuNPs-rGO/GCE 传感器。检测底液为含有 10  $\mu\text{M}$  亚硝酸钠的醋酸盐溶液。

利用电化学阻抗的方法表征不同修饰电极的阻抗性质如图 4 所示, 其中曲线 a 为裸 GCE, b 为 AuNPs-rGO/GCE, c 为 Nafion/AuNPs-rGO/GCE, d 为 Nafion/Hb/AuNPs-rGO/GCE。曲线 b 中代表各电极电荷传输电阻  $R_{CT}$  的半圆弧的值相对于曲线 a (裸 GCE)

明显下降,说明电子在 AuNPs-rGO 修饰界面上电荷传输电阻下降,电子转移速率有所增加; Nafion 修饰后,曲线 c 的  $R_{CT}$  有所增加;固定 Hb 后,曲线 d 中  $R_{CT}$  进一步增加,可以很好地表明 Hb 被固定修饰电极上。各修饰电极的电化学阻抗谱与循环伏安曲线可以很好地相互一一对应。

将组装好的 Nafion/Hb/AuNPs-rGO/GCE 电极作为工作电极,当扫速在 20-500 mv/s 范围内变化时,催化还原峰电流随着扫描速率的增大而增大,催化还原峰电流与扫描速率的平方根 ( $v^{1/2}$ ) 满足线性方程  $y = 0.06359x + 0.19665$ , 相关系数  $R = 0.9993$ 。结果表明  $NO_2^-$  在 Nafion/Hb/AuNPs-rGO/GCE 上的催化还原反应主要是受扩散过程控制。实际测定中选用 100 mV/s 的扫速测定  $NO_2^-$  浓度。

### 2.5 $NO_2^-$ 在 Nafion/Hb/AuNPs-rGO/GCE 上电化学响应的标准曲线

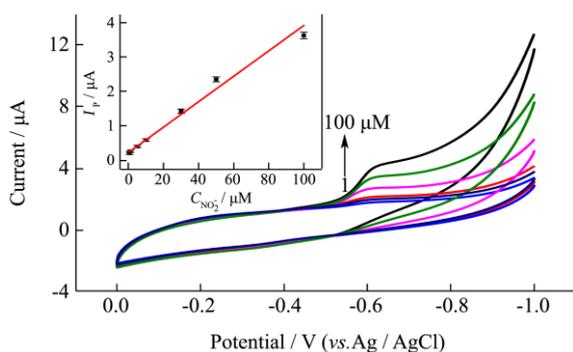


图5 不同浓度亚硝酸盐的循环伏安图

Fig.5 Cyclic voltammogram of Nafion/Hb/AuNPs-rGO/GCE for different concentrations of nitrite

表2 腌制产品中亚硝酸盐含量及加标回收结果

Table 2 Nitrite content in pickled products and the standard addition recovery results

样品	样品测定值/ $\mu\text{M}$	加标量/ $\mu\text{M}$	测定值/ $\mu\text{M}$	理论值/ $\mu\text{M}$	回收率/R%
腊肉	0.72	10	11.06 $\pm$ 0.55	10.72	103.2 $\pm$ 5.1
香肠	0.93	10	10.62 $\pm$ 0.76	10.93	97.2 $\pm$ 6.9

### 2.8 重现性及使用寿命

对 Nafion/Hb/AuNPs-rGO/GCE 传感器进行重现性和使用寿命的研究,同一支电极连续测量 10 次后,其测相对标准差为 3.12%,说明电极具有良好的重现性。将修饰好的电极放在冰箱中 4  $^{\circ}\text{C}$  下保存 7 d 后,其对于亚硝酸盐的响应信号约为第一天的 93.2%,表明该传感器可以维持较长的使用周期。

## 3 结论

Note: Insert: the standard curve of  $NO_2^-$ .

使用 Nafion/Hb/AuNPs-rGO/GCE 对系列标准浓度的  $NO_2^-$  溶液进行检测,将电极置于 pH 为 4 浓度为 0.2 M 的醋酸盐缓冲液中,通氮除氧 5 min 后,进行检测。在亚硝酸盐浓度为 0.5~100  $\mu\text{M}$  的范围内,亚硝酸盐的浓度与还原峰电流成正比,符合线性方程  $IP = 0.0369C(NO_2^-) + 0.2245$ ,  $R = 0.9918$ ,最低检测限为: 0.1  $\mu\text{M}$ 。可以实现对样品的连续检测且可以重复使用。

### 2.6 干扰实验

为了考察该传感器的选择性,试验加入不同浓度的  $NaNO_3$ 、 $Na_2SO_4$ 、 $Na_2S$ 、抗坏血酸等干扰物质,通过试验发现这些干扰物质对  $NO_2^-$  催化还原峰电流的影响很小,表 1 数据显示干扰物质对测定的影响在  $\pm 5\%$  以下,说明该电极具有优良的选择性。

表1 Nafion/Hb/AuNPs-rGO/GCE 传感器检测亚硝酸盐时其它离子干扰

Table 1 Interference from other ions during nitrite detection using Nafion/Hb/AuNPs-rGO/GCE

干扰离子	干扰离子浓度倍数	还原峰电流变化率/%
$NaNO_3$	20	+4.562
$Na_2SO_4$	50	+5.571
$Na_2S$	50	+3.245
抗坏血酸	50	-4.592

### 2.7 样品检测

用 pH 为 4 的醋酸盐缓冲液配制不同样品(腊肉和香肠)溶液。取适量样品溶液,插入制备好的 Nafion/Hb/AuNPs-rGO/GCE,除氧 5 min 后,进行循环伏安检测,并进行加标回收试验,结果见表 2,较为满意。

本方法利用 Hb 为亚硝酸盐的信号分子,通过修饰的方法,将 Hb 修饰到电极上,用 Nafion 进行成膜处理后形成 Nafion/Hb/AuNPs-rGO/GCE 传感器,该传感器可以实现对亚硝酸盐的快速检测,建立了线性范围为 0.5~100  $\mu\text{M}$  的标准曲线,并且对实际样品进行了检测,通过加标回收试验表明所建立的方法可靠,检测了实际样品,通过加标回收实验证明该传感器能够对食品中的亚硝酸盐进行快速、准确的检测。

### 参考文献

- [1] Mirvish S S. Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC [J]. *Cancer Letters*, 1995, 93(1): 17-48
- [2] Lijinsky W, Epstein S S. Nitrosamines as environmental carcinogens [J]. *Nature*, 1970, 225(5227): 21-23
- [3] 郑诗超,黄国华.肉制品中亚硝酸盐含量分析及思考[J].*肉类工业*,2014,398(6):32-35  
ZHENG Shi-chao, HUANG Guo-hua. Analysis and thinking on nitrite content in meat products [J]. *Meat Industry*, 2014, 398(6): 32-35
- [4] Pasquali C E L, Hernando P F, Alegría J S D. Spectrophotometric simultaneous determination of nitrite, nitrate and ammonium in soils by flow injection analysis [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 600(1-2): 177-182
- [5] 胡彩霞,李红,刘美霞,等.离子色谱法检测乳及乳制品中硝酸盐和亚硝酸盐方法的研究[J].*食品安全质量检测学报*,2014,5(7):2235-2240  
HU Cai-xia, LI Hong, LIU Mei-xia, et al. Determination of nitrate and nitrite content in milk and dairy products using ion chromatography [J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2014, 5(7): 2235-2240
- [6] Niedzielski P, Kurzyca I, Siepak J. A new tool for inorganic nitrogen speciation study: Simultaneous determination of ammonium ion, nitrite and nitrate by ion chromatography with post-column ammonium derivatization by Nessler reagent and diode-array detection in rain water samples [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 577: 220-224
- [7] Trushina E V, Oda R P, Landers J P. Determination of nitrite and nitrate reduction by capillary ion electrophoresis [J]. *Electrophoresis*, 1997, 18(10): 1890-1898
- [8] MacArthur P H, Shiva S, Gladwin M T. Measurement of circulating nitrite and S-nitrosothiols by reductive chemiluminescence [J]. *Journal of Chromatography B*, 2007, 851(1-2): 93-105
- [9] Peng M, Min S, Limin N, et al. Functionalization of platinum nanoparticles for electrochemical detection of nitrite [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, 399(7): 2401-2411
- [10] Santos W J R, Lima P R, Tanaka A A, et al. Determination of nitrite in food samples by anodic voltammetry using a modified electrode [J]. *Analytical Methods*, 2009, 113(4): 1206-1211
- [11] Salimi A, Hallaj R, Mamkhezri H, et al. Electrochemical properties and electrocatalytic activity of FAD immobilized onto cobalt oxide nanoparticles: Application to nitrite detection [J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2008, 619-620(15): 31-38
- [12] Cancino J, Borgmann S, Machado S A S, et al. Electrochemical sensor for nitric oxide using layered films composed of a polycationic dendrimer and nickel (II) phthalocyaninetetrasulfonate deposited on a carbon fiber electrode [J]. *Microchim Acta*, 2014, doi:10.1007/s00604-014-1425-0
- [13] Marlinda A R, Pandikumar A, Yusoff N, et al. Electrochemical sensing of nitrite using a glassy carbon electrode modified with reduced functionalized graphene oxide decorated with flower-like zinc oxide [J]. *Microchim Acta*, 2014, DOI 10.1007/s00604-014-1436-x
- [14] Meng Z C, Zheng J B, Li Q D. A nitrite electrochemical sensor based on electrodeposition of zirconium dioxide nanoparticles on carbon nanotubes modified electrode [J]. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 2014, DOI 10.1007/s13738-014-0565-9
- [15] Ma H Y, Hu N F, Ruslin J F. Electroactive myoglobin films grown layer-by-layer with poly(styrenesulfonate) on pyrolytic graphite electrodes [J]. *Langmuir*, 2000, 16(11): 4969-4975
- [16] Fan C H, Wang H Y, Sun S. Electron-transfer reactivity and enzymatic activity of hemoglobin in a sp sephadex membrane [J]. *Analytical Chemistry*. 2001, 73(13): 2850-2854
- [17] Sun H, Hu N F, Ma H Y. Direct electrochemistry of hemoglobin in polyacrylamide hydrogel films on pyrolytic graphite electrodes [J]. *Electroanalysis*, 2000, 12(13): 1064-1070
- [18] Jain P K, El-Sayed I H, El-Sayed M A. Au nanoparticles target cancer [J]. *Nano Today*, 2007, 2(1): 18-29
- [19] Gu H Y, Yu A M, Chen H Y. Direct electron transfer and characterization of hemoglobin immobilized on a Au colloid-cysteamine-modified gold electrode [J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2001, 516(1-2): 119-126
- [20] GB5009.33-2010 食品安全国家标准食品中硝酸盐和亚硝酸盐的测定[S].  
GB5009.33-2010 National food safety standard-determination of nitrate and nitrite [S]