

• 研究论文 •

双重信号放大的竞争型免疫传感器的制备及其应用于瘦肉精检测的研究

肖 飞 白 静 张 亨 丹 赖 彦 君 金利通*

(华东师范大学化学系 上海 200062)

摘要 制备了葡萄糖氧化酶(GOD)-克伦特罗(Clenbuterol, CB)功能纳米复合物, 并采用共价键合和温育组装等方法构建了双重信号放大的竞争型免疫传感器. 研究了 GOD 催化氧化葡萄糖和普鲁士蓝(PB)催化还原 H_2O_2 双重信号放大的反应机理和传感器检测 CB 的作用机制. 用扫描电子显微镜(SEM)等方法表征了纳米复合材料的形貌和复合物中 GOD 的活性, 复合物中的 GOD 保持了良好的电催化性能和酶动力学响应, 并且符合米氏动力学方程. 最佳实验条件下, 该免疫传感器对盐酸克伦特罗的检测线性范围为 0.01~100 ng/mL, 检测限达 4.50 pg/mL. 实验结果表明, 该传感器对瘦肉精克伦特罗的检测具有灵敏度高, 特异性强, 重现性好, 线性范围宽和检测限低等优点. 将该方法用于猪肝样品的分析, 加标样品回收率在 97.5%~102%之间. 该研究为瘦肉精及 β -受体兴奋剂的分析提供了一种新方法.

关键词 葡萄糖氧化酶; 免疫传感器; 瘦肉精; β -受体兴奋剂

Construction of Dual Signal Amplification Competitive Immunosensor for Detection of Clenbuterol

Xiao, Fei Bai, Jing Zhang, Ningdan Lai, Yanjun Jin, Litong*

(Department of Chemistry, East China Normal University, Shanghai 200062)

Abstract A dual signal amplification immunosensor based on glucose oxidase (GOD)-functionalized nanocomposites was developed for the detection of clenbuterol. The characteristics of the nanocomposites were confirmed by scanning electron microscopy (SEM) and spectrophotometry. The results indicate that GOD in the nanocomposites keeps good enzyme dynamic response and electro-catalysis performance. The detection mechanism of the immunosensor was investigated by electrochemical methods of differential pulse voltammetry (DPV). A set of experimental conditions were also optimized for the detection of clenbuterol. The developed immunosensor exhibited high sensitivity, selectivity and reproducibility, which had a wide linear range of 0.01~100 ng/mL and a low detection limit of 4.50 pg/mL for clenbuterol. Accurate detection of clenbuterol in pig liver samples was demonstrated by standard addition method.

Keywords glucose oxidase; immunosensor; clenbuterol; β -agonist

“瘦肉精”在中国通常是指克伦特罗(CB), 实际它是克伦特罗等一类 β -受体兴奋剂的总称, 因其具有促进肌肉生长和降低脂肪含量的作用而被非法用作饲料添加剂. 但该类药物易在动物体内(特别是肝脏内)沉积, 人

食用含有该类药物残留的动物产品后可引起食物中毒, 严重危害人体健康^[1]. 同时, 服用 β -受体兴奋剂可提高人体平衡能力和运动耐力, 提高运动成绩^[2]. 因此 β -受体兴奋剂被世界反兴奋剂组织列入禁药名单. 近年来,

* E-mail: Ltjin@chem.ecnu.edu.cn

Received November 25, 2011; accepted February 27, 2012.

Project supported by Shanghai Science and Technology Commission Foundation (No. 06dz05824).

上海市科委专项(No. 06dz05824)资助项目.

“瘦肉精”引发的中毒事件频发^[3], 运动员误食含“瘦肉精”的肉制品后药检呈阳性的事件也屡见报道^[4]. 国家食品药品监督部门对其监管力度也日益加大. 但在利益的驱动下, 仍有不法饲养者铤而走险. 为保障人民生命安全和体育运动纯洁性, 对“瘦肉精”残留进行及时、准确地监控与检测显得十分必要.

传统的“瘦肉精”残留检测方法如气相色谱-质谱联用法(GC-MS)^[5]和液相色谱-质谱联用法(LC-MS)^[6]尽管能比较准确地检测克伦特罗残留量, 但是因其设备昂贵, 操作复杂, 分析周期长而限制了其广泛使用. 而免疫分析技术具有操作简便快捷, 特异性强, 易于现场检测等优点, 在食品安全检测领域具有很大的实际应用价值. 其中电化学免疫分析技术由于兼具免疫分析技术的高特异性和电化学检测技术的高灵敏度, 且设备简单、检测成本低等优点而备受关注. 科研工作者已经成功开发了用于检测食品相关产品中农药、兽药残留^[7], 苏丹红等^[8]的电化学免疫传感器. 但用于“瘦肉精”残留检测的电化学免疫传感器研究较少^[9].

由于非标记免疫分析存在灵敏度不够高等缺点, 人们将抗原或抗体用各种标记物如放射标记、荧光标记、酶标记等进行标记, 通过对免疫复合物中的标记物进行检测实现对待测抗原或抗体的测定. 为了获得高灵敏度的电化学响应信号, 科研工作者已经开发了各种信号放大的技术. 而酶(包括碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶(HRP)、葡萄糖氧化酶(GOD)等)作为一种最常用的标记物被广泛地固定于碳纳米管(CNTs)^[10]、生物纳米磁珠^[11]等材料上以获得增强的酶催化响应信号. 其中 HRP 催化反应易受溶解氧干扰, 检测中常需通氮除氧而限制了其实际应用. GOD 较 HRP 干扰少, 但其分子量较大, 且具有较多氨基, 标记时易形成广泛聚合. 因此, 以 GOD 作为标记酶的敏感度较 HRP 低. 为解决此局限性, 科研工作者多用两种酶偶联反应放大技术提高方法灵敏度. 普鲁士蓝(PB)作为许多生物化学物质的人工酶, 可和 GOD 或 HRP 偶联以获得双重信号放大的电化学响应信号.

抗原或抗体的固定是制备免疫传感器的关键步骤. 而对于盐酸克伦特罗等小分子半抗原, 其固定通常需要较复杂的衍生化或偶联蛋白的过程, 因此限制了免疫传感器在小分子化合物检测中的应用. 本文利用氨基和金纳米粒子(Au NPs)的共价键合作用将葡萄糖氧化酶和克伦特罗同时固定于 Au NPs/CNTs 上, 首次制备了 GOD-Au NPs/CNTs-CB 纳米复合物, 同时在电极表面修饰 PB、聚二烯丙基二甲基氯化铵(PDDA)、壳聚糖(CS)、Au NPs、克伦特罗单克隆抗体(CB Mab)等功能性材料, 构建了 CB Mab/Au NPs/PB-PDDA-CS 竞争型免

疫传感器, 建立了检测盐酸克伦特罗的方法. 该研究为瘦肉精及 β -受体兴奋剂的分析提供了一种新方法.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

CHI660a 型电化学分析仪(上海辰华仪器有限公司), 扫描电镜(SEM, HITACHI-4800), 紫外可见分光光度计(Varian, Cary 50 Conc). 本实验采用三电极体系: Ab/Au NPs/PB-PDDA-CS 修饰的玻碳电极为工作电极, 玻碳电极直径为 3 mm(日本东海株式会社); Ag/AgCl 电极为参比电极; 铂丝电极为对电极.

克伦特罗(Clenbuterol, CB)盐酸盐, 葡萄糖氧化酶(GOD, type VII-S, from *Aspergillus niger*, 10000 units/mg), 聚二烯丙基二甲基氯化铵(PDDA, 20%, w/w in water, MW: 200000~350000)和壳聚糖(CS, $\geq 85\%$)购自 Sigma 公司. 羧基化的碳纳米管(Carbon nanotubes, CNTs)购自中国科学院成都有机化学有限公司. 克伦特罗单克隆抗体(CB Mab)购于杭州隆基生物技术有限公司. 氯金酸、葡萄糖购自上海国药集团.

所用其它试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水.

1.2 GOD-Au/CNTs-CB 复合物的制备

GOD-Au/CNTs-CB 复合物的制备过程如图 1A 所示. 将 100 mL 的 HAuCl₄溶液(0.01%)在剧烈搅拌下加热至沸腾, 迅速加入 2.5 mL 1%柠檬酸钠溶液, 溶液由淡黄色变为紫红色, 持续搅拌至溶液冷却.

将 2.5 mg CNTs 加入 5 mL 0.20% PDDA 水溶液(含 0.50 mol/L NaCl)中, 超声分散 30 min, 水洗三次除去过量 PDDA, 即可得 PDDA 功能化的 CNTs. 取 0.75 mg 该 CNTs 加入 9 mL 前述金胶(Au NPs)溶液中, 搅拌 20 min 后离心分离得到浅紫色 Au NPs/CNTs, 用水洗涤后分散于 2.5 mL Tris-HCl 缓冲溶液(50 mmol/L, pH=9.0).

取上述溶液 0.5 mL, 加入 375 μ L 2.0 mg/mL GOD 的磷酸盐缓冲(PBS, 0.05 mol/L, pH=6.5)溶液和 30 μ L 0.50 mg/mL CB 溶液, 冰水浴中反应 3 h 后离心分离, 所得产物重新分散于 100 μ L 的含 0.05% Tween 20 的 PBS 溶液(PBST, 含 0.2% BSA)中, 存于 4 $^{\circ}$ C 冰箱备用.

1.3 免疫传感器的构建

剧烈搅拌下将 4 mL 0.025 mol/L K₃Fe(CN)₆溶液逐滴加入 16 mL 含 6.25 mmol/L FeCl₂·4H₂O、0.4% PDDA 和 0.15%壳聚糖(1% HAc 溶液)的溶液中至得到深蓝色溶液, 表明 PB-PDDA-CS 复合物的生成.

免疫传感器的构建过程如图 1B 所示. 将玻碳电极

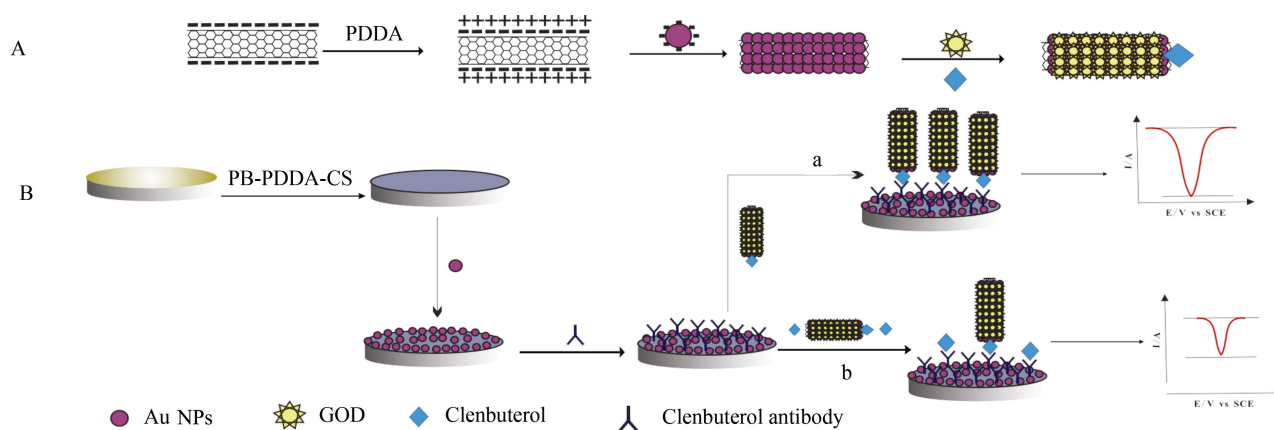


图1 (A) GOD-Au NPs/CNTs-CB 复合物制备过程示意图和(B)免疫传感器制备过程和竞争型免疫分析示意图

Figure 1 Schematic representation of (A) preparation procedure of GOD-Au NPs/CB conjugation and (B) preparation of immunosensor and competitive electrochemical immunoassay

用氧化铝粉末打磨抛光, 使成镜面, 依次在 HNO_3 (1.0 mol/L), NaOH (1.0 mol/L)、丙酮及二次蒸馏水中超声处理 5 min. 先将 1 μL PB-PDDA-CS 溶液滴涂于电极表面, 室温下晾干后, 将电极置于 0.10 mol/L H_2SO_4 中, 1.3 V 电位下预处理 2 min, 晾干. 10 μL 金胶溶液滴涂于电极表面, 室温下反应 6 h, 用 PBST 和 PBS 洗涤以除去未结合的金纳米粒子. 将 0.5 μL 0.50 mg/mL 克伦特罗单克隆抗体溶液滴在前面两个步骤处理过的电极表面, 置于 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中温育过夜. 用 PBST 和 PBS 冲洗所得电极以除去物理吸附的抗体, 随后滴加 20 μL BSA 于电极表面, 室温下反应 1 h 以封闭非特异性结合位点, 再次用 PBST 和 PBS 冲洗电极, 晾干后保存于 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中备用.

1.4 免疫传感器应用于盐酸克伦特罗的测定

盐酸克伦特罗的检测方法如下: 在制得的免疫传感器表面滴加 10 μL GOD-Au/CNTs-CB 溶液, 室温下温育 1 h, PBST 和 PBS 冲洗, 室温下晾干. 在 10 mL PBS 溶液中加入一定量的葡萄糖溶液, 搅拌 5.0 min, 待稳定后在静止溶液在 0.6 ~ -0.2 V 电压范围内扫描差分脉冲伏安(DPV)曲线, 记录产生的峰电流 I_0 ; 在免疫传感器表面滴加 10 μL GOD-Au/CNTs-CB 和 CB 的混合溶液, 同样条件测定各种不同浓度(0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10,

50, 100 ng/mL) CB 存在下的峰电流 I_S . 由于 CB 与 GOD-Au/CNTs-CB 竞争免疫传感器上的结合位点, 导致结合到电极上的葡萄糖氧化酶的数量相应减少, 电流响应下降, 电流下降(ΔI)的程度可由下式计算: $\Delta I = I_S - I_0$, 据此可检测盐酸克伦特罗.

1.5 猪肝样品的制备

猪肝样品 A、B 购于农贸市场, 样品 C、D 购于本地超市. 按 10 $\mu\text{g/g}$ 的浓度向猪肝中加入盐酸克伦特罗标准样品制备加标样品. 准确称取 10.00 g 切碎的猪肝样品或加标样品, 参照文献^[12]制备猪肝样品提取液, 最后提取液用 PBS (pH=6.5)定容至 5.0 mL, 贮藏于冰箱中备用.

2 结果与讨论

2.1 GOD-Au NPs/CNTs-CB 的表征

图 2 为 CNTs, Au/CNTs 和 GOD-Au/CNTs-CB 的 SEM 表征图. 从图中可以看出羧基化的碳纳米管表面光滑且分散均匀(a), 当经带正电荷的 PDDA 功能化, 且表面结合大量带负电荷的金纳米颗粒后, 碳纳米管直径略微增大, 并出现一定程度的团聚(b)状态. 而当 GOD

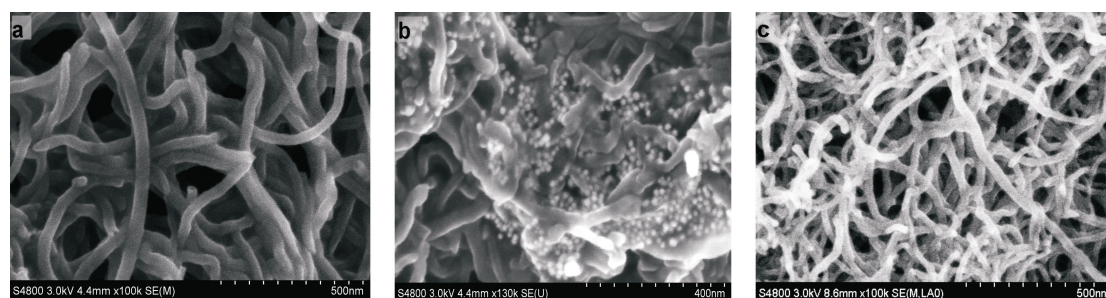


图2 (a) CNTs, (b) Au/CNTs 和(c) GOD-Au/CNTs-CB 的 SEM 表征图

Figure 2 The SEM images of (a) CNTs, (b) Au/CNTs and (c) GOD-Au/CNTs-CB

和克伦特罗结合到金纳米粒子表面后, 碳纳米管表面被修饰物均匀的覆盖(c), 表明 GOD 和克伦特罗分子成功附载到碳纳米管表面形成了 GOD-Au/CNTs-CB 复合物.

本文中采用分光光度法测定了复合物中 GOD 的活性, 利用 Lineweaver-Burk 公式计算得其表观米氏常数 (K_M^{app}) 为 0.870 mmol/L, 该数值远小于文献^[13]报道的 GOD (5.85 mmol/L) 和 Au-GOD 复合物 (3.74 mmol/L) 的 K_M^{app} 值, 表明 GOD-Au/CNTs-CB 复合物中的 GOD 保持了良好的酶动力学响应, 并且符合米氏动力学方程.

由于 GOD/CB 质量比直接影响特异性结合到免疫传感器上 GOD-Au/CNTs-CB 复合物的数量和 GOD-Au/CNTs-CB 复合物分子中葡萄糖氧化酶的分子的数量, 进而影响到传感器电化学响应的大小. 实验中通过改变 GOD/CB 质量比来控制附载在 CNTs 表面的 GOD 分子和 CB 分子数量比. 结果表明 GOD/CB 质量比为 50 时, 免疫传感器电流响应最大, 因此实验中选择 GOD/CB 质量比 50 制备 GOD-Au/CNTs-CB 复合物.

2.2 CB Mab/Au NPs/PB-PDDA-CS 免疫传感器的电化学表征

本工作中, 我们采用电化学阻抗谱(EIS)实验考察了免疫传感器制备过程中电极表面的阻抗变化情况. 阻抗谱中 EIS 高频部分半圆直径的大小等于电子传递阻抗 (R_{et}). 如图 3 所示, 裸玻碳电极的阻抗谱图几乎呈一直线(曲线 a), 当 PB-PDDA-CS 修饰到电极表面上后, 电子传递阻抗显著增大(曲线 b), 而当 Au 纳米粒子进一步

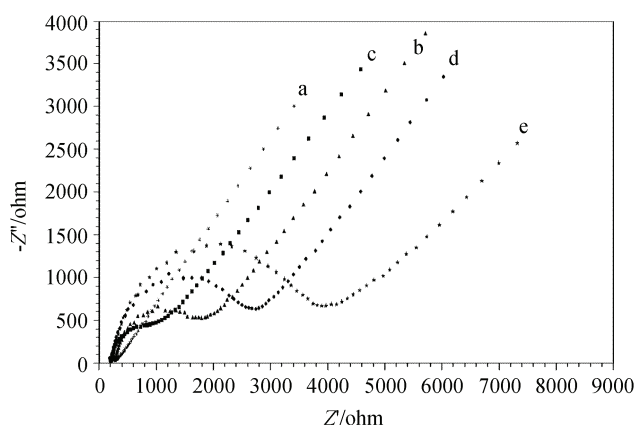


图3 裸玻碳电极(a), PB-PDDA-CS (b), Au NPs/PB-PDDA-CS (c), CB Mab/Au NPs/PB-PDDA-CS (d) 和 GOD-Au/CNTs-CB/CB Mab/Au NPs/PB-PDDA-CS (e) 修饰的玻碳电极的交流阻抗图

Figure 3 EIS Nyquist plots obtained with bare glassy carbon electrode (a), PB-PDDA-CS (b), Au NPs/PB-PDDA-CS (c), CB Mab/Au NPs/PB-PDDA-CS (d) and GOD-Au/CNTs-CB/CB Mab/Au NPs/PB-PDDA-CS (e) modified electrodes, which were measured in PBS (pH 6.5) containing $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (1 : 1, 2.5×10^{-3} mol/L)

修饰到电极表面上后, 修饰电极的阻抗降低(曲线 e), 表明修饰在电极上的 Au 纳米粒子具有良好的电子传导效应, 继续在电极上修饰 CB Mab(曲线 d)、结合 GOD-Au/CNTs-CB(曲线 e)复合物后, 修饰电极的阻抗又逐渐增大, 表明成功制备了 CB Mab/Au NPs/PB-PDDA-CS 免疫传感器.

2.3 CB Mab/Au NPs/PB-PDDA-CS 免疫传感器检测 CB 的作用机制

电极表面反应机理如图 4 所示.

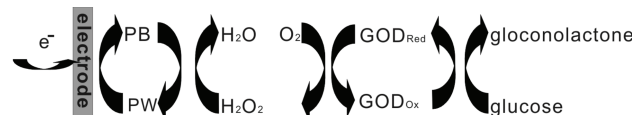


图4 电极表面电化学反应示意图

Figure 4 Schematic diagram of the enzymatic and electrochemical coupled reactions

GOD-Au/CNTs-CB 复合物和免疫传感器上的 CB Mab 特异性结合后, 复合物中的 GOD 首先被溶解 O_2 氧化, 生成 GOD 氧化态和 H_2O_2 , GOD 氧化态将溶液中的底物葡萄糖氧化生成葡萄糖酸内酯, 形成第一个反应循环. 当产生的 H_2O_2 扩散至电极上修饰的 PB-PDDA-CS 层时, 将 PB 还原态(普鲁士白, PW)氧化生成 PB, PB 分子在玻碳电极表面被外加负电位重新还原为 PW, 形成第二个反应循环. 两个反应循环通过第一步酶催化反应产生的 H_2O_2 连接起来, 而 PB 作为电子传递媒介加速了电子传递, 在较低电位下产生快速、灵敏的电催化响应电流. 当电极上滴加 GOD-Au/CNTs-CB 溶液时, 大量的 GOD 分子被附载于免疫传感器上, 产生较大电流响应(图 1B 过程 a). 而当电极上滴加 GOD-Au/CNTs-CB 和 CB 的混合溶液时, 由于 CB 与 GOD-Au/CNTs-CB 竞争免疫传感器上的结合位点, 导致结合到电极上的 GOD 数量相应减少, 电流响应下降(图 1 过程 b), 且电流响应下降的程度(ΔI)随着竞争 CB 浓度增大而增大.

2.4 实验条件的优化

底物葡萄糖的浓度高低直接影响传感器电化学响应的大小. 随着葡萄糖浓度的增加, 电极的响应电流逐渐增大, 当其浓度达到 10 mmol/L 时, 响应电流趋于稳定. 因此, 实验中选取的底物浓度为 10 mmol/L.

实验考察了 PBS 的 pH 值对 GOD 催化氧化底物葡萄糖电流响应的的影响, 如图 5A 所示. 据图 5A, 实验中选择 pH=6.5 作为检测体系的 pH 值.

温育时间对免疫传感器响应电流的影响如图 5B 所示, 响应电流在温育时间为 60 min 时达到最大值, 60 min 之后趋于稳定, 表明 GOD-Au/CNTs-CB 在免疫传感器表面的特异性结合达到饱和. 因此, 实验中将 60 min

作为最佳温育时间。

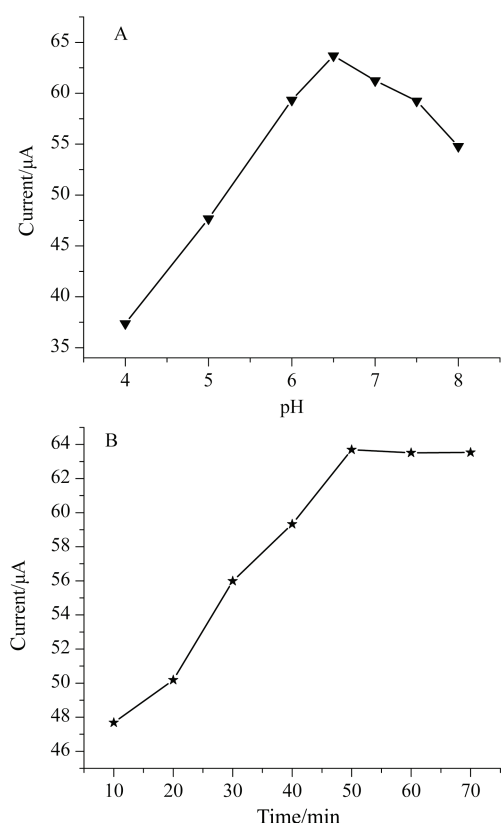


图5 检测体系 pH 值(A)和温育时间(B)对传感器响应电流的影响

Figure 5 The effect of the pH (A) and incubation time (B) on the response of immunosensor

2.5 CB Mab/Au NPs/PB-PDDA-CS 免疫传感器在盐酸克伦特罗测定中的应用

将该传感器应用于盐酸克伦特罗的测定。在最佳实验条件下, 无竞争 CB 时所得 I_0 为 63.7 μA 。竞争 CB 浓度为 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 ng/mL 时的 I_S 分别为 59.3, 56.0, 53.0, 47.7, 45.1, 31.7, 30.0, 22.2, 18.6 μA 。相应的 ΔI 为 3.40, 7.70, 10.7, 16.0, 18.6, 32.0, 33.7, 41.5, 45.1 μA 。以 ΔI 对 CB 浓度的对数值作图, 所得线性回归方程为: $\Delta I = 2.22 + 1.10 \lg [\text{CB}]$, $R = 0.9895$ 。该传感器对盐酸克伦特罗的线性检测范围为 0.01~100 ng/mL, 检出限为 4.50 pg/mL (3σ)。该免疫传感器的检出限与线性范围均优于类似报道^[3]。

2.6 传感器的特异性和稳定性

通过免疫传感器和其它 β -受体兴奋剂的交叉反应率来考察其特异性。分别在 10 μL GOD-Au/CNTs-CB 溶液中加入克伦特罗、莱克多巴胺、多巴酚丁胺和沙丁胺醇, 使它们浓度均为 50 ng/mL, 温育 60 min 后, 分别测定其造成的 ΔI 值。结果分别为 41.5, 1.53, 0.746, 1.04 μA , 免疫传感器和莱克多巴胺、多巴酚丁胺和沙丁胺醇

的交叉反应率为 3.69%, 1.80% 和 2.51%。此结果表明样品中可能存在的相关 β -受体兴奋剂不会产生显著干扰。

将制备好的传感器置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存, 每隔两天测定其对相同浓度 CB 的响应性能。结果表明, 起始 14 d 内传感器对 CB 的响应无明显变化, 40 d 时仍能保持原有响应值的 85.0%。由此说明, 此方法制备的传感器寿命长, 稳定性好。

2.7 实际样品的测定

免疫传感器表面滴加 10 μL GOD-Au/CNTs-CB 和猪肝提取液的混合溶液, 根据由盐酸克伦特罗标准溶液建立的工作曲线测定猪肝中 CB 的含量。农贸市场购买的样品 A 中检出 CB 浓度为 0.450 $\mu\text{g/g}$, 样品 B 中未检出, 超市购买的样品 C、D 均未检出 CB。为检验所建立方法检测实际样品的准确性, 采用标准加入法分析了四种猪肝加标样品, 加标回收率在 97.5%~102% 之间。详细结果如表 1 所示。

表 1 猪肝样品中 CB 的测定

Table 1 Determination of CB in pig liver samples

Sample	Spiked/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Found/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Recovery/ %	R.S.D(%) ($n=3$)
Sample A	0.00	0.450		
	10.00	10.4	99.5	3.5
Sample B	0.00	0.00		
	10.00	9.81	98.1	5.1
Sample C	0.00	0.00		
	10.00	10.2	102	6.2
Sample D	0.00	0.00		
	10.00	9.75	97.5	3.7

3 结论

本文利用氨基和金纳米粒子的共价键合作用首次将 GOD 和 CB 分子同时固定于 Au NPs/CNTs 上, 为小分子半抗原的固定提供了一种新方法; 成功制备了 GOD-Au NPs/CNTs-CB 纳米复合物, 并基于复合物中 GOD 和 PB 的双重信号放大功能构建了 CB Mab/Au NPs/PB-PDDA-CS 竞争型免疫传感器。该传感器可用于盐酸克伦特罗及其它瘦肉精和 β -受体兴奋剂测定, 具有灵敏度高, 特异性强, 线性范围宽等优点。因此, 本文所建立的方法在瘦肉精及兴奋剂检测的工作中有着广阔的应用前景。

References

- (a) Mazzanti, G.; Sotto, A. D.; Daniele, C.; Battinelli, L.; Brambilla, G.; Fiori, M.; Loizzo, S.; Loizzo, A. *Food Chem.*

- Toxicol.* **2007**, *45*, 1694.
- (b) Aresta, A.; Calvano, C. D.; Palmisano, F. C.; Zambonin, G. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *47*, 641.
- 2 Lorenzo, I.; Cortes, S.; Ramos, G. J. V. *Langmuir* **2010**, *26*, 14663.
- 3 He, P. L.; Wang, Z. Y.; Zhang, L. Y.; Yang, W. J. *Food Chem.* **2009**, *112*, 707.
- 4 Poletti, A. *J. Chromatogr. B* **1996**, *687*, 27.
- 5 (a) Courant, F.; Pinel, G.; Bichon, E.; Monteau, F.; Antignac, J. P.; Bizec, B. L. *Analyst* **2009**, *134*, 1637.
(b) He, L.; Su, Y.; Zeng, Z.; Liu, Y.; Huang, X. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2007**, *132*, 316.
- 6 (a) Guy, P. A.; Savoy, M. C.; Stadler, R. H. *J. Chromatogr. B* **1999**, *736*, 209.
(b) Lin, L. A.; Tomlinson, J. A.; Satzger, R. D. *J. Chromatogr. A* **1997**, *762*, 275.
- 7 Campanella, L.; Eremin, S.; Leloa, D.; Martini, E.; Tomasetti, M. *Sens. Actuators, B* **2011**, *156*, 50.
- 8 Xiao, F.; Zhang, N. D.; Gu, H. J.; Qian, M.; Bai, J.; Zhang, W.; Jin, L. T. *Talanta* **2011**, *84*, 204.
- 9 Chen, C. Y.; Zhang, H. L.; Liu, M. S.; Yan, Y.; Zhao, B. *Acta Chim. Sinica* **2011**, *69*, 2865 (in Chinese).
(陈昌云, 张红琳, 柳闽生, 颜妍, 赵波, 化学学报, **2011**, *69*, 2865.)
- 10 Lai, G. S.; Yan, F.; Ju, H. X. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 9730.
- 11 Mani, V.; Chikkaveeraiah, B. V.; Patel, V.; Gutkind, J. S.; Rusling, J. F. *ACS Nano* **2009**, *3*, 585.
- 12 Wang, W. Y.; Zhang, Y. L.; Wang, J. Y.; Shi, X.; Ye, J. N. *Meat Sci.* **2010**, *85*, 302.
- 13 Pandey, P.; Singh, S. P.; Arya, S. K.; Gupta, V.; Datta, M.; Singh, S.; Malhotra, B. D. *Langmuir* **2007**, *23*, 3333.

(A1111253 Cheng, B.; Lu, Z.)