

# 芦丁在石墨烯修饰电极上的电化学行为及其灵敏检测

刘坤平<sup>1,2</sup>, 李惠茗<sup>2</sup>, 何钢<sup>1,2</sup>, 颜军<sup>1,2</sup>, 郭晓强<sup>1,2</sup>, 赵琦<sup>1</sup>, 苟小军<sup>1,2\*</sup>

(1. 成都大学中药化学实验室, 四川成都 610106; 2. 成都大学生物产业学院, 四川成都 610106)

**摘要** [目的]研究了芦丁在石墨烯修饰电极上的电化学行为及其测定方法。[方法]采用化学还原法,制备了氨基功能化的石墨烯,并用于构建灵敏的芦丁电化学传感器。采用循环伏安法和差分脉冲法,研究芦丁在该修饰电极上的电化学行为,并用差分脉冲法对芦丁进行检测。[结果]高比表面积和高导电性的石墨烯使芦丁在该传感器上表现出增强的电化学活性。电极反应动力学研究表明,芦丁在该修饰电极表面经历了一个受表面控制的准可逆过程。在最优试验条件下,芦丁的还原峰电流与其浓度在  $2 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-5}$  mol/L 范围内呈良好的线性关系,检出限( $S/N=3$ )为  $1.0 \times 10^{-8}$  mol/L。[结论]该修饰电极具有良好的选择性和稳定性,可实现实际样品中芦丁含量的灵敏检测。

**关键词** 芦丁; 石墨烯; 修饰电极; 差示脉冲; 灵敏检测

**中图分类号** S131; Q652.9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)10-04238-04

## Electrochemical Behavior and Sensitive Detection of Rutin on Graphene Modified Electrode

LIU Kun-ping et al (Chemistry Laboratory of Traditional Chinese Medicine, Chengdu University, Chengdu, Sichuan 610106)

**Abstract** [Objective] The aim was to study the electrochemical behavior of rutin on the graphene modified electrode and develop the corresponding detection method. [Method] Amino functionalized graphene was prepared with a chemical reduction method and was used to fabricate the sensitive rutin electrochemical sensor. Cycle voltammetry and difference pulse method were used to study electrochemical behavior of rutin on modified electrode, and difference pulse voltammetry was adopted to determine rutin. [Result] Due to the high special surface area and electrical conductivity of graphene, rutin exhibited an enhanced electrochemical activity in the novel sensor. The study of electrode reaction kinetics indicated that rutin underwent a surface-controlled quasi-reversible process. Under the optimized experimental condition, the fabricated sensor displayed excellent analytical performance for rutin detection from  $2.0 \times 10^{-8}$  to  $1.0 \times 10^{-5}$  mol/L with a low detection limit of  $1.0 \times 10^{-8}$  mol/L at  $3\sigma$ . [Conclusion] The proposed electrochemical sensor exhibited good selectivity and stability, and it could be used for real samples.

**Key words** Rutin; Graphene; Modified electrode; Differential pulse voltammetry; Sensitive detection

芦丁是自然界中存在最丰富的一种黄酮类化合物糖苷,存在于多种植物中,其结构式如图1所示。它具有多种生理活性如抗炎止血、抗肿瘤及抗氧化等<sup>[1-2]</sup>,被广泛用作临床治疗药物。因此,芦丁的快速、灵敏检测受到广泛的重视。目前,常见的检测方法有高效液相色谱、化学荧光、毛细管电泳法<sup>[3-4]</sup>、电化学方法等。其中,电化学的检测方法由于具有简单、快速、高灵敏、高稳定性等优点,已在药物分析检测领域引起广泛的关注。近年来,随着纳米技术的快速发展,基于纳米材料所构建的修饰电极由于能极大地增强电化学传感器的信号强度,从而提高检测灵敏度,已被广泛用于药物检测分析。

作为一种新型的平面二维碳纳米材料,石墨烯自2004年被发现以来由于具有许多优良的性质如高比表面积、高导电性及高载流子迁移率,已经在纳米电子器件、超导体、传感器以及纳米复合物材料<sup>[5-6]</sup>等方面得到广泛应用。笔者采用化学还原法制备了氨基功能化的石墨烯( $\text{NH}_2 - \text{G}$ ),并将其用于构建灵敏的芦丁电化学传感器。一方面,石墨烯具有大的比表面积,且其上的氨基可以与芦丁形成氢键,从而提高芦丁修饰电极上的吸附量。另一方面,石墨烯具有高的导电性,可以加快芦丁与电极之间的电子传递。因此,它可以极大地增强芦丁在所构建的电化学传感器的电化学响应,从

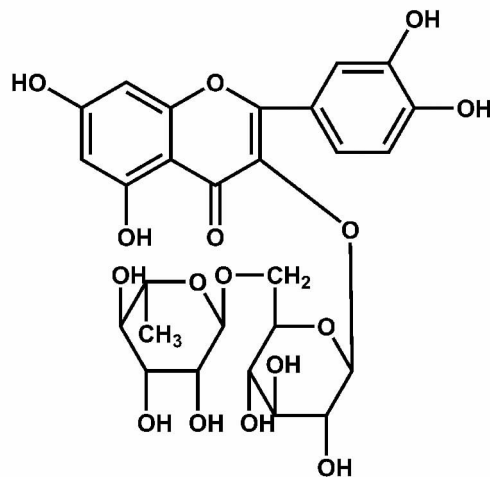


图1 芦丁结构式

而实现芦丁的灵敏检测。此外,所构建的芦丁电化学传感器还表现出良好的选择性和稳定性,可以用于实际样品中芦丁的灵敏检测。

## 1 材料与方法

**1.1 仪器和试剂** 芦丁、石墨粉(KS-10)购自Sigma-Aldrich公司(St. Louis, MO, USA)。其他化学试剂均为化学纯。氨水(28%)和水合肼(80%)购自成都长征试剂公司。芦丁储备液( $1 \times 10^{-3}$  mol/L)使用无水乙醇配制,并于4℃下暗处保存备用。循环伏安试验在CHI 832C电化学工作站上进行(上海辰华)。采用传统的三电极体系,以修饰的玻碳电极(GCE)为工作电极,以饱和甘汞电极(SCE)为参比电极,以

**基金项目** 成都大学基金(2012XJZ12)。

**作者简介** 刘坤平(1975-),男,山东菏泽人,讲师,博士,从事分析化学方面的研究。\*通讯作者,教授,博士,硕士生导师,从事食品分析方面的研究, E-mail: goujx@163.com。

**收稿日期** 2013-03-07

铂丝电极为对电极。用 pHs-3B 数字 pH 计(上海雷磁),测定 pH。所有试验中所使用的超纯水均由 Milli-Q 系统制备(Millipore Inc,电阻率 18.2 M $\Omega$ /cm)。场发射扫描电子显微镜(FESEM)在 S5X-550 上进行(岛津)。透射电子显微镜(TEM)在 JEOL 2100 上进行。X 射线粉末衍射数据由 XRD-6000 获得(岛津)。

**1.2 石墨烯的制备** 采用修改的 Hummers 和 Offeman 方法,以石墨粉为原料制备石墨氧化物(GO)。然后,在超声辅助下在适量水中将所制备的 GO 进行片层超声剥离 2 h,得到黄褐色的石墨烯氧化物纳米片水溶分散液。接着,在 3 000 r/min 下离心 30 min 以除去未剥离的 GO,即可得到石墨烯氧化物纳米片(GOs)分散液,其浓度由 GO 标准曲线确定。接着,向 20 ml 所制备的均一的 GOs 分散液(0.25 mg/ml)中加入 10  $\mu$ l 水合肼、70  $\mu$ l 氨水,搅拌均匀,并升温至 90  $^{\circ}$ C,反应 1 h,即得均一的氨基保护的石墨烯纳米片分散液(NH<sub>2</sub>-G)。

**1.3 电化学传感器的构建** 在电化学测量和修饰过程开始之前,先将裸玻碳电极(GCE)分别用 1.0、0.3 和 0.05  $\mu$ m 的氧化铝抛光粉进行抛光处理。然后,依次用二次水、1:1 HNO<sub>3</sub>、丙酮和超纯水各超声清洗 3~5 min 以得到平滑、新鲜、光洁的电极表面,N<sub>2</sub> 吹干。最后,将 5  $\mu$ l 上述制备的 NH<sub>2</sub>-G 溶液滴涂到预处理的裸玻碳电极表面,并置于干燥器中室温下自然晾干。

**1.4 芦丁的测定及电极再生** 在优化的条件下,将制备的修饰电极浸入一系列含有不同浓度的芦丁的 PBS 缓冲液中(0.1 mol/L,pH 3.0)。在搅拌下采用循环伏安法(CV)富集 100 圈,再采用差示脉冲伏安法(DPV)于室温下在 0.1~0.8 V 电位窗下进行测量,并获得芦丁标准曲线。测量后的电极浸入 pH 7.0 的 PBS 缓冲溶液中(0.1 mol/L),采用循环伏安法(CV)于室温下在 0.1~0.8 V 电位窗下连续扫描 15 圈,可实现电极的再生。

## 2 结果与分析

**2.1 材料的表征** 由图 2 可知,NH<sub>2</sub>-G 呈褶皱的不规则片状半透明结构,就像是由皱纹并卷曲着的半透明的轻纱。图 3 显示的是修饰电极表面的 NH<sub>2</sub>-G 膜的场发射扫描电镜(SEM)照片。由图 3 可知,膜的表面较粗糙,呈高低起伏不平如波浪般的非均一的膜。

由图 4 可知,石墨粉在 26.4 表现出一个特征衍射峰。当石墨粉被氧化为 GO 后,石墨粉的 26.4 $^{\circ}$ 特征峰消失了,而出现了 10.0 $^{\circ}$ 附近的特征衍射峰。这表明通过插层效应,羧基(-COOH)、羟基(-OH)以及环氧(C-O-C)等含氧基团已成功地插入到石墨片层中。因此,石墨的层间距被拉大。当石墨烯氧化物纳米片被水合肼还原后,得到的 NH<sub>2</sub>-G 的 X 射线衍射图上没有观察到明显的衍射峰。这表明石墨烯氧化物纳米片已被完全还原,形成无定形结构。

**2.2 芦丁的电化学行为** 采用循环伏安法对芦丁在不同电极上的电化学行为进行研究。由图 5 可知,在裸玻碳电极上,芦丁在 0.475 和 0.488 V 处显示一对强度相对较小的氧

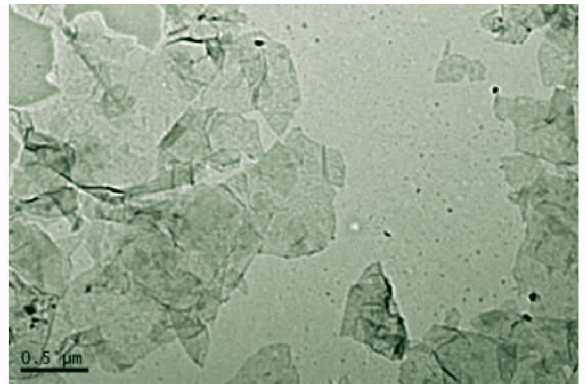


图 2 NH<sub>2</sub>-G 的 TEM 图

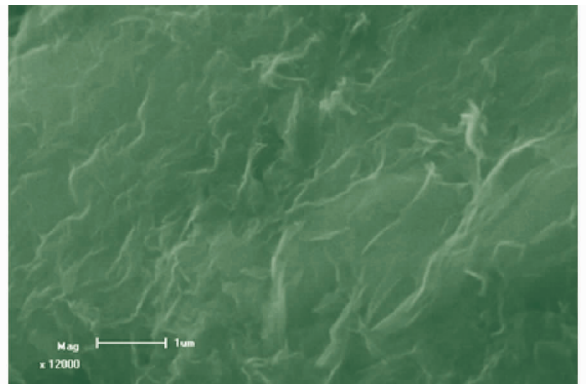


图 3 NH<sub>2</sub>-G 的 SEM 图

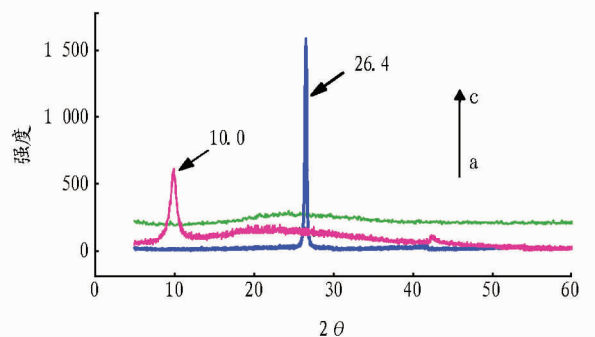
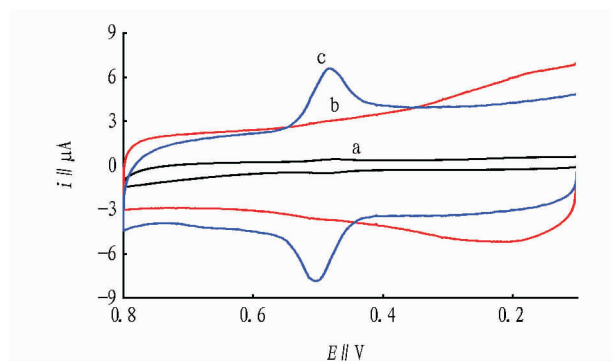


图 4 石墨粉(a)、GO(b)、NH<sub>2</sub>-G(c)的 XRD 图

化还原峰。然而,芦丁在 NH<sub>2</sub>-G/GCE 电极上于 0.482 和 0.505 V 处表现出一对稳定的、对称的准可逆的氧化还原峰,峰峰分离度仅为 23 mV。这表明芦丁在 NH<sub>2</sub>-G/GCE 修饰电极表面经历了一个快速的电子转移过程。与裸玻碳电极相比,在该修饰电极上芦丁的电流响应得到了极大的增强。这可能是 NH<sub>2</sub>-G 对芦丁的富集作用和石墨烯的高导电性共同作用的结果。一方面,由于 NH<sub>2</sub>-G 具有氨基,可以与芦丁上的羟基形成氢键,从而将芦丁分子富集到电极表面。同时,由于石墨烯具有较大的比表面积,它可以提高芦丁在电极表面的负载量。另一方面,由于 NH<sub>2</sub>-G 具有高的导电性,它可加速电极表面的电子传递速率,从而实现了对电化学信号的放大。因此,NH<sub>2</sub>-G 能为芦丁提供电子转移微环境,从而促进芦丁在电极表面的电化学反应以实现芦丁的灵敏检测。另外,在没有芦丁存在的缓冲液中,NH<sub>2</sub>-G/GCE 电极表现出较大的背景电流信号。这可能是由于电极表面

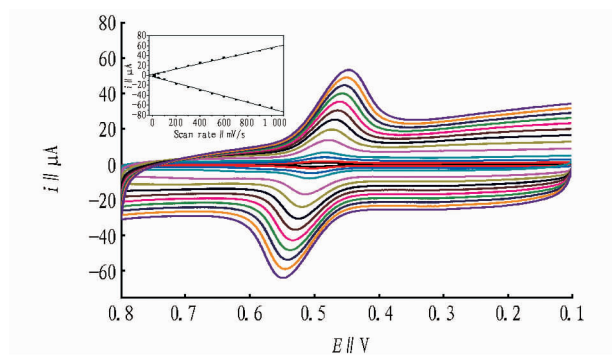
的  $\text{NH}_2\text{-G}$  膜具有较大的比表面积<sup>[7]</sup>。



注:扫速为 100 mV/s。

图5 芦丁( $1 \times 10^{-6}$  mol/L, 0.1 mol/L pH 3.0 PBS)在裸 GCE (a) 和  $\text{NH}_2\text{-G/GCE}$  (b) 和  $\text{NH}_2\text{-G/GCE}$  (c) 电极上的循环伏安图和  $\text{NH}_2\text{-G/GCE}$  (b) 在 0.1 mol/L pH 3.0 PBS 中的循环伏安图

为了研究芦丁在  $\text{NH}_2\text{-G/GCE}$  电极上的反应动力学,对芦丁在该修饰电极上的电化学响应受扫描速率的影响进行了研究。由图 6 可知,随着扫描速率的增加,芦丁的氧化还原峰电流也相应增加,且峰电位差逐渐增大。插图表明,当扫描速率从 10 增加到 1 000 mV/s 时,阴极电流和阳极电流均随扫描速率呈线性变化。这表明芦丁在该修饰电极上的电化学反应是一个受表面控制的准可逆过程。



注:插图为峰电流与扫描速率关系图。

图6  $\text{NH}_2\text{-G/GCE}$  电极在 0.1 mol/L pH 3.0 PBS 中于 10、20、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900 和 1000 mV/s 扫速下的循环伏安图(由里到外)

由图 7 可知,在高扫描速率范围,阳极 ( $E_{pa}$ ) 和阴极 ( $E_{pc}$ ) 峰电位与扫描速率的对数 ( $\lg v$ ) 呈线性关系,其线性方程分别为:

$$E_{pa} = 0.5457 + 0.0496 \times \lg v$$

$$E_{pc} = 0.4503 - 0.0443 \times \lg v$$

方程的相关系数分别为 0.9871 和 0.9886。根据 Laviron 模型<sup>[8]</sup>,可得电子转移数 ( $n$ )、电子转移系数 ( $\alpha$ ) 及表观速率常数 ( $k_s$ ),分别为 2.00、0.51 和  $4.50 \text{ s}^{-1}$ 。这表明芦丁在该修饰电极上经历了一个快速的电子转移电化学反应。

**2.3 试验条件优化** pH 的变化对芦丁的检测有较大的影响。为了确定最优的试验 pH,开展了 pH 优化试验。由图 8 可知,随着缓冲溶液 pH 的增加,芦丁氧化还原峰电位逐渐向负电位偏移。这表明质子参与了芦丁的氧化还原反应。由

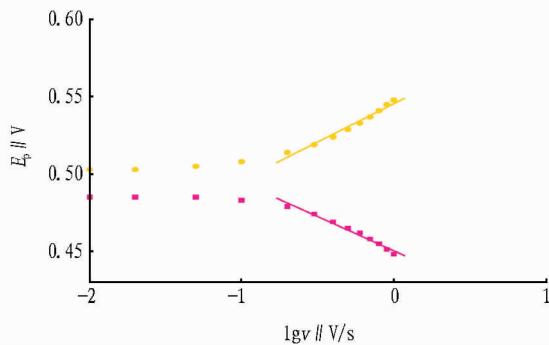
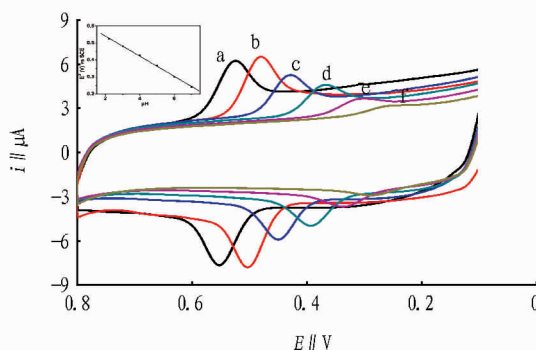


图7 扫描速率对阴极和阳极峰电位的影响

插图可知,芦丁的还原峰电位与 pH 在 2.2 ~ 7.0 的范围内呈线性关系,其线性方程为:

$$E_{pa} = 0.6587 - 0.0592 \text{ pH}$$

方程的相关系数为 0.9992,斜率为 59.2 mV,非常接近理论值 59 mV。这表明参与芦丁电化学反应的电子数和质子数相等<sup>[9]</sup>。因此,结合 Laviron 模型的计算结果,发现芦丁在  $\text{NH}_2\text{-G/GCE}$  电极上的电化学反应为两质子两电子反应,其电极反应方程如图 9 所示。芦丁在该电极上电氧化的机理可简单的表述为:芦丁先失去一个质子形成一价阴离子,然后一价阴离子被氧化为阴离子自由基。阴离子自由基进一步经历一个可逆的氧化过程被氧化为去氢芦丁。最后,去氢芦丁经历快速的去氢过程产生最终电活性产物 3',4'-二醌。此外,由图 9 可知,随着 pH 的增加,芦丁的电化学响应电流逐渐增大,当 pH 为 3.0 时达到最大值,然后逐步下降。因此,选择 pH 3.0 为最优的 pH 来进行芦丁的检测。



注:插图为 pH 与芦丁还原电位的关系图。a~f 分别表示 pH 为 2.2、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0。

图8  $\text{NH}_2\text{-G/GCE}$  电极在含芦丁( $1 \times 10^{-6}$  mol/L)的缓冲液中的循环伏安图

另外,还对芦丁的 CV 富集圈数进行了优化。由图 10 可知,芦丁的还原峰电流随着圈数的增加而逐渐增大,在 100 圈后达到最大值并保持恒定。这表明在 100 圈内芦丁就已经在  $\text{NH}_2\text{-G/GCE}$  电极上达到饱和和吸附。因此,选择 100 圈为最佳的芦丁 CV 富集圈数。

**2.4 芦丁的检测** 采用 DPV 法,研究该传感器对芦丁的检测能力。由图 11 可知,在最优的试验条件下,DPV 峰电流的对数值与芦丁浓度在  $2 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-5}$  mol/L 的浓度范围内呈良好的线性关系。线性方程为:

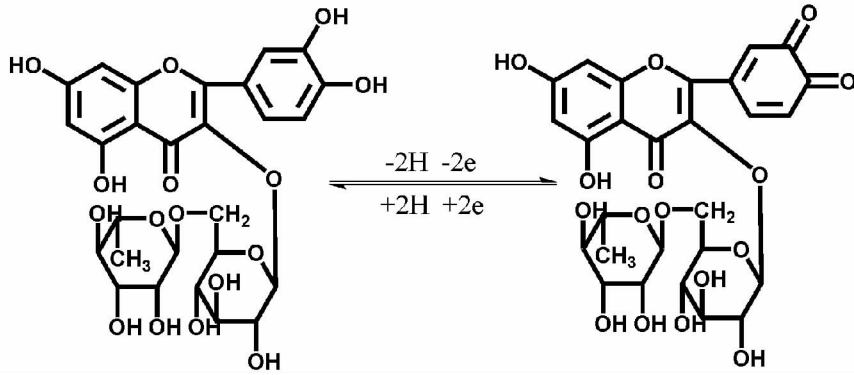
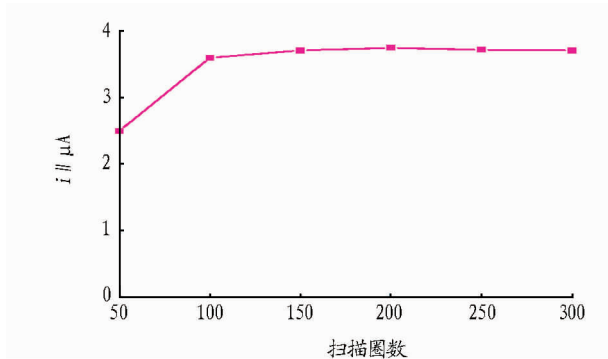
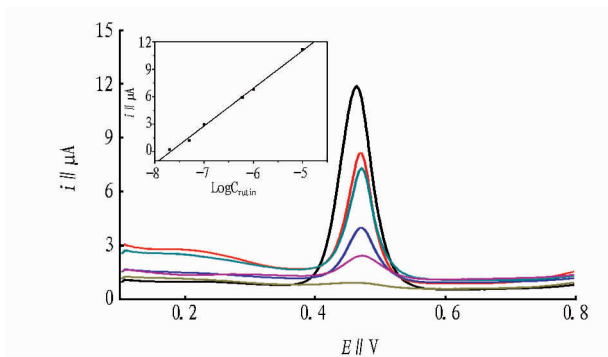
图9 芦丁在  $\text{NH}_2\text{-G/GCE}$  电极上的电极反应方程

图10 芦丁 CV 富集圈数的优化

$$\lg[i] = 31.5961 + 4.1132 \times C_{\text{芦丁}}$$

线性方程的相关系数为 0.998 3, 检测限为  $1.0 \times 10^{-8}$  mol/L ( $S/N = 3$ ), 比碳糊修饰电极 ( $2.0 \times 10^{-7}$  mol/L)<sup>[10]</sup> 和碳纳米管修饰电极 ( $3.2 \times 10^{-8}$  mol/L)<sup>[11]</sup> 有较大的提高。其原因可能是: 一方面,  $\text{NH}_2\text{-G}$  上的氨基可以与芦丁形成氢键, 且石墨烯具有大的比表面积, 大大提高了芦丁在修饰电极上的负载量; 另一方面, 高导电的石墨烯可以加速电极表面的电子传递速率, 实现电化学信号的放大, 从而提高芦丁在该传感器上的检测灵敏度。



注: 插图为芦丁 DPV 响应的浓度校正曲线。

图11  $\text{NH}_2\text{-G/GCE}$  电极在含不同浓度芦丁 ( $2 \times 10^{-8}$ 、 $5 \times 10^{-8}$ 、 $6 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-5}$ 、 $1 \times 10^{-5}$  mol/L) 的 PBS 缓冲液 (0.10 mol/L, pH 3.0 PBS) 中 DPV 响应

**2.5 电极稳定性和干扰试验** 使用同一支修饰电极对浓度为  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 的芦丁溶液进行 6 次平行测定,  $RSD$  为 3.6%; 用 6 支不同修饰电极测定同一芦丁溶液,  $RSD$  为 4.0%; 将修饰电极在室温下放置 14 d 后重新测定,  $RSD$  为

4.3%, 表明该修饰电极具有良好的重复性和稳定性。该研究考察常见物质如多巴胺、抗坏血酸、血红蛋白以及葡萄糖对测定的影响, 结果表明这些共存的干扰物均不干扰该传感器对芦丁的测定。

**2.6 实际样品的测定** 为了检验该传感器对实际样品中的芦丁的检测能力, 首先将一片商品芦丁药片 (含 20 mg 芦丁) 研磨为固体粉末; 然后, 加入 20 ml 乙醇, 超声 15 min, 使之均匀分散; 最后, 滤除不溶物, 滤饼用 10 ml 乙醇冲洗 3 遍, 合并各次滤液, 用乙醇定容到 100 ml。在优化的条件下, 对样品进行 DPV 测定。由表 1 可知, 该方法测定的芦丁药片的平均值为 20.23 mg/片, 与标称值差别不大; 回收率达 96.8% ~ 106.4%。因此, 所构建的芦丁电化学传感器可以用于实际样品中芦丁含量的灵敏检测。

表1 商品芦丁药片的检测

编号	标称值//mg/片	测定值//mg/片	回收率//%
1	20	21.28	106.4
2	20	20.06	100.3
3	20	19.35	96.8
平均值	20	20.23	101.2

### 3 结论

该研究构建了一个基于石墨烯的简单、灵敏的电化学传感器。该传感器对芦丁表现出优秀的电化学活性, 在最优化条件下可实现芦丁的灵敏、简便和快速检测并获得宽的线性范围、较低检测限。同时, 该传感器具有较高的选择性和稳定性, 可用于实际样品中芦丁的灵敏检测。因此, 该研究为拓宽石墨烯在药物分析上的应用提供了一个潜在的平台。

### 参考文献

- [1] GENE R M, CARTANA C, ADZET T, et al. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: Identification of its active constituents [J]. *Planta Medica*, 1996, 62(3): 232-235.
- [2] HE J L, YANG Y, YANG X, et al.  $\beta$ -Cyclodextrin incorporated carbon nanotube-modified electrode as an electrochemical sensor for rutin [J]. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2006, 114(1): 94-100.
- [3] ZHANG Y, ZHENG J B. Sensitive voltammetric determination of rutin at an ionic liquid modified carbon paste electrode [J]. *Talanta*, 2008, 77(1): 325-330.
- [4] LIU M L, DENG J H, CHEN Q, et al. Sensitive detection of rutin with novel ferrocene benzene derivative modified electrodes [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 41: 275-281.



各种生物化学过程的强度和方向,是土壤肥力高低的重要指标之一。小麦、玉米秸秆还田无施肥的处理可以较大幅度地提高土壤脲酶活性,但其增加的幅度没有小麦、玉米秸秆均还田有施肥处理的高,后者在小麦-玉米的生育期内较秸秆还田有施肥的处理分别提高了 21.93%、4.92%、35.88%、4.71%、21.79%、0.99%、31.52%、21.77%、8.52%、3.74%、12.89%,增幅差异达 0.01 显著水平。这说明在小麦、玉米秸秆还田又施肥的条件下,土壤脲酶活性能够被大幅度地提高。

秸秆还田无施肥和秸秆还田有施肥处理均能提高土壤微生物量氮含量,两者没有显著性差异。仅仅施肥而无秸秆还田的处理对于提高土壤微生物量氮的效果微乎其微,说明秸秆还田是土壤微生物量氮提高的核心因素。Witter<sup>[18]</sup>在长达 30 年的肥料试验田上的研究表明,长期施用有机肥或有机物料如秸秆、绿肥、农家肥等土壤中微生物量较高。化肥的施用对土壤微生物的影响比较复杂。一般来说,长期施用磷肥能够促进土壤微生物量的增长,而长期施用氮肥则降低土壤微生物量。施用磷肥一般对土壤微生物量的影响不明显,但也有在实验室培养中发现微生物量降低和增加的报道<sup>[19-20]</sup>。该研究也恰恰印证了前人的研究结果。

秸秆还田是一项增强土壤生物肥力、改善土壤生物学性状的措施,在农业生态系统中具有重要意义。秸秆还田对土壤养分和土壤生物学特性的影响是十分复杂的过程。在以后的研究过程中,可以利用分子生物学的手段,在更深层次进行探究,为农业的可持续发展提供理论基础。

#### 参考文献

[1] 江永红,字振荣,马永良. 秸秆还田对农田生态系统及作物生长的影响[J]. 土壤通报,2001(5):54-58.

[2] WU T Q. The development of sustainable agriculture in Taiwan[J]. Soil and Environment,2001,3:1-10.

[3] MARX M C, WOOD M, JARVIS S C. A microplate fluorimetric assay for the study of enzyme diversity in soils[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2001,33(12/13):1633-1640.

[4] 张咏梅,周国逸,吴宁. 土壤酶学的研究进展[J]. 热带亚热带植物学报,2004,12(1):83-90.

(上接第 4241 页)

[5] CHANG H X, TANG L H, WANG Y, et al. Graphene fluorescence resonance energy transfer aptasensor for the thrombin detection[J]. Analytical Chemistry, 2010,82(6):2341-2346.

[6] KIM H, ABDALA A A, MACOSKO C W. Graphene/polymer nanocomposites[J]. Macromolecules, 2010,43(16):6515-6530.

[7] WANG S F, XIE F R, HU F. Carbon-coated nickel magnetic nanoparticles modified electrodes as a sensor for determination of acetaminophen[J]. Sensors and Actuators B-Chemical, 2007,123(1):495-500.

[8] LAVIRON E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems[J]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 1979,101(1):19-28.

[5] WELP G. Inhibitory effects of the total and water-soluble concentrations of nine different metals on the dehydrogenase activity of a loesssoil[J]. Biol Fertil Soils, 1999,30:132-139.

[6] GIANFREDA L, SANNINO F, VTOANTE A. Pesticide effects on the activity of urease, immobilized and invertase[J]. Soil Biol & Biochem, 1995,27(9):1201-1208.

[7] 周建斌,陈竹君,李生秀. 土壤微生物量氮含量、矿化特性及其供氮作用[J]. 生态学报,2001,21(10):1718-1725.

[8] 张镜清. 农作物根茬培肥土壤的作用[J]. 土壤通报,1984,15(2):63-64.

[9] 肖玲,李岗,和文祥,等. 旱地不同培肥方式对土壤酶活性影响的研究[J]. 西北农业大学学报,1999,27(5):142-146.

[10] 中国土壤学会农业化学专业委员会. 土壤农业化学常规分析方法[M]. 北京:科学出版社,1983.

[11] 关松荫. 土壤酶及其研究方法[M]. 北京:农业出版社,1986.

[12] 吴金水,林启美,黄巧云,等. 土壤微生物量测定方法及其应用[M]. 北京:气象出版社,2006.

[13] 何振立. 土壤微生物量及其在养分循环和环境质量评价中的意义[J]. 土壤,1997(2):61-69.

[14] 刘守龙,肖和艾,童成立,等. 亚热带稻田土壤微生物量碳、氮、磷状况及其对施肥的反应特点[J]. 农业现代化研究,2003,24(4):279-283.

[15] GALE W J, CAMBARDELLA C A. Carbon dynamics of surface residue and root-derived organic matter under simulated no-till[J]. Soil Science Society of America Journal, 2000,64:190-195.

[16] LIANG W, YUE J, WU J, et al. Seasonal variations of soil microbial biomass respiration rate and CH<sub>4</sub> emission in black earth rice fields[J]. Chin J Appl Ecol, 2003,14(12):2278-2280.

[17] 李贵桐,赵紫鹃,黄元仿,等. 秸秆还田对土壤氮素转化的影响[J]. 植物营养与肥料学报,2002,8(2):162-167.

[18] WITTER E, MARTINSSON A M, GARICA F V. Size of the soil microbial biomass in a long term experiment as affected by different N-fertilizers and organic manures[J]. Soil Biol & Bio Chem, 1993,25:659-669.

[19] 陈安磊,王凯荣,谢小立. 施肥制度与养分循环对稻田土壤微生物量碳氮磷的影响[J]. 农业环境科学学报,2005,24(6):1094-1099.

[20] 陶水龙,林启美,赵小蓉. 土壤微生物量研究方法进展[J]. 土壤肥料, 1998(5):15-18.

[21] 刘佳斌,李传宝,王宏燕. 秸秆还田不同处理方式对黑土微生物数量和土壤酶活性的影响[J]. 安徽农业科学,2012,40(9):5285-5287.

[22] 周俊国,杨鹏鸣. 不同肥料对土壤脲酶和碱性磷酸酶活性的影响[J]. 西南农业学报,2012(2):577-579.

[23] LU Z W, WAN G F, YANG Z J, et al. Effects of straw processing methods and irrigation sources on enzymatic activity of soils under winter wheat[J]. Agricultural Science & Technology, 2012,13(7):1465-1468,1515.

[24] 南雄雄,游东海,田霄鸿,等. 关中平原农田作物秸秆还田对土壤有机碳和作物产量的影响[J]. 华北农学报,2011(5):222-229.

[9] ZARE H R, SOBHANI Z, MAZLOUM-ARDAKANI M. Electrocatalytic oxidation of hydroxylamine at a rutin multi-wall carbon nanotubes modified glassy carbon electrode; improvement of the catalytic activity[J]. Sensors and Actuators B-Chemical, 2007,126:641-647.

[10] FRANZOI A C, PERALTA R A, NEVES A, et al. Biomimetic sensor based on (MnMnII)-Mn-III complex as manganese peroxidase mimetic for determination of rutin[J]. Talanta, 2009,78(1):221-226.

[11] YANG S L, QU L B, LI G, et al. Gold nanoparticles/ethylenediamine/carbon nanotube modified glassy carbon electrode as the voltammetric sensor for selective determination of rutin in the presence of ascorbic acid[J]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2010,645(2):115-122.