

鱼精蛋白-核酸适配体-金纳米技术快速检测牛奶中的卡那霉素

贾向阳^{1,3}, 尤慧艳^{1*}, 付秀丽^{2*}

(1. 大连大学环境与化学工程学院, 辽宁 大连 116622; 2. 烟台大学化学化工学院, 山东 烟台 264005;
3. 中国科学院烟台海岸带研究所, 山东 烟台 264003)

摘要 : 基于聚阳离子鱼精蛋白与带负电的核酸适配体以及金纳米粒子之间的静电作用, 发展了一种生物纳米检测技术, 用于卡那霉素的检测; 优化了缓冲溶液中阳离子、鱼精蛋白以及核酸适配体浓度, 结果表明在 20 mmol/L Na⁺、1 mmol/L Mg²⁺、2 mg/L 鱼精蛋白、100 nmol/L 核酸适配体条件下, 卡那霉素在 5~5 000 nmol/L 范围内与金纳米粒子的吸光度比值呈现良好的线性关系, 相关系数 (R^2) 为 0.992 8, 方法的检出限为 0.53 nmol/L。在此实验条件下, 检测了牛奶中卡那霉素的含量, 回收率为 96%~98%, 相对标准偏差为 1.5%~3.2%。该方法选择性高, 灵敏度好, 线性范围广, 显示出其应用于食品中卡那霉素检测的优势。

关键词 : 鱼精蛋白; 核酸适配体; 金纳米粒子; 纳米生物; 卡那霉素; 牛奶

中图分类号 : O658 文献标识码 : A 文章编号 : 1000-8713 (2017) 03-0269-05

Fast detection of kanamycin in milk by protamine-aptamer-gold nanotechnology

JIA Xiangyang^{1,3}, YOU Huiyan^{1*}, FU Xiuli^{2*}

(1. College of Environment and Chemical Engineering, Dalian University, Dalian 116622, China;
2. Department of Chemistry and Chemical Engineering, Yantai University, Yantai 264005, China;
3. Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China)

Abstract : A bio-nanodetection system was developed for kanamycin based on electrostatic interaction between polycationic protamine and negatively charged aptamer or gold nanoparticles (AuNPs). The concentrations of protamine, aptamer and cations in the buffer solution were optimized. The results showed that there was a good linear correlation ($R^2 = 0.9928$) between gold nanoparticles and kanamycin in the range of 5–5 000 nmol/L with 20 mmol/L Na⁺, 1 mmol/L Mg²⁺, 2 mg/L protamine and 100 nmol/L aptamer. The limit of detection was 0.53 nmol/L. Under this experimental condition, the content of kanamycin in milk was detected, the recoveries were 96%–98%, and the relative standard deviations (RSDs) were 1.5%–3.2%. This method has the advantages of high selectivity, good sensitivity and wide linear range, and is useful in the detection of kanamycin in foods.

Key words : protamine; aptamer; gold nanoparticles; bio-nano; kanamycin; milk

卡那霉素 (kanamycin) 作为一种氨基糖苷类抗生素, 因具有价格低廉、广谱抗菌等优点被广泛用作人畜共用药^[1], 主要对结核杆菌、大肠杆菌等革兰阴性细菌及肺炎杆菌等部分革兰阳性菌、厌氧菌等

有强抗菌作用, 可用于治疗各种感染类疾病^[2,3]。卡那霉素的滥用造成其在动物源性食品中残留, 通过食物链传递, 循环进入人体沉积, 具有耳毒性、肾毒性及抗生素耐药性等副作用。欧盟、中国、日本等

收稿日期 2016-10-08

* 通讯联系人, E-mail: dlyhy@dicp.ac.cn (尤慧艳), fxl1984.happy@163.com (付秀丽)。

基金项目 : 国家重大科学仪器设备开发专项 (2013YQ17052506); 国家自然科学基金项目 (21275158); 烟台大学博士科研启动基金项目 (HY15B13)。

Foundation item : National Key Scientific Instrument and Equipment Development Project (No. 2013YQ17052506); National Natural Science Foundation of China (No. 21275158); Doctoral Scientific Research Foundation of Yantai University (No. HY15B13)。

国家明确规定了动物源食品中抗生素的最大残留量 (MRLs $\leq 200 \mu\text{g}/\text{kg}$), 牛奶中的 MRL 为 $200 \mu\text{g}/\text{kg}$ ^[4, 5]。

目前, 卡那霉素的检测技术有酶联免疫法^[6]、高效液相色谱法^[7]、电化学法^[8]、高效液相色谱-串联质谱法^[9]、微生物检测法^[10]等, 这些方法的检出限为 $5 \sim 10 \text{ nmol}/\text{L}$ ^[11-13]。检测牛奶中其他抗生素的方法还有超高效液相色谱-三重四极杆质谱法^[14]、液相色谱-串联质谱法^[15, 16]。虽然这些方法可以较灵敏地检测食品中的卡那霉素, 但受其所用设备昂贵、样品前处理复杂、操作繁琐、性能不稳定等因素的影响, 实际应用受到了限制。因此, 发展一种快速、简便、灵敏、成本低的检测食品中卡那霉素的方法是十分必要的。

核酸适配体可与靶标卡那霉素通过产生空间结构匹配的高亲和力而特异性结合^[17]。核酸适配体是一段人工合成的单链寡糖核苷酸片段, 通常是一段 DNA 或 RNA, 可与多种目标物如离子、蛋白质、抗生素甚至很多细胞特异性结合。因其具有制备简便、特异性好、稳定性好、亲和性高等优点, 在分析检测、临床诊断和治疗以及生化分离等方面拥有广泛的应用前景^[18, 19]。

2014 年, 陈效兰等^[20]通过未修饰纳米金与卡那霉素核酸适配体共振瑞利散射光谱强度的变化, 建立了分析测定卡那霉素的新方法。随后, 徐飞等^[21]建立了基于荧光微球标记的卡那霉素免疫层析试纸定量新方法, 特异检测了牛奶样品中卡那霉素的残留。上述两种方法虽成功应用于实际样品的检测, 但核酸适配体都需要经过荧光物质标记后才能产生信号, 过程复杂, 不仅增加了检测成本, 同时也会降低卡那霉素与核酸适配体的结合程度^[22]。针对上述问题, 本文发展了一种较为简单的新型鱼精蛋白-核酸适配体-金生物纳米检测技术, 即用聚阳离子鱼精蛋白为桥梁, 使其先与表面带有大量负电荷的核酸适配体通过静电作用结合, 当核酸适配体被靶标物质夺走后, 再与表面带有负电荷的金纳米粒子通过静电作用结合, 间接测定靶标卡那霉素的含量。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

紫外光谱分析仪 (NanoDrop2000/2000C, 美国 Thermo Scientific 公司), 分析天平 (XS105, 瑞士 Mettler Toledo 公司), 超纯水仪 (Cascade-bio, 美

国 Pall 公司)。

硫酸鱼精蛋白 (纯度 $> 98\%$, 来自于鲱鱼, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 卡那霉素 (纯度 $\geq 98\%$), DNA 序列为 $5' \text{-TGGGGTTGAGGCTAAGCCGA-3'}$ (上海生工生物技术有限公司); 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES 纯度 $\geq 99.5\%$, 上海 Aladdin 化学试剂有限公司); 盐酸四环素、硫酸庆大霉素 (纯度 $\geq 98\%$, 美国 BBI 生命科技有限公司); 氯金酸 ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 纯度 $\geq 47.8\%$), 葡萄糖、柠檬酸钠 (纯度 $\geq 99\%$), NaCl (纯度 $\geq 99.5\%$), MgCl_2 (纯度 $\geq 99.5\%$), NaOH (纯度 $\geq 99\%$) (上海国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 金纳米颗粒的制备

将 $100 \text{ mL } 1 \text{ mol}/\text{L}$ 氯金酸溶液加入 250 mL 三口烧瓶中, 剧烈搅拌, 加热溶液至沸腾回流, 迅速加入 $10 \text{ mL } 38.8 \text{ mmol}/\text{L}$ 柠檬酸钠溶液。在此过程中溶液颜色由黄色逐渐变为浅灰色, 最终变为酒红色。继续加热煮沸 30 min 后停止加热, 搅拌冷却至室温, 产物置于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存备用。实验中所用到的玻璃仪器均经过以下处理: 先用新配制的王水 ($\text{HCl-HNO}_3, 3:1, \text{v/v}$) 浸泡, 再用超纯水冲洗, 干燥后备用^[23]。

1.3 缓冲溶液中卡那霉素的检测步骤

实验中所用卡那霉素、核酸适配体均用含 $20 \text{ mmol}/\text{L } \text{Na}^+$ 、 $1 \text{ mmol}/\text{L } \text{Mg}^{2+}$ 的 HEPES ($10 \text{ mmol}/\text{L}$ $\text{pH}=7.4$) 缓冲溶液配制。

取系列不同浓度的卡那霉素各 $20 \mu\text{L}$, 与 $20 \mu\text{L } 100 \text{ nmol}/\text{L}$ 核酸适配体溶液混合, 室温反应 1 h , 确保卡那霉素与核酸适配体特异性结合完全。加入 $20 \mu\text{L } 2 \text{ mg}/\text{L}$ 鱼精蛋白, 室温反应 10 min , 与溶液中未结合卡那霉素的核酸适配体通过静电作用进行结合, 之后用超纯水定容到 $180 \mu\text{L}$ 。加入 $20 \mu\text{L}$ 的金纳米粒子, 继续反应 10 min , 与剩余的鱼精蛋白结合。通过金纳米粒子的紫外-可见吸收光谱变化进行分析。

1.4 牛奶中卡那霉素的检测步骤

取 10 mL 当地购置的纯牛奶, 加入不同浓度的卡那霉素, 获得人工污染的牛奶, 随后逐滴加入体积分数为 20% 的乙酸溶液, 将 pH 调到 4.6 , $45 \text{ }^\circ\text{C}$ 静置 10 min , 以 $10\,000 \text{ r}/\text{min}$ 的转速离心 25 min , 经 $0.2 \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 用 $2 \text{ mol}/\text{L}$ NaOH 将其 pH 调到 7.4 , 以 $5\,000 \text{ r}/\text{min}$ 的转速离心 10 min , 过滤待用^[24, 25]。

用 1.3 节中的方法测定金纳米粒子在 520 和 650 nm 处紫外-可见吸收光度值。

2 结果与讨论

2.1 实验条件的优化

卡那霉素可与核酸适配体特异性结合,聚阳离子鱼精蛋白既可与带负电的核酸适配体通过静电作用结合,又可与表面包覆负电荷的金纳米粒子相互作用。当溶液中没有靶标卡那霉素存在时,聚阳离子鱼精蛋白与游离的核酸适配体通过静电作用结合成类似双链结构的复合物,加入金纳米粒子后,由于鱼精蛋白不足,不能使金纳米粒子发生团聚,金纳米粒子将呈现良好的分散状态,保持其自身的表面等离子体共振 (SPR) 吸收峰,仍为酒红色。当溶液中有靶标存在时,核酸适配体优先与靶标作用形成复合物而被消耗,阻碍了鱼精蛋白与核酸适配体的结合,此时加入金纳米粒子后,鱼精蛋白会与金纳米粒子相互作用使金纳米粒子发生一定程度的团聚,并使其 SPR 吸收峰发生变化,随着卡那霉素浓度的增加,金纳米粒子由红色逐渐变浅为浅紫色,最后变为蓝色,从而实现靶标卡那霉素的检测。因此金纳米粒子的紫外吸收光谱的变化可间接反映卡那霉素的含量变化。

本试验中金纳米粒子的颜色及其 SPR 吸收峰的改变与核酸适配体和鱼精蛋白的浓度密切相关,缓冲溶液中 Na^+ 、 Mg^{2+} 的存在可促进卡那霉素和核酸适配体的反应。因此,为实现生物纳米检测技术对靶标的最佳检测,需对核酸适配体、鱼精蛋白的浓度及缓冲溶液中 Na^+ 、 Mg^{2+} 的浓度进行优化。金纳米粒子在不同波长处 SPR 吸收值的大小反映了金纳米粒子的团聚和分散程度,因此选用金纳米粒子在 520 和 650 nm 处的吸光度比值 (A_{520}/A_{650}) 来表示检测靶标时金纳米粒子的团聚和分散的物质的量比值。

2.1.1 缓冲溶液中 Na^+ 、 Mg^{2+} 浓度的优化

试验所用缓冲溶液为 10 mmol/L HEPES 缓冲溶液,溶液中过多的 Na^+ 、 Mg^{2+} 会使金纳米粒子发生团聚,所以对其含量进行了优化。结果表明在含 20 mmol/L Na^+ 、1 mmol/L Mg^{2+} 的缓冲液中金纳米粒子不团聚。

2.1.2 鱼精蛋白质量浓度的优化

无靶标及适配体时,不同浓度的鱼精蛋白通过静电作用与金纳米粒子反应后进行紫外-可见吸收光谱分析。用去离子水将鱼精蛋白定容至 180 μL ,加入金纳米颗粒反应 5 min,进行紫外-可见吸收光谱分析。如图 1 所示,随着鱼精蛋白质量浓度的增加,金纳米粒子的吸光度比值逐渐减小,650 nm 处

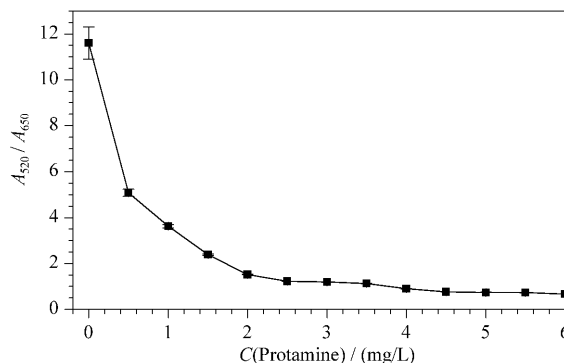


图 1 鱼精蛋白的质量浓度对金纳米粒子吸光度比值 (A_{520}/A_{650}) 的影响 ($n=5$)

Fig. 1 Effects of the protamine concentration on the absorbance ratio of gold nanoparticles (A_{520}/A_{650}) ($n=5$)

Conditions: 20 μL protamine, 160 μL H_2O , 20 μL gold nanoparticles (AuNPs).

的吸光度逐渐增大,520 nm 处的吸光度逐渐减小。当鱼精蛋白的质量浓度为 2 mg/L 时,金纳米粒子的吸光度比值较小,浓度进一步增大时没有明显变化。因此本试验中鱼精蛋白的最佳质量浓度为 2 mg/L。

2.1.3 核酸适配体浓度的优化

2 mg/L 鱼精蛋白与核酸适配体结合 10 min,加入金纳米粒子后,进行金纳米粒子的紫外-可见吸收光谱分析。如图 2 所示,核酸适配体的浓度由 0.1 nmol/L 逐渐增大到 50 nmol/L,金纳米粒子的吸光度比值几乎没有变化;当其浓度由 50 nmol/L 逐渐增大到 100 nmol/L,吸光度比值迅速增大;当核酸适配体的浓度达到 100 nmol/L 时,吸光度比值达到最大,随后继续增大浓度,金纳米粒子的吸光度

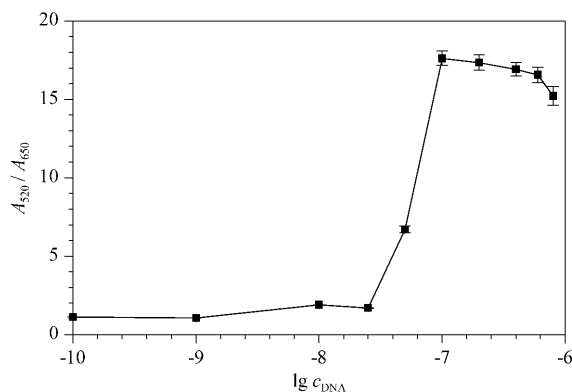


图 2 核酸适配体浓度对金纳米粒子的吸光度比值 (A_{520}/A_{650}) 的影响 ($n=5$)

Fig. 2 Effects of the aptamer concentration on the absorbance ratio of gold nanoparticles (A_{520}/A_{650}) ($n=5$)

Conditions: 2 mg/L protamine, 20 μL DNA, 160 μL H_2O , 20 μL AuNPs.

比值反而下降。其原因可能是：反应体系中核酸适配体的浓度很低时，与之结合的鱼精蛋白很少，更多的鱼精蛋白与金纳米粒子结合，使之团聚，核酸适配体的浓度增大，促进了鱼精蛋白与其结合，减弱了纳米金颗粒的团聚程度。因此本试验中核酸适配体的最佳浓度为 100 nmol/L。

2.2 卡那霉素的标准曲线

在所选的最优试验条件下，考察了该生物纳米检测技术对卡那霉素检测的灵敏度。单分散状态的金纳米粒子的 SPR 吸收峰在 520 nm 波长处，而团聚态的金纳米颗粒由于纳米颗粒之间 SPR 吸收峰发生耦合，使其在 520 nm 处的紫外-可见吸收峰强度下降，且在更长波长处出现新的吸收峰。随着团聚程度的增加，耦合作用增大，金纳米颗粒在更长波长处共振频率下降，吸收峰红移^[22-26]。如图 3 所示，当卡那霉素分别为 0、5、10、50、100、500、1 000、5 000 nmol/L 时，随着浓度的增大，金纳米粒子的分散状态由不团聚（酒红色）、部分团聚（浅紫色）到全部团聚（蓝色）。在 520 nm 处的吸光度值缓慢变小，而在更长波长（650 nm）处的吸光度值迅速增大，使得金纳米粒子的吸光度比值 A_{520}/A_{650} 发生改变，金纳米粒子的吸光度比值与卡那霉素浓度的对数呈现良好的线性关系，标准曲线为 $\Delta A = -3.990 - 0.8791lg c$ ，其中 ΔA 为金纳米粒子的吸光度比值 (A_{520}/A_{650})， c 为卡那霉素的浓度 (mol/L)，线性相关系数 (R^2) 为 0.992 8。方法的检出限按照 $L =$

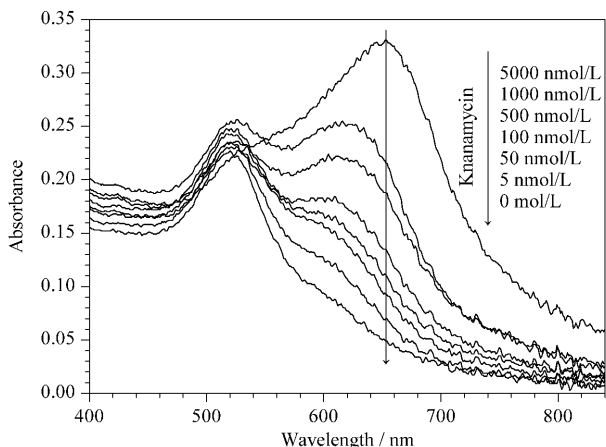


图 3 不同浓度卡那霉素的金纳米粒子紫外-可见吸收光谱图
Fig. 3 Ultraviolet-visible absorption spectra of gold nanoparticles with different concentrations of kanamycin.

As shown by the arrows, the absorption peak of surface plasmon resonance (SPR) of gold nanoparticles at the wavelength of 650 nm was gradually decreased with the decrease of kanamycin concentration from the top to the bottom.

$3S_b/S$ 计算 S_b 为空白样品多次测量的标准偏差， S 为方法的灵敏度（标准曲线的斜率）。本试验中 5 次空白的标准偏差 $S_b = 0.153 2$ ，标准曲线的斜率 $S = 0.879 1$ ，故 $L = 0.52$ nmol/L。

2.3 方法的选择性

考察了该生物纳米检测技术对卡那霉素的选择性。如图 4 所示，在最优试验条件下，溶液中分别含有 100 nmol/L 盐酸四环素、葡萄糖、硫酸庆大霉素时，金纳米粒子的 SPR 吸收比值 (A_{520}/A_{650}) 明显高于卡那霉素，表明该生物纳米检测技术对卡那霉素有良好的选择性。

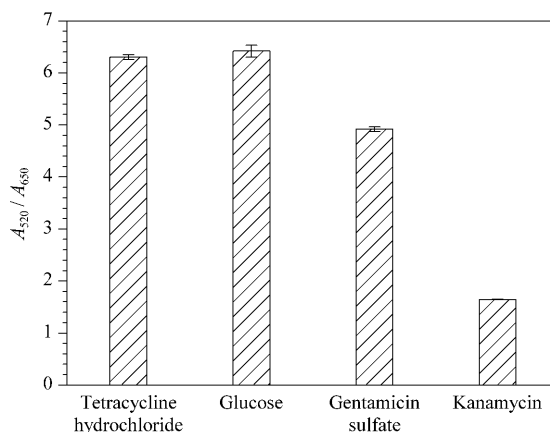


图 4 该方法对卡那霉素的选择性 ($n = 5$)
Fig. 4 Selectivity of kanamycin by this method ($n = 5$)

2.4 牛奶中卡那霉素的检测

对经过前处理的牛奶进行加标回收试验，加标水平为 8、50 和 200 nmol/L。如表 1 所示，在最优试验条件下，对牛奶中卡那霉素的含量进行了检测，回收率为 96%~98%，相对标准偏差 (RSD) 为 1.5%~3.2%，表明该方法能成功应用于牛奶中卡那霉素的检测。

表 1 牛奶中卡那霉素的加标回收率 ($n = 3$)
Table 1 Spiked recoveries of kanamycin in milk ($n = 3$)

No.	Added/ (nmol/L)	Found/ (nmol/L)	Recovery/%	RSD/%
1	8	7.86±0.03	98	2.5
2	50	48.50±0.04	97	3.2
3	200	191.10±0.12	96	1.5

2.5 检测卡那霉素不同分析方法的比较

对检测卡那霉素的不同方法（包括共振瑞利散射法、电化学检测、色谱-质谱联用技术、毛细管电泳检测及荧光检测等）进行比较分析，结果（见表 2）表明基于鱼精蛋白-核酸适配体-金纳米粒子检测技术的灵敏度高于其他检测方法，线性范围宽，且该方法简便、反应时间短、样品前处理简单。

表 2 卡那霉素不同检测方法的比较

Table 2 Comparison of different detection methods for kanamycin

Method	Linear range	Limit of detection	Reference
Resonance rayleigh scattering (RRS) detection	20–300 $\mu\text{g/L}$	2.3 $\mu\text{g/L}$	[23]
Electrochemical aptasensor detection	10.0–150.0 $\mu\text{g/L}$	5.8×10^{-9} mol/L	[11]
Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-MS/MS	40–4000 $\mu\text{g/L}$	19.4 $\mu\text{g/L}$	[7]
Nanocomposite-based electrochemical detection	9.0×10^{-9} – 5.0×10^{-8} mol/L	$(9.4 \pm 0.4) \times 10^{-9}$ mol/L	[12]
Capillary electrophoresis detection	5×10^{-8} – 1×10^{-5} mol/L	8.9×10^{-9} mol/L	[13]
Based on fluorescent microsphere labeling detection	9.5–100 $\mu\text{g/L}$	5 $\mu\text{g/L}$	[19]
Based on fluorescence enhancement effect of quantum CdTe detection	0.2–20 mg/L	5 $\mu\text{g/L}$	[27]
Fluorescence detection	2.7×10^{-8} – 6.7×10^{-5} mol/L	8.95×10^{-9} – 2.56×10^{-8} mol/L	[28]
Protamine-aptamers-AuNPs-based aptasensor assay	5×10^{-9} – 5×10^{-6} mol/L (2.91–2910 $\mu\text{g/L}$)	0.53×10^{-9} mol/L (3.09 $\mu\text{g/L}$)	this work

3 结论

本文利用鱼精蛋白和核酸适配体以及金纳米粒子间的静电作用, 构建了一种新型生物纳米检测技术用于食品中卡那霉素的检测。结果表明, 在最佳反应条件(含 20 mmol/L Na^+ 和 1 mmol/L Mg^{2+} 的 10 mmol/L pH 7.4 HEPES 缓冲溶液、2 mg/L 鱼精蛋白、100 nmol/L 核酸适配体)下, 在 5 ~ 5 000 nmol/L 范围内, 卡那霉素与金纳米粒子吸光度比值呈现良好的线性关系 ($R^2 = 0.9928$) 检出限为 0.52 nmol/L。对牛奶中卡那霉素含量进行了检测, 回收率为 96%~98%, RSD 为 1.5%~3.2%。该方法选择性高, 灵敏度好, 线性范围广, 显示出其应用于食品中卡那霉素检测的优势。

参考文献:

- [1] Megoulas N C, Koupparis M A. *Anal Chim Acta*, 2005, 547: 64
- [2] Chen P Z, Lin X C, Ma C H, et al. *Journal of Instrumental Analysis*, 2008, 27 (12): 1367
陈培珍, 林旭聪, 马春花, 等. *分析测试学报*, 2008, 27 (12): 1367
- [3] Gutierrez-Huante M, Martinez H, Bustamante V H, et al. *Lett Appl Microbiol*, 2015, 60: 440
- [4] Kaufmann A, Butcher P, Maden K. *Anal Chim Acta*, 2012, 711: 46
- [5] Bogialli S, Cuini R, Di Corcia A, et al. *J Chromatogr A*, 2005, 1067: 93
- [6] Wei Q, Zhao Y F, Du B, et al. *Food Chem*, 2012, 134: 1601
- [7] Wang Y, Ji S, Zhang F, et al. *J Chromator A*, 2015, 1403: 32
- [8] Yan J L, Sun R D. *Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis*, 2002, 38 (9): 446
严金龙, 孙汝东. *理化检测-化学分册*, 2002, 38 (9): 446
- [9] Gong Q, Ding L, Zhu S H, et al. *Chinese Journal of Chromatography*, 2012, 30 (11): 1143
龚强, 丁利, 朱绍华, 等. *色谱*, 2012, 30 (11): 1143
- [10] Liu Z Z, Li W D, Wang J Q. *Capital Food and Medicine*, 2015 (4): 46
刘照振, 李文东, 王俊秋. *首都食品与医药*, 2015 (4): 46

- [11] Sun X, Li F L, Shen G H, et al. *Anal*, 2014, 139: 299
- [12] Zhu Y, Chandra P, Song K M, et al. *Biosens Bioelectron*, 2012, 36: 29
- [13] Ge S L, Tang W R, Han R B, et al. *J Chromatogr A*, 2013, 1295: 128
- [14] Zhang X Y, Cai X X. *Chinese Journal of Chromatography*, 2014, 32 (7): 693
张秀尧, 蔡欣欣. *色谱*, 2014, 32 (7): 693
- [15] Wang H, Zhao L, Yang H M, et al. *Chinese Journal of Chromatography*, 2015, 33 (9): 995
王浩, 赵丽, 杨红梅, 等. *色谱*, 2015, 33 (9): 995
- [16] Li W, Ai L F, Guo C H, et al. *Chinese Journal of Chromatography*, 2013, 31 (10): 946
李玮, 艾连峰, 郭春海, 等. *色谱*, 2013, 31 (10): 946
- [17] Wang Y, Zhao X Y, Shi D D, et al. *Chinese Journal of Chromatography*, 2016, 34 (4): 361
王勇, 赵新颖, 石冬冬, 等. *色谱*, 2016, 34 (4): 361
- [18] Robati R Y, Arab A, Ramezani M, et al. *Biosens Bioelectron*, 2016, 82: 162
- [19] Luo J B. [PhD Dissertation]. Wuxi: Jiangnan University, 2015
罗继宝. [博士学位论文]. 无锡: 江南大学, 2015
- [20] Chen X L, Zhang H, Liu B, et al. *Journal of Instrumental Analysis*, 2015, 33 (6): 709
陈效兰, 张慧, 刘冰, 等. *分析测试学报*, 2015, 33 (6): 709
- [21] Xu F, Zhou J, Wu Y, et al. *Scientia Agricultura Sinica*, 2015, 48 (21): 4358
徐飞, 周洁, 吴越, 等. *中国农业科学*, 2015, 48 (21): 4358
- [22] Fu X L, Chen L X, Li J H. *Analyst*, 2012, 137: 3653
- [23] Frens G. *Nat J Phy Sci*, 1973, 241: 20
- [24] Zhou N D, Zhang J, Tian Y P. *Anal Methods*, 2014, 6: 1569
- [25] Wang C K, Chen D, Lu F, et al. *Journal of Instrumental Analysis*, 2015, 34 (12): 1434
王承克, 陈丹, 陆峰, 等. *分析测试学报*, 2015, 34 (12): 1434
- [26] Wang S S. [PhD Dissertation]. Yantai: University of Chinese Academy of Sciences, 2016
王莎莎. [博士学位论文]. 烟台: 中国科学院大学, 2016
- [27] Mao Y Q, Hu M N, Li N, et al. *Journal of Analytical Science*, 2016, 32 (2): 253
毛永强, 胡美娜, 李娜, 等. *分析科学学报*, 2016, 32 (2): 253
- [28] Yu C Z, He G N, Xie H Y, et al. *J Chromatogr B*, 2009, 877: 333