

基于荧光微球的免疫层析法 快速检测黄曲霉毒素 B₁

程敏¹, 张凯义^{2,+}, 谭丽容¹, 夏骏³, 赖卫华^{2,*}

(1.无限极(中国)有限公司, 广东江门 529156;

2.南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西南昌 330047;

3.江西省兽药饲料监察所, 江西南昌 330047)

摘要:本研究采用荧光微球纳米粒子作为免疫标记物, 偶联黄曲霉毒素 B₁ 单克隆抗体制备纳米探针, 建立了决明子中黄曲霉毒素 B₁ 的荧光微球免疫层析定量检测方法。结果表明: 方法的线性范围为 0.1~2.0 ng/mL, 灵敏度为 0.034 ng/mL。该方法具有快速和简便等优点, 可满足现场快速定量筛查的需求。

关键词: 荧光微球, 免疫层析, 黄曲霉毒素 B₁, 决明子

Rapid Detection of AFB₁ by Immunochromatographic Assays based on Fluorescent Microspheres

CHENG Min¹, ZHANG Kai-yi^{2,+}, TAN Li-rong¹, XIA Jun³, LAI Wei-hua^{2,*}

(1.Infinitus(China) Company Limited, Jiangmen 529156, China;

2.State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

3.Jiangxi Institute of Veterinary Drug and Feedstuff Control, Nanchang 330047, China)

Abstract: In this study, fluorescent microsphere nanoparticles were used as immune label to develop fluorescent microspheres immunochromatographic quantitative assay for detection of aflatoxin B₁ in *Semen cassiae*. The results showed that the linear range and the sensitivity of the fluorescent microspheres immunochromatographic quantitative assay was 0.1~2.0 and 0.034 ng/mL, respectively. The detection methods had the advantages of rapidity and simplicity, could meet the rapid and quantitative need of the on-site screening process.

Key words: fluorescent microsphere; immunochromatographic assay; aflatoxin B₁; *Semen cassiae*

中图分类号: TS201

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2018)23-0272-05

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2018.23.047

引文格式: 程敏, 张凯义, 谭丽容, 等. 基于荧光微球的免疫层析法快速检测黄曲霉毒素 B₁ [J]. 食品工业科技, 2018, 39(23): 272-275, 281.

黄曲霉毒素 (Aflatoxins, AFs) 是黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 和寄生曲霉 (*Aspergillus parasiticus*) 的次级代谢产物, 以二呋喃环和香豆素为基本结构, 具有强烈的致癌性和毒性, 1993 年被世界卫生组织的癌症研究机构划定为 I 类致癌物, 其中黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 的致癌性和毒性最强, 主要危害人和动物的肝脏^[1]。目前, 玉米、小麦等粮食作物中的 AFB₁ 的污染已受到广泛的关注^[2], 并已制定相应的国家限量标准^[3-4]。同时决明子等药食同源的种子类作物受 AFB₁ 污染的情况也逐渐得到重视^[5], 很多国家制定了相应的限量标准。韩国决明子中 AFB₁

最高限量为 10 ng/g^[6], 意大利设定的最高限量则为 5 ng/g^[7]。因此, 针对决明子中 AFB₁ 快速检测方法的建立具有前瞻性和必要性。

目前, 传统的 AFB₁ 的检测方法主要有高效液相色谱法^[8-9] 和酶联免疫吸附法^[10-11] 等。这些方法的灵敏度高, 重现性好, 但样品的前处理比较复杂、耗时较长, 需要专业人员操作和特定的仪器设备, 不适合大批量样品的现场筛查。

免疫层析法是近年来迅速发展的一项快速检测技术, 具有简便、高效、成本低、污染小等特点, 非常适合于大批量样品的现场筛查^[12]。免疫层析法有多

收稿日期: 2018-04-23 + 并列第一作者

作者简介: 程敏 (1979-), 男, 本科, 中级工程师, 研究方向: 质量检测管理和中药材检测, E-mail: Min.Cheng@infinitus-int.com。

张凯义 (1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: 1308321418@qq.com。

* 通讯作者: 赖卫华 (1968-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: talktolaiwh@163.com。

基金项目: 江西省主要学科学术和技术带头人培养计划项目 (20113BCB22007); 江西省教育厅落地项目 (KJLD13009)。

种标记物可供选择,目前最常用的是胶体金纳米粒子(AuNP)^[13]和荧光微球纳米粒子(Fitc@PS)^[14]。胶体金纳米颗粒具有良好的稳定性,能够被长期保存,可以依靠肉眼对信号进行读取识别,达到可视化检测的目的^[15]。但荧光微球比胶体金具有更高的信号值,更宽的线性范围,更好的批间重复性^[16],适合于待检物的定量检测。

本研究以 Fitc@PS 制备免疫探针,旨在建立针对决明子中 AFB₁ 的定量免疫层析快速检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

荧光微球(激发波长为 470 nm,发射波长为 525 nm,Fitc@PS) 美国 Ocean Nanotech; AFB₁ 检测抗原(AFB₁-BSA)、AFB₁ 单克隆抗体 本实验室制备;羊抗鼠二抗 艾美捷科技有限公司;AFB₁ 标准品 北京索莱宝科技有限公司;脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准品、赭曲霉毒素 A 标准品、T2 毒素标准品、伏马毒素 B₁ 标准品、玉米赤霉烯酮标准品、牛血清白蛋白(BSA)和乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC) 美国 Sigma 公司;其它试剂 均为分析纯。

BG-12 C 超声仪 广州邦洁电子产品有限公司;HGS510 划膜喷金机、HGS-201 可编程切条机和荧光微球试纸条读取仪 杭州峰航科学仪器有限公司;TGL-16 型高速冷冻离心机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;硝酸纤维素膜(NC膜) 德国 Sartorius 公司;聚酯膜(滤纸)、样本垫、结合垫、吸水纸和 PVC 底板 上海金标生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 Fitc@PS 免疫探针及免疫层析试纸条的制备 用 0.2 mol/L 的 Na₂CO₃ 溶液或 1 mol/L 的 HCl 溶液调节 0.7 mL PB 缓冲液(0.01 mol/L) pH 至一定值,加入 12 μL 荧光微球(0.12 mg),混匀超声 2 min (600 W, 40 kHz) 后分别加入 100 μL EDC (0.05 mg/mL) 和一定浓度的 100 μL AFB₁ 单克隆抗体溶液,室温反应 30 min 后再加入 100 μL EDC (0.05 mg/mL),继续室温反应 30 min,加入 111 μL 10% (w/v) BSA 溶液及 100 μL EDC (0.1 mg/mL),封闭 120 min。4 °C、13500 r/min 离心 15 min,弃上清,以 200 μL 复溶液(0.01 mol/L PBS、5% 蔗糖、2% 果糖、1% PEG-20000、1% BSA、0.4% Tween-20) 重悬沉淀^[17]。

用 HGS510 划膜喷金机在 NC 膜上喷涂一定浓度的 AFB₁-BSA (0.74 μL/cm) 和羊抗鼠二抗 (0.9 mg/mL, 0.74 μL/cm), 分别作为检测线(T线)和质控线(C线),在结合垫上喷涂 Fitc@PS 免疫探针。将滤纸、样本垫、结合垫、NC 膜、吸水纸按顺序贴于 PVC 底板上,切成 3.9 mm 宽的试纸条。制备好的试纸条置于密封袋中,干燥阴凉条件下保存。

1.2.2 Fitc@PS 及 Fitc@PS-mAb 复合物的表征 通过扫描电镜(Scanning electron microscope, SEM)对 Fitc@PS 进行表征。通过粒度仪对 Fitc@PS 及 Fitc@PS-mAb 复合物进行动态光散射(Dynamic light scattering, DLS)分析,表征 AFB₁ 抗体是否成功

标记于 Fitc@PS 上。

1.2.3 抑制率的测定 采用荧光微球试纸条读取仪分别读取荧光微球试纸条上 T 线和 C 线的荧光信号值,计算抑制率。抑制率 = 1 - B_x/B₀, B_x 为阳性样本 T 线和 C 线信号强度的比值, B₀ 为阴性样本 T 线和 C 线信号强度的比值。

1.2.4 荧光微球试纸条的单因素实验

1.2.4.1 标记 pH 的选择 将 PB 缓冲液的 pH 分别调整为 5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0,在此条件下将 Fitc@PS 与 60 μg/mg 的 AFB₁ 单克隆抗体进行偶联,制备 Fitc@PS 免疫探针。通过荧光微球试纸条(T线上 AFB₁-BSA 的浓度为 0.8 mg/mL) 读取 T 线和 C 线的荧光信号值,根据抑制率,比较五个不同标记 pH 下,Fitc@PS 与 AFB₁ 单克隆抗体的偶联结果。

1.2.4.2 抗体标记量的选择 在最佳标记 pH 下,分别选取 30、40、50、60 和 70 μg/mg 五个抗体标记量进行 Fitc@PS 免疫探针的制备。比较不同抗体标记量下,检测线(T线)信号强度和质控线(C线)信号强度的比值(T/C 值)和抑制率的结果。

1.2.4.3 AFB₁-BSA 浓度的选择 在最佳标记 pH 以及最佳抗体标记量下,分别将 0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mg/mL 的 AFB₁-BSA 喷在 NC 膜上作为检测抗原。比较不同 AFB₁-BSA 浓度下, T/C 值和抑制率的结果。

1.2.5 免疫层析试纸条的检测步骤 将决明子样本粉碎,过 18 目筛,准确称取 1 g,用纯甲醇进行提取,振荡 3 min, 4 °C、4000 r/min 离心 10 min,取上清,用 0.01 mol/L PBS 溶液(pH 7.4) 稀释到甲醇终浓度为 20%,取 100 μL 试样滴加于试纸条样本垫上。

如图 1 所示,反应 20 min 后,荧光微球免疫层析试纸条经荧光微球试纸条读取仪读取 T/C 值,通过所建立的标准曲线来进行定量检测。

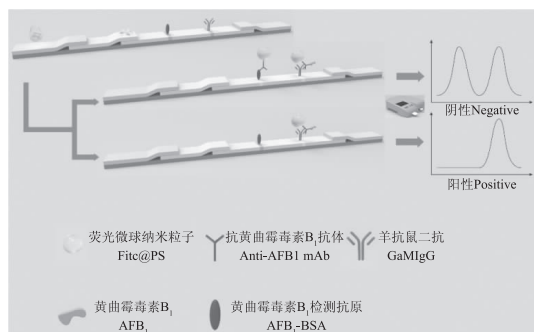


图 1 黄曲霉毒素 B₁ 免疫层析试纸条检测原理图

Fig.1 Schematic diagram of lateral flow strip for the detection of AFB₁

1.2.6 荧光微球免疫层析试纸条的评价

1.2.6.1 灵敏度评价 以 AFB₁ 浓度为 X 轴, B_x/B₀ 为 Y 轴绘制荧光免疫层析方法标准曲线。在经 UPLC 确证为阴性样本的决明子提取液(提取方法同 1.2.5) 中加标: 0、0.01、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0 ng/mL, 每个浓度梯度进行三组平行实验,灵敏度通过阴性样本的平均值减三倍的标准偏差计算^[18]。

1.2.6.2 特异性评价 PBS 缓冲液中分别加入黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON)、赭曲霉毒素 A (OTA)、T2 毒素、伏马毒素 B₁ (FB₁) 和玉米赤霉烯酮 (ZEN), 配制标准品溶液, 其中 AFB₁ 标准品溶液浓度为 1 ng/mL, 其它标准品溶液浓度均为 100 ng/mL。用本实验所建立的免疫层析检测方法进行检测, 每个条件重复三次。

1.2.6.3 准确度验证 参照本方法的线性范围, 阴性决明子样本加标 0、1、2.5、5、10 ng/g 后, 用本实验所建立的免疫层析方法进行检测, 并将结果与 UPLC 方法的检测结果进行比较, 评价本实验所建立检测方法的准确度。

2 结果与分析

2.1 Fitc@PS 及 Fitc@PS-mAb 复合物表征

扫描电镜图像显示 Fitc@PS 粒径均一, 分散均匀, 平均直径为 340 nm (图 2)。Fitc@PS-mAb 复合物中的抗体是通过氨基与 Fitc@PS 微球表面经 EDC 活化的羧基作用实现偶联的。动态光散射结果显示 (图 3), Fitc@PS 的平均水化粒径为 302 nm, 而标记抗体后平均水化粒径增大至 324 nm, 表明 AFB₁ 单克隆抗体成功与 Fitc@PS 偶联。

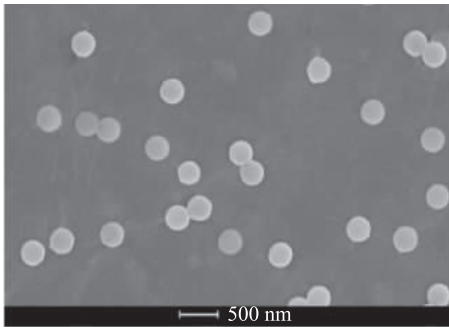


图 2 Fitc@PS 扫描电镜图像
Fig.2 SEM images of Fitc@PS

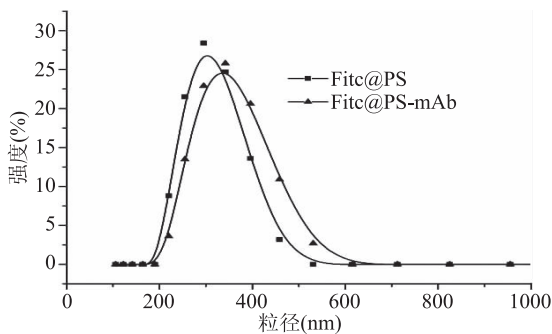


图 3 Fitc@PS 及 Fitc@PS-mAb 复合物的动态光散射分析
Fig.3 DLS analysis of Fitc@PS and Fitc@PS-mAb complex

2.2 免疫层析试纸条的优化

2.2.1 标记 pH 的优化 在不同的 pH (5.0、6.0、7.0、8.0、9.0) 下, 抗体的活性及抗体与标记物的结合效率不同^[19]。如图 4A, 在 Fitc@PS 标记抗体中, 不同 pH 下, 阴性 T 线荧光信号值差异显著 ($p < 0.05$)。当 pH 为 7 时, T 线阴性信号值最大, 因此最佳 pH 为 7。

2.2.2 抗体标记量的优化 在最佳标记 pH 下, 研究了抗体标记量对免疫层析的影响。如图 4B, 在

Fitc@PS 免疫层析系统中, 不同抗体标记量下, 阴性 T/C 值差异显著 ($p < 0.05$)。当抗体标记量为 60 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 时, 阴性 T/C 最大, 因此最佳抗体标记量为 60 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。

2.2.3 AFB₁-BSA 浓度的优化 如图 4C, 在 Fitc@PS 免疫层析系统中, 在不同 AFB₁-BSA 浓度下, 阴性 T/C 值在四个水平的 AFB₁-BSA 浓度间 (0.6、0.8、1.0 和 1.2 mg/mL) 差异显著 ($p < 0.05$)。当 AFB₁-BSA 浓度为 0.8 mg/mL 时有合适的 T/C 值 (T/C 值为 1.78, T/C 值过高会导致高的 CV 值, T/C 值过低会导致线性范围变窄), 因此最佳检测抗原浓度为 0.8 mg/mL。

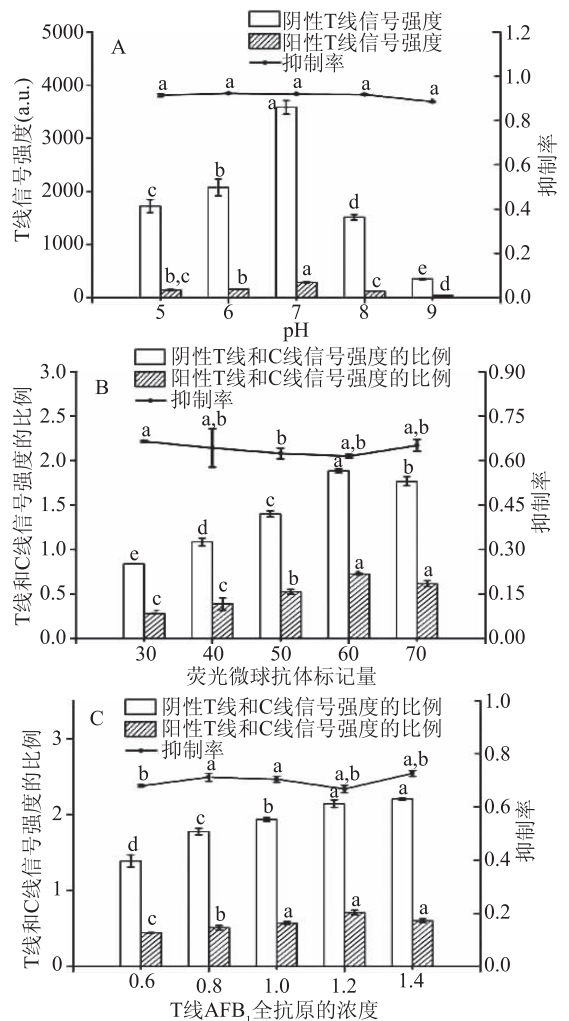


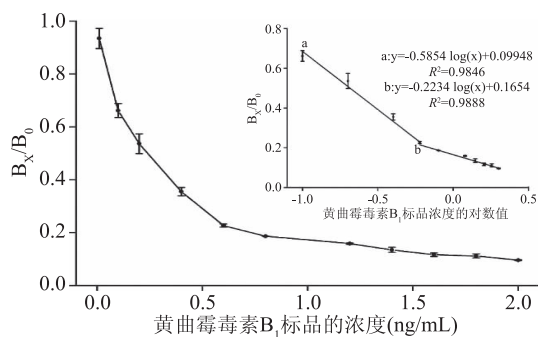
图 4 荧光微球免疫层析试纸条的单因素实验

Fig.4 Single factor experiment of fluorescent microsphere lateral flow strip

注: 图中不同小写字母表示在 $p < 0.05$ 水平上差异显著。

2.3 免疫层析试纸条的评价

2.3.1 灵敏度评价 标准曲线如图 5 所示, 通过线性拟合得到标准曲线及相应的线性范围, a 为低浓度曲线, 线性范围为 0.1~0.6 ng/mL, 线性方程为 $y = -0.5854 \log(x) + 0.09948$, $R^2 = 0.9846$; b 为高浓度曲线, 线性范围为 0.6~2.0 ng/mL, 线性方程为 $y = -0.2234 \log(x) + 0.1654$, $R^2 = 0.9888$ 。其中, x 为溶液中的 AFB₁ 浓度, y 为 B_x/B_0 值, 灵敏度为 0.034 ng/mL。

图5 AFB₁ 荧光微球免疫层析试纸条标准曲线Fig.5 Calibration curve of the fluorescence microsphere lateral flow strip to quantitatively detect AFB₁

注:a:低浓度标曲;b:高浓度标曲。

2.3.2 特异性评价 特异性结果显示,Fitc@PS 免疫层析试纸条有很好的特异性。如图6,只有在 AFB₁ 的加标检测中产生了明显的抑制。其中, B_x 为加标样本 T 线和 C 线的信号强度比值, B_0 为阴性缓冲液 T 线和 C 线的信号强度比值。

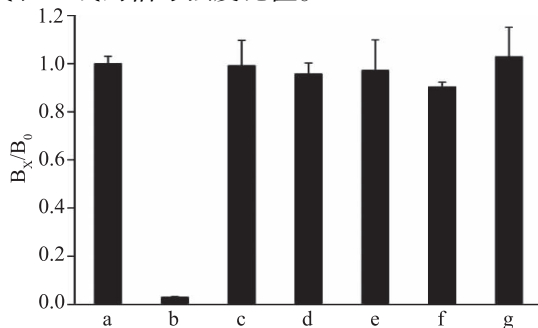


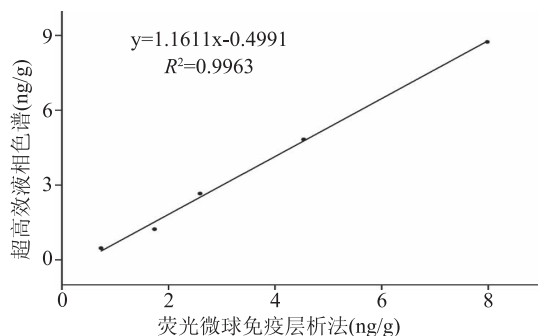
图6 免疫层析试纸条特异性

Fig.6 Specificity of the lateral flow strip

注:a:阴性;b:黄曲霉毒素 B₁;c:脱氧雪腐镰刀菌烯醇;

d:赭曲霉毒素 A;e:T₂ 毒素;f:伏马毒素 B₁;g:玉米赤霉烯酮。

2.3.3 准确度评价 将荧光微球免疫层析法对加标决明子样本的检测方法与 UPLC 的检测方法绘制线性相关曲线,结果显示,两种方法检测结果的相关性很好(图7), R^2 为 0.9963。因此本文所建立的荧光微球免疫层析法检测结果准确可靠。

图7 荧光微球免疫层析试纸条与 UPLC 检测决明子中 AFB₁ 结果相关性Fig.7 Correlation of AFB₁ assay between the fluorescence microsphere lateral flow strip and UPLC method in Semen cassiae samples

3 结论

本研究以 Fitc@PS 为标记物,成功建立了针对决明子基质中 AFB₁ 的荧光微球免疫层析试纸条定量检测方法。方法灵敏度为 0.034 ng/mL,具有良好的特异性,且与 UPLC 的检测结果一致,可以满足现场大批量决明子样本中 AFB₁ 快速、准确和定量检测的需求。

参考文献

- [1] Xu W, Xiong Y H, Lai W H, et al. A homogeneous immunosensor for AFB₁ detection based on FRET between different-sized quantum dots [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2014, 56 (12): 144-150.
- [2] 马海华,孙辉舟,甄形,等.我国国家标准和行业标准中黄曲霉毒素测定方法综述[J].食品工业科技,2016,37(6):360-366.
- [3] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.GB 2761-2017 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量[S].北京:中国标准出版社,2017.
- [4] Zhao M M, Wang P L, Guo Y J, et al. Detection of aflatoxin B₁ in food samples based on target-responsive aptamer-cross-linked hydrogel using a handheld pH meter as readout [J]. Talanta, 2018, 176: 34-39.
- [5] Chen A J, Jiao X L, Hu Y J, et al. Mycobiota and mycotoxins in traditional medicinal seeds from china [J]. Toxins, 2015, 7 (10): 3858-3875.
- [6] Lee S D, Yu I S, Jung K, et al. Incidence and level of aflatoxins contamination in medicinal plants in Korea [J]. Mycobiology, 2014, 42 (4): 339-345.
- [7] Bennett J W, Klich M. Mycotoxins [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2003, 16 (3): 497-516.
- [8] Golge O, Hepsag F, Kabak B. Determination of aflatoxins in walnut sujuk and Turkish delight by HPLC-FLD method [J]. Food Control, 2016, 59: 731-736.
- [9] Irakli M N, Skendi A, Papageorgiou M D. HPLC-DAD-FLD method for simultaneous determination of mycotoxins in wheat bran [J]. Journal of Chromatographic Science, 2017, 55 (7): 690-696.
- [10] Xiong Y, Pei K, Wu Y Q, et al. Colorimetric ELISA based on glucose oxidase-regulated the color of acide-base indicator for sensitive detection of aflatoxin B₁ in corn samples [J]. Food Control, 2017, 78: 317-323.
- [11] Sun L L, Zhao Q. Competitive horseradish peroxidase-linked aptamer assay for sensitive detection of aflatoxin B₁ [J]. Talanta, 2018, 179: 344-349.
- [12] Wu C H, Liu D F, Peng T, et al. Development of a one-step immunochromatographic assay with two cutoff values of aflatoxin M1 [J]. Food Control, 2016, 63: 11-14.
- [13] 杜碧柏,刘庆菊,周影,等.不同标记物质在黄曲霉毒素快速检测中的应用[J].食品安全质量检测学报,2015,6(9):3505-3516.
- [14] 汤轶伟,张宏,崔芷萌,等.荧光标记免疫层析技术在食

(下转第 281 页)

聚糖,对于低分子量(≤ 100000)壳聚糖脱乙酰度的测定建议采用紫外光谱法,而高粘度($\geq 400 \text{ mPa}\cdot\text{s}$)壳聚糖脱乙酰度的测定可采用线性电位滴定法。

参考文献

- [1] Khalifa I, Barakat H, El-Mansy H A, et al. Enhancing the keeping quality of fresh strawberry using chitosan-incorporated olive processing wastes [J]. Food Bioscience, 2016, 13 (1): 69-75.
- [2] Higuera L, López-Carballo G, Gavara R, et al. Reversible covalent immobilization of cinnamaldehyde on chitosan films via Schiff base formation and their application in active food packaging [J]. Food and Bioprocess Technology, 2015, 8 (3): 526-538.
- [3] 李海浪. 壳聚糖衍生物的制备及其在药物载体中的应用研究[D]. 中国科学院研究生院(上海应用物理研究所), 2014.
- [4] Guo A, Wang F, Lin W, et al. Evaluation of antibacterial activity of N-phosphonium chitosan as a novel polymeric antibacterial agent [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 67(3): 163-171.
- [5] 胡剑灿, 肖敏, 李改利. 纤维素/壳聚糖复合吸附剂的制备及其对重金属离子吸附的研究[J]. 山东化工, 2016, 45(14): 150-152, 154.
- [6] 杨怀宇, 武婷茹, 刘俊希, 等. 甲壳素-壳聚糖的生理功能及应用研究进展[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(18): 24-25.
- [7] 胡荣康, 吴林秀, 陈明军, 等. 不同分子量壳聚糖的制备及其应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2017, 38(15): 324-328, 334.
- [8] 蒋元勋, 李海鹰, 杨文智, 等. 壳聚糖脱乙酰度测定方法的总结与比较[J]. 应用化工, 2011, 40(10): 1837-1841.
- [9] 纪建华. 直接测定壳聚糖脱乙酰度分析方法的比较[J]. 当代化工, 2016, 45(12): 2727-2729.
- [10] 李海鹰, 蒋元勋, 杨文智, 等. 紫外测定壳聚糖脱乙酰度

(上接第 275 页)

- 品安全检测中的应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2018(2): 314-319.
- [15] 马小明, 孙密, 林悦, 等. 基于金纳米材料的可视化生物传感器的研究进展[J]. 分析化学, 2018, 46(1): 1-10.
- [16] Luo K, Hu L M, Guo Q, et al. Comparison of 4 label-based immunochromatographic assays for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in milk [J]. Journal of Dairy Science, 2017, 100: 1-12.
- [17] Shen J, Zhou Y F, Fu F, et al. Immunochromatographic assay for quantitative and sensitive detection of hepatitis B virus surface

方法的探讨[J]. 应用化工, 2012, 41(4): 705-707.

- [11] 纪建华. 不同方法测定壳聚糖脱乙酰度的比较[J]. 化学工程师, 2016, 30(11): 23-25, 11.
- [12] 赵颖, 杨琰, 卢实, 等. 壳聚糖脱乙酰度两种测定方法的比较[J]. 武汉工业学院学报, 2009, 28(2): 15-17.
- [13] 马其坤. 壳聚糖脱乙酰度测定方法研究新进展[J]. 应用化工, 2016, 45(9): 1756-1759.
- [14] Z M dos Santos, A L P F Caroni, M R Pereira, et al. Fonseca. Determination of deacetylation degree of chitosan: A comparison between conductometric titration and CHN elemental analysis [J]. Carbohydrate Research, 2009, 344(18): 2591-2595.
- [15] 王超, 潘家保, 焦世宁, 等. 双指示剂法测定壳聚糖的脱乙酰度[J]. 理化检验: 化学分册, 2014, 50(7): 892-894.
- [16] 邹思辉, 余晓红, 张宏亮, 等. 碱量法测定壳聚糖脱乙酰度通用指示剂的研究[J]. 食品科技, 2009, 34(4): 262-265, 275.
- [17] 贾之慎, 李奇彪. 双突跃电位滴定法测定壳聚糖脱乙酰度[J]. 化学世界, 2001(5): 240-241, 253.
- [18] 况伟, 刘志伟. 线性电位滴定法测定壳聚糖的脱乙酰度[J]. 广州化工, 2006, 34(2): 49-51.
- [19] 王伟. 可溶性甲壳素制取及其稀溶液性质的研究[D]. 中国科学院长春应用化学研究所, 1989.
- [20] 杜上鉴, 路彦, 岳淑媛, 等. 紫外光谱法测定甲壳素的脱乙酰化值[J]. 应用化学, 1994, 11(2): 108-109.
- [21] 孔祥平. 红外光谱法测定壳聚糖脱乙酰度[J]. 应用化工, 2012, 41(8): 1458-1461.
- [22] 马家骅, 谭承佳, 邓霞, 等. 蛻螂药渣中壳聚糖的回收与初步表征[J]. 中药材, 2012, 35(7): 1029-1032.
- [23] Wang C, Yuan F, Jin L, et al. Evaluation of the deacetylation degree of chitosan with two-abrupt-change coulometric titration [J]. Electroanalysis, 2016, 28(2): 401-406.
- [24] 祝小静. 壳聚糖脱乙酰度测定方法的探讨[D]. 保定: 河北大学, 2010.

antigen using highly luminescent quantum dot-beads [J]. Talanta, 2015, 142: 145-149.

- [18] Anfossi L, Baggiani C, Giovannoli C, et al. Optimization of a lateral flow immunoassay for the ultrasensitive detection of aflatoxin M1 in milk [J]. Analytica Chimica Acta, 2013, 772: 75-80.
- [19] Chen Y, Xin Y, Yang H L, et al. Immobilization and stabilization of cholesterol oxidase on modified sepharose particles [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 56(5): 6-13.

权威·核心·领先·实用·全面