

荧光探针对植物组织乙烯释放的监测及在白熟期番茄中的应用

杨倩, 屠鹏, 郝振芳, 崔彦君, 边红霞

(甘肃农业大学理学院, 兰州 730070)

摘要 以酪蛋白为载体, 将第一代 Grubbs 催化剂与 6-甲氧基-2-萘乙烯相结合的荧光探针(P3)包覆在蛋白疏水袋中制成水溶性荧光探针(C-E-P). 对 P3 的性能测试表明, 其对乙烯表现出良好的线性关系、快速的响应时间和高选择性. 将 P3 包覆于酪蛋白制成的水溶性探针 C-E-P 能够实现对苹果、苦水玫瑰和芦荟组织乙烯释放的荧光成像, 并可用于白熟期番茄成熟过程中组织的乙烯变化监测, 发现种子的乙烯释放峰值先于果皮出现. 本文开发的 C-E-P 探针能够有效捕捉植物组织中乙烯的释放信息, 为农业生产中果实成熟和植物健康监测提供了一种有效的工具.

关键词 植物组织荧光成像; 乙烯; 荧光探针; 酪蛋白

中图分类号 O657.3; O644

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20240517

Monitoring of Ethylene Release from Plant Tissues by Fluorescent Probe and Application in White Ripe Tomato

YANG Qian, TU Peng, HAO Zhenfang, CUI Yanjun, BIAN Hongxia*

(College of Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract The quantification of ethylene can be achieved through the change of fluorescence signal, but there are few reports about the real-time monitoring of ethylene levels in plant tissues. Developing environmentally friendly and biocompatible chemical-based fluorescent probes is one of the ways to achieve plant tissue imaging. This article uses casein as a carrier to create a water-soluble fluorescent probe (C-E-P) by encapsulating a fluorescent probe (P3) that combines the first-generation Grubbs catalyst with 6-methoxy-2-naphthylene in a hydrophobic pocket. The synthesis of probe P3 was confirmed through various structural characterization methods. Performance tests demonstrated that P3 exhibited a strong linear relationship with ethylene, rapid reaction time, and high selectivity. The C-E-P, created by encapsulating P3 with casein, facilitated fluorescence imaging of ethylene release from apple, bitter water rose, and aloe tissues. This approach allowed for observing changes in ethylene release between different plant tissues over time. Additionally, it was employed to monitor ethylene variations in the tissues of white ripe tomatoes during ripening, revealing that the peak ethylene release from the seeds occurs before that from the pericarp. The C-E-P developed in this study can effectively capture ethylene release information in plant tissues, providing an effective tool for fruit ripening and plant health monitoring in agricultural production.

Keywords Plant tissue fluorescence imaging; Ethylene; Fluorescent probe; Casein

乙烯(C₂H₄)是五大植物激素之一, 在调节植物生长、免疫、促进发育和果实成熟等方面发挥着关键作用^[1-4]. 作为分子量最小的气态烯烃, 乙烯能够在植物生理条件下自由扩散于膜之间, 给开发适宜

收稿日期: 2024-11-22. 网络首发日期: 2025-01-18.

联系人简介: 边红霞, 女, 博士, 教授, 主要从事生物质材料的开发与应用方面的研究. E-mail: bhxia790311@gsau.edu.cn

基金项目: 甘肃省自然科学基金(批准号: 22JR5RA866)资助.

Supported by Gansu Provincial Natural Science Foundation, China (No.22JR5RA866).

的乙烯检测方法带来挑战。目前,植物中乙烯的测定主要依赖于气相色谱法、电化学传感器和光声光谱法等分析技术^[5-11]。然而,这些方法通常操作复杂或受限于仪器条件,限制了其在实验室之外的应用。化学基探针检测作为一种新兴技术,正逐渐引起研究者的关注,尤其是利用荧光信号变化进行检测的荧光探针技术。

在乙烯的荧光探针检测方面, Burstyn 等^[12]研发了一种浸渍银离子的乙烯基苯酮聚合物薄膜,当乙烯与浸渍的银离子配位时,导致光致发光成比例降低。Kodera 等^[13]设计构建了银-蒽配合物体系,当该配合物暴露于乙烯时,由金属-芳烃结构转变为金属-乙烯,进而引起蒽的荧光变化。随后, Nguyen 等^[14]报道了一种利用末端硫醇基修饰的聚二乙炔薄膜传感器,当接触乙烯时,薄膜由蓝色变为红色,检出限达到 0.6 $\mu\text{L/mL}$ 。这些方法为乙烯的荧光检测提供了新的思路,研究者期望进一步提高乙烯荧光检测的灵敏度,并逐步实现其在生物系统中的应用。基于金属催化剂作用的烯烃复分解反应可将烯烃中的碳-碳双键切断并重组成为新的分子;含有末端烯烃的小分子荧光团具有良好的稳定性和高荧光产率等优势^[15]。结合上述原理及优势, Huang 等^[16]制备了小分子荧光团 1-乙烯基芘标记的第一代 Grubbs 催化剂,作为荧光探针用于乙烯检测。Tu 等^[17]在此基础上,采用分子量更小的荧光团对第一代 Grubbs 催化剂进行标记,制成了新型探针。这两种探针均展现出较低的检出限,并可应用于监测水果成熟过程中乙烯的释放。

目前使用的乙烯荧光探针面临诸多挑战。一方面,由于金属催化剂在水中的溶解性较差,这些探针严重依赖于有机溶剂;另一方面,金属配合物在水基植物样品中容易聚集,导致其反应性降低^[18],从而无法直接在植物组织中检测乙烯。此外,植物中的高浓度谷胱甘肽也会导致金属的失活^[19]。因此,设计或采用赋予金属络合物催化剂生物相容性的策略,成为实现植物组织生物成像的必然选择。将非生物金属复合物与蛋白质结合后,可以提高其在水中的溶解性。蛋白质分子中的疏水结合袋及其在生理 pH 下的表面负电性,能够阻止带电代谢物进入疏水结合袋,从而减少谷胱甘肽对金属催化剂的失活影响,保持其良好的催化活性。如, Vong 等^[18]利用人血清白蛋白与乙烯探针 RuQ 结合改性,获得了可用于检测果实和叶片中乙烯生物合成变化的水溶性探针。Niu 等^[20]则使用牛血清白蛋白作为载体,将探针负载其中并成功应用于植物组织的荧光成像。然而,血清蛋白的提取工艺较为复杂,涉及纯化等多个步骤,导致其成本相对较高。因此,寻找成本低廉的替代方法具有重要意义。酪蛋白作为一种蛋白分子,内部含有多个疏水性氨基酸残基,这些残基通过疏水作用相互吸引形成疏水袋,具备类似于血清蛋白的功能。因此,本文尝试将酪蛋白作为探针载体,以期在经济层面上降低成本。目前尚未见到将酪蛋白用作基于烯烃复分解反应的乙烯荧光探针载体的相关报道。

在众多含有末端烯烃的小分子荧光团中, 6-甲氧基-2-萘乙烯(III)不仅具有末端烯烃结构,还在萘环对位上包含一个甲氧基。甲氧基作为强供电子基团,与荧光团形成共轭体系,增强了分子内的电荷转移效应,从而提高了其荧光强度。本文将荧光团 III 与第一代 Grubbs 催化剂结合,合成了荧光探针 P3,并检测其对乙烯的响应性能。同时,为了监测植物组织中乙烯的释放,将 P3 包裹在酪蛋白疏水袋中,制备了水溶性乙烯荧光探针(C-E-P)。对苹果、苦水玫瑰和芦荟的组织进行了乙烯释放监测,并将其应用于白熟期番茄组织的乙烯释放监测。需要说明的是,酪蛋白中所含的相关氨基酸在约 280 nm 的激发光下会发光^[21],而 C-E-P 的激发波长在 400 nm 以上,因此酪蛋白内的氨基酸荧光不会影响 C-E-P 的成像效果。

图 1 示出了 C-E-P 探针的设计思路及其应用检测。通常,当金属催化剂与荧光团的端基双键结合

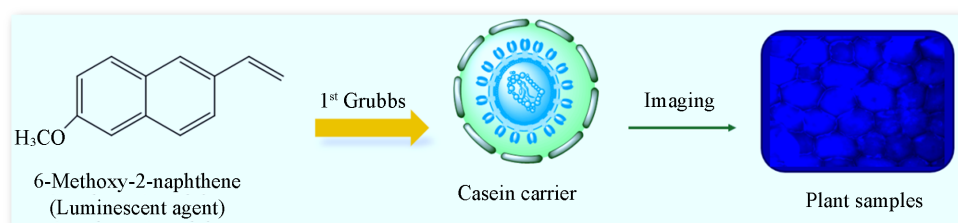


Fig. 1 C-E-P design and application detection routes

时,连接的重金属原子会破坏荧光团分子内的电荷转移机制,从而导致探针呈现低背景荧光.在乙烯存在的情况下,荧光团与乙烯发生烯炔复分解反应,释放出荧光团,从而使探针表现出可测量的荧光变化.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

6-甲氧基-2-萘乙烯(III)(纯度 $\geq 97\%$)、1-氨基环丙烷羧酸(ACC,纯度98%)和吡嗪-2-酰胺(PZA,纯度98%)均购自上海毕得医药科技股份有限公司;二氯甲烷(分析纯)购自利安隆博华医药化学有限公司;第一代Grubbs催化剂(纯度 $\geq 98\%$)购自江苏艾康生物医药研发有限公司;酪蛋白和1,4-二氧六环(分析纯)购自麦克林试剂公司;无水磷酸氢二钠和磷酸二氢钾均为分析纯,购自天津市光复科技发展有限公司;苹果、芦荟、苦水玫瑰以及处于白熟期的番茄均购自当地市场.

F-380型荧光分光光度计,天津港东科技发展股份有限公司;LGJ-12型真空冷冻干燥机,北京松源华兴科技有限公司;RVL-100-G型正倒置一体荧光显微镜,美国ECHO公司.

1.2 实验过程

1.2.1 探针的制备 将第一代Grubbs催化剂(164.5 mg, 0.2 mmol)加入50 mL CH_2Cl_2 中,待固体溶解后加入0.4 mmol荧光团;室温下搅拌40 min,然后通过旋转蒸发除去溶剂.用3 mL丙酮洗涤所得固体3次,真空干燥6 h,得到探针P3.

1.2.2 水溶性探针的制备 参照文献[20]方法,将酪蛋白(10 mL, 60 $\mu\text{mol/L}$)、探针P3(10 mL, 50 $\mu\text{mol/L}$)、1,4-二氧六环(15%, 80 mL)和PBS缓冲溶液(pH=7.2, 100 mL)混合均匀后,转移至37 $^\circ\text{C}$ 恒温箱中培养3 h,结束后将混合液冷冻干燥,得到水溶性探针C-E-P.

1.2.3 P3的性能测试 以二氯甲烷为溶剂配制150 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的P3溶液.将3 mL P3溶液转移至7 mL玻璃瓶中,缓慢注入不同体积的乙烯气体(5, 10, 20, 30, 40, 50和100 μL).采用荧光分光光度计测量P3溶液的荧光强度,激发波长设定为365 nm,测量波长范围为380~600 nm.每组实验均平行测定3次.

1.2.4 生物组织乙烯释放成像 植物组织处理:将苹果、玫瑰花瓣和芦荟外皮分别切成1 mm \times 1 mm的片状.首先,进行去除应力损伤处理,将植物组织置于去离子水中,于室温下浸泡过夜.随后,将处理后的组织分别加入ACC, PZA和 H_2O 中进行培养,最后转移至22.6 mmol/L的C-E-P溶液中,并在荧光显微镜下观察组织荧光.

白熟期番茄组织处理:使用镊子小心撕下白熟期番茄的外果皮,并剥出内腔中的种子.所得组织经去除应力损伤处理后,转移至22.6 mmol/L的C-E-P溶液中培养,并观察组织荧光.

2 结果与讨论

2.1 P3的结构表征

利用核磁共振波谱、红外光谱和高分辨质谱对P3进行了结构表征,结果分别如图S1~S3所示(见本文支持信息).其中,P3的核磁共振氢谱峰及红外光谱图中,3580 cm^{-1} 处的峰消失,2926和2846 cm^{-1} 处出现—CH的伸缩振动峰,说明Grubbs催化剂与荧光团III已结合.高分辨质谱进一步佐证了核磁共振氢谱和红外光谱表征结果,表明探针P3已经合成.

2.2 P3的荧光性能

图2(A)~(D)分别示出了P3的荧光光谱、对乙烯气体浓度的响应、时间响应及选择性.从图2(A)可以看出,荧光团III在未与催化剂结合之前呈现亮蓝色,而与催化剂结合后荧光强度明显减弱.当乙烯存在时,探针与乙烯发生烯炔复分解反应,重新释放荧光团,此时在365 nm波长光激发下呈现出明亮的蓝色,且反应后的荧光强度高于荧光团III.图2(B)显示P3对乙烯气体浓度具有良好的线性响应,通过LOD($3\sigma/S$)公式计算得出,P3对乙烯的检出限为0.625 $\mu\text{L/mL}$.在约400 s时,响应达到稳定,此后

荧光强度基本保持不变. 从图2(D)可以看出, 在众多检测物中, 只有在目标物为乙烯时, P3才表现出较强的荧光, 这表明P3对乙烯具有良好的选择性. 为进一步验证P3的实际应用潜力, 将从市场购买的新鲜苹果和芒果贮藏于密闭容器, 定期从容器顶部抽取定量气体并注入探针溶液, 记录P3的响应变化. 对于相对耐贮藏的苹果, 其乙烯释放量呈逐渐上升的趋势; 而对于不耐贮藏的芒果, 在贮藏期间出现了一个特殊的转折点: 乙烯释放量在上升趋势中突然下降, 随后迅速回升, 最终又稳定下降(图3). 针对这一特定现象, 可以考虑为果实的呼吸跃变期. 果实呼吸跃变期是指果实成熟到一定程度时, 呼吸速率首先降低, 然后突然升高, 之后又下降的现象, 通常标志着果实从生长阶段向衰老阶段的转变. 这也表明P3对内源性和外源性乙烯均表现出良好的响应性.

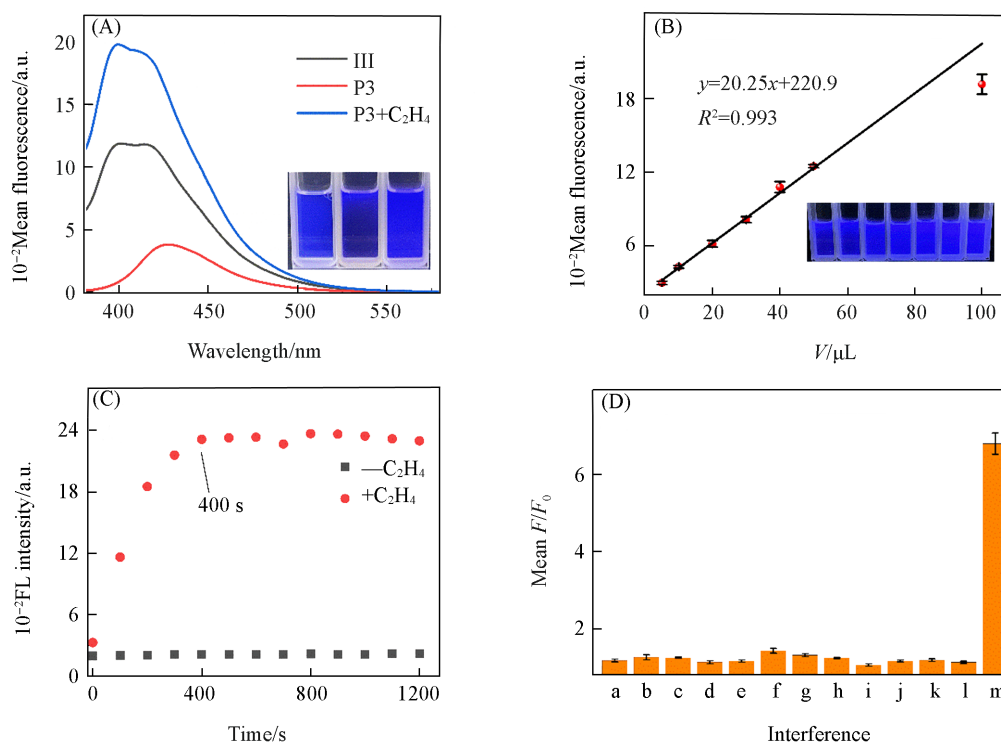


Fig. 2 Performance of P3: fluorescence spectra(A), response concentration to ethylene(B), response time(C), and selectivity(D)

(D) a. Ethyl acetate, b. ethanol, c. isopropanol, d. toluene, e. butyl 5-butyrate, f. methanol, g. geranyl, h. hydrogen sulfide, i. sulfur dioxide, j. 10 ammonia, k. acetone, l. nitrogen dioxide, m. ethylene.

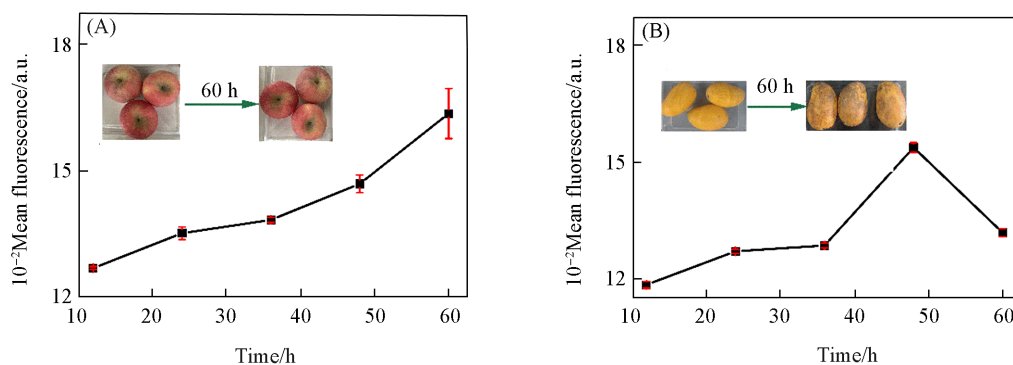


Fig. 3 Response of P3 to the storage period of apple(A) and mango(B)

2.3 C-E-P的稳定性和工作曲线响应

为了探讨C-E-P的稳定性, 首先测量了C-E-P空白溶液的荧光强度. 随后, 将该溶液置于365 nm紫

外灯下照射约 30 min, 再次测量其荧光强度, 以评估其稳定性. 如图 4(A) 所示, 在紫外灯照射前后溶液的荧光强度略有减少, 但变化幅度较小, 表明探针溶液具有较好的稳定性. 此外, 建立了 C-E-P 溶液测量气体的工作曲线[图 4(B)], 可见该曲线表现出良好的线性相关性, 通过公式 $LOD(3\sigma/S)$ 确定其检出限为 $0.7008 \mu\text{L/mL}$.

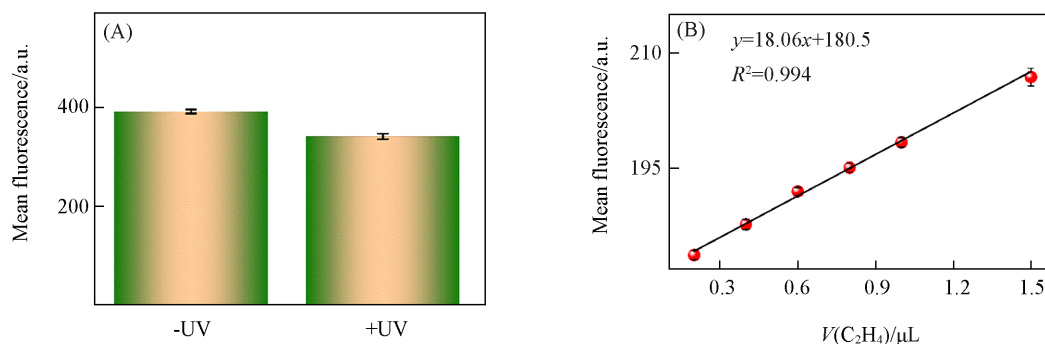


Fig. 4 Stability of C-E-P(A) and linear curve(B)

2.4 C-E-P 对不同植物组织乙烯释放的响应

P3 对乙烯具有良好的响应, 但有机溶剂的使用限制了其在植物组织成像中的应用. 将 P3 负载于酪蛋白制成的 C-E-P 探针可以显著提高其水溶性, 从而能够用于探究植物组织中的乙烯释放. 图 5 示出了 C-E-P 在不同添加剂中对苹果果肉、玫瑰花瓣以及芦荟外皮组织的荧光成像. 可见, 置于 ACC 溶液中的植物组织荧光强度最强, 其次是作为对照组的去离子水, 而置于 PZA 溶液中的组织则表现出最低的荧光强度. ACC 是乙烯合成的直接前体物质. 在乙烯合成过程中, S-腺苷蛋氨酸通过 ACC 合成酶催化转化为 ACC, 随后 ACC 被 ACC 氧化酶催化转变为乙烯. 因此, 添加 ACC 将增加植物的乙烯产量. 相对而言, PZA 是一种已知的 ACC 氧化酶抑制剂, 添加 PZA 会降低植物的乙烯产量. 这表明利用与酪蛋白结合的荧光探针能够对不同植物组织实现荧光成像, 并有效显示同一植物组织中乙烯含量的差异.

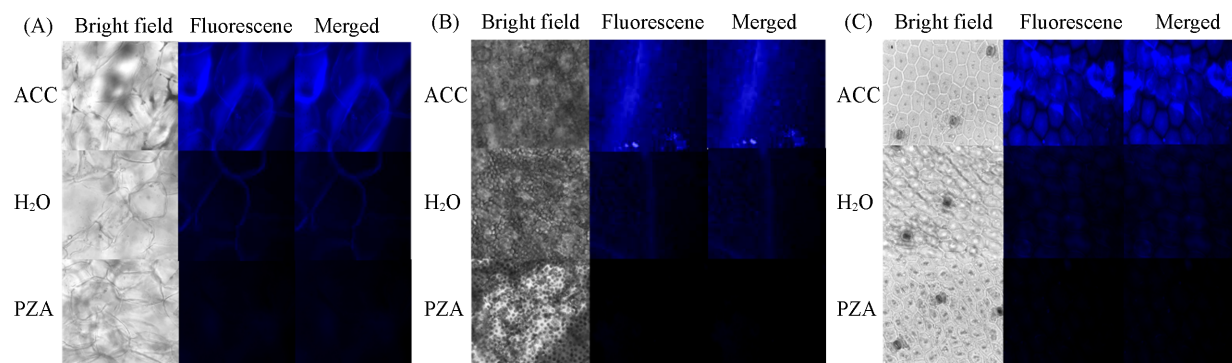


Fig. 5 C-E-P fluorescence imaging of ethylene release from different plant tissue

(A) Apple flesh; (B) rose peels; (C) aloe skin.

2.5 C-E-P 对植物组织乙烯随时间释放的响应

将不同植物组织去除应力损伤后, 分别在 ACC 溶液中孵育 0, 2, 5, 7, 9 和 12 h, 随后转移至 22.6 mmol/L 的 C-E-P 溶液中. 随着培养时间的增加, 各组织的荧光强度变化如图 6 所示. 玫瑰花瓣、苹果果肉和芦荟外皮组织的荧光成像强度随着在 ACC 溶液中孵育时间的延长而增强. 这表明 C-E-P 能够有效捕捉各植物组织中因 ACC 促进作用导致的乙烯含量变化, 并显示出其在实际样品应用中的潜力.

2.6 白熟期番茄乙烯释放监测

2.6.1 贮藏白熟番茄乙烯释放 图 7 和图 8 分别示出了白熟期番茄在贮藏期间的颜色变化和乙烯释放情况. 将白熟期番茄贮存于密闭容器中, 每隔 24 h 从容器顶部抽取 2 mL 气体, 缓慢注入探针溶液, 然后使用荧光分光光度计测量溶液的荧光强度. 从图 7 可以看出, 随着时间的推移, 番茄的颜色逐渐由

青转红. 在此期间, 乙烯量自白熟期开始逐渐增加, 至第5天时出现下降, 而在第6天骤然升高, 随后又呈现出逐渐降低的趋势(图8). 这表明采摘后的白熟期番茄可在自身乙烯的催化下逐渐成熟并进入衰老阶段. 因此, 长途运输时通常选择采摘处于白熟期的番茄, 此时果实已定型, 肉质坚硬, 有助于减少运输过程中的损耗.

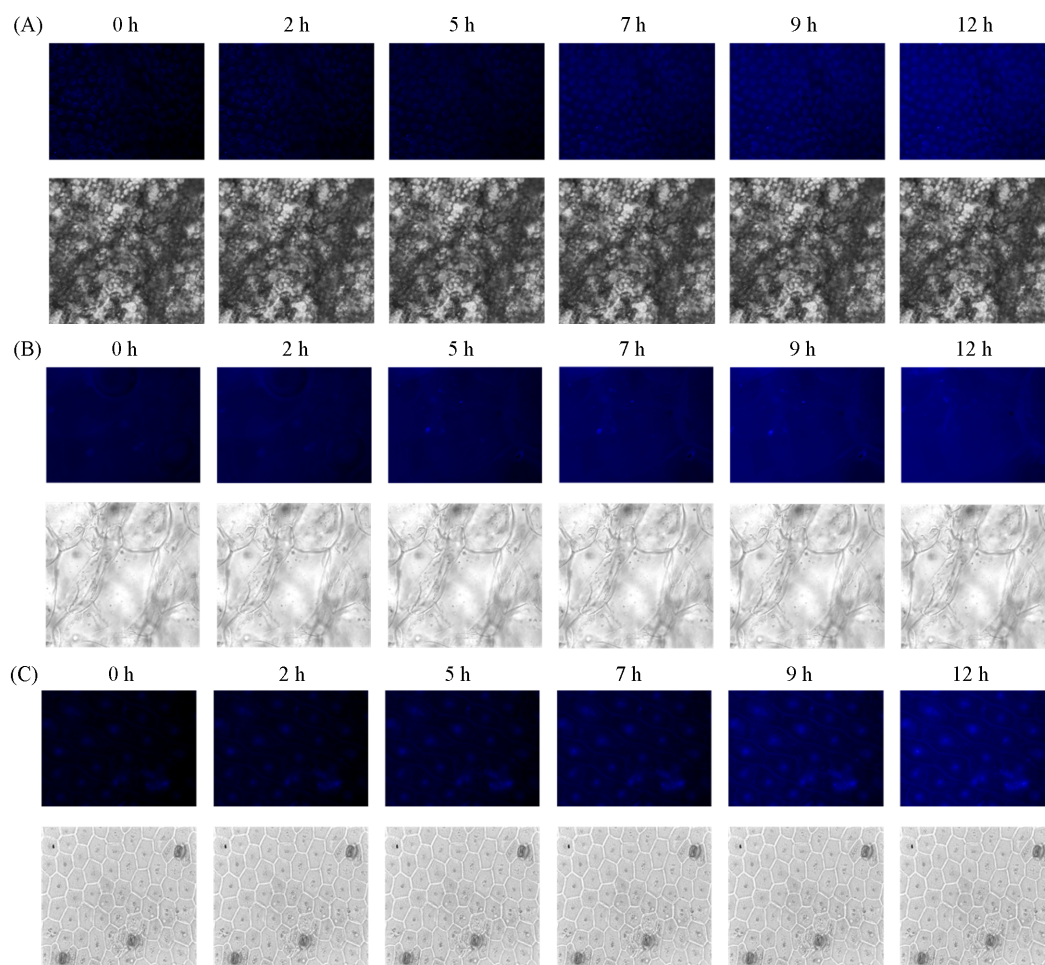


Fig. 6 C-E-P fluorescence imaging of ethylene in different plant tissues over time
(A) Rose peels; (B) apple flesh; (C) aloe skin.

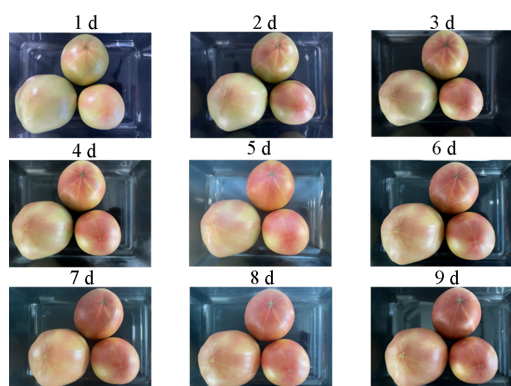


Fig. 7 Color changes of white ripe tomatoes during storage

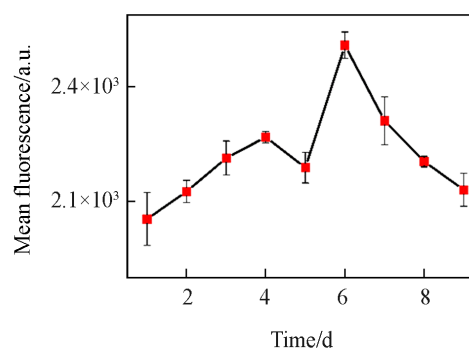


Fig. 8 Response of P3 during storage of white ripe tomatoes

2.6.2 贮藏白熟番茄组织成像 将番茄的果皮和种子从白熟期逐渐观察至完全变红(见图9), 并使用C-E-P进行荧光成像. 果皮组织的荧光成像结果如图10所示, 可见, 果皮组织在前3天的荧光强度逐渐



Fig. 9 Color change of tomato with time in white ripening stage

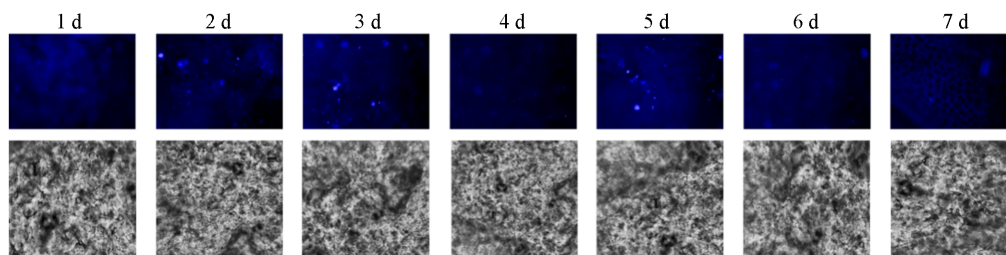


Fig. 10 Fluorescence imaging of tomato peel by C-E-P

增大,第4天时荧光强度略有下降,而第5天则骤然增强,随后再次逐渐减弱.种子的荧光成像结果如图11所示,种子中乙烯释放的变化趋势与果皮略有不同.在初始阶段,种子的荧光强度较强,第2天减弱,第3天又增强,随后持续下降.利用ImageJ软件分别处理图10和图11中果皮和种子的荧光图像,得到了不同时期的相对荧光强度值,其趋势分别如图12所示.可以看出,对于同一果实的不同部位,乙烯含量均呈现先上升后下降的趋势.由此现象可以推断果皮和种子的乙烯释放均经历了跃变.值得注意的是,从成像结果中可以观察到,种子的荧光强度明显高于果皮,且种子出现呼吸跃变的时间也早于果皮.这表明种子的乙烯含量相对较高.这一结论验证了文献[22]报道结果,即在番茄果实成熟初期,种子的乙烯含量高于同期果实.种子作为植物生命的载体,其高水平的乙烯可能向外传递,促进果实的逐渐成熟.因此,种子在成熟初期的乙烯含量是整个果实组织中最高的,发生呼吸跃变的时间也早于其它组织.

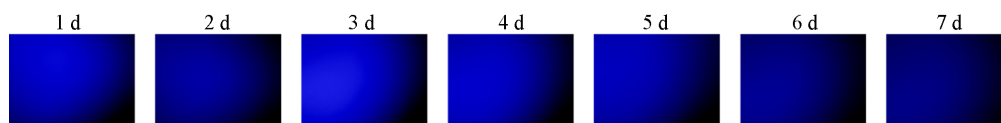


Fig. 11 Fluorescence imaging of tomato seeds by C-E-P

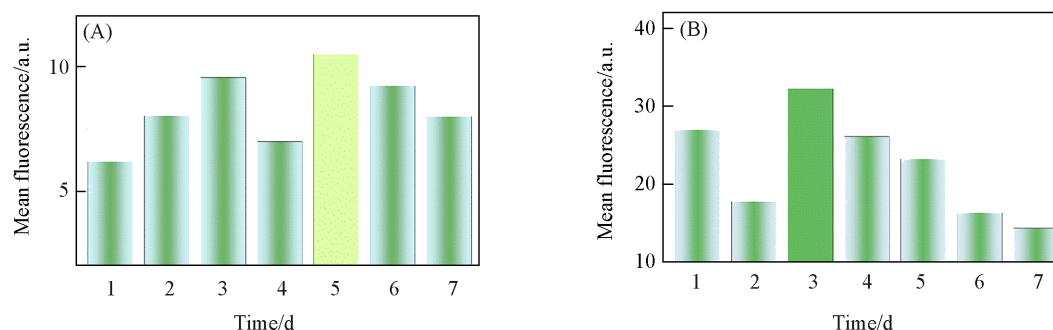


Fig. 12 Relative fluorescence intensity of tomato peel(A) and tomato seeds(B) over time

3 结 论

利用第一代Grubbs催化剂与6-甲氧基-2-萘乙烯合成了乙烯荧光探针P3,基于烯烃复分解反应,在365 nm波长光激发下对乙烯表现出可测量的荧光信号变化.该探针展现出良好的线性关系、快速的响应时间(400 s)和优良的选择性,检出限为0.625 $\mu\text{L}/\text{mL}$.为了监测植物组织中的内源乙烯,进一步将P3经过冷冻干燥负载于酪蛋白,得到水溶性探针C-E-P.该水溶性探针具有良好的线性相关性,并可应用于苹果、玫瑰花瓣和芦荟外皮组织的内源乙烯荧光成像.结果表明,处于ACC溶液中的植物组织荧

光显著增强,并且随着植物组织在ACC溶液中培养时间的增加,荧光强度也随之增强.基于此,进一步将C-E-P应用于白熟期番茄的研究.组织成像结果表明,种子内的乙烯含量在初期时高于同期果皮.从数据分析来看,种子发生呼吸跃变的时间在第3天,而果皮则在第5天,表明即使在同一植物体内,不同部位的乙烯含量也存在差异,呼吸跃变的时间亦有所不同.

支持信息见 <http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/cjcu20240517>.

参 考 文 献

- [1] Yang X. Q., Dou K., *Journal of Fruit Resources Guoshu*, **2024**, 5(3), 112—114(杨小芹, 窦凯. 果树资源学报, **2024**, 5, 112—114)
- [2] Shu P., Li Y., Sheng J., Shen L., *Agric. Food Chem.*, **2023**, 71(15), 6003—6013
- [3] Bari R., Jones J. D. G., *Plant Mol. Biol.*, **2009**, 69(4), 473—488
- [4] Iqbal N., Khan N. A., Ferrante A., Trivellini A., Francini A., Khan M. I. R., *Front. Plant Sci.*, **2017**, 8, 1—19
- [5] Pham-Tuan H., Vercammen J., Devos C., Sandra P., *J. Chromatogr. A*, **2000**, 868(2), 249—259
- [6] Zaidi N. A., Tahir M. W., Vellekoop M. J., Lang W., *Sensors*, **2017**, 17(10), 2283
- [7] Cristescu S. M., Mandon J., Arslanov D., De Pessemier J., Hermans C., Harren F. J. M., *Ann. Bot.*, **2013**, 111(3), 347—360
- [8] Wu H., Dong L., Zheng H., Yu Y., Ma W., Zhang L., Yin W., Xiao L., Jia S., Tittel F. K., *Nat. Commun.*, **2017**, 8(1), 15331
- [9] Sampaolo A., Patimisco P., Giglio M., Zifarelli A., Wu H., Dong L., Spagnolo V., *Anal. Chim. Acta*, **2022**, 1202, 338894
- [10] Zevenbergen M. A. G., Wouters D., Dam V. A. T., Brongersma S. H., Crego-Calama M., *Anal. Chem.*, **2011**, 83(16), 6300—6307
- [11] Esser B., Schnorr J. M., Swager T. M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51(23), 5752—5756
- [12] Green O., Smith N. A., Ellis A. B., Burstyn J. N., *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126(19), 5952—5953
- [13] Hitomi Y., Nagai T., Kodera M., *Chem. Commun.*, **2012**, 48(84), 10392—10394
- [14] Nguyen L. H., Oveissi F., Chandrawati R., Dehghani F., Naficy S., *ACS Sens.*, **2020**, 5(7), 1921—1928
- [15] Li M., Lin W. B., *Acta Chimica Sinica*, **2017**, 75, 1150(李猛, 林伟彬. 化学学报, **2017**, 75(12), 1150)
- [16] Sun M., Yang X., Zhang Y., Wang S., Wong M. W., Ni R., Huang D. J., *J. Agric. Food Chem.*, **2019**, 67(1), 507—513
- [17] Yang Y. Y., Bian H. X., Jia Z. L., Tu P., *ACS Omega*, **2023**, 8(17), 15350—15359
- [18] Vong K., Eda S., Kadota Y., Nasibullin I., Wakatake T., Yokoshima S., Shirasu K., Tanaka K., *Nat. Commun.*, **2019**, 10(1), 5746
- [19] Noctor G., Mhamdi A., Chaouch S., Han Y., Neukermans J., Marquez-Garcia B., Queval G., Foyer C. H., *Plant Cell Environ.*, **2012**, 35(2), 454—484
- [20] Wu M., Yin C., Fu L., Liu T., Jiang M., Sun Q., Chen L., Niu N., *Chem. Eng. J.*, **2022**, 435, 135045
- [21] Liu Z., Sun Y., *Anal. Chem.*, **2014**, 42(1), 41—46(刘振, 孙洋. 分析化学, **2014**, 42, 41—46)
- [22] Ruan Y., Sheng J. P., Liu K. L., Shen L., *J. China Agricultural Univ.*, **2005**, 10(5), 21—25(阮英, 生吉萍, 刘开朗, 申琳. 中国农业大学学报, **2005**, 10(5), 21—25)

(Ed.: N, K)