

超高效液相色谱—大气压化学电离—飞行时间质谱法测定油茶籽油中的 3 种甾醇

Determination of three sterols in camellia oleifera seed oil by atmospheric pressure chemical ionization ultra performance liquid chromatography-time of flight mass spectrometry

潘锦华^{1,2} 陈 峰^{1,2} 白建平^{1,2} 段雪菲^{1,2} 李绮淇^{1,2}

PAN Jin-hua^{1,2} CHEN Feng^{1,2} BAI Jian-ping^{1,2} DUAN Xue-fei^{1,2} LI Qi-qi^{1,2}

(1. 广州检验检测认证集团有限公司, 广东 广州 511447; 2. 国家加工食品质量检验中心[广东], 广东 广州 511447)

(1. Guangzhou Inspection and Testing Certification Group Co., Guangzhou, Guangdong 511447, China;

2. National Quality Testing Center for Processed Food [Guangdong], Guangzhou, Guangdong 511447, China)

摘要:目的:为准确测定油茶籽油中的 β -谷甾醇、菜籽甾醇、菜油甾醇含量。方法:建立超高效液相色谱—四极杆/飞行时间质谱测定方法。样品以 6-酮胆甾醇为内标物, 50 mL 乙醇加热回流提取 30 min, 离心分层后, 液经 Xbridge BEH C₁₈ (100 mm × 4.6 mm, 2.5 μ m) 色谱柱洗脱分离, 大气压化学电离源 (APCI) 电离和正离子模式分析测试。结果:3 种甾醇在 0.1~10.0 mg/L 的质量浓度范围内具有良好的线性关系, 相关系数 R^2 均大于 0.999 2, 本底值 0.5, 1.0, 2.0, 10.0 倍添加水平的回收率为 84.5%~99.5%, 相对标准偏差 (RSDs) 为 3.92%~7.44%, 方法检出限均为 1.0 mg/kg, 方法定量限为 3.0 mg/kg。结论:该方法操作简单、溶剂消耗少且环保、回收率及重现性好, 可用于准确测定油茶籽油中的 3 种甾醇。

关键词:超高效液相色谱—四极杆/飞行时间质谱; 大气压化学电离; 油茶籽油; β -谷甾醇; 菜籽甾醇; 菜油甾醇

Abstract: Objective: In this study, ultra performance liquid chromatography-high resolution quadrupole time of flight mass spectrometer (UPLC-Q-TOF/MS) was established to determine β -sitosterol, brassicasterol, and campesterol in camellia oleifera seed oil. Methods: Using 6-ketcholestanol as the internal standard and performing sample extraction by heating it for

30 min and refluxing it with 50 mL ethanol. After centrifugation and layering, three sterols were separated by Xbridge BEH C₁₈ (100 mm × 4.6 mm, 2.5 μ m) Chromatographic column elution. Finally, ionized by atmospheric pressure chemical ionization source and analyzed by positive ion mode. Results: The internal standard curves of the three sterols showed an observable linear relationship in the range of 0.1~10.0 mg/L, while the correlation coefficient R^2 was both greater than 0.999 2. The average recoveries at 0.5, 1.0, 2.0, and 10.0 times of background value were in the range of 84.5%~99.5%. The relative standard deviation (RSDs) was ranged from 3.92% to 7.44%. Moreover, the limits of detection were 1.0 mg/kg and the limits of quantitation were 3.0 mg/kg, respectively. Conclusion: The method was simple in operation, low in solvent consumption, and toxicity. It had good recoveries and reproducibility that could be applied for the accurate determination of three sterols in camellia oleifera seed oil.

Keywords: UPLC-Q-TOF-MS; APCI; camellia oleifera seed oil; β -sitosterol; brassicasterol; campesterol

油茶是一类山茶科山茶属的常绿小乔木或灌木^[1]。油茶籽压榨后所得茶油成分与橄榄油相似, 含有 90% 的不饱和脂肪酸^[2]。油茶籽油中含有大量的多酚, 甾醇等活性成分, 具有极强的抗氧化作用^[3-4], 因此有降低血脂、预防心脑血管疾病等作用^[5]。而油茶籽油中的甾醇, 主要有 β -谷甾醇、菜籽甾醇、菜油甾醇等, 具体结构式见图 1。有研究表明, β -谷甾醇可减轻幽门螺杆菌感染性胃炎小鼠胃组织炎症^[6], 也具有降脂抗肿瘤等作用^[7]。由于油茶籽油中含有大量的甾醇, 因此被作为健康食用油

基金项目:广州市市场监督管理局科技项目(编号:2022kj51)

作者简介:潘锦华,男,广州检验检测认证集团有限公司助理工程师,学士。

通信作者:潘锦华(1995—),男,广州检验检测认证集团有限公司助理工程师,学士。E-mail: 1369800445@qq.com

收稿日期:2022-12-31 改回日期:2023-05-12

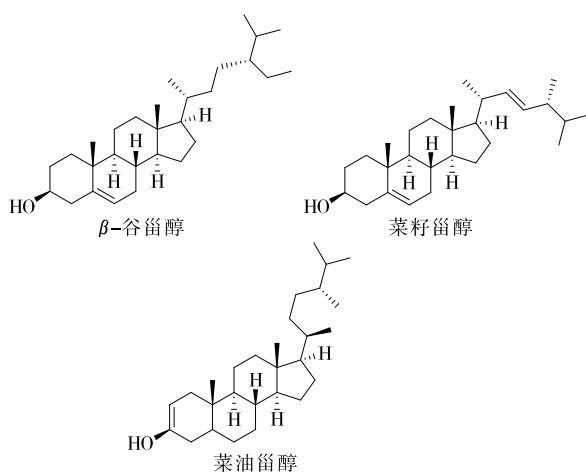


图1 3种甾醇的化学结构

Figure 1 Chemical structure of three sterols

而得到广泛的推广。

目前对于植物油中的甾醇测定方法主要集中在HPLC法^[8-9]、GC法^[10-12]、HPLC-MS/MS法^[13]和GC-MS及GC-MS/MS法^[14-15],其中,色谱法由于检测器选择性较低,谱图容易受杂质影响,而且分离难度大,因此通常需要在预处理中对样品进行皂化,耗时耗力,且影响回收率。而质谱法中,气相色谱质谱法的报道相对较多,相比于与非质谱检测器联用,具有更高的选择性,也能在短时间内实现多种化合物测定。研究拟以加热回流为提取手段,无需对样品进行皂化,利用高分辨飞行时间质谱精确分子量进行测定,内标法定量,以期为建立植物油中甾醇类物质的测定及相关指纹图谱提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备

飞行时间质谱仪: Triple TOF® 5600+型,美国ABSciex公司;

超高效液相色谱仪: UPLC-20AD型,日本岛津公司;

高速离心机: 4k-15型,德国西格玛公司;

多管漩涡振荡器: Multi Reax型,德国 Heidolph公司;

数显恒温电热板: DB-6B型,常州润华电器有限公司。

1.2 材料与试剂

油茶籽油: 市售;

甲酸、乙腈、乙醇: 色谱纯,美国赛默飞世尔公司;

β-谷甾醇、菜籽甾醇、菜油甾醇、6-酮胆甾醇: 纯度≥95.0%,上海安谱实验科技股份有限公司。

1.3 标准溶液的配制

1.3.1 标准储备液 分别称取10 mg 3种甾醇及内标,无水乙醇溶解并定容至10 mL容量瓶,配制成1 000 mg/L的标准储备液。

1.3.2 内标工作液 将6-酮胆甾醇标准储备液,用无

水乙醇稀释成质量浓度为1.0 mg/L的标准内标工作液。

1.3.3 标准工作液 取上述标准储备液加入内标液配制0.10, 0.25, 0.50, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 mg/L的工作曲线,其中内标质量浓度为1.0 mg/L。

1.4 样品处理条件

称取0.5 g油茶籽油样品于250 mL圆底烧瓶中,加入50 mL内标工作液,涡旋混匀,连同圆底烧瓶重新称重。控制电热套温度,在乙醇微沸条件下,加热回流30 min,冷却至室温后,用无水乙醇补足失重,涡旋混匀,取2 mL溶液于离心管中,以12 000 r/min离心10 min,取上清液过0.22 μm有机滤膜,待测定。

1.5 仪器条件

1.5.1 色谱条件 色谱柱: Xbridge BEH C₁₈ (100 mm×4.6 mm, 2.5 μm); 色谱柱柱温: 40 ℃; 进样量: 10 μL; 流动相A为乙腈, B为0.1%甲酸水溶液; 流动相流速: 0.5 mL/min; 梯度洗脱程序: 0.0~2.0 min, 80% A; 2.0~15.0 min, 80%~100% A; 15.0~35.0 min, 100% A; 35.0~36.0 min, 100%~80% A; 36.0~40.0 min, 80% A。

1.5.2 质谱条件 离子源: 大气压化学电离源 (Atmospheric pressure chemical ionization, APCI); 扫描方式: 正离子; 离子源温度: 350 ℃; 离子源电压: 4 000 V。四极杆质量扫描范围: 50~1 000 Da; 去簇电压 DP: 90 V, 碰撞能量 CE: 30, 40, 50 eV; 全信息串联质谱模式检测, 灵敏度模式; 扫描时间间隔: 50 ms; 校正液流速为0.5 mL/min, 每10个样品进行一次自动校正, 以确保系统在批内的精准质量数稳定。

1.6 回收率试验设计

通过初步测定批量样品, 选择3种甾醇含量较低的样品进行加标回收试验, 对含量较高的化合物, 按照其测得的本底值的0.5, 1.0, 5.0倍进行添加, 含量相对较低的, 按照本底值的1.0, 2.0, 10.0倍进行添加, 在优化后的方法下进行6次平行测定, 计算相对标准偏差以评价试验重复性。

1.7 方法的应用

使用优化后的方法, 对样品进行测定, 每个样品平行测定6次, 记录相应平均回收率及相对标准偏差。

1.8 数据分析及绘图

待测定化合物信息由Analyst TF 1.6软件采集, 根据TOF-MS和IDA-MS高分辨质谱获得化合物的准确分子量, 采用PeakView 2.0, MasterView 2.0和MultiQuant 3.0等软件进行定性定量分析处理。

2 结果与讨论

2.1 提取条件的优化

2.1.1 提取溶剂体积的选择 试验初期对提取溶剂体积

进行优化,由于油茶籽油均为阳性样品,且含量较大,因此难以使用本底值相当的浓度进行加标。为了考察对应的提取效率,试验选择含量较高的样品为对象,以不同提取溶剂体积对同一样品最终测得的含量为判定依据,对提取溶剂体积进行优化,结果如图 2 所示。随着提取溶剂体积的增大,3 种甾醇测得的含量均在增加,在 50 mL 时,基本提取充分,体积继续增大,测得的含量基本持平,最终选择 50 mL 为提取溶剂体积。

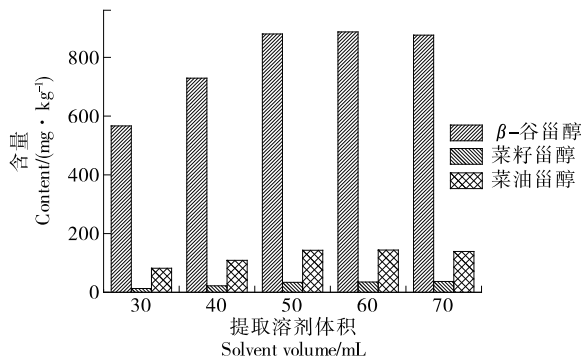


图 2 提取溶剂体积对提取含量的影响

Figure 2 Effects of solvent volume on extraction content

2.1.2 加热回流时间的选择 试验对最佳的加热回流时间进行探讨,3 种甾醇的沸点均较高,因此具有一定的热稳定性,可长时间加热提取,但长时间加热不但检测成本增加,还会导致乙醇蒸发过多,随着时间的推移,提取液中目标物浓度过大,乙醇和油两相之间平行系数发生变化,而导致提取率下降。试验使用 50 mL 的提取液,分别对同一样品提取 15, 20, 25, 30, 35 min, 结果发现, β -谷甾醇在提取 25 min 时,提取含量基本达到最大,但菜籽甾醇和菜油甾醇在 30 min 时的提取含量明显要比 25 min 时的高,因此,综合考虑,最终选择提取时间为 30 min,详细结果见图 3。

2.2 质谱条件的确定

根据 3 种甾醇的化学结构分析可知,其结构中主要含有羟基,使用不同的离子源,不同的模式电离,可能会产生不同的母离子。试验分别对比了 3 种甾醇在电喷雾电离源(ESI)和大气压化学电离源(APCI)下的母离子响应强度。结果发现,3 种甾醇在 ESI 和 APCI 源的负模式下,均没有响应,主要是因为 3 种甾醇的羟基较稳定,没

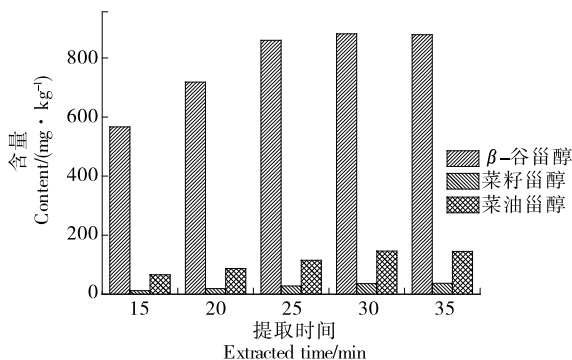


图 3 提取时间对提取含量的影响

Figure 3 Effects of extracted time on extraction content

能失去 H^+ 而产生相应的 $[M-H]^-$ 母离子。而在正模式下,3 种甾醇在 ESI 源中可失去羟基($-OH$),从而生成 $[M-OH]^+$ 形态的母离子,但响应很低,难以用于实际测定,同样,在 APCI 源的正模式下,所产生的 $[M+H]^+$ 母离子响应也很低,说明这两种母离子均不稳定。而 APCI 源的正模式下也同样产生了 $[M-OH]^+$ 形态的母离子,其响应则较高,可满足分析要求,因此最终选择 APCI 源的正模式进行电离。

在流动相中加入质子 H^+ ,可在离子化过程中与羟基结合,使离子化平衡向右移,增强母离子响应。试验对比了乙腈—水和乙腈—0.1% 甲酸水溶液体系作为流动相对母离子响应的影响,结果发现,当使用乙腈—0.1% 甲酸水作为流动相时,3 种甾醇母离子的响应比乙腈—水体系要高 30% 左右,因此,最终选用乙腈—0.1% 甲酸水作为流动相。所测得 3 种甾醇及内标物 6-酮胆甾醇的质谱信息见表 1。由于无法完全确定子离子的归属,因此选择母离子进行定性定量,其余信息辅助定性。3 种甾醇标准品提取离子流色谱图见图 4。

2.3 甾醇质谱裂解途径分析

3 种甾醇均先由 $C-O$ 键开始断裂,在丢失羟基后,由于氧原子(O)的电负性较强,因此 $C-O$ 键中的电子对被 O 吸引带走,使该位置的碳原子(C)失去一个电子而带一个单位正电荷,得到 $[M-OH]^+$ 形态的母离子。由于 3 种甾醇的结构相似,因此在质谱中的裂解途径也相似,且得到的碎片离子离子具有较大的交集。从 IDA-MS 采集得到的子离子质荷比可知,在 APCI 源的电离模式下,

表 1 3 种甾醇的质谱信息

Table 1 Mass spectral information of three sterols

化合物	分子式	理论值 (m/z)	实测值 (m/z)	子离子 (m/z)	误差 ($\times 10^6$)
β -谷甾醇	$C_{29}H_{50}O$	397.382 88	397.383 13	161.132 51;135.116 82	0.6
菜籽甾醇	$C_{28}H_{46}O$	381.351 58	381.351 90	69.070 01;147.116 81	0.8
菜油甾醇	$C_{28}H_{48}O$	383.367 23	383.367 62	161.132 53;147.116 81	-0.2
6-酮胆甾醇	$C_{27}H_{46}O_2$	385.346 49	385.346 66	367.336 90;159.116 88	0.4

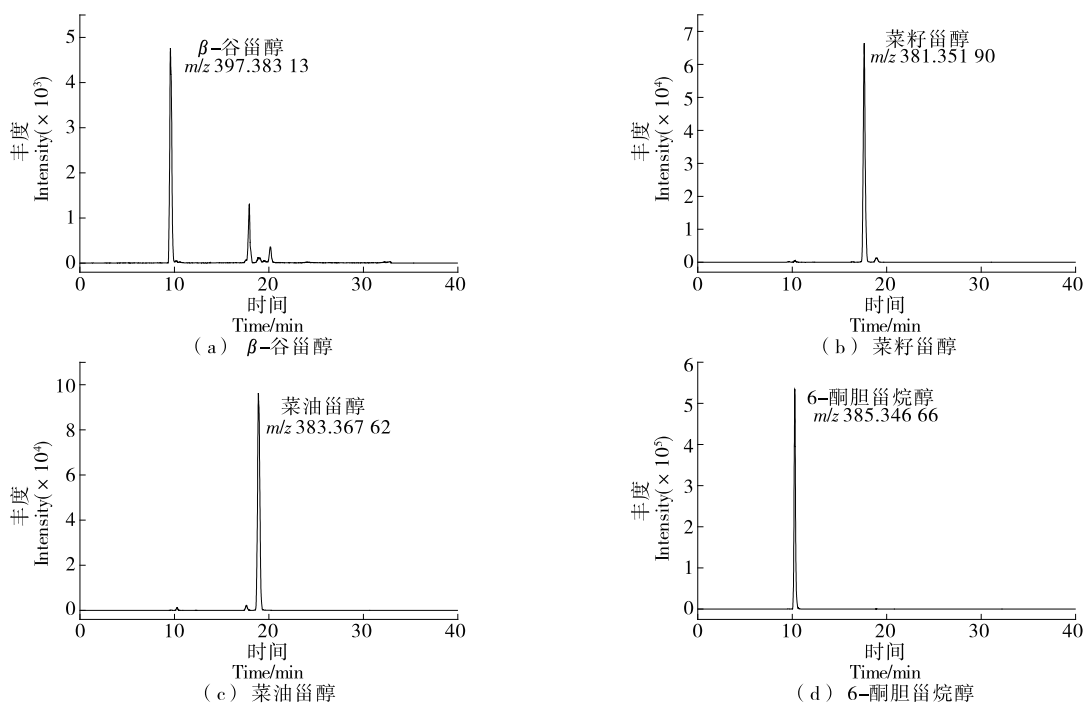


图4 3种甾醇及内标物标准品提取离子流色谱图

Figure 4 Extracted ion chromatogram of three sterols and internal standard

3种甾醇所产生的二级碎片质荷比均较小,主要为 m/z 161, 135, 147, 69, 在碰撞能量的轰击下,多元环逐步碎裂,逐级产生出不同质荷比的碎片,而其他烷基则以中性碎片的形式在四极杆中丢失。由图5可知,3种甾醇的碎片存在互为同分异构体的情况,因此在高通量检测时,若要单独分析单个化合物的裂解机理,应对组分进行色谱分离,以出峰时间作为辅助定性依据。

2.4 标准曲线和检出限

按照1.3的方法配制对应浓度的标注曲线,其中含内

标质量浓度为1.0 mg/L,于优化后的仪器条件测定,将质量浓度和仪器软件积分后得到的峰面积记录于Excel软件,并拟合得到线性方程,3种甾醇的相关系数 R^2 均大于0.999 2,说明在此仪器条件下,3种甾醇线性较好,可准确定量。由于样品均为阳性,因此以信噪比的3倍 ($S/N=3$) 和10倍 ($S/N=10$),结合稀释倍数,计算得到方法检出限(LOD)为1.0 mg/kg,定量限(LOQ)为3.0 mg/kg,经批量测定样品含量后,该定量限可满足一般样品中3种甾醇含量的测定。

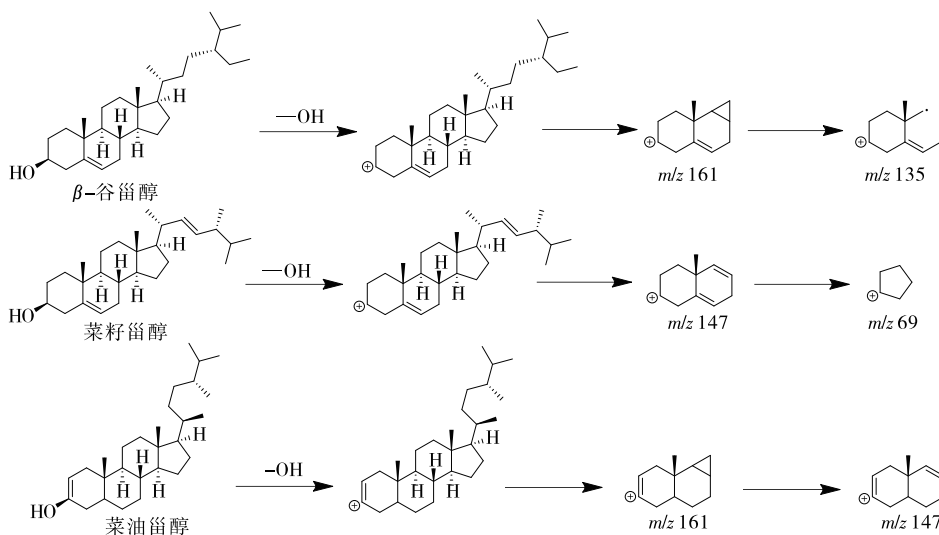


图5 甾醇的质谱裂解途径

Figure 5 Mass spectrometry fragmentation pathway of sterol

表 2 3 种甾醇的线性方程、检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ)

Table 2 Linear equation, Limit of detection (LOD) and quantitation (LOQ) for three sterols

化合物	浓度范围/(mg · L ⁻¹)	线性方程	相关系数 R ²	检出限/(mg · kg ⁻¹)	定量限/(mg · kg ⁻¹)
β-谷甾醇	0.1~10.0	Y=1.175 1X+0.120 9	0.999 6	1.0	3.0
菜籽甾醇	0.1~10.0	Y=1.560 1X+0.221 9	0.999 9	1.0	3.0
菜油甾醇	0.1~10.0	Y=1.334 1X+0.166 7	0.999 2	1.0	3.0

2.5 回收率与精密度试验

对批量样品进行测定,选择 3 种甾醇含量较低的样品,经 6 次测定后,以结果平均值为基准进行不同水平的标准添加,考察 3 种甾醇的回收率。由于油茶籽油中,β-谷甾醇含量普遍较高,而菜籽甾醇和菜油甾醇含量相对较低,因此分别采用不同倍数水平进行加标,根据测定结

果,最终决定 β-谷甾醇的添加水平为 0.5,1.0,5.0 倍,菜籽甾醇和菜油甾醇的添加水平则为 1.0,2.0,10.0 倍。如表 3 所示,在日内重复 6 组平行样品下,3 种甾醇的回收率为 84.5%~99.5%,相对标准偏差 (RSD) 为 3.92%~7.44%,说明方法回收率高,重复性好,可用于准确测定油茶籽油中的 3 种甾醇含量。

表 3 加标回收率和相对标准偏差

Table 3 Recovery rate and relative standard deviation (n=6)

化合物	本底值/(mg · kg ⁻¹)	添加水平/(mg · kg ⁻¹)	测得值/(mg · kg ⁻¹)	回收率/%	RSD/%
β-谷甾醇	98.1	50.0	45.1	90.2	7.44
		100.0	94.8	94.8	6.71
		500.0	494.5	98.9	4.67
菜籽甾醇	11.5	10.0	8.5	84.5	6.76
		20.0	18.1	90.5	3.69
		100.0	94.6	94.6	4.11
菜油甾醇	33.6	20.0	18.0	90.1	5.22
		40.0	36.6	91.6	6.41
		200.0	199.0	99.5	3.92

2.6 实际样品测定

随机选择 10 个油茶籽油样品进行测定,结果如表 4 所示,β-谷甾醇含量均远高于菜籽甾醇和菜油甾醇,而不同样品中,β-谷甾醇和菜油甾醇含量差异较大,但菜籽甾醇含量差异较少。

表 4 不同样品中 3 种甾醇含量

Table 4 Contents of three sterols in different samples

样品编号	β-谷甾醇	菜籽甾醇	菜油甾醇
1	884	36.0	146
2	98.1	11.5	33.6
3	223	22.5	93.6
4	176	14.7	52.1
5	193	18.9	76.9
6	338	23.9	108
7	588	32.1	133
8	430	27.6	119
9	182	16.7	84.7
10	442	29.4	125

3 结论

研究以蒸馏回流的方式提取油茶籽油中的 3 种甾醇,优化提取条件后,提取率高,同时结合超高效液相色谱分离,飞行时间质谱准确测定分子量,能准确定性定量,且回收率试验数据表明,方法回收率高,重现性好,可用于批量测定油茶籽油中 3 种甾醇含量。

针对植物油脂中的中低极性活性物的测定,使用大气压化学电离源可获得较好的响应。研究只针对甾醇进行研究,通过丢失一分子的羟基,可形成相对稳定的母离子,获得较好响应,对于其他不含羟基的化合物,在大气压化学电离源中的离子化机理仍有待进一步研究。

参考文献

[1] 叶敏倩, 吴峰华, 芮鸿飞, 等. 不同产地油茶籽油主要特征组分分析[J]. 食品科学, 2020, 41(20): 222-226.
YE M Q, WU F H, RUI H F, et al. Analysis and comparison of major characteristic components of camellia seed oil from different regions[J]. Food Science, 2020, 41(20): 222-226.
[2] 柏云爱, 宋大海, 张富强, 等. 油茶籽油与橄榄油营养价值的比

- 较[J]. 中国油脂, 2008(3): 39-41.
- BAI Y A, SONG D H, ZHANG F Q, et al. Comparison of nutritional value between *Camellia oleifera* seed oil and olive oil[J]. China Oils Fats, 2008(3): 39-41.
- [3] TAI Y L, WEIC L, YANG H, et al. Transcriptomic and phytochemical analysis of the biosynthesis of characteristic constituents in tea (*Camellia sinensis*) compared with oil tea (*Camellia oleifera*) [J]. BMC Plant Biology, 2015, 15(1): 190-202.
- [4] FREEMAN B L, EGGET D L, PARKER T L. Synergistic and antagonistic interactions of phenolic compounds found in navel oranges[J]. Journal of Food Science, 2010, 75(6): C570-C576.
- [5] VERLEYEN T, FORCADES M, VERHE R. Analysis of free and esterified sterols in vegetable oils[J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 2002, 79: 117-122.
- [6] 陈铁民, 刘永辉, 温健新, 等. β -谷甾醇对幽门螺杆菌感染性胃炎小鼠炎症影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(23): 2 811-2 815.
- CHEN T M, LIU Y H, WEN J X, et al. Effect of β -sitosterol on inflammation in mice with helicobacter pylori infection gastritis[J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2022, 38 (23): 2 811-2 815.
- [7] 陈元堃, 曾奥, 罗振辉, 等. β -谷甾醇药理作用研究进展[J]. 广东药科大学学报, 2021, 37(1): 148-153.
- CHEN Y K, ZENG A, LUO Z H, et al. Advances on pharmacology of β -sitosterol[J]. Journal of Guangdong Pharmaceutical University, 2021, 37(1): 148-153.
- [8] 赵海燕, 詹未, 李兵, 等. 超高效液相色谱法同时测定食用植物油中的4种植物甾醇[J]. 中国食品卫生杂志, 2016, 28(2): 223-226.
- ZHAN H Y, ZHAN W, LI B, et al. Simultaneous determination of four phytosterols in edible vegetable oil by ultra performance liquid chromatography[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2016, 28(2): 223-226.
- [9] 李文. 基于超高效液相色谱的橄榄油中生物活性成分检测方法研究[D]. 杭州: 中国计量大学, 2020: 40-54.
- LI W. Determination of bioactive components in olive oil by ultra high performance liquid chromatography [D]. Hangzhou: China Jiliang University, 2020: 40-54.
- [10] 胡伯凯, 张时馨, 刘亚娜, 等. 贵州茶油气相色谱脂脂肪酸标准指纹图谱构建及其鉴别[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(21): 6 947-6 955.
- HU B K, ZHANG S X, LIU Y N, et al. Construction and identification of gas chromatographic fatty acids standard fingerprint of *Camellia oleifera* seed oil from Guizhou[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2022, 13(21): 6 947-6 955.
- [11] 杜杰, 刘春梅, 林春兰, 等. 气相色谱法测定食用油中的植物甾醇[J]. 中国油脂, 2021, 46(9): 145-148.
- DU J, LIU C M, LIN C L, et al. Determination of phytosterols in edible oil by GC[J]. China Oils Fats, 2021, 46(9): 145-148.
- [12] 黄银波, 花露, 陈君, 等. 气相色谱法测定植物甾醇中 β -谷甾醇、菜油甾醇、豆甾醇、菜籽甾醇的含量[J]. 现代食品, 2021(14): 179-182.
- HUANG Y B, HUA L, CHEN J, et al. Determination of glutosterol, vegetable oil sterol, soybean sterol and canola sterol in phytosterol by gas chromatography[J]. Modern Food, 2021(14): 179-182.
- [13] 王愉宁, 陈军辉, 何秀平, 等. 液相色谱—掺杂辅助大气压光电离子质谱测定海洋沉积物中的植物甾醇[J]. 分析化学, 2021, 49(2): 282-291.
- WAN Y N, CHEN J H, HE X P, et al. Determination of phytosterols in marine sediment by liquid chromatography-dopant-assisted atmospheric pressure photoionization mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2021, 49(2): 282-291.
- [14] 熊小平, 杨明, 樊淑宏, 等. GC-MS法对13种植物油中甾醇和脂肪酸的分布研究[J]. 中国测试, 2019, 45(2): 64-71.
- XIONG X P, YANG M, FAN S H, et al. Research on the distribution of phytosterols and fatty acids in 13 kinds of vegetable oils by GC-MS[J]. China Measurement & Testing Technology, 2019, 45(2): 64-71.
- [15] 陈通, 陈鑫郁, 谷航, 等. 气相离子迁移谱对山茶油掺假的检测[J]. 食品科学, 2019, 40(8): 275-279.
- CHEN T, CHEN X Y, GU H, et al. Detection of adulterated camellia oil using gas chromatography-ion mobility spectrometry [J]. Food Science, 2019, 40(8): 275-279.
- (上接第12页)
- [18] VOORHEES R M, RAMAKRISHNAN V. Structural basis of the translational elongation cycle[J]. Annu Rev Biochem, 2013, 82: 203-236.
- [19] DIEPPOIS G, DUCRET V, CAILLE O, et al. The transcriptional regulator CzcR modulates antibiotic resistance and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e38148.
- [20] 梁文, 李博, 董萌萌, 等. 铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素耐药机制研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2013, 38(9): 641-646.
- LIANG W, LI B, DONG M M, et al. Research progress of carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2013, 38(9): 641-646.
- [21] JAYARAMAN P, SAKHARKAR K R, DANIEL L C, et al. Hybrid-drug design targeting *Pseudomonas aeruginosa* dihydropteroate synthase and dihydrofolate reductase[J]. Front Biosci (Elite Ed), 2013, 5(3): 864-882.
- [22] 褚海青, 李惠萍, 何国钧. 铜绿假单胞菌的耐药机制[J]. 中国抗感染化疗杂志, 2003(1): 54-57.
- CHU H Q, LI H P, HE G J. Drug resistance mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Chinese Journal of Anti-Infective Chemotherapy, 2003(1): 54-57.