

卵白蛋白源抗菌肽的分离纯化与结构鉴定

Isolation, purification and identification of antimicrobial peptides from ovalbumin

蒋雨晴 迟玉杰

JIANG Yu-qing Chi Yu-jie

(东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

(College of Food Science Northeast Agricultural University, Harbin, Henglongjiang 150030, China)

摘要:以卵白蛋白为原料,采用胃蛋白酶水解制备具有抑菌活性的蛋白肽。通过超滤和 Superdex peptide 10/300 凝胶色谱分离技术获得高抑菌性组分,以抗菌肽对大肠杆菌和沙门氏菌的抑菌性为试验指标,筛选最佳抑菌性组分,再进行反相高效液相色谱分离,测定分离得到的 9 个组分抑菌活性,发现 C3 组分的抑菌活性和得率最高,其中大肠杆菌及沙门氏菌抑菌圈直径分别为 (19.32 ± 1.45) , (18.74 ± 1.27) mm。最后采用高效液相色谱—电喷雾—质谱鉴定抗菌肽的结构,显示氨基酸序列为 Gly-Leu-Glu-Pro-Ile-Asn-Phe-Gln(GLESINFQ)。该肽经固相合成纯度为 95.84%,其抑菌活性与 C3 组分无显著性差异($P > 0.05$),从而证明卵白蛋白源抗菌肽发挥抑菌活性的成分主要是肽段 GLESINFQ。

关键词:卵白蛋白源抗菌肽;分离纯化;氨基酸序列

Abstract: The antimicrobial peptides derived from ovalbumin were prepared by Pepsin hydrolysis. High antibacterial components were obtained by ultrafiltration and Superdex peptide 10/300. The antibacterial activity of antibacterial peptides against *E. coli* and *Salmonella* was used as an experimental index to screen the best antibacterial component and then conducted the reversed high-efficiency liquid phase chromatographic separation. After measuring the antibacterial activity of the 9 components, it was found that the C3 component had the highest antibacterial activity and the diameters of bacteriostasis circles were (19.32 ± 1.45) and (18.74 ± 1.27) mm, respectively. Then, the structure of antimicrobial peptides was identified by HPLC (electrospray

ionization-mass spectrometry, HPLC-ESI-MS). The results showed that the amino acid sequence was Gly-Leu-Glu-Pro-Ile-Asn-Phe-Gln (GLESINFQ). The purity of the peptide was 95.84% by solid phase synthesis, and its antibacterial activity was not significantly different with C3 component ($P > 0.05$). The above results prove that the main component of ovalbumin antimicrobial peptide was peptide fragment GLESINFQ.

Keywords: ovalbumin antimicrobial peptides; isolation and purification; amino acid sequence

卵白蛋白是由 385 个氨基酸组成的球蛋白,因其具有良好的功能特性^[1],如起泡性、胶凝性、持水性和成膜性能等,被广泛应用于补铁剂、酶处理剂、肽制剂、蛋白口服剂等领域,同时因其具有良好的成胶性和乳化性,也被广泛应用于烘焙、甜点和肉制品加工中^[2]。随着蛋清深加工、综合利用的深入研究,鸡蛋清中活性肽的提纯技术日趋完善,卵白蛋白作为鸡蛋清蛋白中含量最高的蛋白,其生物活性肽的生理活性受到广泛关注,成为食品、医药保健品中重要的功能性肽原料。

抗菌肽作为一种新型食品防腐剂,因其抑菌谱广,不易产生耐药性,且有较高热稳定性和低温贮藏稳定性,而受到国内外研究者的广泛关注^[3]。目前抗菌肽的来源较广,Hou 等^[4]从家蝇幼虫中提取出 Hf-1,并发现其对食源性致病菌有较强抑制作用。孟婷等^[5]研究发现经酶解的伴大豆球蛋白对沙门氏菌具有抑制作用。杨珮瑜等^[6]采用蛋白酶水解法制备的黄鲷蛋白抗菌肽与葡萄糖进行美拉德反应,发现其产物与大肠杆菌作用 1 h 即可造成细胞膜损伤。而禽蛋因其富含蛋白质成为分离天然或制备抗菌肽的研究对象^[7]。Kobayashi 等^[8]用链霉蛋白酶处理卵黏蛋白,制得的水解物能与大肠杆菌特异性结合,进而发挥抑菌作用。卵白蛋白水解物的抑菌性也得到研究,其中唐文婷等^[9]发现水解物对大肠杆菌和沙门氏菌有抑制性,其中对大肠杆菌的抑菌效果更为显著。Pellegrini

基金项目:“十三五”国家重点研发计划项目(编号:2018YFD0400304);现代农业产业技术体系建设专项资金项目(编号:CARS-40-K25)

作者简介:蒋雨晴,女,东北农业大学在读硕士研究生。

通信作者:迟玉杰(1963—),女,东北农业大学教授,博士。

E-mail: Yjchi323@126.com

收稿日期:2019-01-22

等^[10]将卵白蛋白肽段与丝氨酸蛋白酶抑制剂进行序列对比,发现两者有同源性的肽段序列。该序列对枯草芽孢杆菌具有很强的抑制性,对支气管炎博德特菌、绿脓假单胞菌和黏质沙雷氏菌有一定强度的抑制性。

目前关于抑菌机理的研究较多,大致可以归纳为以下几类:破坏细胞膜蛋白,抗菌肽阻断细胞膜的合成或者抑制分子主动运输^[11];胞质凝结,抗菌肽穿过破坏的细胞壁及细胞膜与胞内目标组分特异性结合,抑制蛋白、DNA 等合成^[12];胞内成分渗透^[13],破坏细胞正常繁殖代谢。

本试验拟探究对卵白蛋白源抗菌肽抗菌活性有显著贡献的寡肽结构,通过胃蛋白酶酶解卵白蛋白制备具有抑菌活性的粗酶解物,进而通过超滤、凝胶色谱及反相色谱技术对其进行分离纯化,得到最佳抑菌效果的组分并分析其氨基酸序列,旨在为卵白蛋白源抗菌肽的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

卵白蛋白:实验室自制,纯度 93.4%;

大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、沙门氏菌 (*Salmonella*):实验室保存菌株;

牛肉膏、蛋白胨、营养琼脂:生化试剂,北京奥博星生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

冷冻干燥机:EYELAFDU-1100 型,日本 Rikakikai 公司;

恒温水浴锅:DK-98 电热型,天津市泰斯特仪器有限公司;

精密 pH 计:pHS-3C 型,上海精密科学仪器有限公司;

分子筛:Superdex Peptide 10-300 型,美国 GE Healthcare 公司;

质谱仪:LTQ-Velos 型,美国 ThermoFinnigan 公司;

电热鼓风干燥箱:DHG-9123A 型,上海精宏实验设备有限公司;

电导率仪:DDS-307 型,上海伟业仪器厂;

手提式压力灭菌锅:YX-160B 型,上海医用核子仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 卵白蛋白酶解 采用胃蛋白酶制备卵白蛋白源抗菌肽,依据本课题组预试验^[14],确定卵白蛋白源抗菌肽酶解最适条件为底物浓度 3%,pH 2.0,水解时间 4 h,反应温度 37 °C,此时水解度为 83.52%。将得到的水解物在-30 °C 条件下预冻 2.5 h 处理,在-82 °C,0.01 kPa 条件下真空冷冻干燥。冷冻干燥处理后于 4 °C 条件下贮存备用。

1.3.2 卵白蛋白源抗菌肽的分离纯化

(1) 超滤分离:依次采用截留分子质量为 10,3 kDa

超滤膜对粗酶解得到的水解物进行分离,根据文献^[15]修改如下:其中料液温度 35 °C,压力 0.15 MPa,超滤 50 min 为 1 个周期。得到 3 个组分,分别编号为 A1,A2,A3,其中 A1(>10 kDa),A2(3~10 kDa),A3(<3 kDa)。将得到的组分进行冷冻干燥处理,测其在大肠杆菌和沙门氏菌抑菌圈及细胞膜通透性的影响。

(2) 凝胶色谱分离:取超滤分离得到,具有最佳抑菌性的组分,经过 0.02 μm 微超滤过滤后在蛋白纯化系统中经 Superdex peptide 10/300(10×300 mm)凝胶色谱分离,分离条件根据文献^[16]修改如下:柱温为室温,检测波长 215 nm;流动相 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲溶液,pH 7.0,等梯度洗脱,样品浓度 10 mg/mL,进样体积 0.5 mL。收集各洗脱峰。将得到的组分进行冷冻干燥处理后测其在大肠杆菌和沙门氏菌的抑菌圈及细胞膜通透性的影响。

(3) 反相液相色谱分离:取凝胶色谱分离得到,并具有最佳抑菌性组分利用反向柱进一步纯化,色谱条件:柱温为室温,检测波长 254 nm;流动相 A 为 2% 乙腈—水(含 0.1% TFA),流动相 B 为乙腈(含 0.1% TFA),洗脱梯度:0%~40% B,样品浓度 0.5 mg/mL,进样体积 0.5 mL。多次收集合并各尖峰,测定其对菌液的抑菌性,选择活性较高的组分进行序列分析^[17]。

(4) 二级质谱结构鉴定:采用二级色谱确定最终卵白蛋白源抗菌肽一级结构,色谱条件:C₁₈ 柱(0.15 mm×150 mm);洗脱液 A(0.1% 甲酸)、B(含 0.1% 甲酸的 85% 乙腈溶液),流速 60 μm/min。质谱条件根据文献^[2]修改如下:喷雾电压 3.4 kV,源温 170 °C,扫描范围 400~2 000 Da,动态排除时间 1.5 min。

1.3.3 抗菌肽合成及活性 根据质谱对氨基酸序列分析结果,委托旭帆生化公司采用 Fmoc 固相合成法,合成多肽。合成肽与步骤 1.3.2(3)中制得的最佳抑菌肽段进行抑菌性对比。

1.3.4 抗菌肽抑菌性测定

(1) 抑菌圈直径测定:将培养至对数期的大肠杆菌和沙门氏菌配成 10⁵ CFU/mL 的悬浊液,均匀涂布至琼脂培养基上。直径为 6 mm 的无菌滤纸片在卵白蛋白、卵白蛋白水解物及各步骤分离纯化得到的组分溶液中(蛋白浓度 2.0 mg/mL)浸泡 10 s 后,置于培养基表面,在 37 °C 培养箱内倒置培养 24 h,培养结束后测定样品的抑菌圈直径^[18]。

(2) 菌液电导率的测定:取 10⁵ CFU/mL 大肠杆菌或沙门氏菌菌液 0.5 mL 于 15 mL 无菌试管中,加入 10 mL 去离子水,分别添加质量浓度为 10 mg/mL 的卵白蛋白、卵白蛋白水解物及各步骤分离纯化得到的组分 5 mL,在 15 min 时测定其电导率^[19]。

(3) 菌液还原糖含量的测定:取 10⁵ CFU/mL 大肠杆菌或沙门氏菌 2.0 mL 及 2 mL 样品溶液(10 mg/mL)至

乳糖胆盐培养基中,37℃恒温培养3h后取出,于6000 r/min离心15 min,取上层清液采用直接滴定法^[20]测定还原糖含量。

(4) 菌液可溶性蛋白的测定:取 10^5 CFU/mL大肠杆菌或沙门氏菌菌液10 mL,分别添加质量浓度为10 mg/mL的样品溶液2 mL,处理8 h后,取3 mL各处理组的菌液,在-20℃冰箱中冷冻12 h,加入0.01 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)缓冲液,采用牛血清蛋白浓度一吸光度标准曲线法测定可溶性蛋白^[21],吸取0.1 mL各处理组菌液于10 mL试管中,加入5 mL考马斯亮蓝G250染色剂,混匀后放置2 min,在595 nm测定其吸光值,从标准曲线查得相应样品的蛋白含量。

1.3.5 统计分析 本试验涉及的试验均设计为3次平行,结果用平均值及标准差形式表示($\bar{x} \pm S$),组间差异显著性采用 t 检验分析(显著 $P < 0.05$)。数据统计分析利用SPSS 17.0软件的统计功能处理。

2 结果与分析

2.1 卵白蛋白水解物的纯化及其分离组分的抑菌性

2.1.1 超滤分级及其分离组分的抑菌性 当微生物受到外界作用,细胞膜结构遭到破坏,细胞内小分子的离子(K^+ 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 等)从细菌细胞中大量渗出,电解质的渗漏会致使菌液电导率上升^[22];当细胞膜被破坏至一定程度,较大分子量的还原糖会渗出,导致菌液中可溶性含量增加;可溶性蛋白是细胞生长的必要营养素之一,其数值的变化可反映菌体蛋白质合成的情况^[23]。卵白蛋白水解物通过两步超滤依次透过10、3 kDa超滤膜^[17],得到3个组分分别为A1($M_r > 10$ kDa)、A2(3 kDa $< M_r < 10$ kDa)和A3($M_r < 3$ kDa)。

从图1可知,抑菌圈直径显示A3相比粗水解物及其他组分对大肠杆菌和沙门氏菌的抑菌性最为明显($P < 0.05$)。通过电阻率可知,粗水解物及其3种组分均可造成两种菌体内内容的渗漏,改变菌体的细胞膜通透性,从而使得菌液培养基的电阻率增加。且A3对两种菌体的通透性影响显著高于其他组分($P < 0.05$),并对大肠杆菌细胞膜通透性影响高于沙门氏菌。从可溶性蛋白和还原糖的含量变化可知,在相同浓度下A3对大肠杆菌蛋白合成的抑制作用最为明显,且菌液渗透到胞外的还原糖最多,再次说明A3对大肠杆菌和沙门氏菌有破坏作用。在相同浓度条件下,分子量小的组分,表现为较高的抑菌性,与Chen等^[2]研究结果一致。因此选择A3组分进行下一步分离纯化。其中A1、A2、A3肽得率分别为14.96%、15.27%、50.46%。

2.1.2 凝胶色谱分离及其分离组分的抑菌性 将A3组分经过10/300凝胶色谱分离,结果如图2所示,测分离得到的4个主要峰的抑菌性,分别标记为B1、B2、B3、B4。

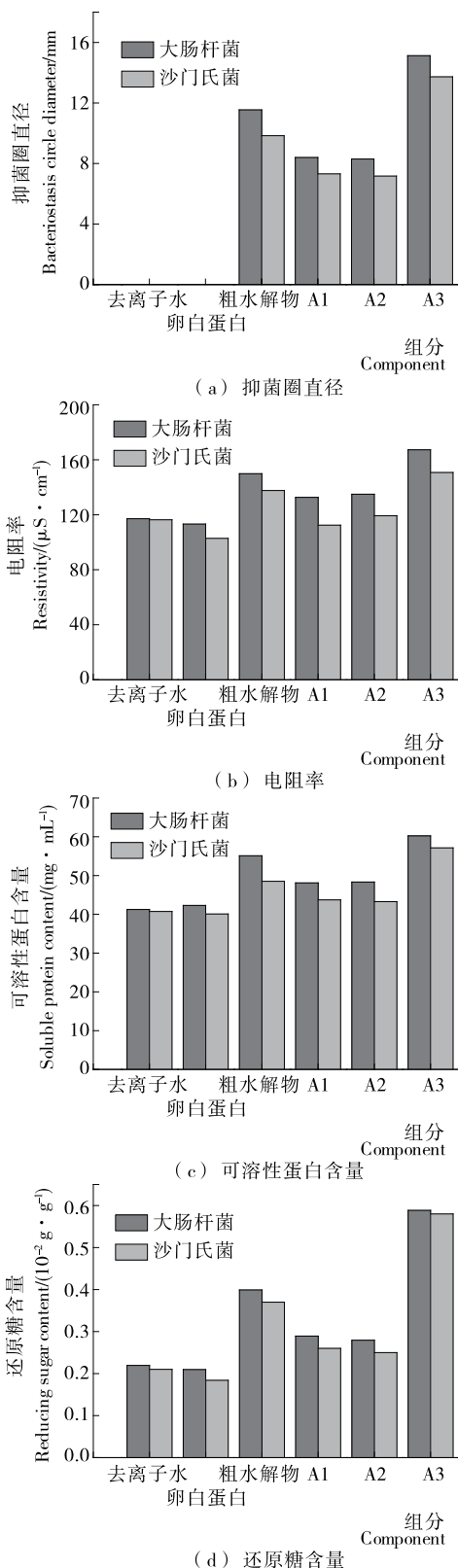


图1 超滤分离组分的抑菌活性比较

Figure 1 The antibacterial activity of each components on ultrafiltration

由图 2 可知, B3 峰面积最大, 所占比例最多。其中 4 个组分对两种菌的抑制作用, 如图 3 所示。由图 3 可知, B3 相比其他组分对两种菌的抑菌性最为明显, 对比抑菌圈直径, B3 组分抑菌效果显著超过粗水解物及其经过凝胶色谱分离得到的其他组分 ($P < 0.05$)。通过对比电阻率可知, 在相同浓度条件下 B3 组分对两种菌体的细胞膜通透性改变最显著 ($P < 0.05$), 其次为 B1 组分, 最差为 B2 组分。其中添加了 B3 的两种菌液培养基内可溶性蛋白和还原糖的含量最高, 对大肠杆菌通透性影响最为明显。再次证明 B3 对两种菌的细胞膜破坏作用最为明显。因此选择 B3 组分进行下一步分离纯化。其中 B1、B2、B3 和 B4 肽得率分别为 21.38%, 16.65%, 47.01%, 14.95%。

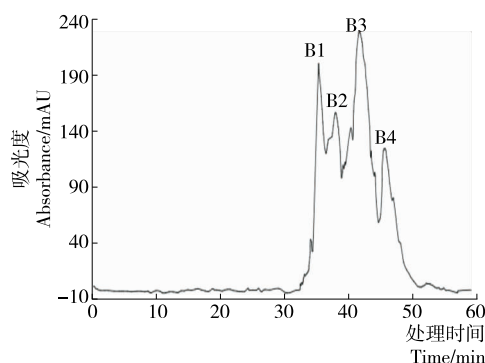


图 2 Superdex peptide 10/300 对 A3 组分的分离曲线
Figure 2 Chromatogram of A3 separated on Superdex peptide 10/300

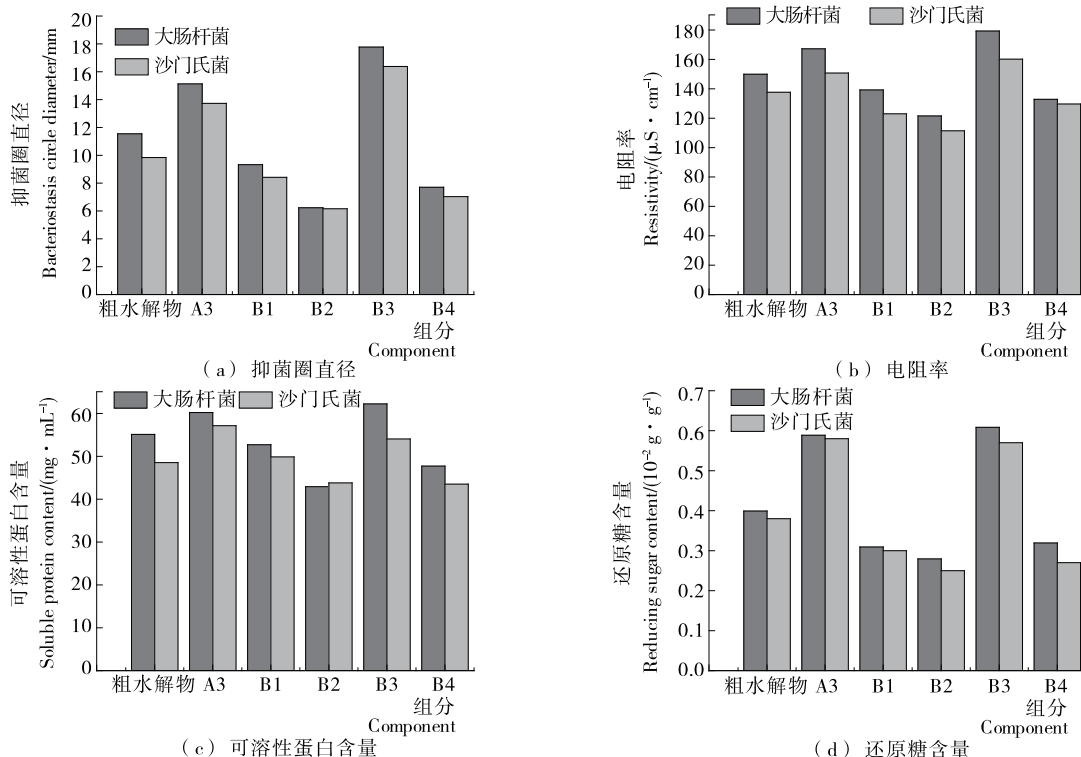


图 3 Superdex peptide 10/300 分离组分的抑菌活性比较

Figure 3 The antibacterial activity of each fraction separated on Superdex peptide

2.1.3 反相高效液相色谱分离及其分离组分的抑菌性

将凝胶色谱柱 100/300 分离得到的抗菌活性最高的 B3 组分经过反相色谱进一步纯化。得到 9 个主要的吸收峰, 如图 4 所示, 分管收集洗脱液, 测定各组分对大肠杆菌和沙门氏菌的抑菌性, 结果如图 5 所示。

由图 4 可知, C3 峰面积最大, 所占比例最多。从图 5 可知, 不同洗脱组分呈现出不同的抑菌能力, 在所收集的 9 个组分中, C3 和 C6 的抑菌圈直径明显超过其他组分 ($P < 0.05$)。通过对比电阻率可知, 在相同浓度条件下, C3 对两种细菌细胞膜通透性的影响最显著 ($P < 0.05$), 其菌液中可溶性蛋白和还原糖的含量变化也最为显著, 并

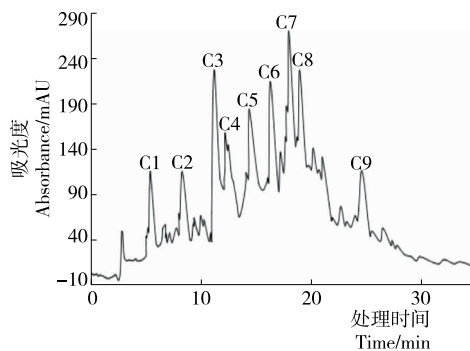


图 4 反相液相色谱对 B3 组分的分离曲线

Figure 4 Chromatogram of B3 separated on RP-HPLC

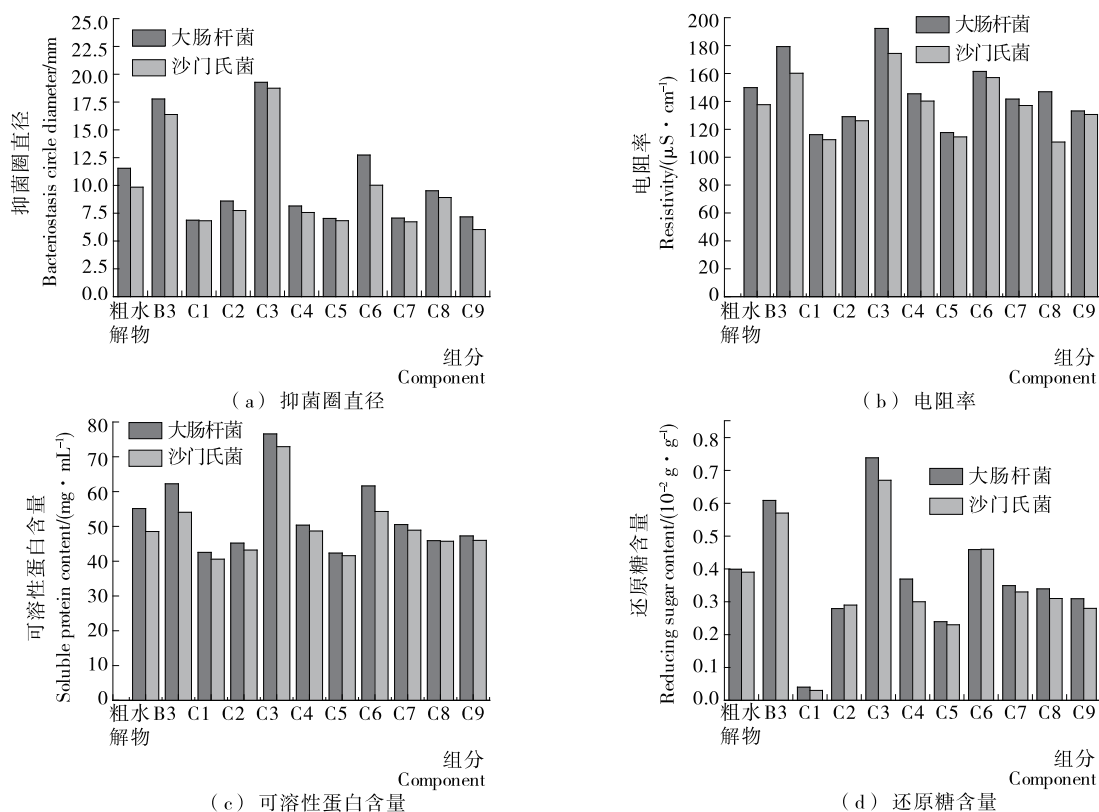


图5 反相色谱柱分离组分的抑菌活性比较

Figure 5 The antibacterial activity of each fraction separated on RP-HPLC

对大肠杆菌细胞膜通透性影响高于沙门氏菌,证明 C3 对两种菌的抑制作用最为明显。而 C6 的抑菌能力略低于 C3。

试验证明卵白蛋白水解物对全蛋液中常见的大肠杆菌和沙门氏菌均会破坏其细胞膜的通透性,抑制其蛋白质合成,使菌液中的还原糖渗透出细胞,从而起抑制作用,与唐文婷等^[9]、Pellerini 等^[10]的研究结果一致。

2.1.4 卵白蛋白源抗菌肽的质谱鉴定和分析 图6为经RP-HPLC分离得到的C3组分在总离子图中分别提取基峰得到MS/MS图谱。C3组分进行ESI-MS/MS分析,

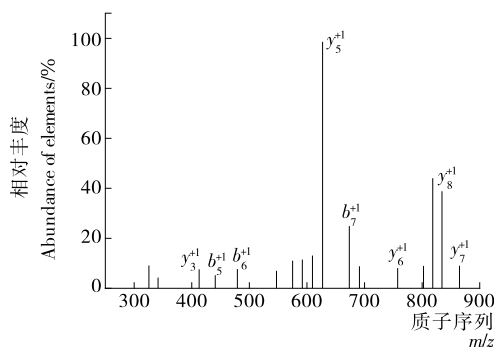


图6 C3组分的串联二级质谱图

Figure 6 Tandem mass spectrum of peak C3

通过测序的方法得到一个具有很高抑菌性的肽段,氨基酸序列为 Gly-Leu-Glu-Pro-Ile-Asn-Phe-Gln, 预测分子质量为 898.42 Da。

2.2 卵白蛋白源抗菌肽的固相合成及活性验证

在得到 C3 组分的氨基酸序列后,合成抗菌肽 GLESLNFQ,其纯度为 95.84%, 相对分子质量实际为 887.83 Da。

由图7可知,经过固相合成的抗菌肽与C3组分对大肠杆菌及沙门氏菌的抑制能力无显著性差异($P > 0.05$),从而证明卵白蛋白源抗菌肽发挥抑菌活性的成分主要为 GLESLNFQ 肽段。

3 结论

本研究通过酶解卵白蛋白制备具有抑菌活性的粗酶解物。通过超滤、凝胶色谱分离技术得到具有较强抑菌性的 B3 组分,进而采用反相高效液相色谱纯化 B3 组分,得到纯化的 9 个组分,其中 C3 组分抑菌性最强。最终鉴定出氨基酸序列为 Gly-Leu-Glu-Pro-Ile-Asn-Phe-Gln (GLESLNFQ)的抑菌肽是卵白蛋白源抗菌肽发挥抑菌活性的主要成分,其分子质量为 887.83 Da。该肽经固相合成纯度为 95.84%,合成肽抑菌活性与 C3 组分无显著性差异。为卵白蛋白的深度开发及其抗菌肽的综合利用提

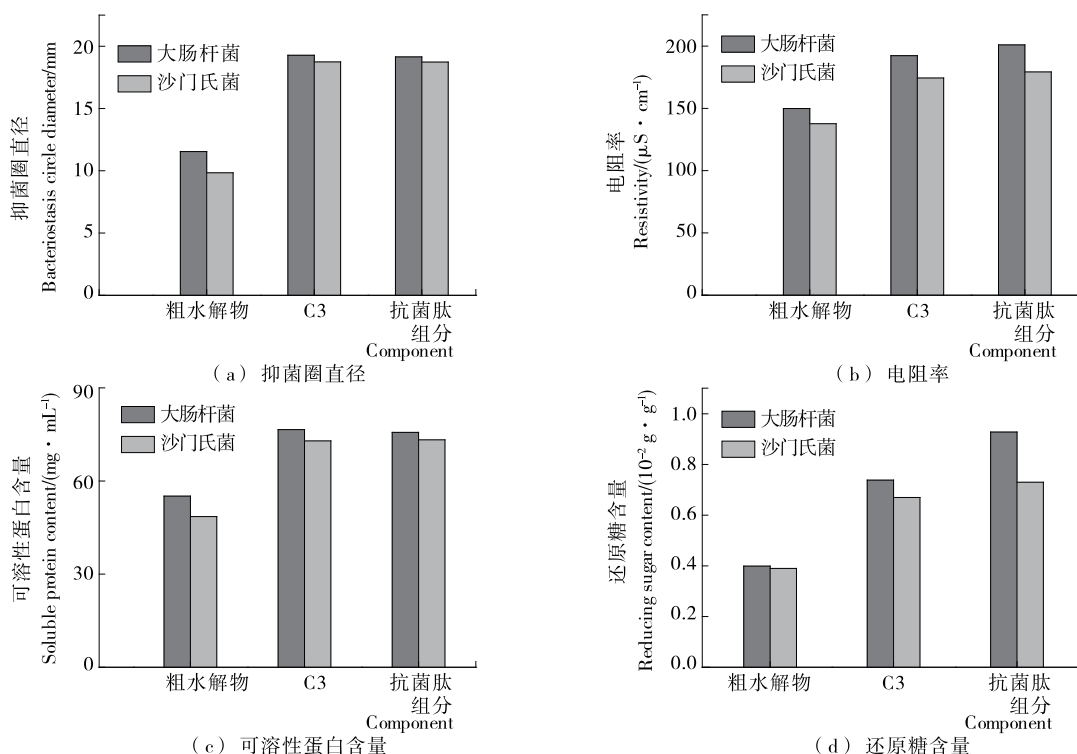


图 7 C3 组分与合成肽的抑菌活性比较

Figure 7 The antibacterial activity of the C3 and synthetic peptide

供理论依据。本研究仅限于卵白蛋白源抗菌肽对大肠杆菌和沙门氏菌活性的抑制效果,而未探讨制备的抗菌片段对革兰氏阳性菌的抑制影响,后续可研究抗菌片段对金黄色葡萄球菌等食品中常见的革兰氏阳性致病菌的抑制作用。

参考文献

- [1] ETSUSHIRO D, TAIHEI K, NAOFUMI K. Effects of limited proteolysis on functional properties of ovalbumin[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1987, 64(12): 1 697-1 703.
- [2] MARINA Z, MICHAEL F, JEHOSSUA K, et al. Relationship between functional properties and structure of ovalbumin[J]. Journal of Protein Chemistry, 1994, 13(2): 261.
- [3] 金红, 叶锐, 徐晶, 等. 抗菌肽对食品腐败菌抑制效果的研究进展[J]. 农产品加工, 2018, 3(5): 59-63.
- [4] HOU Li-xia, SHI Yong-hui, PEI Zhai, et al. Inhibition of foodborne pathogens by Hf-1, a novel antibacterial peptide from the larvae of the housefly (*Musca domestica*) in medium and orange juice[J]. Food Control, 2007, 18(11): 1 350-1 357.
- [5] 孟婷, 左伟勇, 郭成东, 等. 伴大豆球蛋白抗菌活性物质的分离及其对沙门氏菌的抑菌特性[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(4): 381-383.
- [6] 杨珮瑜. 黄鲫蛋白肽美拉德产物的抑菌机理及对小鼠免疫功能的影响[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2017: 24-25.
- [7] 王俊杰, 赵燕, 涂勇刚, 等. 蛋源性抗菌肽的研究进展[J]. 食品科学, 2013, 34(9): 399-403.
- [8] KOBAY A, HATTORI M, HAPA-KUDO Y, et al. Glycopeptide derived from hen egg ovomucin has the ability to bind enterohemorrhagic *Escherichia coli* O 157 : H7[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(18): 5 740-5 746.
- [9] 唐文婷, 张晖, 王立, 等. 卵白蛋白水解产物的抗菌性及抗氧化性[J]. 食品与生物技术学报, 2014, 33(3): 241-247.
- [10] PELLEGRINI A, HULSMIEIER A J, HUNZIKER P, et al. Proteolytic fragments of ovalbumin display antimicrobial activity[J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1 672(2): 76-85.
- [11] 王军, 庞广昌. 抗菌肽抗菌机理的研究现状及趋势[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 508-511.
- [12] LAMBERT R J W, SKANDAMIS P N, COOTE P, et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol [J]. Journal of Applied Microbiology, 2001, 91: 543-462.
- [13] ULTEE A, BENNIK M H J, MOEZELAAR R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(4): 1 561-1 568.

(下转第 86 页)

- [6] 农业部. 中华人民共和国农业部公告第 235 号[EB/OL]. (2002-12-24) [2019-03-28]. http://jiuban.moa.gov.cn/zwllm/tzgg/gg/200302/t20030226_59300.htm.
- [7] 国家食品药品监督管理局. 国家食品安全监督抽检实施细则: 2018 年版 [EB/OL]. (2018-01-24) [2019-03-28]. <http://samr.cfda.gov.cn/WS01/CL1605/223270.html>.
- [8] 杭学宇, 冯晓青, 汪怡, 等. 气相色谱法测定小龙虾中五氯酚[J]. 现代预防医学, 2014, 41(5): 803-805.
- [9] 唐宏兵, 欧阳富富. 固相微萃取一气相色谱法测定鱼肉中五氯酚[J]. 理化检验: 化学分册, 2011, 47(9): 1 026-1 028.
- [10] 张博, 梅勇, 邹晓雪, 等. 顶空固相微萃取一气相色谱法测定尿中五氯酚[J]. 环境与职业医学, 2016, 33(12): 1 187-1 190.
- [11] 史玉坤, 杨梅佳, 杨清华, 等. 气相色谱-质谱法快速检测水产品中五氯酚[J]. 中国食品卫生杂志, 2015, 27(1): 19-21.
- [12] 雍荣锋, 曹慧, 蔡丹丹. 全自动固相萃取-内标衍生一气相色谱-串联质谱法测定肉中五氯酚[J]. 江苏预防医学, 2017, 28(6): 619-621, 625.
- [13] 朱晓华, 梁倩, 王凯, 等. 气相色谱-负化学源质谱法测定河蟹中五氯苯酚及其钠盐的残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(9): 3 650-3 655.
- [14] 廖林川, 颜有仪, 林岚, 等. 高效液相色谱法检测生物样品中五氯酚[J]. 四川大学学报: 医学版, 2004, 35(3): 427-428.
- [15] 牛增元, 包艳, 叶曦雯, 等. 高效液相色谱法测定木材及其制品中的酚类防腐剂[J]. 分析实验室, 2009, 28(6): 57-60.
- [16] 欧天成, 郭艳芬, 陈少芬, 等. 高效液相色谱法同时测定水中挥发性酚(以苯酚计)、2,4,6-三氯酚、五氯酚[J]. 中国卫生工程学, 2018, 17(1): 55-57.
- [17] 陈晓红, 潘胜东, 金米聪. 固相萃取-超快速液相色谱串联质谱测定食品中五氯酚[J]. 卫生研究, 2018, 47(3): 440-445, 458.
- [18] 李淑红, 赵仕沛, 李迎芳. 直接进样超高效液相色谱-串联质谱法测定水中五氯酚[J]. 河南科学, 2014, 32(2): 169-171.
- [19] 闵剑青, 陈梅兰, 陈晓红, 等. 离子液体超声辅助萃取-LC/MS 法测定环境水中痕量五氯酚[J]. 分析测试学报, 2015, 34(4): 438-442.
- [20] 余宇燕, 张淑玲, 邹艳辉, 等. 五氯酚免疫层析检测试纸条的研究[J]. 分析测试学报, 2014, 33(7): 830-834.
- [21] 潘胜东, 陈晓红, 何仟, 等. 超高效液相色谱-高分辨质谱确证分析泥鳅体内五氯酚代谢物[J]. 色谱, 2017, 35(12): 1 245-1 250.
- [22] JIN Mi-cong, CHEN Xiao-hong, PAN Bing-xian. Simultaneous determination of 19 chlorophenols in water by liquid chromatography-mass spectrometry with solid-phase extraction[J]. Journal of Liquid Chromatography & Related, 2006, 29(9): 1 369-1 380.
- [23] 2002/657/EC. Commission decision of 12 August 2002 implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results[S]. [S.L.]: Official Journal of the European Communities, 2002.
- [24] 张盼, 苏福海, 戴新华, 等. 棉类纺织品中痕量五氯酚的液相色谱-同位素稀释质谱法测定及不确定度评定[J]. 分析测试学报, 2010, 29(9): 953-957.
- [25] GONZÁLEZ Oskar, BLANCO María-Encarnación, IRIARTE Gorka, et al. Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect[J]. Journal of Chromatography A, 2014, 1 353: 10-27.
- (上接第 6 页)
- [14] GUNES H, GULEN D, MUTLU R, et al. Antibacterial effects of curcumin: an in vitro minimum inhibitory concentration study[J]. Toxicology & Industrial Health, 2016, 32(2): 246-250.
- [15] BAO Zhi-jie, CHENG Yuan, CHI Yu-jie. Preparation of microencapsulated egg albumin antioxidant peptide with Multi-phase emulsion method[J]. China Poultry, 2016, 38(4): 29-33.
- [16] GÉSAN-GUIZIOU G, JIMENEZ A, ARCELIN C. Cake properties in dead-end ultrafiltration of casein micelles: determination of critical operating conditions [J]. Desalination, 2017, 199(1): 20-22.
- [17] DESBRIERES J, MAZET J, RINAUDO M. Gel permeation chromatography on polyelectrolytes in aqueous solution[J]. European Polymer Journal, 2017, 18(3): 269-272.
- [18] 张养军, 王京兰, 李蕾, 等. 用反相液相色谱分离多肽时峰容量与色谱柱长度关系的研究[J]. 色谱, 2004, 22(1): 24-26.
- [19] 谭才邓, 朱美娟, 杜淑霞, 等. 抑菌试验中抑菌圈法的比较研究[J]. 食品工业, 2016, 37(11): 122-125.
- [20] 宁初光, 杨洋, 吴小勇. 电导率法快速检测食品细菌总数的研究[J]. 现代食品科技, 2012, 28(2): 237-240.
- [21] XIE De-ao. Determination of reducing sugar content in wine by potentiometric titration[J]. Food Engineering, 2007, 3(4): 61-63.
- [22] WANG Jun-gang, CHEN Guo-cang, ZHANG Cheng-lie. The effects of water stress on soluble protein content, the activity of SOD, POD and CAT of two ecotypes of reeds (Phragmites communis)[J]. Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica, 2002, 22(3): 561-565.
- [23] MARUTHUPANDY M, ANAND M, MADURAIVEE-RAN G, et al. Electrical conductivity measurements of bacterial nanowires from Pseudomonas aeruginosa [J]. Advances in Natural Sciences Nanoscience & Nanotechnology, 2015, 6(4): 045007.