

分子模拟技术在小分子免疫检测方法研究中的应用

王伟华, 雷红涛, 孙远明

(华南农业大学食品学院/广东省食品质量安全重点实验室, 广东广州 510642)

摘要: 量子力学法、分子力学法、蒙特卡洛法和分子动力学法是 4 种常用的分子模拟技术。本文重点综述了分子模拟技术在小分子免疫检测方法研究中的应用, 分子模拟技术能够更好地研究抗原抗体反应中的分子间作用力, 促进抗原抗体反应识别机制研究的深入进行, 能够解释抗体的交叉反应率, 从而能应用于提高抗体宽谱性提高的研究。

关键词: 分子模拟; 免疫检测方法; 识别机制

文章编号: 1673-9078(2010)1-102-7

Application of Molecular Modeling Technique in development of Small Molecular Immunity Examination Methods

WANG Wei-hua, LEI Hong-tao, SUN Yuan-ming

(College of Food Science, Key Laboratory of Food Quality and Safety of Guangdong Province, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In this article, several molecular modeling methods were systematically reviewed including quantum mechanics method, molecular mechanics method, Monte Carlo method and molecular dynamics method. The application of molecular modeling technique in the study of the small molecular immunity examination methods was explored. It was found that molecular modeling could enhance the intermolecular action between antigen and antibody well, advanced the research of the recognition mechanism of immunoreaction was advanced, and improve broad specificity of antibody.

Key words: molecular modeling; Immunity examination method; Recognition mechanism

免疫分析是利用抗原抗体之间特异性的结合反应对化合物进行检测的分析技术。由于其无需昂贵的仪器设备、操作简便快捷, 因而在农畜产品农兽药残留现场筛选和大量样本的快速监测中显示出独特优势。目前在有关小分子化合物的免疫分析方法的研究中, 对于免疫原的合成多是采用将待测物衍生化的方法或是在化合物容易进行化学改造的部位引入连接臂从而形成半抗原, 这些设计方法均带有很大的经验性和随意性, 其形成的抗体往往对目标农兽药的亲和力低、特异性差^[1-2]。针对这一问题, 近年来研究者不断将一些新的设计手段引入到半抗原的设计中, 同时也对抗原抗体免疫反应的识别机制做了一些研究, 其中以运用分子模拟技术取得的成果最为突出。

收稿日期: 2009-10-08

基金项目: 国家“863”计划(2006AA10Z447)、国家自然科学基金(20877029)和粤港关键领域重点突破招标项目(2006A25005002)

作者简介: 王伟华(1977-), 女, 讲师, 博士研究生, 研究方向为: 食品质量与安全

通讯作者: 孙远明(1956-), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品质量与安全

分子模拟是一种根据实际体系, 在计算机上进行的实验, 通过比较模拟结果与实际体系的实验数据来检验模型的准确性, 并可检验由模型导出的解析理论所作的简化近似是否成功。用分子模拟不但可以模拟现实中能进行的实验过程, 而且可以用来模拟、研究如分子在各种表面上的动态行为、玻璃态的分子结构、分子运动的特征、蛋白质的折叠等现代物理实验方法难以计量的物理现象与物理过程。分子模拟最先是应用于生物分子领域^[3], 20 世纪 70 年代, 由于生物分子学技术的进步, X 射线、NMR 等技术的使用, 使得研究生物分子的内部结构成为可能。

分子模拟技术已经成为小分子免疫检测方法研究的前沿阵地, 但目前国内对相关内容介绍尚不完善, 因此, 本文综述了分子模拟技术的理论和方法, 旨在为其在小分子免疫检测方法研究中的应用提供理论依据。

1 分子模拟的技术

分子模拟技术是凭借合理的分子结构模型与物理

原理计算出客观事物变化的过程与结果,即利用分子力学、分子动力学和量子力学理论等一定的理论机制直接计算或者借助实验数据确定分子构象或者相关的分子与分子、分子与体系、分子与原子的相互作用或动态行为并通过计算机图形可视化技术模型显示这种空间模型或相互作用。它是不同于试验和理论方法的第3种科学研究的方法。一般说来,分子模拟技术主要有4种:量子力学方法、分子力学方法、分子动力学和分子蒙特卡洛方法^[4,5]。

1.1 量子力学法

量子力学方法是基于量子力学的分子模拟,它借助计算分子结构中各微观参数,如电荷密度、键序、轨道、能级等与性质的关系,设计出具有特定性能的新分子,它们的共同点是对电子的相互作用采用量子化学的知识进行描述,这种方法有很强的理论基础。

1.2 分子力学法

分子力学是通过分子力场这个分子模拟的基石来实现的。分子力学法是在分子水平上解决问题的非量子力学方法。原理是分子内部应力在一定程度上反映被计算分子结构的相对位能大小。分子力学法可用来确定分子结构的相对稳定性,广泛地用于计算各类化合物的分子构象、热力学参数和谱学参数。

1.3 分子动力学法

分子动力学模拟的基本原理是建立一个合适的粒子系统,利用牛顿运动方程确定系统中粒子的运动,通过求得粒子动力学方程组的数值解,决定系统中各个粒子在相空间中的运动规律,然后按照统计物理和热力学原理得出系统相应的宏观物理特性。

1.4 蒙特卡洛法

蒙特卡洛法因利用“随机数”对模型系统进行模拟以产生数值形式的概率分布而得名,作为一种独立的方法,20世纪40年代中期才开始发展,与一般计算方法的主要区别在于它能比较简单地解决多维或因素复杂的问题,它要利用统计学中的许多方法,因此,蒙特卡洛法是数理统计与计算机相结合的产物。

1.5 四种方法的相互关系

量子力学方法能得到有关立体构型和构象的可靠信息,可以描述电子结构的变化;分子力学法研究的是体系的静态性质,描述基态原子结构的变化,得到比分子动力学更精确的值;分子动力学能研究体系中与时间和温度有关的性质,是动态性质,它既克服了

蒙特卡洛法仅能够描述不同温度下分子结构的特征,却不能描述不同温度下体系从一种热力学状态向另一种热力学状态演变过程的缺点,也克服了量子力学法中仅能计算绝对温度零度的真空中的孤立分子和分子力学只能计算绝对温度零度的分子体系等问题,能计算任何温度下分子体系的结构与性质;蒙特卡洛法的误差容易确定,计算量没有分子动力学那样大,费时少,就获取某种状态的统计平均结构这一点而言,蒙特卡洛法往往比分子动力学更有效。四种模拟方法构成了与分子模拟密不可分的组成部分。

2 分子模拟技术在小分子免疫检测方法研究中的应用

2.1 分子模拟技术在半抗原的设计中的应用

2.1.1 分子模拟在同源分析免疫原设计中的应用

同源分析是指用同一种半抗原制备的人工抗原与相应的抗体进行的免疫分析。目前对于同源分析中免疫原的设计多采用“试错法”,即采用预先设计的几个半抗原免疫动物,通过获得的抗体来评价半抗原的优劣。该方法工作量大,需要依靠经验进行设计,偶然性比较大。针对这种情况,有研究者^[6-10]根据抗原-抗体之间的识别作用是基于由分子的电子特性所决定的原子空间排列及其相互作用,提出了一个合理假设,认为若化合物与偶联物抗原决定簇部分的结构相似度越高,则该化合物与相应抗体之间的亲和力越好。从而可以通过比较偶联物相应区域与待分析物的空间结构及电子构型来进行半抗原设计,并通过PCA(Principal component analysis,主成分分析)来确定最佳半抗原,以获得高特异性的抗体。Delaunay-Bertoncini等^[6]采用此方法对三嗪类化合物进行了研究,先计算基于莠灭净(ametryn)设计的免疫原(based on ametryn)与其他三嗪类农药的电子分布以及分子体积(图1),再进行PCA分析(图2)。从PCA图可以明显看出与免疫原相似度高的扑草净(prometryn)、莠去津(atrazine),其次是扑灭津(propazine)、特丁净(terbutryn)、另丁津(sebutylazine)等。Delaunay-Bertoncini等指出农药分子与免疫原距离越近,即分子间相似度越高,则相应的农药与免疫原产生的抗体之间亲和力越高,进一步的免疫实验证实了该结论。

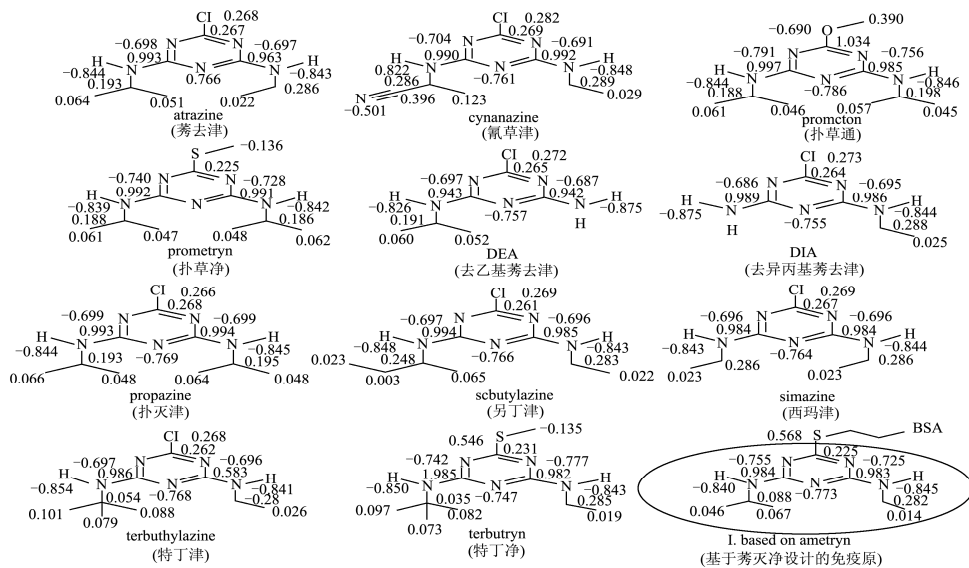


图 1 免疫原和其他三嗪类农药的电荷分布

Fig.1 Charge distribution of immunogen and triazines

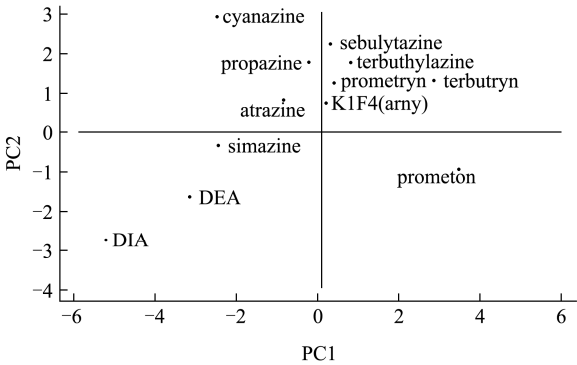


图 2 基于莠灭净设计的免疫原(K1F4)和三嗪类农药的主成分分析(PCA)结果

Fig.2 PCA analysis of ametryn-based immunogen (K1F4) and triazines in plane of the first two principal components

2.1.2 分子模拟在异源分析的竞争原设计中的应用

异源分析是指由同一种分析物的不同半抗原所得的抗体分别与不同半抗原所制备的包被原或标记抗原进行的免疫分析。如何找到结构适宜的竞争原已成为发挥异源分析优越性的关键所在，分子模拟技术是较好解决这一问题的手段之一。

Galve R 研究小组^[11-13]近年来利用分子模拟技术对氯苯酚类化合物的半抗原设计进行的系列研究最为有代表性和系统性。他们设计了 3 种半抗原并对 2, 4, 6-TCP (2,4,6-三氯苯酚) 进行免疫分析(图 3)。通过 Hyperchem 优化分子构型, 得到了能量最低的分子构象后计算了分子总电荷, 然后计算出 pKa 值。另外为了从热力学角度比较半抗原之间的差异, 计算了每个半抗原的两种生成焓: $\Delta H_f(\text{ArOH})$ 、 $\Delta H_f(\text{ArO}^-)$, 以及去质子化作用的焓变(deprotonation enthalpies,

DPE)。通过这种分子模拟分析, 半抗原(Hapten) A 由于各项指标与待分析物相似度最高而被认为是最佳免疫原, 同时通过免疫实验验证了该结论。在选定最佳免疫半抗原结构的基础上, Galve 又设计了 5 个竞争原结构(图 4), 并将比 Hapten A 的间隔臂少一个碳原子的半抗原 Hapten 5 同时作为免疫半抗原用以制备抗体。通过分子模拟的方法对设计的竞争原与分析物(2,4,6-TCP)的异质性差异进行了比较, 参数采用几何结构参数和电荷参数, 采用分子模拟方法对异质性的计算结果为: Hapten 2>Hapten 1>Hapten 3>Hapten 4>Hapten 5。而 ELISA 试验结果表明: 免疫原与竞争原的异质性最高的组合免疫分析方法最佳, 即 Hapten 5(免疫原)/Hapten 2(竞争原)的组合最佳; 两者之间的异质性与灵敏度、特异性有一定的相关性。

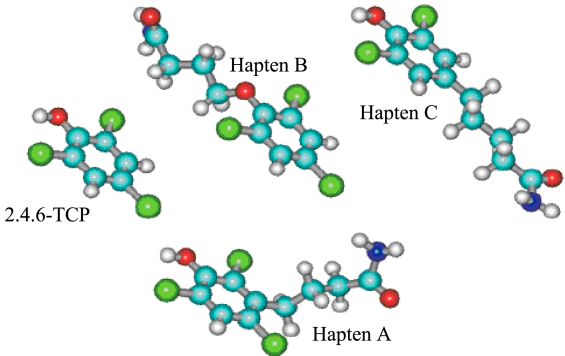


图 3 2, 4, 6-TCP 及其 3 种免疫半抗原的结构式

Fig.3 Chemical structures of 2,4,6-TCP and three haptens

注: 蓝色代表碳原子, 绿色氯原子, 红色氧原子, 白色氢原子

Note: Light blue:carbon; green:chlorine; red:oxygen;

white: hydrogen

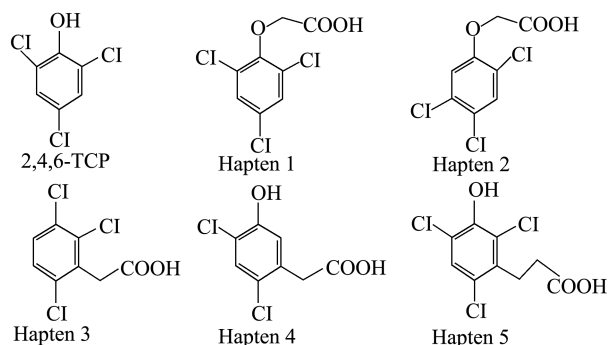


图4 2,4,6-TCP的5个竞争原结构

Fig.4 Chemical structures of 2,4,6-TCP and five competitors

2.2 分子模拟技术在抗原抗体识别机制中的应用

Newman 和 Price 等^[14]对抗原-抗体之间结合的分子机理、尤其针对小分子进行了较深入的研究。他们采用分子模拟方法研究了化合物的三维构型、疏水性、电子特性等能够影响抗原-抗体分子间作用力（主要是氢键、范德华力、疏水作用、静电势）的因素，以便能更好地了解抗原-抗体之间的作用机理，同时提出免疫分析与数学和统计学工具相结合将大大提高半抗原筛选的工作效率。

Wedemayer 等^[15]采用分子模拟技术从结构上分析了一种抗体结合位点的变化。他的研究得到一个胚系抗体 Fab 片段的晶体结构和其与半抗原复合物的晶体结构。这个胚系抗体对应的具有成熟亲和力抗体为 48G7，相比于胚系抗体，它和半抗原的亲和力提高了 30,000 倍，这是由于其中 9 个位点突变（图 5）而造成的。将 48G7 的晶体结构与胚系抗体晶体结构进行比较分析，发现在结合半抗原时，胚系抗体结合位点有明显的构象变化，而 48G7 在结合半抗原时符合“锁钥”结合机制。这些距离半抗原 15 Å 以内的点突变使到抗体结合位点的重排不断优化。这些结果表明，胚系抗体存在很多结合位点构象，通过结合半抗原和基因突变，胚系抗体的结合半抗原的能力不断提高，其结合位点最终稳定，并且和半抗原形成最优的构象互补（图 6）。

Ranieri 等^[16]的研究是通过 WAM 和 SWISS 模型同源模建方法获取 D 型氨基酸抗体 67.36 的抗原结合位点的结构。研究发现 WAM 同源模建所得到的抗体结构模型不能应用于分子对接实验，而 SWISS 方法所得到的模型成功实现分子对接（图 7）。在考虑了

SWISS 模型的结合位点侧链残基的柔性的情况下，可以发现该模型对 D-对映异构体模型存在手性选择性。模型中可以看出，抗体和配体复合物当中存在四个氢键和大量的疏水作用，而且结合位点当中的色氨酸和酪氨酸和配体存在堆积作用。荧光光谱分析当配体结合在抗体上这一过程能引起抗体内色氨酸在 350 nm 的发射光，从而证明了抗体的结合位点确实存在色氨酸。通过模型可以发现，L 型氨基酸配体由于空间位阻的原因，不能结合在构建好的抗体模型里。此外，分子对接实验还发现 D-苯丙氨酸等其它 D-型氨基酸都是以同样方式实现对接，进一步证明模型的可靠性。

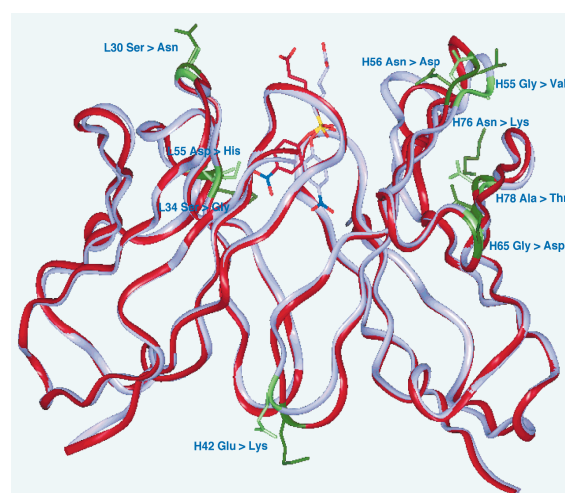


图5 48G7 的9个突变位点

Fig.5 Nine evolution combining site of 48G7

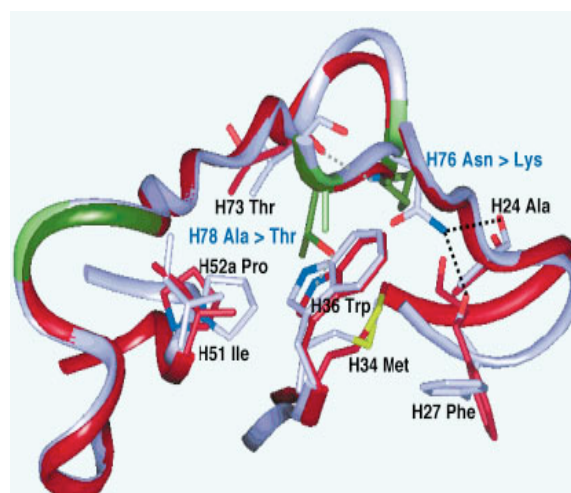


图6 胚系抗体与半抗原结合的构象

Fig.6 Combining conformations of embryo antibody and hapten

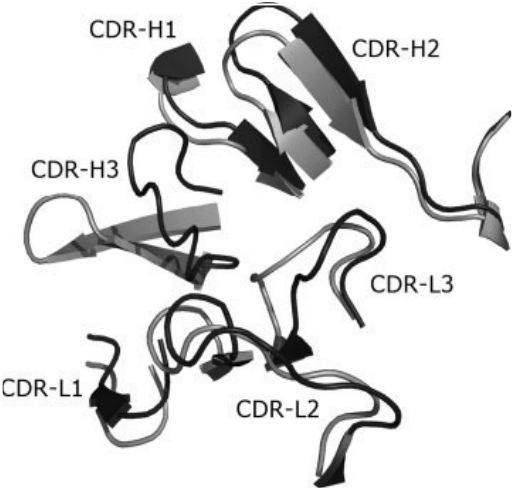


图 7 WAM 模型和 SWISS 模型模拟的结果

Fig.7 Simulation model of WAM and SWISS

注：WAM 模型灰色飘带，SWISS 模型为黑色飘带

2.3 分子模拟技术在抗体制备中的应用

表 1 不同磺胺药物与磺胺单克隆抗体的交叉反应性

Table 1 cross-reactivity of various sulfonamides with MAb

Sulfa-1		
Competitor	IC ₅₀ (ng/well)	%Reactivity
SNT	0.141	4801.42
SPY	2.28	296.93
SUL(hapten)	6.77	100.00
STZ	32.2	21.02
SIM	313.6	2.16
SMR	374.3	1.81
SSZ	430.5	1.57
SCP	436.0	1.55
SDZ	976.3	0.69
SAT	1434.9	0.47
SDM	1572.4	0.43
N ⁴ -ASPY	1596.7	0.42
N ⁴ -ASAM	2000	0.34
SQX	2500	0.27
SAM	6000	0.11
SMX	6000	0.11
SMZ	7000	0.10
N ⁴ -ASMZ	7000	0.10
SMT	7000	0.10
SBM	10000	0.06
SFX	20000 ^a	0.03
SAA	n.i. ^b	0.00

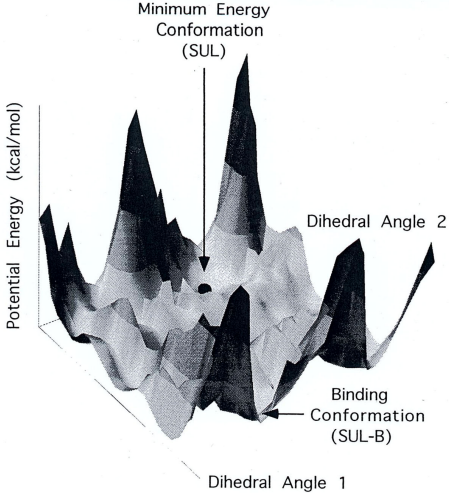


图 8 对交叉反应药物分子模拟的结果

Fig.8 Molecular model of various sulfonamides

目前，分子模拟的方法已经成为解释抗体交叉反应率结果的辅助工具，这些交叉反应率常常是试验前没有预计到的。使用分子模拟的方法对交叉反应试验结果进行分析，能够帮助改进半抗原设计，从而进一步提高抗体的亲和力和特异性。在一些研究中，分子模拟技术帮助研究者提高了抗体的宽谱性，为多残留免疫检测方法的发展提供了一条新的思路^[17-20]，这也是分子模拟技术在半抗原设计中未来的发展热点。

Spink 等^[21]通过分子模拟研究很好地解释了抗氨苯磺胺抗体的特异性比其预计高很多的原因，在于设计的半抗原对目标化合物的决定簇部分模拟程度高。Muldoon 等^[22]也获得了相似的结果，每一种药物都有不同的交叉反应率（表 1）。通过对交叉物的分子模拟（图 8），研究得出抗体与交叉物之间的结合主要受分子立体效应和电性效应的影响。这些研究表明，在同时进行几种分析物的多残留免疫分析方法中，分子模拟技术的优势是显而易见的，该方法能够为半抗原设计、半抗原对载体分子结合位点的识别提供大量的信息。

3 展望

分子模拟和计算机辅助药物设计是当前计算生物学的热点问题，也是计算机生物学与生物医药产业结合最紧密的方向。目前，高性能计算在分子模拟和计算机辅助药物设计领域主要有两个方面的应用，一是通过计算机药物设计和筛选方法进行药物发现，即首先建立化合物分子的骨架数据库，然后设计化合物组成数据库或者直接使用商业数据库，通过已经建立的计算机虚拟药物筛选技术平台，筛选出化合物结构进行类药性分析和三维定量构效关系分析，获取进

一步结构优化的信息。二是用分子动力学模拟方法进行蛋白质动态模拟, 计算生物学运用大规模高效的理论模型和数值计算, 直接从蛋白质序列预测蛋白质三维结构以及动力学特征, 通过计算生物学研究蛋白和蛋白相互间的分子识别, 包括药物与多种蛋白结合, 药物调控靶标信号途径的特性, 可以获得正确的药物设计蛋白质构象, 了解蛋白结构与功能的关系。

分子模拟技术正处在这样一个交叉学科的新生长点上, 国际上的动向集中在四个方面: 一是用分子模拟技术来“扫荡”大分子计算中以往尚不能解决的理论问题与实验问题; 二是用分子模拟技术来代替以往的化学合成、结构分析、物性检测等实验而进行新材料与分子的设计; 三是分子模拟方法本身的不断发展; 四是扩大计算机模拟的应用范围。如何从物理学科、材料学科和生命科学等交叉领域去发展分子模拟技术是众尚需进一步探索的问题。

参考文献

- [1] Basta P V, Adcock A F, Tallent C R, Fleming D N, Seltzman H H, Whisnant C C, Cook C E. Preparation of monoclonal antibodies reactive to the endogenous small molecule, anandamide[J]. *Immunol Methods*, 2004, 285(2):181-195
- [2] Beier R C, Stanker L H. Immunoassays for Residue Analysis: Food Safety[M]. American Chemical Society, Washington, DC, USA, 1995:423-438.
- [3] Birk J P, Casanova J. Computer-based molecular modeling in the curriculum [J]. *Journal of Chemical Education*, 1993, 70(11):904-909
- [4] Dewar M J S, Zebisch E G, Healy E F, Stewart J J P. J. Development and use of quantum mechanical molecular models [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1985, 107: 3902-3909
- [5] Zimmerman S B, Minton A P. Macromolecular crowding: biochemical, biophysical, and physiological consequences [J]. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 1993, 22:27-65
- [6] Delaunay-Bertoncini N, Pichon V, Hennion M C. Experimental comparison of three monoclonal antibodies for the class-selective immunoextraction of triazines. correlation with molecular modeling and principal component analysis studies[J]. *Journal of Chromatography A*, 2003, 999(1-2): 3-15
- [7] Li Y, He W Y, Dong Y M, Sheng F L, Hu Z D. Human serum albumin interaction with formononetin studied using fluorescence anisotropy, FT-IR spectroscopy, and molecular modeling methods[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2006, 14(5):1431-1436
- [8] Bertin-Maghit S M, Capini C J, Bessis N, Chomilier J, Muller S, Abbas A, Autin L, Spadoni J L, Rappaport J, Therwath A, Boissier M C, Zagury J F. Improvement of collagen-induced arthritis by active immunization against murine IL-1 β peptides designed by molecular modeling[J]. *Vaccine*, 2005, 23(3):4228-4235
- [9] Solem S T, Brandsdal B O, Smalås A, Jørgensen T. The primary structure and specificity determining residues displayed by recombinant salmon antibody domains[J]. *Molecular Immunology*, 2004, 40(7):1347-1360
- [10] Zhu C S, Liu X S, Feng J N, Zhang W, Shen B F, Ou-yang W M, Cao Y X, Jin B Q. Characterization of the neutralizing activity of three anti-human TNF monoclonal antibodies and prediction of their TNF epitopes by molecular modeling and mutant protein approach[J]. *Immunology Letters*, 2006, 102(2):177-183
- [11] Galve R, Camps F, Sanchez-Baeza F, Marco M P. Development of an immunochemical technique for the analysis of trichlorophenols using theoretical models [J]. *Analytical Chemistry*, 2000, 72(9):2237-3346
- [12] Galve R, Sanchez-Baeza F, Camps F, Marco M P. Indirect competitive immunoassay for trichlorophenol determination. rational evaluation of the competitor heterology Effect[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2002, 452(2):191-206
- [13] Nickkova M, Galve R, Marco M P. Biological monitoring of 2,4,5-trichlorophenol(I): preparation of antibodies and development of an immunoassay using theoretical models[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2002, 15(6):1360-1370
- [14] Newman D J, Price C P. Molecular aspects of design of immunoassays for drugs[J]. *Therapeutic Drug Monitoring*, 1996, 18(3):493-497
- [15] Wedemayer G J, Patten P A, Wang L H, Schultz P G, Stevens R C. Structural insights into the evolution of an antibody combining site[J]. *Science*, 2007, 276:1665-1669
- [16] Ranieri D I, Corgliano D M, Franco E J, Hofstette H, Hofstette O. Investigation of the stereoselectivity of an anti-amino acid antibody using molecular modeling and ligand docking[J]. *Chirality*, 2008, 20:559-570
- [17] Mak S K, Shan G, HJ Lee, T Watanabe, Stoutamire D W, Gee S J, Hammock B D. Development of a class selective immunoassay for the Type II pyrethroid insecticides[J].

- Analytica Chimica Acta, 2005,534(1): 109-120
- [18] Wang S T, Gui W J, Guo Y R, Zhu G N. Preparation of a multihapten antigen and broad specificity polyclonal antibodies for a multiple pesticide immunoassay [J]. Analytica chimica acta, 2007,587(1):287-292
- [19] Bhand S, Surugiu I, Dzgoev A, Ramanathan K, Sundaram P V, Danielsson B. Immunoarrays for multianalyte analysis of chlorotriazines [J]. Talanta, 2005,65(2):331-336
- [20] Sykes M J, Sorch M J, Miners J O. Molecular modeling approaches for the prediction of the nonspecific binding of drugs to hepatic microsomes[J]. Journal of Chemical Information Model, 2006, 46(9):2661-2673
- [21] Spinks C A, Wyatt G M, Lee H A, Morgan M R A. Molecular modeling of hapten structure and relevance to broad specificity immunoassay of sulphonamide antibiotics[J]. Bioconjugate Chemistry, 1999,10(3):583-588
- [22] Muldoon M T, Holtzapple C K, Deshpande Beier R C. Development of a Monoclonal Antibody-based cELISA for the Analysis of Sulfadimethoxine. I. Development and characterisation of monoclonal antibodies and molecular modeling studies of antibody recognition [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2000,48(2):537-544

(上接第 99 页)

次是甘蔗汁发酵液中麦芽汁的浓度。酵母 Y2-7 发酵产酯优条是甘蔗汁中麦芽汁浓度为 100 g/L、温度 24 ℃、发酵时间 7 d, 发酵蒸馏酒中总酯可高达 2.14 g/L。利用此发酵优化条件进行菌株 Y2-7 产酯的 10 L 发酵小试, 发酵蒸馏酒中总酯含量达 2.1 g/L。

3 展望

生香酵母是白酒、米酒、黄酒等酒发酵产香的主要菌种, 生香酵母不仅广泛应用于发酵酒酯的生香, 而且也逐渐用于食醋、果汁、香料的生产加工中, 其应用前景很大。甘蔗汁作为非常廉价的糖来源, 可与麦芽汁混合发酵, 既有利于提高生香酵母发酵后酒中总酯又降低了生产原料成本。酿酒行业今后的一个重要研究方向是如何提高发酵酒中总酯含量和各种酯的组成比例, 其核心是选育和改良生香酵母。因此, 利用基因工程技术、原生质体融合技术、传统诱变育种技术等综合选育出产酯能力高、各种酯组成优化的生

香酵母, 这是酿酒行业急需研究和非常有意义的课题。

参考文献

- [1] 王国良, 宋俊梅, 曲静然. 生香酵母及其应用[J]. 食品工业, 2004 (3): 16-17
- [2] 王小红, 徐康, 赵山, 等. 孝感凤窝酒曲中酵母菌的分离及特性研究[J]. 现代食品科技, 2008, 24(2): 134-137
- [3] 徐军, 罗惠波, 崔德宝等. 大曲中酵母菌的分离及其鉴定[J]. 酿酒, 2008(3): 95-96
- [4] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验(3 版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 43-44
- [5] 胡开辉. 微生物学实验[M]. 北京: 中国林业出版社, 2004, 8.
- [6] 杨文博. 微生物学实验[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004, 10.
- [7] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002, 8.
- [8] 黄晓东, 程巢宣. 白酒中总酸、总酯、总醛含量的常规连续测定[J]. 食品科技, 2004(5): 70-72
- [9] 巴尼特, 佩恩. 亚罗. 酵母菌的特征与鉴定手册[M]. 胡瑞卿译. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991.

(上接第 119 页)

3 结论

3.1 采用甲醇-磷酸二氢钠溶液作流动相, 用 ZOBAX-NH₂ 在 260 nm 处可将猪肉中呈味核苷酸很好的分离出来, 且峰型很好无拖尾现象, 出峰时间分别为。

3.2 该方法精密度高, RSD%均小于 3%, 在 1.00~100 μg/mL 的浓度范围内线性关系良好, 具有较高的灵敏度。

3.3 采用本方法对猪肉样品作了加标回收率测定, 回收率在 85%以上, 能满足食品卫生学评价的要求, 具有较强的实用价值。

参考文献

- [1] 方燕, 过世东. 棚养和塘养甲鱼肌肉中呈味核苷酸的含量变化及比较[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(8): 17-21
- [2] 文娜, 汤兆星, 李芳, 等. 反相高效液相色谱法同时测定羊肉中肌酸、肌酸酐、肌苷酸、鸟苷酸[J]. 化学工程与装备, 2008, (5): 105-107
- [3] 何鑫, 杨荣华. 鲜味物质及其在水产调味品中的应用[J]. 中国调味品, 2005, (4): 3-8
- [4] 李燕, 周培根, 戚晓玉. 肌苷酸和肌苷作为评价虾鲜度质量指标的研究. 上海水产大学学报, 2002, 11(3): 264-267
- [5] 黄涛, 刘华贵, 徐淑芳. 相同营养条件下五种鸡肉肌苷酸及其相关代谢物含量的比较研究. 饲料工业, 2005, (10): 45-47