

粪产碱杆菌胞内核苷酸的 反相高效色谱法测定

陈定强, 詹晓北*, 郑志永, 吴剑荣, 张洪涛

(江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏无锡 214122)

摘要:建立了用反相离子对色谱法同时精确测定产热凝胶粪产碱杆菌胞内中 ATP、ADP、AMP、UTP、UDP、UMP、NADH、NAD⁺ 及 UDP-glucose 含量的方法。采用 Agilent Zorbax SB-Aq C₁₈ 反相色谱柱(5 μ m, 4.6 × 250nm), 紫外检测波长为 254nm, 以乙腈-含 10mmol/L 四正丁基溴化铵的 0.2mol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液(体积比 10.5:89.5) 为流动相, 流速为 1.0mL/min 时, 成功分离了上述九种核苷酸, 分离效果良好。且九种核苷酸的线性范围为 10~100mg/L, 回收率均在 97%~104% 之间, 说明其准确度较好。相对标准偏差均在 3% 之内, 说明本方法精密度和重现性均较好, 且其最低检出限均在 0.1~0.3mg/L 之间。该方法为研究热凝胶发酵过程中粪产碱杆菌胞内的核苷酸变化和氧化-还原态趋势及其胞内的核苷酸水平和热凝胶生物合成的关系提供了基础。

关键词: 高效液相色谱, 核苷酸, ATP, NAD⁺, UDP, UDP-glucose, 粪产碱杆菌, 热凝胶

Determination of intracellular nucleotides in *Alcaligenes faecalis* by RP-HPLC method

CHEN Ding-qiang, ZHAN Xiao-bei*, ZHENG Zhi-yong, WU Jian-rong, ZHANG Hong-tao

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: A quantitative method for determining the ATP, ADP, AMP, UTP, UDP, UMP, NADH, NAD⁺, and UDP-glucose in *Alcaligenes faecalis* by reversed phase ion pair chromatography (IP-RP-HPLC) was proposed. The HPLC system consisted of Agilent Zorbax SB-Aq C₁₈ reversed-phase column (5 μ m, 4.6 × 250nm) and an UV detector. The chromatography was carried out with 0.2mol/L sodium phosphate buffer containing 10.5% acetonitrile with 10mmol/L Tetrabutyl ammonium bromide as ion pair reagent. Flow rate was 1.0mL/min and UV detection was operated at 254nm. The method proved to be reproducible. The method provided a sound basis for determining the cellular nucleotides change and oxidation-reduction state throughout the curdlan fermentation, and thus the relationship between curdlan biosynthesis and intracellular nucleotides could be explored.

Key words: HPLC; nucleotides; ATP; NAD⁺; UDP; UDP-glucose; *Alcaligenes faecalis*; curdlan

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)01-0391-05

热凝胶(Curdlan)又称凝结多糖、热凝多糖、凝乳

糖,是继黄原胶、结冷胶之后又一种新型微生物发酵多糖。它具有独特的流变学特性和热成胶性能,因此可作为食品成分用以生产果冻、面条、可食用纤维以及新型减肥食品。粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)胞内的核苷酸在维持细胞代谢和合成热凝胶过程起着十分重要的作用^[1],因此,*Alcaligenes faecalis*

收稿日期: 2009-03-03 * 通讯联系人

作者简介: 陈定强(1984-),男,硕士研究生。

基金项目: 国家自然科学基金(20676055, 20806034); 国家高新技术 863 项目(2006AA02Z207)。

syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification[J]. Virol Meth, 2004, 115: 59-65.

[15] Song T, Toma C, Nakasone N, et al. Sensitive and rapid detection of Shigella and enteroinvasive Escherichia coli by a loop-mediated isothermal amplification method[J]. FEMS Microbiol

Lett, 2005, 243(1): 259-263.

[16] Enosawa M, Kageyama S, Sawai K, et al. Use of loop-mediated isothermal amplification of the IS900 sequence for rapid detection of cultured Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41: 4359-4365.

胞内核苷酸的测定对研究热凝胶发酵过程中细菌胞内的核苷酸变化、氧化-还原态趋势的变化和细菌胞内的核苷酸水平和热凝胶生物合成的关系有着重要的意义。生物体中核苷酸含量的测定方法主要有毛细管电泳^[2-3]、离子对 LC-MS^[4]、毛细管电泳与质谱联用^[5]或流动注射法(FIA)^[6]等分析方法,但操作复杂,对设备要求较高。近年来更多的研究采用了高效液相色谱(HPLC)法,不但操作方便,同时也能提高了测量的准确性和灵敏度。根据核苷酸的理化性质,使用更多的是反相高效液相色谱法(RP-HPLC)^[7-8]及离子交换色谱^[9-10],特别是离子对反相液相色谱(IP-RP-HPLC)^[11-12]能够大大节省分析时间,提高灵敏度。但是文献所报道方法仅为测定ATP、AMP、UMP、CMP、GMP等少数几种核苷酸的含量,对需要测定细胞内多种核苷酸或其衍生物来说,已经报道的方法还不能满足同时测定这些核苷酸含量的要求。因此,建立一个适合测定细胞内尽可能的核苷酸或其衍生物的方法,成为研究不同胁迫条件下细胞内核苷酸及其衍生物分布变化的关键问题之一。本文利用离子对反相液相色谱,采用等度洗脱对粪产碱杆菌胞内的九种核苷酸进行了分离和检测。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

九种标准品 ATP、ADP、AMP、UMP、NADH、UTP、NAD⁺、UDPG、UDP,纯度均大于98%,均购自Sigma公司;乙腈 色谱纯,购自江苏汉邦科技有限公司;四正丁基溴化铵 购自华东试剂公司,分析纯;菌种 本实验室保藏的一株粪产碱杆菌WX-12(*Alcaligenes faecalis var. myxogene*);斜面培养基(g/L)

葡萄糖 20,酵母膏 5.0,琼脂 20,pH 7.0~7.2;种子培养基(g/L) 葡萄糖 20,酵母膏 1.0,KH₂PO₄ 1.74,MgSO₄·7H₂O 0.05,pH7.0;发酵培养基(g/L) 葡萄糖 50,酵母膏 1.0,KH₂PO₄ 2.7,MgSO₄·7H₂O 0.5,NH₄Cl 1.6,10mL无机盐浓缩液,pH7.0~7.2。

惠普1100型高效液相色谱系统 包括C₁₈反相色谱柱,自动脱气系统(G1322),四元泵系统(G1311A),自动进样系统(G1313A)和UV检测器;3K-15型高速冷冻离心机 Sigma公司;循环水式多用真空泵,超声波破碎仪。

1.2 实验方法

1.2.1 培养方法 从新鲜斜面上接一环菌至100mL种子培养基(500mL锥形瓶)中,在30℃、200r/min下培养17h,以5%接种量接入发酵罐。7L发酵罐装液量为5L,用3mol/L的NaOH溶液控制pH为7.0,通气量为1vvm,发酵温度为30℃。发酵17h后,无机氮源耗尽,热凝胶开始进入合成热凝胶初期。此时,取20mL发酵液离心破碎后,-20℃下保存备用。

1.2.2 样品的处理和制备 取20mL热凝胶合成初期的发酵液,4℃,10000×g离心1min,倒去上清液,将沉淀悬浮于3mL冰浴的0.5mol/L高氯酸溶液中,0℃冰浴10min,4℃超声破碎(超声15s,间隔4s,循环20次),再冰浴20min,10000×g离心15min,取上

清,用0.2μm的过滤膜过滤后,-20℃保存备用。

1.2.3 色谱分析条件 色谱柱:Agilent Zorbax SB-Aq C₁₈反相色谱柱(5μm,4.6mm×250mm);流动相组成:乙腈-含10mmol/L四正丁基溴化铵的0.2mol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄缓冲液(体积比10.5:89.5);流速:1.0mL/min;温度:25℃;检测波长:254nm;进样量:10μL。

2 结果与讨论

2.1 色谱分离模式的选择

目前国内外测定核苷酸的方法,主要有离子交换液相色谱法和反相液相色谱法。离子交换色谱法具有较高的分离效率,但需要对分离柱进行平衡(再生),分析时间较长;反相液相色谱法具有快速、操作方便的优点。

离子对反相高效色谱法综合了反相色谱与离子交换色谱的特点,同时存在静电力和分子作用力,与离子交换色谱相比,极大地缩短了柱平衡时间;与经典反相色谱相比,又有较高的可重复性^[13]。为同时在一次样品中分离多种核苷酸及其衍生物提供了可能。因此本文选择离子对反相高效色谱法进行研究。

2.2 流动相的选择

2.2.1 盐浓度的选择 增大盐的浓度,会使核苷酸的保留值增大,且分离效率提高;但是盐浓度过大对仪器及柱子的腐蚀性^[14]也大,因此本文选择了浓度适中的0.2mol/L的磷酸盐缓冲液^[15]。

2.2.2 pH的选择 在强酸性及碱性的条件下,核苷酸会分解变性^[15],且C₁₈色谱柱适用的pH范围有所限制,故必须在弱酸性或中性条件下进行测定,因此选择pH=7.0。

2.2.3 离子对试剂及其浓度的选择 离子对色谱法是根据被测组分离子与离子对试剂离子形成中性的离子对化合物后,在非极性固定相中溶解度增大,从而使其分离效果改善。

核苷酸类物质在使用反相高效液相色谱分离时,往往得不到适宜的极性效果。因此,为了增加核苷酸对固定相的亲和能力,可以在流动相中加入适当浓度的离子对试剂。

而离子对试剂的烷基链愈长,或者烷基数目越多,即非极性部分越大,离子对试剂的疏水性愈强,与固定相的作用愈强,形成的对离子在两相间的分配更倾向于固定相,所以样品的保留值随着离子对疏水性的增加而增加^[16],因此分析多种酸性物质(如核苷酸)常用四丁基季铵盐(如四(正)丁基溴化铵、四丁基铵磷酸盐)作为离子对试剂。本文选用了常用的四(正)丁基溴化铵作为离子对试剂。核苷酸中磷酸基以阴离子形式存在,可与带正电荷的四丁基铵盐合成极性很弱的有机络合物,使其在非极性的反相固定相产生疏水作用而保留,如果核苷酸分子中所含的有效磷酸基越多,只要分子空间结构足够,就能结合更多的四丁基铵基形成极性更弱的有机络合物,与非极性的反相固定相产生更强烈的疏水作用而使保留时间更长。这样核苷酸就会按有效磷酸

基团的多少有序地洗脱出来,先是一磷酸核苷酸(UMP、NAD⁺、UDPG、AMP,其中NAD⁺作为氧化型辅酶I,虽然含有两个磷酸基,但因本身带正电荷,因此仅有一个磷酸基能结合四丁基氨基阳离子;而UDPG中的一个磷酸基结合了一个葡萄糖基,同样只有一个磷酸基能结合四丁基氨基),其次是二磷酸核苷酸(NADH、UDP、ADP),最后是三磷酸核苷酸(UTP、ATP)。离子对试剂的浓度则选择相对适中的10mmol/L。

由于甲醇的洗脱能力较乙腈要弱,会因此导致保留值过大。因此本文选择了乙腈作为有机相,并研究了不同乙腈浓度(12%、11%、10.5%、10%)对核苷酸分离的影响,分别见图1中的A、B、E、D。

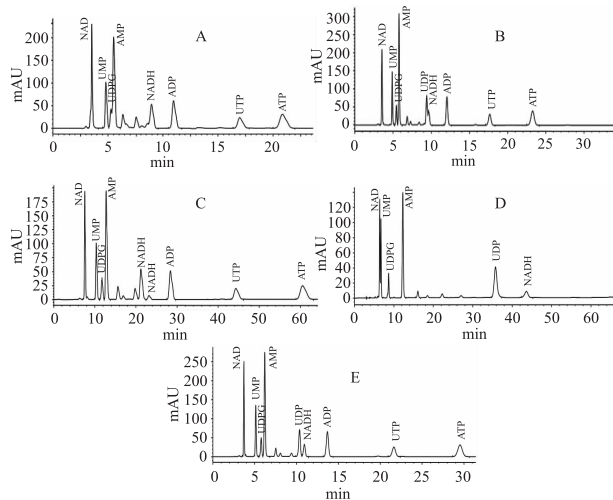


图1 不同乙腈量,不同流速下的九种核苷酸标准品的HPLC分离图谱

A:乙腈浓度为12%,流速为1.0mL/min;B:乙腈浓度为11%,流速为1.0mL/min;C:乙腈浓度为10.5%,流速为0.5mL/min;D:乙腈浓度为10%,流速为1.0mL/min;E:乙腈浓度为10.5%,流速为1.0mL/min;UDPG:UDP-葡萄糖;NAD:NAD⁺;九种核苷酸的标准品的浓度均为100mg/L。

2.2.4 有机相及其浓度的选择 从图1中可以看出,随着乙腈浓度的降低,各组分保留值增大。当乙腈含量为10.5%,九个核苷酸组分均有着很好的分离效果,且保留时间均在30min以内。因此,选择乙腈含量为10.5%。乙腈含量对核苷酸保留值的影响见图2。

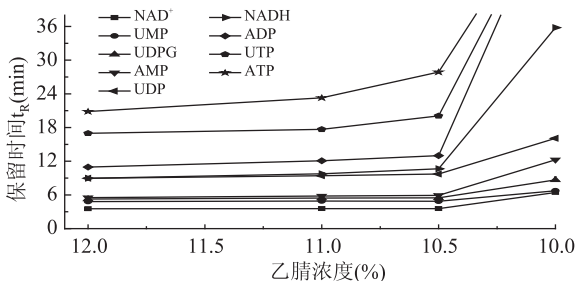


图2 乙腈含量对九种核苷酸标准品保留值的影响

由图2可以看出,不同的核苷酸的保留值对乙腈含量变化的敏感度是不一致的,极性越大,对乙腈含量变化的敏感度越高,比如当乙腈含量从12%降

至11%时,只有极性较大的ATP和UTP的保留值有所增长,这可能是由于ATP和UTP中含有三个磷酸基团,极性较大,与离子对试剂的络合作用相对较强,从而使之在乙腈含量略微降低的情况,洗脱速率变慢,保留值增加;另外,当在乙腈的量低于10.5%时,大部分核苷酸对乙腈浓度变化十分敏感。邹汉法等人^[17]研究了在相同离子对试剂浓度及无机盐浓度条件下,有机溶剂对保留值的影响,结果可用下式表示: $\ln k' = a + Cc_b$,式中 c_b 为有机修饰相即乙腈的浓度, k' 为保留因子。从此式中可以看出:在其它条件相同的情况下,保留因子的对数与有机溶剂浓度成线性关系,即保留因子随有机溶剂浓度成指数关系(参数 a 主要由离子对试剂与固定相及流动相弱溶剂的静电及分子作用力决定, C 主要由离子对试剂与流动相的分子及静电作用相关),而不是保留因子与有机溶剂成线性关系。因此,由于不同核苷酸的参数(a 和 C)不同,而导致了图2中九种物质的保留值随不同的乙腈含量的变化趋势。因此,利用这个特性,只需要在稍微调整流动相中乙腈含量(10%~10.5%),就可以使更多的核苷酸或其衍生物产生更好的分离效果,但同时也要求配制流动相时尽量精确。

2.2.5 流速的选择 在上述色谱条件下,我们考察了在0.5、1.0mL/min这2个流速下(分别见图1C和图1E),流速的改变对分离的影响。实验结果表明:在0.5mL/min的流速下,核苷酸的分离度增加,但谱峰扩张增大,降低了柱效,而且三磷酸核苷酸的保留时间过长(将近60min);而在1.0mL/min的流速下,谱峰展宽减小,提高了柱效,峰形也尖锐了很多。因此,我们选用常规流速1.0mL/min。在此流速下,分离度及柱效都符合要求。

2.3 样品分离效果

从图3可以看出,本文所测的九种核苷酸的分离效果良好。同时,其它未知核苷酸或其衍生物(图3中未明峰,可能为CMP、GMP、NADPH等)也同样有着较好的分离效果。

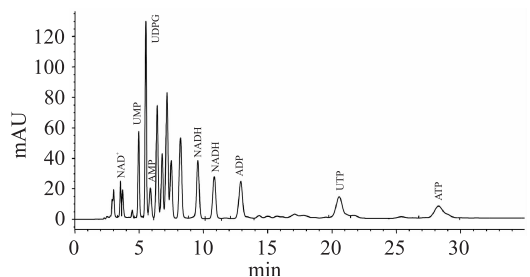


图3 10.5%乙腈量,1.0mL/min下的样品分离色谱图

根据图中的峰面积及对应的标准曲线得到九种核苷酸的浓度(由于1L发酵液中约含有3g的干菌体量,因此换算成每克细胞中所含有的核苷酸量),见表1。

从表1中可以看出,最终进样的样品浓度10~200mg/L之间,而在这个浓度范围内,九种核苷酸浓度对峰面积的线性很好,这说明样品的浓缩倍数适宜(从20mL的发酵液浓缩成最终的3mL进样的样

品),如果胞内九种核苷酸浓度相差较大,也可以选择不同的浓缩倍数来分别测定。因此,粪产碱杆菌胞内九种核苷酸完全能通过此条件下的反相离子色谱来很好地分离。

表1 粪产碱杆菌胞内九种核苷酸的含量

核苷酸	峰面积 (mAU)	样品核苷酸浓度 (mg/L)	菌体核苷酸浓度 (mg/g · cell)
NAD ⁺	175.6	11.85	237.0
UMP	489.5	44.44	888.8
UDP-Glucose	948.8	196.2	3923
AMP	251.9	9.936	198.7
UDP	585.1	55.38	1107
NADH	460.5	109.7	2193
ADP	546.6	42.42	848.4
UTP	588.5	79.46	1589
ATP	412.5	32.16	643.1

2.4 定性、定量实验及精密度、回收率实验

2.4.1 定性实验 分别准确称取一定量的 ATP、ADP、AMP、UMP、NADH、UTP、NAD⁺、UDP-glucose、UDP,配制成各自的 1mg/mL 的标准品,在 HPLC 上对各自的标准品进行色谱分析,并根据各个核苷酸的保留时间进行定性,定性结果见表 2。

2.4.2 定量实验 分别准确称取一定量的 ATP、ADP、AMP、UMP、NADH、UTP、NAD⁺、UDPG、UDP,配制成六个不同浓度的标准混合样(10、20、40、60、80、100mg/L)。通过在 HPLC 上混合标准液进行色谱分析,以标准品峰面积 y (mAU · min) 对质量浓度 x (mg/L) 作标准曲线,标准曲线和回归方程见表 2。由表 2 可以看出,在上述浓度范围内,质量浓度与峰面积呈良好的线性关系。

表2 九种核苷酸的回归方程及相关系数

核苷酸	保留时间 (min)	回归方程	相关系数
NAD ⁺	3.562	$y = 14.77x + 0.5937$	0.9992
UMP	4.867	$y = 10.778x + 10.492$	0.9997
UDP-Glucose	5.472	$y = 4.8115x + 4.0394$	0.9998
AMP	5.923	$y = 25.079x + 2.7154$	0.9998
UDP	9.718	$y = 10.421x + 8.0429$	0.9994
NADH	10.652	$y = 4.152x + 5.0392$	0.9999
ADP	12.993	$y = 12.802x + 3.4659$	0.9997
UTP	20.084	$y = 7.3347x + 5.705$	0.9999
ATP	27.872	$y = 12.458x + 11.944$	0.9998

2.4.3 精密度和重现性实验 取同一浓度的混合标准样品在同一天连续进样 6 次测定精密度,结果用相对标准偏差来表示,结果见表 3。

从表 3 中可以看出:九种核苷酸的 RSD 均在 3% 之内,说明本方法精密度和重现性均较好。

2.4.4 加标回收率实验 取一定含量的核苷酸样品,以 1:1 的体积比分别加入 3 种不同浓度(高浓度为 100mg/L、中浓度为 50mg/L、低浓度为 10mg/L)的核苷酸标准溶液,按上述方法和条件各测定 3 次,求平均值,进行回收率的测定,结果见表 3。

从表 3 中可以看出:九种核苷酸的回收率均在 97%~104% 之间,说明其准确度较好。

表3 核苷酸测定的精密度、回收率及定量限

核苷酸	回收率(%)			相对标准偏差 RSD(%)	检出限 (mg/L)
NAD ⁺	101.9	99.3	102.7	2.34	0.3
UMP	103.3	101.2	97.8	1.29	0.2
UDPG	103.2	103.0	101.1	0.92	0.1
AMP	102.3	100.9	101.7	2.78	0.3
UDP	97.4	101.1	101.9	1.25	0.1
NADH	103.5	102.6	97.7	1.58	0.1
ADP	101.6	101.7	97.6	2.35	0.3
UTP	103.1	102.2	97.7	0.93	0.3
ATP	102.5	101.8	100.4	1.73	0.3

2.4.5 定量限实验 定量限系指样品中被测物能被定量测定的最低量,常用信噪比法确定,即以信噪比为 10:1 时相应的浓度或注入仪器的量进行确定。当信噪比为 10:1 时相应注入核苷酸的量见表 3,其检出限均在 0.1~0.3mg/L 之间。

3 结论与展望

采用 Agilent Zorbax SB-Aq C₁₈ 反相色谱柱(5 μ m, 4.6 \times 250nm),紫外检测波长为 254nm,以含有 10.5% 乙腈的磷酸钠盐缓冲液为流动相,流速为 1.0mL/min,进样量为 10 μ L 时,九种核苷酸的保留时间均在 30min 以内,且分离效果很好。另外,九种核苷酸的线性范围为 10~100mg/L,回收率均在 97%~104% 之间,说明其准确度较好。相对标准偏差来均在 3% 之内,说明本方法精密度和重现性均较好,且其最低检出限均在 0.1~0.3mg/L 之间。

精确测定了产热凝胶菌 *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* 细胞内的 ATP、ADP、AMP、UMP、NADH、UTP、NAD⁺、UDP-glucose 和 UDP,为有效地测出其胞内的核苷酸水平和氧化-还原态趋势,为进一步研究产热凝胶菌胞内核苷酸水平及氧化-还原态趋势和热凝胶的生物合成之间的关系,从核苷酸水平的角度来进一步研究热凝胶生物合成机理,进而对菌株的代谢途径进行改造,最终实现高产量、高产率和高生产强度的目的奠定了基础。

参考文献

- [1] Zhi-Yong Zheng, Jin Woo Lee, Xiao Bei Zhan, et al. Effect of metabolic structures and energy requirements on curdilan production by *Alcaligenes faecalis* [J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2007(12):359-365.
- [2] H T Feng, N Wong, S Wee, et al. Simultaneous determination of 19 intracellular nucleotides and nucleotide sugars in Chinese Hamster ovary cells by capillary electrophoresis [J]. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2008, 870(1):131-134.
- [3] H F Tzeng, C H Hung, J Y Wang, et al. Simultaneous determination of adenosine and its metabolites by capillary electrophoresis as a rapid monitoring tool for 5'-nucleotidase activity [J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1129(1):149-152.
- [4] T X Qian, Z W Cai, M S Yang. Determination of adenosine (下转第 398 页)

大分子的酶联免疫测定一般采用双抗体夹心 ELISA 法,本研究采用的间接竞争 ELISA 法,从原材料角度考虑,可以省去筛选对抗体及抗体酶标记的工作,研究可集中于方法的建立。在方法的优化过程中,通过合理设计实验方案,以实际使用的方便性为出发点,选择符合要求的生产工艺条件,使最终研制的方法可行性更强。添加回收实验结果表明,本方法测定结果比较准确,变异系数在可以接受范围内,同时对 11 份实际样品的检测结果也表明,方法适应于市面常见产品中 IgG 成分的检测。

由于实际检测对于产品的保存性能等有较高要求,因此后续研究中将会对方法的长期稳定性进行研究,并最终进行产业化,给工业生产和基层检测牛 IgG 含量提供检测产品。

参考文献

- [1] Leyton W Gapper, David E J Copestake, Don E Otter, et al. Analysis of bovine immunoglobulin G in milk, colostrum and dietary supplements: a review[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2007, 389: 93-109.
- [2] 刘鹏龙, 张丹凤, 陆东林. 琼脂单、双扩散法测定牛初乳 IgG 的应用分析[J]. *草食家畜*, 2002(3): 41-45.
- [3] 田波, 姜瞻梅, 吴刚. 免疫透射比浊法测定初乳制品中 IgG 的质量浓度[J]. *中国乳品工业*, 2008, 36(1): 63-64.
- [4] 郭鸽, 姜瞻梅, 刘恩照, 等. 火箭免疫电泳法测定牛奶中的

免疫球蛋白[J]. *中国食品学报*, 2004, 4(4): 75-77.

- [5] 项新华, 尹香君, 赵丹慧, 等. 酶联免疫双抗体夹心法检测牛初乳素中免疫球蛋白 IgG[J]. *中国卫生检验杂志*, 2002, 12(2): 137-138.
- [6] 刘春龙, 李忠秋. 免疫胶体金法和免疫单扩散法检测牛初乳中 IgG 含量的比较研究[J]. *吉林农业大学学报*, 2006, 28(4): 458-461.
- [7] 刘冀琬, 乔惠理, 邓泽沛. 应用化学发光自显影法 (CLAGIA) 测定牛初乳 IgG[J]. *中国兽医学报*, 2000, 20(4): 382, 389.
- [8] Jack N Lasso, Angela Kummer, Eunice Li - Chan, et al. Development of a particle concentration fluorescence immunoassay for the quantitative determination of IgG in bovine milk[J]. *J Agric Food Chem*, 1993, 41: 682-686.
- [9] 马燕芬, 陈志伟, 魏晓兵, 等. 高效液相色谱法测定牛初乳中 IgG 含量的方法研究[J]. *饲料工业*, 2007, 28(5): 33-38.
- [10] 中华人民共和国国家标准. GB/T 5009.194-2003 保健食品中免疫球蛋白 IgG 的测定[S]. 2003-8-11.
- [11] 王茜, 丁晓静, 王心宇, 等. 毛细管电泳法快速测定保健食品中免疫球蛋白 G[J]. *分析化学*, 2006, 34(8): 1161-1164.
- [12] 马燕芬, 王心刚, 陈志伟, 等. 前处理及液相色谱分离条件对牛初乳 IgG 含量影响的研究[J]. *乳业科学与技术*, 2007(5): 224-229.
- [13] 中国乳制品工业协会. RHB 602-2005 牛初乳产品行业规范[S]. 2005.

(上接第 394 页)

nucleotides in cultured cells by ion-pairing liquid chromatography - electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Analytical Biochemistry*, 2004, 325(1): 77-84.

[5] C F Yeh, S J Jiang. Determination of monophosphate nucleotides by capillary electrophoresis inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *Analyst*, 2002, 127(10): 1324-1327.

[6] T Yao, K Takashima, Y Nanjyo. Simultaneous determination of orthophosphate and total phosphates (inorganic phosphates plus purine nucleotides) using a bioamperometric flow-injection system made up by a 16-way switching valve [J]. *Talanta*, 2003, 60(4): 845-851.

[7] M Y Xie, Y X Wang, R H Peng, et al. RP-HPLC method developed for the simultaneous determination of nucleotides in cordyceps [J]. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 2005, 230: 212.

[8] T Dervieux, Y Q Chu, Y Su, et al. HPLC determination of thiopurine nucleosides and nucleotides in vivo in lymphoblasts following mercaptopurine therapy [J]. *Clinical Chemistry*, 2002, 48(1): 61-68.

[9] S Sawada, R Ono, T Sato, et al. Determination of sugar phosphates and nucleotides related to photosynthetic metabolism by high-performance anion-exchange liquid chromatography with fluorometric and ultraviolet detection [J]. *Analytical Biochemistry*, 2003, 314(1): 63-69.

[10] N Tomiya, E Ailor, S M Lawrence, et al. Determination of nucleotides and sugar nucleotides involved in protein glycosylation

by high-performance anion-exchange chromatography: Sugar nucleotide contents in cultured insect cells and mammalian cells [J]. *Analytical Biochemistry*, 2001, 293(1): 129-137.

[11] P Yeung, L Ding, W L Casley. HPLC assay with UV detection for determination of RBC purine nucleotide concentrations and application for biomarker study in vivo [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008, 47(2): 377-382.

[12] K M Olesen, S H Hansen, K Schmiegelow. Determination of leukocyte DNA 6-thioguanine nucleotide levels by high performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2008, 864(1-2): 149-155.

[13] 任铭, 张亚卓. HPLC 技术检测细胞核酸库水平及其临床意义 [J]. *国外医学临床生物化学与检验学分册*, 2001, 22(6): 300-301.

[14] L R 施奈德. 实用高效液相色谱法的建立 [M]. 北京: 科学出版社, 1998: 123.

[15] 黄晓兰, 李科德, 陈云华. 15 种核酸水解产物的高效液相色谱分离及其在酵母抽提物分析中的应用 [J]. *分析化学研究简报*, 2000, 28(12): 1504-1507.

[16] R S Deelder, H A J Linszen, A P Konunenduk, et al. Retention mechanism in reversed-phase ion-pair chromatography of amines and amino acids on bonded phases [J]. *Journal of Chromatography*, 1979, 185: 241-257.

[17] 邹汉法, 张玉奎, 洪名放, 等. 反相离子对色谱中有机溶剂浓度及离子对试剂浓度对保留值的影响 [J]. *分析化学*, 1994, 52: 1106-1111.