

鸡全蛋粉中金属硫蛋白检测方法的研究

张根生,岳晓霞,王芮,常虹

(哈尔滨商业大学,黑龙江省普通高等学校食品科学与工程重点实验室,黑龙江哈尔滨 150076)

摘要:使用5,5'-二硫硝基苯甲酸(DTNB)比色法来测定鸡全蛋粉中的金属硫蛋白含量,采用酸水解的方法对样品进行前处理,通过单因素和正交试验确定最优条件:水解时间24 h,盐酸浓度6 mol/L,质量体积比1:20 g/mL,水解温度130 ℃,在此条件下,水解度为55.28%,金属硫蛋白含量为0.4821 mg/g。在前处理后对检测方法的反应条件及试剂配制条件进行优化,最终选用pH为4.0的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液配制Ellman试剂,反应最佳pH为7.2。得到的线性回归方程为 $Y = 0.019x + 0.027$, $R^2 = 0.999$,呈良好的线性关系。加标回收率在75.83%~88.15%,相对标准偏差为3.10%,该方法具有较好的重现性和准确度和精密性,方法检测限为7.57 μg/g,本方法可以用于样品中金属硫蛋白(MTs)的快速检测。

关键词:比色法,鸡全蛋粉,金属硫蛋白,快速检测

Study on the Detection Method of Metallothionein in Whole Egg Powder

ZHANG Gen-sheng, YUE Xiao-xia, WANG Rui, CHANG Hong

(Key Laboratory for Food Science and Engineering of Heilongjiang Province,
Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Abstract: The experiment used 5,5'-dithianitrobenzoic acid (DTNB) colorimetric method to quantify metallothioneins (MTs) content, pretreatment of samples by acid hydrolysis. The optimal condition was determined by single factor and orthogonal test: 24 hours hydrolysis, 6 mol/L hydrochloric acid, 1:20 mass volume ratio, and hydrolysis temperature at 130 ℃. The optimized hydrolysis degree could achieve 55.28%, with detection of MTs 0.4821 mg/g. After pretreatment, the reaction conditions and reagent preparation conditions were optimized. Ellman reagent was prepared with disodium hydrogen phosphate-citric acid buffer with pH 4.0, the best reaction pH was 7.2. The experiment showed a good linear regression ($Y = 0.019x + 0.027$, $R^2 = 0.999$). Besides, the recovery test result of its standard was 75.83%~88.15%, and the relative standard deviation was 3.10%. The method had relatively good reproducibility, accuracy and precision with detection limit 7.57 μg/g. This method could be used for rapid detection of MTs.

Key words: colorimetric method; egg powder; metallothioneins (MTs); rapid detection

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2018)19-0214-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2018.19.038

引文格式: 张根生,岳晓霞,王芮,等.鸡全蛋粉中金属硫蛋白检测方法的研究[J].食品工业科技,2018,39(19): 214-219.

金属硫蛋白(MTs)是广泛存在于生物体中,具有低分子量、富含半胱氨酸(20%~30%)、缺乏芳香族氨基酸的一类金属结合蛋白质^[1-4]。金属硫蛋白可以调节生物体内微量元素浓度,对人体内重金属有解毒的作用,除此之外,金属硫蛋白对激素的调节、细胞代谢的调节、细胞分化和增殖的控制、紫外(UV)诱导反应以及清除自由基都有重要作用^[5-7]。Alonso等^[8]的研究表明硫蛋白可以使猪肝肾中的镉含量显著降低。MTs具有清除自由基、抑制脂质过氧化过程^[9],在对保护心肌的过程中也起到了一定的作用^[10]。目前已从许多海洋动物的消化腺或胰腺腺、生殖腺、肝、脑、鳃、肌肉、外套膜等组织以及幼体或成体中提取到MTs^[11-15]。

近些年,在金属硫蛋白的前处理方法研究中,各国的科学家采用的方法主要为匀浆后离心法^[16]。此种方法在提取MTs过程中,提取不完全,样品有损失,会影响测定结果,酸水解法的特点是水解迅速彻底,产物为L型氨基酸,不会发生消旋作用。且在酸性条件下,样品中含有巯基,较为稳定,不易被氧化,酸水解蛋白成本低、投资小,是一种被广泛使用的生产方法^[17]。同时,酸水解方法中,样品在固定容器里水解,水解液过滤后进行测定^[18],样品没有损失,且样品水解后澄清不影响比色,是一种比较可行的样品前处理方法,可以为金属硫蛋白样品测定前处理提供一种参照方法。

随着技术的不断改进,MTs的测定方法也逐渐

收稿日期:2017-12-27

作者简介:张根生(1964-),男,硕士,教授,研究方向:畜产品加工,E-mail:zhanggsh@163.com。

基金项目:国家标准化管理委员会(20142018-T-469);哈尔滨商业大学研究团队支持项目(2016TD007)。

精细化,从传统的金属结合法到现在的分子生物学测定手段,在技术层面极大地推动了对 MTs 功能及作用机制的研究^[19]。除金属结合法外,MTs 的检测方法还有:电化学法、免疫法、色谱分析法^[20]、色质联用法^[21]等。目前尚未发现一种简便快捷适用于产业化的检测技术。因此,当前亟需建立检测 MTs 的统一标准。巯基(SH)定量法^[22],是以 5,5'-二硫硝基苯甲酸(DTNB)作为巯基定量试剂,通过测定 412 nm 波长处显色产物硫代硝基苯甲酸阴离子(TNBA)的量,确定金属硫蛋白含量^[23]。DTNB 比色法操作简便易行,快速直观,可用于测定生物体中金属硫蛋白的含量,对 MTs 快速检测提供了一种快速检测的方法。

因此,本文将对 DTNB 比色法的测定条件进行优化,对其准确性进行验证,并使用酸水解作为 DTNB 比色法的前处理方法,对鸡全蛋粉中的 MTs 进行检测,以探索样品中 MTs 检测的新途径,为今后的 MTs 检测提供新的方法。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

金属硫蛋白鸡蛋粉 哈尔滨春源生物科技开发有限公司提供;DTNB 美国 Sigma 公司;兔肝金属硫蛋白(MTs,纯度 $\geq 95\%$) 上海源叶生物科技有限公司;盐酸胍、乙二醇四乙酸(EDTA)、甲醛、盐酸、柠檬酸、磷酸氢二钠等 均为国产分析纯。

双束紫外可见分光光度计 北京是普析通用仪器有限责任公司;电子天平(读数精度 0.1 mg) 瑞士 Mettler Toledo 公司;电热鼓风干燥箱 上海东星建材试验设备有限公司;定氮仪 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;pH 计 德国赛多利斯股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 金属硫蛋白标准曲线的绘制 在试管中加入标准金属硫蛋白溶液(质量浓度为 $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$),加入 $25 \mu\text{L}$ 1.2 mol/L HCl 和 $100 \mu\text{L}$ 0.1 mol/L EDTA,置暗处反应 10 min,加入 $500 \mu\text{L}$ 5 mmol/L Ellma 试剂混匀 3 min,使 MTs 与 DTNB 形成黄色络合物,用 0.1 mol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液定容至 10 mL,在 412 nm 波长处测定吸光度,并绘制标准曲线。

1.2.2 酸水解法前处理条件单因素实验

1.2.2.1 原料与盐酸用量质量体积比对处理效果的影响 称取适量样品,按照质量体积比 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 g/mL 加入 6 mol/L HCl,充入 N_2 密封,置于 110 °C 电热干燥箱内水解 16 h,水解完成后过滤水解液,取水解液测定 MTs 含量和水解度。

1.2.2.2 盐酸浓度对处理效果的影响 称取适量样品,按照质量体积比 1:20 g/mL 加入 2、4、6、8、10 mol/L HCl,充入 N_2 封口,置于 110 °C 电热干燥箱内水解 16 h,水解完成后过滤水解液,取水解液测定 MTs 含量和水解度。

1.2.2.3 水解时间对处理效果的影响 称取适量样品,按照质量体积比 1:20 g/mL 加入 6 mol/L HCl,充入 N_2 封口,置于 110 °C 电热干燥箱内水解 12、14、16、20、24 h,水解完成后过滤水解液,取水解液测定 MTs 含量和水解度。

1.2.2.4 水解温度对处理效果的影响 称取适量样品,按照质量体积比 1:20 g/mL 加入 6 mol/L HCl,充入 N_2 封口,置于 100、110、120、130、140 °C 电热干燥箱内水解 16 h,水解完成后过滤后,取水解液测定 MTs 含量和水解度。

1.2.3 酸水解法前处理条件正交实验设计 为确定最佳水解方案,在单因素实验基础上,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,优化水解方案。正交实验设计见表 1。

表 1 酸水解法正交实验设计

Table 1 Orthogonal design of acid hydrolysis

水平	因素			
	质量体积比 (g/mL)	盐酸浓度 (mol/L)	水解时间 (h)	水解温度 (°C)
1	1:10	4	16	120
2	1:15	6	20	130
3	1:20	8	24	140

1.2.4 Ellma 试剂最佳 pH 的确定 DTNB 0.297 g,盐酸胍 0.086 g,EDTA 0.056 g,用 pH 为 4、5、6、7、8 的 0.1 mol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液,溶解并定容到 500 mL,并每隔 2 h 于 412 nm 处测定吸光度。

1.2.5 DTNB 比色法条件的研究和方法学考察

1.2.5.1 DTNB 比色法反应最佳 pH 吸取金属硫蛋白溶液(质量浓度为 $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$),加入 $100 \mu\text{L}$ 1.2 mol/L 盐酸溶液和 $200 \mu\text{L}$ 0.1 mol/L EDTA,置暗处反应 10 min 脱去金属,加入 0.5 mL Ellma 试剂,使 MTs 与 DTNB 形成黄色络合物(TNBA),再分别用 pH3、4、5、6、7、8 的 0.1 mol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液定容至 10 mL,混匀静置反应 3 min,在反应时间为 3、10、20、30、40、50、60 h,分别于 412 nm 处测定吸光度。

1.2.5.2 反应的最佳 pH 及最佳测定时间 吸取金属硫蛋白溶液(质量浓度为 $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$),加入 $100 \mu\text{L}$ 1.2 mol/L 盐酸和 $200 \mu\text{L}$ 0.1 mol/L EDTA,置暗处反应 10 min 脱去金属,加入 0.5 mL Ellma 试剂,用 0.1 mol/L pH7.0、7.2、7.4、7.6、7.8、8.0 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液定容至 10 mL,混匀静置反应 3 min,当反应时间为 3、10、20、30、40、50、60 h 于 412 nm 处测定吸光度。

1.2.5.3 DTNB 比色法加标回收率 取一定量鸡蛋粉,分别加入不同量 MTs 标准溶液(质量浓度为 $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$),按照测定方法做加标回收实验。计算其回收率。

1.2.5.4 精密度 配制 MTs 标准溶液 $10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$,分别取标准溶液 $200 \mu\text{L}$,连续吸取 6 个标准溶液与 $500 \mu\text{L}$ 5 mmol/L DTNB 试剂反应,计算得相对标准偏差(RSD),来评价其精密度。

1.2.5.5 方法检测限 取 7 份空白组织 MTs 提取液,进行测定,并计算 MTs 含量,按公式(1)计算方法检测限^[20]。

$$\text{方法检测限} = t_{(n-1,0.99)} \times s \quad \text{式(1)}$$

式中:S 为 7 次空白测定的标准差; $t(6,0.99) = 3.143$ 。

1.2.6 指标测定 MTs 含量计算按下式(2);

$$\text{金属硫蛋白含量}(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}) = \frac{CV_1V_2}{mV_3} \quad \text{式(2)}$$

式中:C-金属硫蛋白浓度,mg/mL; V_1 -测定定容体积,mL; V_2 -粗提液体积,mL; V_3 -粗提液测定体积,mL; m -样品质量,g。

水解度测定按下式(3);总氮测定参照 GB 5009.5-2016 凯氏定氮法进行^[24];氨基态氮参照 GBT 5009.235-2016 甲醛法进行^[25]。

$$\text{水解度}(\text{DH},\%) = \frac{\text{氨基态氮}}{\text{总氮}} \times 100 \quad \text{式(3)}$$

1.3 数据处理

试验统计分析采用 Microsoft Office 2007 软件的 Excel 2007 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 金属硫蛋白标准曲线

金属硫蛋白标准曲线见图 1,回归方程为 $Y = 0.019x + 0.027$, $R^2 = 0.999$,在 MTs 浓度为 5~40 $\mu\text{g/mL}$ 内成良好的线性关系。

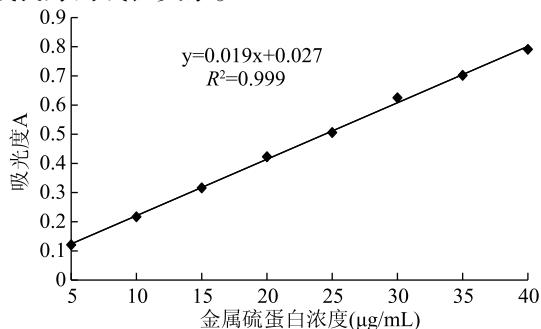


图 1 金属硫蛋白标准曲线

Fig.1 Standard curve of metallothionein

2.2 酸水解前处理方法单因素实验结果

2.2.1 质量体积比对前处理效果的影响 由图 2 可以看出,水解度随着原料质量与盐酸体积比增大而增大,在 1:30 g/mL 时,水解度增加到最大值,但当质量体积比大于 1:20 g/mL 时,水解度增加不明显。MTs 的含量随着质量体积比的增大,先增大后减小,在 1:20 g/mL 时,MTs 含量取得最大值。原因可能是,一定量的盐酸有助于蛋白质水解,提高水解度,从而鸡全蛋粉中 MTs 含量较高,但是随着盐酸用量的增加,也存在着盐酸过量的情况,而且过量的盐酸也不利于后期的废液处理。所以,综合考虑选取 1:20 g/mL 比较适宜的质量体积比。

2.2.2 盐酸浓度对前处理效果的影响 由图 3 可知,盐酸浓度在 2~6 mol/L 时,水解度和 MTs 含量随着盐酸浓度的增加呈现上升的趋势,盐酸浓度继续增大时,水解度趋于稳定,MTs 含量在盐酸浓度 8 mol/L 时达到最大,但与 6 mol/L 时的水解度相比,差异不明显。当增加到 10 mol/L 时含量反而有所下降,前处理效果较差,可能是盐酸浓度过高破坏了 MTs 的巯基,影响比色,使含量降低。为避免巯基被破坏,综合选用 6 mol/L 的盐酸进行前处理。

2.2.3 水解时间对前处理效果的影响 由图 4 可知,随着水解时间的延长,水解度和 MTs 含量呈现上升的趋势,在 12~20 h 内,水解度和 MTs 含量增加速度

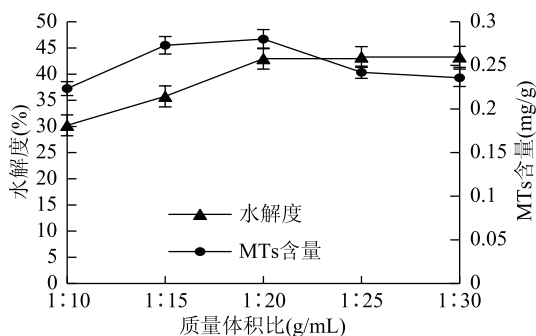


图 2 质量体积比对前处理的影响

Fig.2 Effect of mass volume ratio on pretreatment

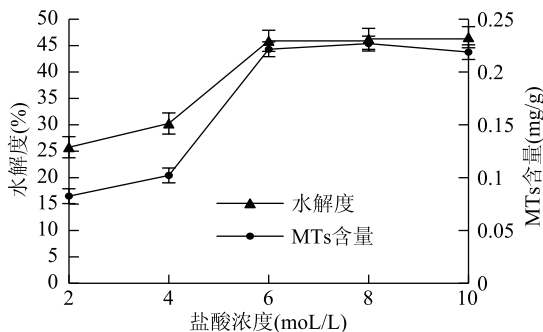


图 3 盐酸浓度对前处理的影响

Fig.3 Effect of hydrochloric acid concentration on pretreatment 较大,说明前处理效果较好,在超过 20 h 后,其增加速度减缓,尤其是水解度增加幅度不大,在 24 h 时,均达到最大值。所以综合考虑,选取 24 h 为最佳酸水解前处理时间。

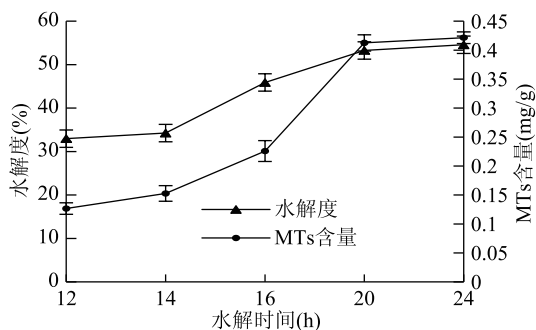


图 4 水解时间对前处理的影响

Fig.4 Effect of hydrolysis time on pretreatment

2.2.4 水解温度对前处理效果的影响 由图 5 可知,当温度为 100~130 $^{\circ}\text{C}$ 时,MTs 含量随着温度的升高而增大,在 130 $^{\circ}\text{C}$ 时达到最大值,在 140 $^{\circ}\text{C}$ 时含量稍有减少,而水解度在 140 $^{\circ}\text{C}$ 时达到最大,但与 130 $^{\circ}\text{C}$ 相比,水解度相差仅 1.18%,另外,随着温度的升高水解液颜色逐渐变深,温度越高耗能也越高。所以应选 130 $^{\circ}\text{C}$ 为适宜前处理水解温度。

2.3 酸水解法前处理方法正交实验结果

由表 2 可以得出,以水解度为评价指标,因素影响主次为 $C > B > A > D$,即:影响水解效果最大的因素为水解时间,其次为盐酸浓度、原料与盐酸用量质量体积比,水解温度影响较小。以 MTs 含量为评价指标,影响因素主次为 $C > B > D > A$,即:影响水解效果最大的因素为水解时间,其次为盐酸浓度、水解温

表2 正交试验结果
Table 2 Orthogonal test results

试验	A 质量体积比 (g/mL)	B 盐酸浓度 (mol/L)	C 水解时间 (h)	D 水解温度 (°C)	指标		
					水解度(%)	MTs 含量(mg/g)	
1	1	1	1	1	39.27	0.2556	
2	1	2	2	2	53.34	0.3597	
3	1	3	3	3	47.25	0.3892	
4	2	1	2	3	43.36	0.2862	
5	2	2	3	1	45.94	0.4612	
6	2	3	1	2	36.37	0.3564	
7	3	1	3	2	49.24	0.4567	
8	3	2	1	3	42.12	0.3652	
9	3	3	2	1	47.24	0.2961	
水解度	k ₁	46.62	43.96	39.25	44.15	-	-
	k ₂	43.85	48.84	47.98	46.32	-	-
	k ₃	46.20	43.62	47.48	44.24	-	-
	R	2.77	5.22	8.73	2.17	-	-
MTs 含量	k ₁	0.335	0.333	0.326	0.338	-	-
	k ₂	0.368	0.395	0.314	0.391	-	-
	k ₃	0.373	0.347	0.436	0.347	-	-
	R	0.038	0.062	0.122	0.053	-	-

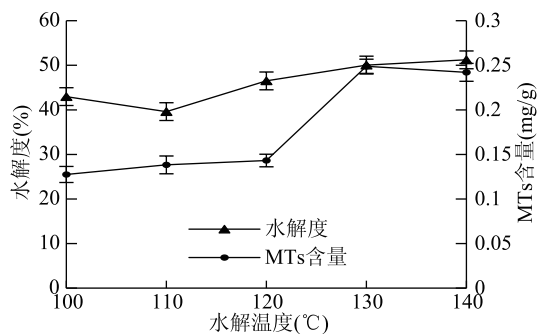


图5 水解温度对前处理的影响

Fig.5 Effect of hydrolysis temperature on pretreatment

度、原料与盐酸用量质量体积比。

单独以水解度为指标时,由于水解度越大,蛋白质水解效果越好,可以得到更小分子的蛋白质,所以最佳的实验方案是 A₁B₂C₂D₂,即水解时间 20 h,盐酸浓度 6 mol/L,质量体积比 1:10 g/mL,水解温度 130 °C。单独分析以 MTs 含量为指标的实验结果,可以得出的最佳实验方案是 A₃B₂C₃D₂,即水解时间 24 h,盐酸浓度 6 mol/L,水解温度 130 °C,质量体积比 1:20 g/mL。分析两个指标所得到的最佳方案不同,由于较大的质量体积比 1:20 g/mL 更有利于样品在盐酸内部的均匀分散,这与单因素实验结果一致,较长的时间 24 h 相较 20 h 可以使样品更大程度上的水解成小分子,所以最终选取水解时间 24 h,盐酸浓度 6 mol/L,质量体积比 1:20 g/mL,水解温度 130 °C 为最佳前处理水解方案。对此条件进行验证,得到水解度为 55.28%,MTs 含量为 0.4821 mg/g,所以此实验方案为最佳水解条件。

2.4 配制 Ellma 试剂缓冲液最佳 pH 的选择

由图 6 可以看出,DTNB 在偏酸性的 pH 环境中,

吸光度值较小且比较稳定,在 pH 为 4 时,24 h 内吸光度值基本上没有明显变化,在 24 h 后吸光度值变化也比较小。在 pH 为 5 时,24 h 内吸光度变化比较小,超过 24 h 后有较大变化。在 pH 为 6 时,吸光度值变化仍比较小,但是存在一些波动,尤其是在超过 24 h 后,吸光度有明显的提高。在 pH 为 7、8 时,吸光度值大于 pH 为 4、5、6 时的吸光度值,并且随着时间的增长,吸光度值在不断上升,这是因为,DTNB 在中性或偏碱性条件下可以发生离子化,生成 NTB²⁻,呈现黄色,在 412 nm 可以检测,因此为降低 DTNB 自身在 Ellma 试剂中的离子化裂解现象影响最终显色反应,应选用偏酸的缓冲液配制,这与吴云辉等^[26]的研究结果一致。因此,综合评价,选择 pH 为 4 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液进行配制,且为了可以准确进行实验,Ellma 试剂应现用现配,避免过长时间的存放,以免影响实验结果。

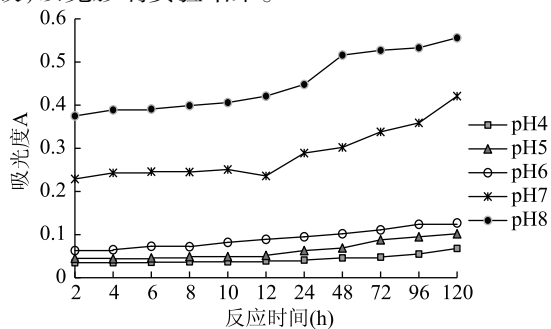


图6 Ellma 试剂缓冲液 pH 对吸光度的影响

Fig.6 Optimal pH for formulation of Ellma reagent buffer

2.5 反应的最佳 pH 及最佳测定时间

由图 7 可以看出,生成物 TNBA 在 pH7、8 时,吸光度值最高,且在 60 min 内稳定性较好,说明 TNBA 在碱性条件下比较稳定。这与王俊坤^[27]在 DTNB 比

表4 DTNB 比色法测定结果的相对标准偏差(RSD)

Table 4 Relative standard deviation(RSD) of DTNB colorimetric assay

项目	测定值						平均值	RSD(%)
吸光度 A	0.348	0.342	0.356	0.357	0.360	0.337	0.351	3.10

色法测定金属硫蛋白含量中的研究规律一致。由图8可知,在碱性条件下,当 pH = 7.2 时,吸光度值最大,说明 TNBA 生成量最多,且 TNBA 在 30 min 内变化不大,比较稳定,而且结合 Ellma 试剂在中性或者偏碱性条件下会出现裂解,为保证 TNBA 的稳定又考虑到显色剂的性质,最终选择 pH7.2 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液进行定容,并在 30 min 内进行检测。

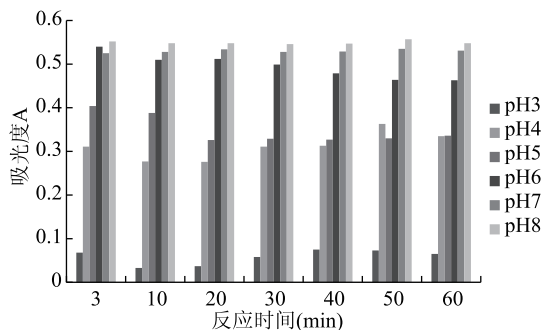


图7 Ellma 试剂缓冲液在 pH3~8 的稳定性

Fig.7 Stability of Ellma reagent buffer solution in pH3~8

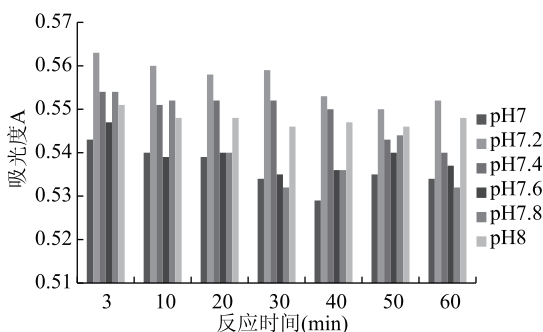


图8 Ellma 试剂缓冲液在 pH7~8 下的稳定性

Fig.8 Stability of Ellma reagent buffer solution at pH7~8

2.6 DTNB 比色法加标回收率、精密度、方法检测限

加标回收率、精密度、方法检测限结果分别见表4~表6,加标回收率为 75.83%~88.15%,相对标准偏差为 3.10% < 5%,表明该方法具有较好的重现性和准确度。DTNB 比色法的方法检测限为 7.57 $\mu\text{g/g}$ 。

3 结论

酸水解法前处理条件为:水解时间 24 h,盐酸浓度 6 mol/L,质量体积比 1:20 g/mL,水解温度 130 $^{\circ}\text{C}$,测定鸡全蛋粉中 MTs 含量为 0.4821 mg/g,水解度为 55.28%。优化了 DTNB 比色法测定条件,并使用 DTNB 比色法测定鸡全蛋粉中 MTs 含量,最终选用 pH 为 4.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液配制 Ellman 试剂,反应最佳 pH 为 7.2。使用 DTNB 比色法测量样品中 MTs 含量,加标回收率最高为 88.15%,相对标准偏差小于 5%,DTNB 比色法的方法检测限为 7.57 $\mu\text{g/g}$,由此可以得出该方法具有较好的重现性和准确度,本方法可以用于样品中 MTs 的快速检测。

表3 DTNB 比色法加标回收率实验结果

Table 3 The results of spiked recovery by DTNB colorimetric method

加入鸡蛋粉中 MTs 含量 (μg)	加入标准品中 MTs 含量 (μg)	MTs 测定量 (μg)	回收率 (%)	RSD (%)
40	100	133.53	83.83	2.75
		135.26	88.15	
		130.76	84.40	
80	200	265.21	81.51	2.68
		262.34	77.93	
		268.98	86.21	
100	300	380.23	80.23	3.10
		379.85	79.85	
		375.83	75.83	

表5 DTNB 比色法方法检测限

Table 5 DTNB colorimetric method detection limit

次数	MTs 含量 ($\mu\text{g/g}$)	平均 MTs 含量 ($\mu\text{g/g}$)	S ($\mu\text{g/g}$)	检测限 ($\mu\text{g/g}$)
1	45.32	44.34	2.41	7.57
2	46.38			
3	43.20			
4	44.59			
5	39.98			
6	43.62			
7	47.32			

参考文献

- [1] Coyle P, Philcox J C, Carey L C, et al. Metallothionein: The multipurpose protein[J]. Cellular and Molecular Life Sciences CmLS, 2002, 59(4): 627-647.
- [2] Xue J H, Qian Q M, Wang Y S, et al. Resonance light scattering determination of metallothioneins using levofloxacin-palladium complex as a light scattering probe[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2013, 102(2): 205-211.
- [3] Qian Q M, Wang Y S, Zhou B, et al. Fluorescence quenching determination of metallothioneins using 8-hydroxyquinoline-5-sulphonic acid-Cd(II) chelate[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2013, 118(24): 992-998.
- [4] Arriaga J M, Levy E M, Bravo A I, et al. Metallothionein expression in colorectal cancer; Relevance of different isoforms for tumor progression and patient survival[J]. Hum Pathol, 2012, 43(2): 197-208.
- [5] 励建荣, 宣伟, 李学鹏, 等. 金属硫蛋白的研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(17): 392-396.

- [6] Mao H, Wang D H, Yang W X. The involvement of metallothionein in the development of aquatic invertebrate [J]. *Aquat. Toxicol*, 2012, 110-111 (4): 208-213.
- [7] 徐炳政, 张东杰, 王颖, 等. 金属硫蛋白及其重金属解毒功能研究进展 [J]. *中国食品添加剂*, 2014 (5): 171-175.
- [8] Lopez Alonso M, Benedito J L, Garcia-Vaquero M, et al. The involvement of metallothionein in hepatic and renal Cd, Cu and Zn accumulation in pigs [J]. *Livestock Science*, 2012, 150 (1-3): 152-158.
- [9] Hardivillier Y, Denis F, Demattei M V, et al. Metal influence on metallothionein synthesis in the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus thermophilus* [J]. *Comparative Biochemistry & Physiology Part C*, 2006, 143 (3): 321.
- [10] Figueira E, Branco D, Antunes S C, et al. Are metallothionein equally good biomarkers of metal and oxidative stress [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2012, 84 (10): 185-190.
- [11] 杨丽芳. 金属硫蛋白的心肌保护机制研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2014.
- [12] 唐秀丽, 秦春晶, 孙瑞成, 等. 金属硫蛋白抗氧化作用研究进展 [J]. *山东化工*, 2015, 44 (11): 42-43.
- [13] Bebianno M J, Santos C, Canario J, et al. Hg and metallothionein-like proteins in the black scabbardfish *Aphanopus carbo* [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2007, 45 (8): 1443-1452.
- [14] Martín-Díaz M L, Blasco J, Sales D, et al. Field validation of a battery of biomarkers to assess sediment quality in Spanish ports [J]. *Environmental Pollution*, 2008, 151 (3): 631-640.
- [15] Damiens G, Mouneyrae C, Quiniou F, et al. Metal bioaccumulation and metallothionein concentrations in larvae of *Crassostrea gigas* [J]. *Environmental Pollution*, 2006, 140 (3): 492-499.
- [16] 王洋. 金属硫蛋白检测方法的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2010.
- [17] 高文宏, 李国基, 于淑娟, 等. 水解植物蛋白 [J]. *食品科学*, 2000, 21 (12): 167-170.
- [18] 胡燃, 张慜, 陈世豪. 酸水解麦麸蛋白质及氨基酸分析 [J]. *食品与生物技术学报*, 2015, 34 (1): 90-93.
- [19] 赵之伟, 曹冠华, 李涛. 金属硫蛋白的研究进展 [J]. *云南大学学报: 自然科学版*, 2013, 35 (3): 390-398.
- [20] 薛金花. 重金属污染生物标志物—金属硫蛋白检测新方法及其应用 [D]. 衡阳: 南华大学, 2007.
- [21] 赵锐, 纪建国, 袁洪生, 等. 兔肝金属硫蛋白亚型异构体的高效液相色谱分离与 ESI-MS, MALDI-TOF-MS 鉴定 [J]. *高等学校化学学报*, 2002, 23 (23): 1086-1090.
- [22] 王同青. 玉米金属硫蛋白的表达、纯化及其光谱学特性研究 [D]. 太原: 太原理工大学, 2016.
- [23] 刘璐, 刘慧萍, 陈伶俐, 等. 金属硫蛋白的检测方法研究进展 [J]. *应用化工*, 2015, 44 (9): 1729-1732.
- [24] GB 5009.5-2016 食品安全国家标准, 食品中蛋白质价的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [25] GB 5009.235-2016 食品安全国家标准, 食品中氨基酸态氮的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [26] 吴云辉, 王俊坤, 孙继鹏, 等. DTNB 比色法测定金属硫蛋白含量 [J]. *食品科学*, 2013, 34 (16): 196-199.
- [27] 王俊坤. 海洋源金属硫蛋白的提取、纯化和检测 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
- [28] 高玉清, 徐琼. 白刺提取物的急性经口毒性和遗传毒性研究 [J]. *医学动物防制*, 2017, 33 (2): 179-181.
- [29] 关则婷, 叶小忠, 梁群欢, 等. 葛花急性毒性及遗传毒性试验研究 [J]. *中国医药导报*, 2014, 11 (9): 130-134.
- [30] 王璐, 邹思颖, 李琼英, 等. 3 种海洋活性肽的 Ames 试验和小鼠精子畸形试验 [J]. *现代预防医学*, 2009, 36 (12): 2334-2336.
- [31] 刘海波, 隋海霞, 支媛, 等. 芹菜素的急性毒性、遗传毒性及亚慢性毒性试验研究 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2011, 23 (6): 489-494.
- [32] 肖志勇. 薏苡仁多糖急性毒性及遗传毒性试验研究 [J]. *中南药学*, 2009, 7 (9): 678-681.
- [33] 林梁鹏. 酰化茶多酚的安全性毒理学评价 [D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [34] 严婷, 钟义红, 张成香, 等. 松灵胶囊的毒理学安全性评价 [J]. *江苏预防医学*, 2017, 28 (1): 29-31, 38.
- [35] 孙宇立, 刘君丽, 潘杰, 等. 功能饮料的毒理学安全性研究 [J]. *中国临床医生杂志*, 2016, 44 (12): 99-105.
- [36] 周长慧, 常艳, 林海霞, 等. 遗传毒性标准试验组合结果分析的最近进展 [J]. *中国新药杂志*, 2010, 19 (17): 1512-1516.

(上接第 213 页)

22-28.

[14] 耿建暖. 食品辐照技术及其食品中的应用 [J]. *食品研究与开发*, 2013, 34 (15): 109-112.

[15] 胡少新. 我国食品辐照技术研究进展 [J]. *黑龙江农业科学*, 2011 (8): 149-151.

[16] 朱佳廷, 冯敏, 杨萍, 等. 辐照宠物食品毒理安全性试验研究 [J]. *江苏农业科学*, 2011, 39 (6): 488-490.

[17] 郭艳梅, 郑平, 孙际宾. 黑曲霉作为细胞工厂: 知识准备与技术基础 [J]. *生物工程学报*, 2010, 26 (10): 1410-1418.

[18] 陈凤莲, 方桂珍, 许世玉. 黑曲霉诱变方法比较研究 [J]. *食品研究与开发*, 2009, 30 (6): 24-27.

[19] 梁志宏, 黄昆仑, 何云龙, 等. 黑曲霉及其食品安全领域的赭曲霉毒素问题 [J]. *食品科技*, 2008 (10): 191-194.

[20] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 15193.1-2014 食品安全性毒理学评价程序 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.

[21] 吴露露, 汪岱迪, 宗卫峰, 等. 木糖醇的小鼠骨髓细胞微核试验 [J]. *海峡药学*, 2016, 28 (4): 32-33.

[22] 王欢. 电子束辐照大米食用安全性评价 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2017.