

壳寡糖分析检测方法的研究进展

王宗继, 李进国*, 张佰帅

(山东卫康生物医药科技有限公司, 临沂 276017)

摘 要: 壳寡糖是由壳聚糖水解得到的一类具有生物活性的高分子化合物, 具有抗氧化、提高免疫力、抑菌、降血糖等生物学作用, 被广泛应用于食品、医药、农业、化妆品等领域。近年来随着壳寡糖应用与研究的不深入, 壳寡糖的检测技术方法不断更新发展, 目前检测壳寡糖的方法有比色法、色谱法、质谱法以及电泳法。本文简单介绍了壳聚糖的分类, 并综述了近些年壳寡糖分析检测方法的研究进展, 以为壳寡糖检测方法的进一步发展提供参考。

关键词: 壳寡糖; 分类; 检测方法

Research progress on analysis and detection methods of chitosan oligosaccharide

WANG Zong-Ji, LI Jin-Guo*, ZHANG Bai-Shuai

(Shandong Weikang Biomedicine Technology Co., Ltd., Linyi 276017, China)

ABSTRACT: Chitosan oligosaccharide is a kind of macromolecular compound with biological activity, which is hydrolyzed by chitosan. It has biological effects such as oxidation resistance, immunity enhancement, bacteriostasis and hypoglycemia, and is widely used in food, medicine, agriculture, cosmetics and other fields. In recent years, with the deepening of application and research of chitosan oligosaccharides, the detection technology and methods of chitosan oligosaccharides have been constantly updated and developed. At present, the detection methods of chitosan oligosaccharides include colorimetry, chromatography, mass spectrometry and electrophoresis. This paper briefly introduced the classification of chitosan oligosaccharide, and reviewed the research progress on analysis and detection methods of chitosan oligosaccharide in recent years, in order to provide reference for the further development of chitosan oligosaccharide detection method.

KEY WORDS: chitosan oligosaccharide; classification; detection method

1 引 言

壳寡糖(chitosan oligosaccharide, COS), 又称低聚壳聚糖、氨基寡糖素、甲壳低聚糖, 是指以 β -1, 4 糖苷键连接的聚合度为 2~10 的低分子量的水溶性低聚氨基葡萄糖, 其分子化学式为 $(C_6H_{11}O_4N)_n$ 。通常情况下, 壳寡糖的聚合度为 2~20, 分子量为 340~3500 Da。但用于生物刺激素的低聚壳聚糖(也被称为甲壳寡聚糖), 要求聚合度为 2~30,

分子量 340~6000 Da^[1,2]。食品级要求聚合度 $n=2\sim10$ 的含量 $\geq 80\%$ (新食品原料公告), 分子量 340~1610 Da。

壳寡糖具有良好的水溶性, 其分子量低, 有利于生物体的吸收。壳寡糖链段分子上连接着大量的活性基团羟基和氨基, 因此具有独特的生物活性^[1]及抗氧化功能^[2]。壳寡糖还有提高人体免疫^[3,4]、抗肿瘤^[5]、抑菌^[6]、降血压^[7,8]、修复受损细胞、加速伤口愈合的功能^[9,10]。此外还具有降血糖, 强化肝脏机能, 延缓衰老, 增殖肠道有益菌, 调节

*通讯作者: 李进国, 高级工程师, 主要研究方向为壳寡糖功能与应用技术。E-mail: 18669517839@163.com

*Corresponding author: LI Jin-Guo, Senior Engineer, Shandong Weikang Biomedical Technology Co., Ltd., Science and Technology Road, High and New Tech Development Zone, Linyi 276017, China. E-mail: 18669517839@163.com

植物生长,防治植物疾病^[11],增强骨骼密度^[12,13]和保护神经元细胞^[14]等功效。因此,壳寡糖又被国际学术界称为继蛋白质、脂类、糖类、维生素和矿物质之后的人类第 6 生命要素^[15,16]。

随着对壳寡糖研究的不断深入,其检测技术方法也不断的涌现。本文对常用的壳寡糖检测法进行综述,包括比色法、色谱法、质谱法以及电泳法,以期对壳寡糖的检测技术的发展提供一定的参考。

2 壳寡糖的分类

根据应用领域不同,壳寡糖分为食品级壳寡糖、农业级壳寡糖和饲料级壳寡糖,农业级壳寡糖又分为氨基寡糖素、甲壳寡聚糖 2 类^[17-20]。不同种类的壳寡糖分子量及生物活性均有所不同,具体分类如表 1。

表 1 壳寡糖的分类
Table 1 Classification of chitooligosaccharides

名称	应用范围	分子量/Da
壳寡糖(食品级)	新食品原料	340~1610
氨基寡糖素	生物农药	340~2500
甲壳寡聚糖	生物刺激素	340~6000
壳寡糖(饲料级)	动物饲料	340~2500

2.1 食品级壳寡糖

国家卫计委于 2014 年颁布的《新食品原料》中将壳寡糖等 6 种非传统食用习惯的物品列为新食品原料^[18],并将这种主要成分为 2~10 个聚合度的寡聚氨基葡萄糖命名为壳寡糖,它是由壳聚糖经过酶降解而形成,其结构式如图 1。

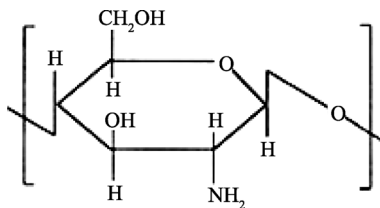


图 1 食品级壳寡糖的结构式

Fig.1 Structural formula of food grade chitosan oligosaccharide

目前食品级壳寡糖主要是以食品添加剂的形式添加到固体饮料、乳制品、保健品以及其他的食品中。随着居民保健意识的增加,对于壳寡糖的认可度也在不断的攀升,未来的壳寡糖在食品中将具有更广阔的应用前景。

2.2 农业级壳寡糖

农业级壳寡糖按照功能作用不同分为甲壳寡聚糖^[19]和氨基寡糖素^[20]。

生物刺激素是指源于生物的产品,可以促进或有利于植物体内的生理过程,包括有益于营养吸收,提高营养利用效率以及作物品质,通过生物作用诱导植物抗病、抗胁迫力,并可提高肥料有效成分利用率且无害于生态环境的一类相关物质^[19]。而壳寡糖属于 7 大类生物刺激素中的第 4 类,能够诱导植物免疫系统使植物获得或提高对病菌的抗性^[21]。目前根据壳寡糖作用机制的探究结果,推测壳寡糖诱导子首先被植物细胞膜上的受体蛋白识别并产生跨膜信号,可迅速引起质膜去极化、离子通道开放等早期响应,进而引起过氧化氢、活性氧等信使分子传递,激活植物激素途径,调控防卫基因的表达,积累次生代谢产物,最终实现抗病^[22-24]。

氨基寡糖素作为一种新型生物农药,不同于传统农药,它不直接作用于有害生物,而是通过激发植物自身的免疫反应,使植物获得系统性抗逆(包括抗逆性),从而起到抗逆、抗病虫和增产作用。氨基寡糖素易被土壤中的微生物降解为水和二氧化碳等环境易吸收的物质,无残留,其诱导的植物抗性组分均是植物的正常成分,对人、畜安全,无毒害,符合无公害农业发展的需求^[25]。

2.3 饲料级壳寡糖

壳寡糖用于饲料配方已成为新型饲料开发的方向之一,它可以提高动物的生产性能^[26]、增强动物机体免疫力^[27]、活化肠道双歧杆菌活性^[28]等。

3 壳寡糖分析测定方法

3.1 比色法

目前关于壳寡糖的初步分析多采用比色法,根据使用的化学药品不同,又分为 Elson-Morgan 法、苯酚-硫酸法和 3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)法 3 种。

郭建敏^[29]通过 DNS 显色法确定了壳寡糖的平均聚合度及平均相对分子质量。李克成等^[30]通过实验对比,发现 Elson-Morgan 法不适用于壳寡糖含量的测定;苯酚-硫酸法中盐酸氨基葡萄糖在 200~3000 μg 范围与吸光度也有很好的线性关系,但苯酚-硫酸法对壳寡糖的测定值较实际值偏大;DNS 法测定壳寡糖与实际值接近,平均回收率为 96.1%,且 DNS 法操作简单、快速,重现性好,可直接用于壳寡糖含量的测定。

刘琳等^[31]利用分光光度法测定壳寡糖平均聚合度,此方法经凝胶渗透色谱验证,能较为准确地判断壳寡糖的平均聚合度。Sabina 等^[32]采用水合茚三酮作为反应中的染色剂测定壳聚糖溶液的浓度,这种方法具有灵敏及可重复的优点,但是所测得的标准曲线只适用于脱乙酰相近壳聚糖样品的浓度定量分析。

Riccardo 等^[33]利用 Cibacron 亮红 3B-A 作为染色剂,采用分光光度的方法,在 557 nm 条件下,对含有不同壳聚

糖浓度的标准溶液和 Cibacron 亮红 3B-A 混合反应后的溶液进行测试, 在壳聚糖浓度为 2~50 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内, 壳聚糖的浓度与其吸光值呈线性关系。Elson 和 Morgan 于 1933 年建立的测定方法^[34]测定样品中的氨基葡萄糖为游离单糖氨基, 适用于测定壳寡糖的含量, 将壳寡糖先水解成游离糖然后测定。

虽然比色法技术简单, 对设备要求不高, 成本较低, 但由于其准确性不高, 因此有必要开发一种新的可准确测定壳寡糖的分析方法。

3.2 色谱法

(1) 薄层色谱法

薄层色谱法是在纸层析法的基础上发展起来的, 其分辨率高, 分离效果好, 简便易行, 重现性好, 在同一块薄板上可同时分析多个样品。杨国宁等^[35]通过实验建立了聚合度为 2~10 的壳寡糖的薄层层析分析方法, 在异丙醇:水:氨水=60:30:4($V:V:V$)的展开体系中, 各壳寡糖可以得到很好的分离, 各单体间比移值差异明显, 无拖尾现象。通过对比薄层色谱法与高效液相色谱法分析壳寡糖单体的效果, 得出薄层色谱法具有快速、有效、方便的优点, 可以作为定性分析壳寡糖单体纯度的方法。

孟显丽等^[36]通过实验建立了薄层色谱分析壳寡糖的条件, 壳寡糖薄层色谱分析法最佳的展开剂是乙酸乙酯:乙醇:水:氨水=5:5:4:0.3($V:V:V:V$), 样品上行展距为 8 cm, 采用浸渍法显色。该分离效果较好, 操作简便, 重现性好。

薄层层析法虽然可以分析壳寡糖, 价格低廉, 但此方法操作时间长, 只能进行微量生产, 无法定量, 可用于观察壳寡糖单体分布情况。但是, 要大规模地对壳寡糖分离分析还需要不断地寻求新的技术。

(2) 高效液相色谱法

高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)是定量分析低聚糖类及其他糖类最常用的方法, 具有方便、快速、分离效果好、分辨率高、重现性好和不破坏样品等优点, 该方法必须有标准品作参照^[37], 是目前分析检测壳寡糖最常用的方法之一。

蒋慧等^[38]探讨高效液相色谱法在壳寡糖含量测定中的应用, 结果表明 HPLC 法可快速、高效地测定壳寡糖样品中 2~6 个聚合度壳寡糖的含量。刘文丽等^[39]将壳寡糖经浓盐酸水解生成盐酸氨基葡萄糖, 以高效液相色谱法测定盐酸氨基葡萄糖来确定壳寡糖的含量, 发现盐酸氨基葡萄糖的质量浓度在 1.0~8.0 mg/mL 范围内与色谱峰峰面积呈良好的线性关系, 相关系数为 0.9989, 方法检出限为 0.8%; 测定结果的相对标准偏差为 1.5%($n=6$), 加标回收率为 97.4%~99.2%, 说明高效液相色谱法定量准确, 适合于壳寡糖的检测。

胡祖艳等^[40]建立了液相色谱法测定辣木叶壳寡糖袋

泡茶中壳寡糖的含量, 其重复性实验的相对标准偏差为 0.15%, 回收率为 94.52%~98.52%, 在进样量 0.0913~0.913 μg 内呈线性, $r=0.99868$, 符合实验要求。

高效液相色谱法操作简单、定量准确, 适合于壳寡糖的检测。但需要大型的仪器, 流动相和标准品花费昂贵, 对于一般的实验室来说, 初期筛选不宜使用高效液相色谱法。

(3) 离子色谱法

离子色谱法是利用离子交换原理, 连续对共存的多阴离子或阳离子进行分离、定性和定量的方法。邵波等^[41]建立了一种分离度好、灵敏度高的壳寡糖离子色谱快速检测方法, 该方法需要样品量少, 检验快速, 无需衍生, 为壳寡糖质量分析、组分分离提供了参考依据。陈梅兰等^[42]利用高效阴离子交换色谱-积分脉冲安培检测法对 5 种壳寡糖(聚合度 $DP=2\sim6$)标准样品进行分离, 确定通过保留因子定性检测壳寡糖的聚合度。

离子色谱作为高效液相色谱的一个新的发展方向, 虽然只有十几年的历史, 但对于含有多种阴离子(或阳离子)的混合物灵敏度较高, 检测线性范围更广。由于壳寡糖是携带正电荷的碱性多糖, 因此使用离子色谱法检测壳寡糖应用前景较好, 可有效地解决糖的种类繁多、结构复杂多样等干扰因素。

(4) 凝胶渗透色谱

凝胶渗透色谱法(gel permeation chromatography, GPC)是利用流动相与控制孔径分布的固定相接触从而使溶质按分子体积大小分离的色谱方法, 该方法速度快、重复性好。凝胶色谱不但可以用于分离测定高聚物的相对分子质量和相对分子质量分布, 同时根据所用凝胶填料不同, 可分离脂溶性和水溶性物质, 分离相对分子质量的范围从几百万到 100 以下。凝胶色谱不能分辨分子大小相近的化合物, 相对分子质量相差需在 10%以上才能得到分离^[43]。常用于低聚糖的测定。

盛以虞等^[44]用高效凝胶渗透色谱法测定不同分子量的壳寡糖, 色谱柱为 TSK G3000SWXL, 流动相为 0.1 mol/L 醋酸钠和醋酸, 检测器为示差折光检测器, 经普适校正后才能比较准确地用于测定壳聚糖样品的分子量。胡瑞^[45]通过运用 GPC 法测定不同酶解时间产物分子量数据, 可以指导生产实践中通过控制酶解时间控制各特定分子量的壳寡糖产品, 方便快速地获取壳寡糖分子量及分布情况, 同时通过质谱分析验证发现该方法的可靠性较好。刘羿君等^[46]通过凝胶渗透色谱法跟踪研究了过氧化氢对壳聚糖氧化降解过程中壳聚糖的分子量及其分布的影响。

3.3 质谱法

质谱法是检测壳寡糖聚合度最有效的方法, 可以利用时间飞行质谱(time-of-flight mass spectrometer, TOF-MS)

直接测定壳寡糖的分子量,同时测定壳寡糖是否带有 *N*-乙酰基,也可以利用基体辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析壳寡糖。

飞行时间质谱技术可实现对壳寡糖的聚合度、分子式及其分布进行高效准确的检测^[47],但是 TOF-MS 仪器价格昂贵,限制了该技术的广泛使用。

张静文等^[48]采用 3-(2-吡啶二巯基)丙酸 *N*-羟基琥珀酰亚胺酯对壳寡糖进行衍生化,对产物进行分离和纯化,得到溶于甲醇的壳寡糖衍生化产物,采用红外光谱、核磁共振氢谱和碳谱对衍生化产物结构进行表征。将该衍生物溶于甲醇,采用电喷雾电离质谱对产物进行聚合度测定,结果表明该壳寡糖样品主要有壳三糖、壳四糖、壳六糖和壳九糖组成。

3.4 电泳法

目前用电泳法分析壳寡糖的报道不多,采用这种方法难于实现较大规模的分离纯化,它仅仅为我们提供了一条新的思路。例如王亮等^[49]用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳方法分析检测壳寡糖组成,能够简单、快速、有效地定性检测壳寡糖。

4 展望

在减少饲料中抗生素以及农业生产中农药用量的大趋势下,壳寡糖在农业和饲料中的应用受到国内外学者的广泛关注,同时随着各种检测技术的发展,壳寡糖在食品中的应用将会越来越广泛,而适用于不同食品的特定分子量范围的壳寡糖及壳寡糖加入食品的口感影响及改善问题,将会得到进一步的研究,但在应用的过程中也面临着很多理论和实际问题,如何进一步提高壳寡糖分析的准确性和灵敏度仍是未来壳寡糖研究的热点之一。

参考文献

- [1] Dang Y, Li S, Wang W, *et al.* The effects of chitosan oligosaccharide on the activation of murine spleen CD11c(+) dendritic cells via toll-like receptor4 [J]. *Carbohydr Polym*, 2011, 83 (3): 1075–1081.
- [2] Yen MT, Yang J, Mau J. Antioxidant properties of chitosan from crab shells [J]. *Carbohydr Polym*, 2008, 74: 840–844.
- [3] Ma Y, Huang Q, Lv MY, *et al.* Chitosan-Zn chelate increases antioxidant enzyme activity and improves immune function in weaned piglets [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2014, 158(1): 45–50.
- [4] Mei YX, Chen HX, Zhang J, *et al.* Protective effect of chitooligosaccharides against cyclophosphamide-induced immune-suppression in mice [J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, (62): 330–335.
- [5] Xu W, Jiang C, Kong X, *et al.* Chito-oligosaccharides and *N*-acetyl-*D*-glucosamine stimulate peripheral blood mononuclear cell-mediated antitumor immune responses [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 6(2): 385–390.
- [6] Wu SJ, Pan SK, Wang HB, *et al.* Preparation of chitooligosaccharides from cicada slough and their antibacterial activity [J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, (62): 348–351.
- [7] Ngo DN, Qian ZJ, Je JY, *et al.* Aminoethyl chitooligosaccharides inhibit the activity of angiotensin converting enzyme [J]. *Proc Biochem*, 2008, 43 (1): 111–123.
- [8] Huang R, Mendis E, Kim SK. Improvement of ACE inhibitory activity of chitooligosaccharides(COS) by carboxyl modification [J]. *Bioorgan Med Chem*, 2005, 13(11): 3649–3655.
- [9] Yang J, Cai J, Wu K, *et al.* Preparation, characterization and anticoagulant activity *in vitro* of heparin-like 6-carboxylchitin derivative [J]. *Int J Biol Macromol*, 2012, 50: 1158–1164.
- [10] Ribeiro MP, Espiga A, Silva D, *et al.* Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing [J]. *Wound Repair Regen*, 2009, (17): 817–824.
- [11] Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans [Z]. 2006.
- [12] Ratanavaraporn J, Kanokpanont S, Tabata Y, *et al.* Growth and osteogenic differentiation of adipose-derived and bone marrow-derived stem cells on chitosan and chitooligosaccharides films [J]. *Carbohydr Polym*, 2009, 78 (4): 873–878.
- [13] 魏长征, 韩宝芹, 刘万顺, 等. 壳寡糖对绝经后骨质疏松症模型大鼠骨质量作用的研究[J]. *中国海洋大学学报*, 2007, 37(3): 443–448.
Wei CZ, Han BQ, Liu WS, *et al.* Effect of chitooligosaccharide on bone quality in postmenopausal osteoporosis rats [J]. *Period Ocean Univ China*, 2007, 37 (3): 443–448.
- [14] Dai X, Chang P, Zhu Q, *et al.* Chitosan oligosaccharides protect rat primary hippocampal neurons from oligomeric B-amyloid 1-4,2-induced neurotoxicity [J]. *Neurosci Lett*, 2013, (554): 64–69.
- [15] Tharanathan RN, Kittur FS. Chitin-the undisputed biomolecule of great potential [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2003, 43(1): 61–69.
- [16] Merzendorfer H, Zimoch L. Chitin metabolism in insects: Structure, function and regulation of chitin synthases and chitinase [J]. *J Exp Biol*, 2003, 206 (24): 4393–4412.
- [17] 余劲聪, 何舒雅, 林克明. 基于专利的我国壳寡糖种植业领域技术发展态势分析[J]. *中国农业科技导报*, 2017, (6): 7–15.
She JC, He SY, Lin KM. Analysis on the technology development of china's shell oligosaccharide planting area based on patent [J]. *J Agric Sci Technol China*, 2017, (6): 7–15.
- [18] 佚名. 国家卫生计生委批准壳寡糖等 6 种新食品原料[J]. *中国食品学报*, 2014, (5): 37.
Anonymity. The national health and family planning commission approved six new food materials, including chitosan oligosaccharide [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2014, (5): 37.
- [19] T/CAI 中国农业国际合作促进会团体标准 生物雌激素 甲壳寡聚糖[S].
T/CAI China agriculture international cooperation promotion association group standard-Bioestrogen-Chitosan oligosaccharide [S].
- [20] 张洪山, 陈德清, 任士伟, 等. 氨基寡糖素对番茄生长的影响[J]. *现代农业科技*, 2018, (6): 63.
Zhang HS, Chen DQ, Ren SW, *et al.* Effects of amino oligosaccharide on tomato growth [J]. *Mod Agric Technol*, 2018, (6): 63.
- [21] 谢尚强, 王文霞, 张付云, 等. 植物生物刺激素研究进展[J]. *中国生物防治学报*, 2019, 35(3): 487–496.
Xie SQ, Wang WX, Zhang FY, *et al.* Advances in plant biostimulants [J]. *Chin J Biol Control*, 2019, 35(3): 487–496.

- [22] Zhang H, Wang W, Yin H, *et al.* Oligochitosan induces programmed cell death in tobacco suspension cells [J]. *Carbohydr Poly*, 2012, 87(3): 2270–2278.
- [23] Jia X, Meng Q, Zeng H, *et al.* Chitosan oligosaccharide induces resistance to tobacco mosaic virus in *Arabidopsis* via the salicylic acid-mediated signalling pathway [J]. *Sci Rep*, 2016, (6): 26144.
- [24] Yin H, Du Y, Dong Z. Chitin oligosaccharide and chitosan oligosaccharide: Two similar but different plant elicitors [J]. *Front Plant Sci*, 2016, (7): 522.
- [25] 佚名. 新型生物农药:氨基寡糖素[J]. 营销界(农资与市场), 2018, (13): 71–72.
- Anonymity. A new biopesticide: Amino oligosaccharide [J]. *Market (Agric Market)*, 2018, (13): 71–72.
- [26] Liu P, Piao XS, Kim SW, *et al.* Effects of chito -oligosaccharide supplementation on the growth performance, nutrient digestibility, intestinal morphology, and fecal shedding of *Escherichia coli* and *Lactobacillus* in weaning pigs [J]. *J Anim Sci*, 2008, 86(10): 2609–2618.
- [27] Wu GJ, Wu CH, Tsai GJ. Chitooligosaccharides from the shrimp chitosan hydrolysate induces differentiation of murine RAW264. 7 macrophages into dendritic-like cells [J]. *J Funct Food*, 2015, (12): 70–79.
- [28] 胡志鹏. 壳寡糖的研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2003, 24(4): 210.
- Hu ZP. Research progress of chitooligosaccharides [J]. *Chin J Biochem Drugs*, 2003, 24(4): 210.
- [29] 郭建敏. 光度法测定甲壳低聚糖的平均相对分子质量[J]. 化学世界, 2001, (6): 293–295.
- Wu JM. Determination of mean relative molecular mass of chitosan oligosaccharide by photometric analysis [J]. *Chem World*, 2001, (6): 293–295.
- [30] 李克成, 李鹏程, 邢荣娥, 等. 壳寡糖含量的测定方法比较[J]. 药物分析, 2011, (8): 1530–1532.
- Li KC, Li PC, Xing RE, *et al.* Comparison of methods in determination of chitosan oligosaccharide [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2011, (8): 1530–1532.
- [31] 刘琳, 张杰, 李鹏, 等. 分光光度法测定壳寡糖平均聚合度的研究[J]. 食品科技, 2010, 35(9): 318–321.
- Liu L, Zhang J, Li P, *et al.* Research of the spectrophotometry for the average polymerization rate of chito-oligosaccharide [J]. *Food Sci Technol*, 2010, 35(9): 318–321.
- [32] Sabina P, Kjell M, Vaerum, *et al.* Quantitative determination of chitosans by ninhydrin [J]. *Carbohydr Polym*, 1999, (38): 115–122.
- [33] Riccardo A, Muzzarelli A. Colorimetric determination of chitosan [J]. *Anal Biochem*, 1998, (260): 257–259.
- [34] 凌沛学. 透明质酸[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000.
- Ling PX. Hyaluronic acid [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2000.
- [35] 杨国宁, 陈列欢, 曾毅伟, 等. 壳寡糖和壳聚糖酶水解特性的薄层色谱分析[J]. 中国海洋大学学报, 2013, 43(2): 23–27.
- Yang GN, Chen LH, Zeng YW, *et al.* TLC analysis of hydrolysis characteristics of chitooligosaccharides and chitosan enzymes [J]. *J Ocean Univ China*, 2013, 43(2): 23–27.
- [36] 孟显丽, 陈国华, 孙明昆, 等. 薄层色谱法分析壳寡糖[J]. 青岛海洋大学学报, 2002, 32(4): 641–644.
- Meng XL, Chen GH, Sun MK, *et al.* TLC analysis of chitooligosaccharides [J]. *J Qingdao Ocean Univ*, 2002, 32(4): 641–644.
- [37] 董惠忠. 聚合度 6–8 壳寡糖的制备关键技术研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2014.
- Dong HZ. Study on key technologies for the preparation of chitosan oligosaccharides with polymerization degree 6–8 [D]. Shanghai: China University of Science and Technology, 2014.
- [38] 蒋慧, 李恒, 张澜, 等. 高效液相色谱法测定壳寡糖的含量[J]. 发酵科技通讯, 2016, 5(4): 232–236.
- Jiang H, Li H, Zhang L, *et al.* Determination of chitosan oligosaccharide by high performance liquid chromatography [J]. *Ferment Sci Technol Commun*, 2016, 45(4): 232–236.
- [39] 刘文丽, 严虞虞, 杨华瑞, 等. 高效液相色谱法测定壳寡糖的含量[J]. 化学分析计量, 2018, 27(6): 87–90.
- Liu WL, Yan YY, Yang HR, *et al.* Determination of chitosan oligosaccharide by high performance liquid chromatography [J]. *Chem Anal Meter*, 2018, 27(6): 87–90.
- [40] 胡祖艳, 仁绍坤, 陆应彩. 辣木叶壳寡糖袋泡茶中壳寡糖的含量测定方法[J]. 现代食品, 2017, (21): 90–95.
- Hu ZY, Reng SK, Lu YC. Determination of the content of chitosan oligosaccharide in moringa leaves chitosan tea [J]. *Mod Food*, 2017, (21): 90–95.
- [41] 邵波, 陈梅兰, 金月珠. 离子色谱快速检测壳寡糖含量[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(11): 1973–1977.
- Shao B, Chen ML, Jin YZ. Rapid detection of chitosan oligosaccharide by ion chromatography [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2017, 37(11): 1973–1977.
- [42] 陈梅兰, 林智威, 卢珩俊, 等. 离子色谱分离保留因子计算定性分析低聚壳寡糖的研究[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(1): 43–50.
- Chen ML, Lin ZW, Lu HJ, *et al.* Application of ion chromatography separation and retention factor calculation in the qualitative analysis of chitosan oligosaccharide of low degree of polymerization [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2017, 37(1): 43–50.
- [43] 王平. 高效液相色谱在中药研究中的应用[M]. 北京: 冶金工业出版社, 2010.
- Wang P. Application of high performance liquid chromatography in the study of traditional Chinese medicine [M]. Beijing: Metallurgical Industry Press, 2010.
- [44] 盛以虞, 仲惠娟. 高效凝胶渗透色谱法测定壳寡糖的分子量[J]. 中国药科大学学报, 1994, 25(4): 242–244.
- Sheng YY, Zhong HH. Determination of molecular weight of chitosan by high performance gel permeation chromatography [J]. *J China Pharm Univ*, 1994, 25(4): 242–244.
- [45] 胡瑞. 酶解法制备特定重均分子量及窄分布壳寡糖的工艺研究[D]. 武汉: 武汉理工大学, 2012.
- Hu R. Study on enzymatic preparation of specific weight-average molecular weight and narrow distribution chitosan oligosaccharides [D]. Wuhan: Wuhan University of Technology, 2012.
- [46] 刘羿君, 蒋英, 封云芳, 等. 用 GPC 研究壳聚糖氧化降解过程中的分子量及其分布[J]. 功能高分子学报, 2014, 12(17): 671–674.
- Liu YJ, Jiang Y, Feng YF, *et al.* Study on molecular weight and distribution of chitosan in the process of oxidative degradation by GPC [J]. *J Funct Pol*, 2014, 12(17): 671–674.
- [47] 陈勉, 朱希强, 李志明, 等. 聚合度为 6–8 的壳寡糖的制备[J]. 食品与药品, 2008, 10(2): 14–16.
- Chen M, Zhu XQ, Li ZM, *et al.* Preparation of chitooligosaccharides with the degree of polymerization in 6–8 [J]. *Food Drugs*, 2008, 10(2): 14–16.

- [48] 张静文, 陈会英, 张久明, 等. 用高分辨液相质谱法测定壳寡糖的聚合度[J]. 化学世界, 2017, (10): 600–603.

Zhang JW, Chen HY, Zhang JM, *et al.* Measurement of polymerization degree of chitosan oligosaccharide by high performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Chem World, 2017, (10): 600–603.

- [49] 王亮, 吴昌英, 刘桦, 等. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析壳寡糖[J]. 成都医学院学报, 2008, 3(4): 263–265.

Wang L, Wu CY, Liu H, *et al.* Electrophoretic analysis of chitooligosaccharide by SDS-PAGE [J]. J Chengdu Med Coll, 2008, 3(4): 263–265.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



王宗继, 主要研究方向为企业发展战略研究。

E-mail: 1292928721@qq.com



李进国, 高级工程师, 主要研究方向为壳寡糖功能与应用技术。

E-mail: 18669517839@163.com