壳聚糖氧化降解制备聚合度 6 以下的壳寡糖

吴丽华[1]，周萌[1]，郑必胜[1]，叶盛权[2]
（1.华南理工大学食品科学与工程学院，广东广州 510640）（2.广东海洋大学食品科技学院，广东湛江 524088）

摘要：壳寡糖是壳聚糖经降解后的低聚物，其相对分子质量较小，水溶性好，易于吸收，生物活性高。本实验采用过氧化氢氧化降解脱乙酰度高于 95%的壳聚糖，利用离子色谱-脉冲安培法对低聚合度的壳寡糖进行定性和定量分析，以制备聚合度在 6 以下的壳寡糖。以降解产物的离子色谱中聚合度 6 以下的峰面积和与产物得率之积作为响应指标，并结合凝胶渗透色谱来考察过氧化氢浓度、反应时间、反应温度对壳聚糖降解的影响及降解特性，并利用响应面分析法对氧化条件进行优化。研究结果表明，采用离子色谱测定聚合度 6 以下的壳寡糖在方法学上是可行的，具有良好的精密度、稳定性和重现性。得到的最佳降解工艺条件为：过氧化氢浓度 4.50%、反应时间 6 h、反应温度 56 ℃。由最优条件下的降解产物离子色谱图可知，聚合度越低的壳寡糖越容易得到；可利用离子色谱法对壳聚糖的降解过程进行调控。

关键词：壳聚糖；壳寡糖；氧化降解；离子色谱
文章篇号：1673-9078(2017)9-140-146 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.9.021

Preparation of Chitooligosaccharides with the Degree of Polymerization below Six by Oxidative Degradation of Chitosan

WU Li-hua[1], ZHOU Meng[1], ZHENG Bi-sheng[1], YE Sheng-quan[2]
(1.College of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)
(2.College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: Chitooligosaccharides can be obtained by chitosan (COS) degradation. Chitooligosaccharides have a low molecular weight, good water solubility, and high biological activity, and can be easily absorbed. In this work, Chitosan with a deacetylation degree of over 95% underwent oxidative degradation by hydrogen peroxide to prepare chitooligosaccharides with a degree of polymerization below six, which was qualitatively and quantitatively analyzed by ion chromatography and pulsed amperometric detection. The effect and degradation characteristics of hydrogen peroxide concentration, reaction time, and reaction temperature on chitosan degradation were investigated using gel permeation chromatography and using the product of the total peak area of chitooligosaccharides in the ion chromatogram of the degradation products and the yield of products as the response index. In addition, the oxidation conditions were optimized by a response surface analysis method. The results showed that in terms of methodology, it was feasible to use ion chromatography to determine chitooligosaccharides, and the method had good precision, stability, and reproducibility. The optimum degradation conditions were as follows: hydrogen peroxide concentration 4.50%, reaction time 6 h, and reaction temperature 56 ℃. From the chromatographic analysis of the degradation products under optimal conditions, the chitooligosaccharides with a lower degree of polymerization were easier to obtain, and the degradation process of chitosan could be controlled by ion chromatography.

Key words: chitosan; chitooligosaccharide; oxidative degradation; ion chromatography

壳寡糖是壳聚糖其经降解后得到的聚合度为 2~20 的水溶性低聚糖[1]，它是由氨基葡萄糖通过 β-1,4-糖苷键连接而成。与壳聚糖相比，其分子量更小，水溶性大大提高，表现出许多独特的生理活性，如具有抗菌抗炎、降血糖血压、抑制肿瘤和改善肠道菌群促进肠道健康等作用[2]。单糖（氨基葡萄糖）可制造蛋白多糖润滑关节，防止骨关节摩擦疼痛，使关节活动

收稿日期：2017-03-03
基金项目：广东省科技计划项目（2013B090800033、2013B090600129、2014A010107007）
作者简介：吴丽华（1990-），女，硕士研究生，研究方向：糖类物质的制备及应用
通讯作者：郑必胜（1966-），男，博士，副教授，研究方向：天然活性多糖制备与功能应用

自如，治疗骨质疏松[3]；聚合度 2~3 的壳寡糖可用来控制食欲，与芙蓉提取物及左旋肉碱复配有减肥功效；聚合度 2~8 的壳寡糖可作为乳酸杆菌和保加利亚乳酸杆菌的益生原，与乳酸菌粉复配可作为膳食补充剂；聚合度 2~7 的壳寡糖可预防哺育动物感冒和其上呼吸道感染，并且可以缓解感染病症[2]。由于壳寡糖在医药[4]、食品[5]、农业[6]和化妆品[7]等方面显示了独特的生理活性，越来越被人们所重视。

离子色谱能够有效检测出糖类物质[8]，因为糖在碱性环境中电离并以阴离子形式存在，可在阴离子交换柱上被保留而得到分离，脉冲安培检测器能将糖发生氧化反应电位的变化转化为电信号[9]。刘庆生等报道一种改进的色谱方法，可直接定量分析低浓度糖[10]，可用于壳寡糖的分析。

降解壳聚糖的方法有化学降解、物理降解和生物酶降解。物理方法可使壳聚糖降解，但效率低，且降解程度有限，得到的分子量较大。酶法条件温和，反应专一性强，易得到所需分子量范围的低聚糖，但获得大量、专一的高活力酶用于工业化大规模生产尚存在一定困难。化学法简便易行，试剂廉价，易于产业化，但所得壳寡糖分子量范围较宽[11]。

本研究拟将壳聚糖通过过氧化氢氧化降解得到聚合度 6 以下的壳寡糖。在建立离子色谱-脉冲安培法定量分析聚合度 6 以下壳寡糖含量的基础上，研究壳聚糖的氧化降解规律，并采用响应面分析法对降解过程进行优化。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

壳聚糖（脱乙酰度>95%）：浙江澳兴生物科技有限公司；葡聚糖系列标样：美国 APSC；壳寡糖标样：大连物化所；冰乙酸、醋酸钠、50%氢氧化钠为色谱纯；其它试剂均为分析纯。

A1260 型 HPLC 仪：美国 Agilent 公司；ICS-5000 离子色谱：美国 Dionex 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 壳聚糖氧化降解工艺

壳聚糖 2 g→4%乙酸溶解加过氧化氢降解反应调 pH 为 7.00→真空浓缩→乙醇沉淀的真空干燥，经干燥所得的产物即为壳聚糖降解产物

1.2.2 离子色谱检测的方法学考察

用浓度为 0.1 mol/L CH_3COOH~0.05 mol/L CH_3COONa 缓冲液，分别配制壳 1~6 糖的储备液，浓度为 0.0005，放置冰箱待用。

（1）精密度试验取壳 1~6 糖各标准品的储备液，用缓冲液配制成浓度为 5×10^{-6} 的混标，保证相同的进样体积 20 μL，连续进样 5 次，测定壳 1~6 糖峰面积值总和值及相对标准偏差 RSD 值。

（2）稳定性试验取壳 1~6 糖各标准品的储备液，用缓冲液配制成浓度为 5×10^{-6} 的混标，在 0 h、1 h、2 h、3 h 和 4 h 时分别进样检测，测定壳 1~6 糖峰面积总和值及相对标准偏差 RSD 值。

（3）重现性试验取壳 1~6 糖各标准品的储备液，用缓冲液配制成浓度为 50×10^{-6} 的混标。取一定量混标液稀释为 5×10^{-6}，连续操作 5 次，得五份浓度为 5×10^{-6} 的混标，测定每一份样品中壳 1~6 糖峰面积总和值及相对标准偏差。

1.2.3 反应条件对壳聚糖的氧化降解影响及规律

以壳聚糖氧化降解得到聚合度 6 以下的壳寡糖为目的，考察降解温度、过氧化氢的百分含量以及降解的时间三个关键因素对壳聚糖降解的影响。对于降解所得产物，用渗透凝胶色谱（GPC）测定分子量[12]后，用离子色谱分析壳寡糖含量，以聚合度≤6 糖峰面积总和与降解产物得率的乘积作为表征结果，其值越大，表明降解产物中壳 1~6 糖含量越高，其中，得率即经真空干燥所得降解产物与原料壳聚糖的质量之比。

1.2.4 壳寡糖的分析检测

GPC 检测条件：色谱柱 TSKgel G4000PWXL；流动相为 0.10 mol/L CH_3COOH~0.05 mol/L CH_3COONa 溶液[13]，待测样品浓度：0.50 mg/mL，流速 0.50 mL/min，柱温 30 ℃，检测器温度 35 ℃。

离子色谱检测条件：色谱柱 CarboPac PA20；流动相为 25 mmol NaOH，待测样品浓度：0.50 mg/mL，流速 0.50 mL/min。

1.2.5 氧化过程的优化-响应面法实验设计

依据单因素实验结果，以降解温度、时间及过氧化氢百分含量为试验因素，用离子色谱分析壳寡糖含量，以≤6 糖峰面积总和与降解产物得率的乘积（R_1）作为响应值，采用 Design Expert 8.0 软件设计

Box-Benhnken 试验。

2 结果与讨论

2.1 离子色谱-脉冲安培法测壳寡糖的方法学考察

按 1.2.4 中所示的色谱条件对壳聚糖降解产物进行定性定量的测定。根据壳六糖、壳五糖、壳四糖、壳三糖、壳二糖及氨基葡萄糖的单品标准品确定六种糖的保留时间，所有数据均重复三次测定取平均值，详见表 1。

（1）精密度试验考察结果

待测样品连续五次进样，RSD 值为 0.89%，精密度良好，测量值见表 2。

（2）稳定性试验考察结果

待测样品每隔 1 h 测一次，RSD 值为 0.082，稳定性佳，测量值见表 3。

（3）重现性试验考察结果

五个待测样品依次测定，RSD 值为 1.25%，重现性良好，测量值见表 4。

表 1 壳 1～6 糖标准品保留时间

Table 1 Retention time of oligochitosan with DP 1–6

标准品名称	保留时间/min
壳六糖	4.48
壳五糖	4.90
壳四糖	5.43
壳三糖	6.15
壳二糖	7.57
单糖	5.75

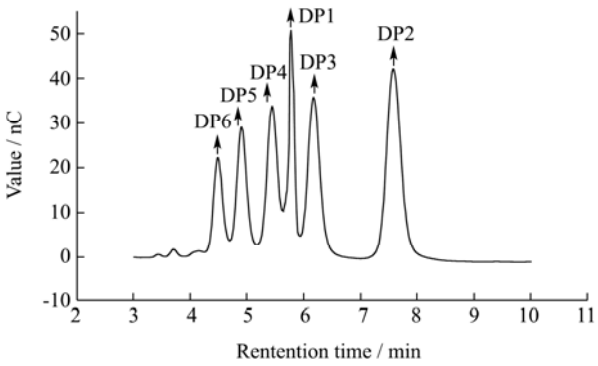


图 1 壳 1～6 糖混标的离子色谱图

Fig. 1 Ion chromatography of oligochitosan with DP 1–6

表 2 精密度试验

Table 2 Precision test

次数	1	2	3	4	5	RSD/%
壳 1~6 糖峰面积总和/nC	61.966	61.169	61.706	62.327	61.004	0.89

表 3 稳定性试验

Table 3 Stability test

时间/h	0	1	2	3	4	RSD/%
壳 1~6 糖峰面积总和/nC	61.897	61.903	61.912	61.798	61.924	0.082

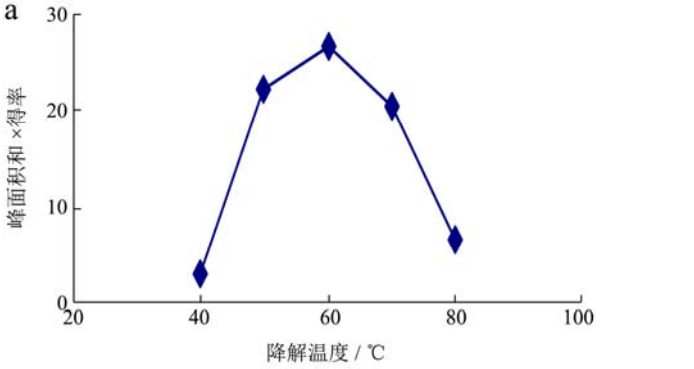
表 4 重现性试验

Table 4 Reproducibility test

样品	1	2	3	4	5	RSD/%
壳 1~6 糖峰面积总和/nC	61.733	62.225	61.022	62.905	61.184	1.25

2.2 壳聚糖的氧化降解特性及规律

2.2.1 降解温度对可控降解的影响



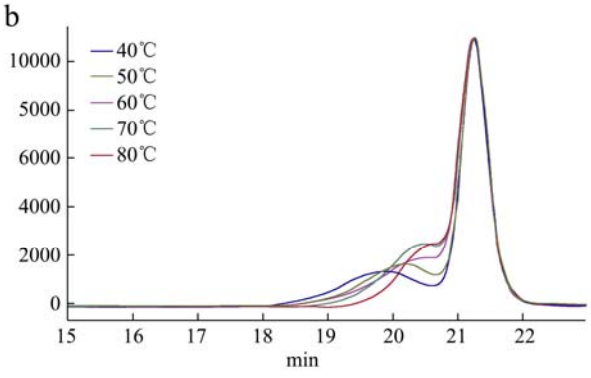


图 2 温度对降解产物的影响

Fig. 2 Effects of temperature on the degradation products

注：a，离子色谱检测结果；b，GPC 检测结果。

取降解时间为 5 h，过氧化氢的百分含量为 4%，考察不同温度对降解产物中聚合度在 6 以下壳寡糖含量的影响，结果见图 2。

图 2 中，a 图为用离子色谱测得的聚合度在 6 以下壳寡糖峰面积总和与降解产物得率的乘积随着温度的变化情况，可知随着温度的升高乘积先增大后减小，在 60 ℃时有最高值，即在 60 ℃降解产物壳 1~6 糖的含量最高。b 图为不同温度下降解产物的分子量分布图，主要产物出峰时间集中在 21 min 以后，对应相对分子量为 1000，说明降解产物主要是壳 6 糖以下（壳 6 糖的相对分子质量为 1203.72 u）；而在 19~21 min 时间段内，峰型由 40 ℃~70 ℃发生明显右移，表明降解温度是控制降解的关键因素，60 ℃下部分降解产物在 20.40 min 出峰，峰面积为 24%，对应相对分子量为 2580；且温度越高，GPC 谱图中对应分子量越低，但在离子色谱中检测得知壳寡糖含量是减少的，且有文献[14]发现当反应温度高于 85 ℃时，明显有黑色物质生成，副反应增加，综合考虑反应温度选 60 ℃较合适。

2.2.2 过氧化氢百分含量对可控降解的影响

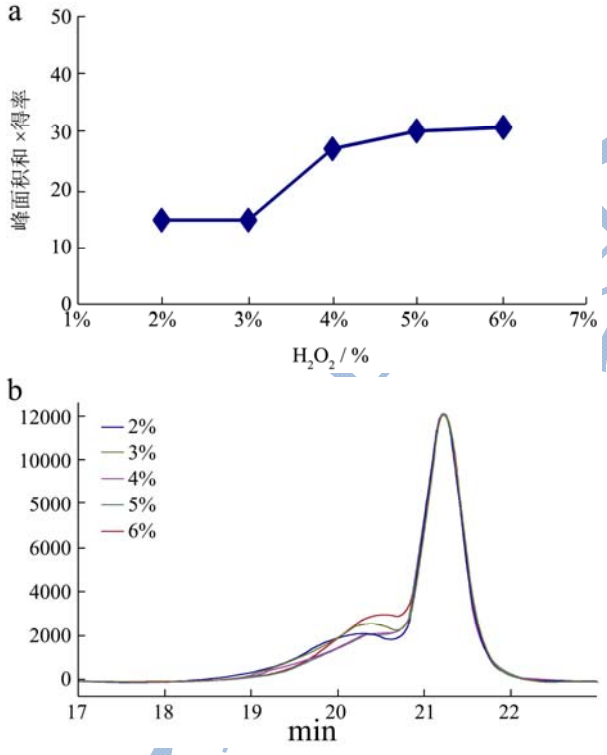


图 3 过氧化氢含量对降解产物的影响

Fig. 3 Effects of H_2O_2 concentration on the degradation products

注：a，离子色谱检测结果；b，GPC 检测结果。

取降解温度为 60 ℃，降解时间为 5 h，考察不同过氧化氢百分含量对降解产物中聚合度在 6 以下壳寡糖含量的影响，结果见图 3。

由 a 图得知，随着过氧化氢百分含量增大，响应值先基本不变，在达到 4%迅速增大后又趋于平缓，可知过氧化氢百分含量达到 4%以后目标产物含量增加程度变得缓慢，故 4%较适宜。由 b 图知，同样主峰出峰时间在 21 min 之后，对应的相对分子量为 1000。19~21 min 时间段内，过氧化氢百分含量自 2%到 6%的峰型图有微弱右移的趋势，不如温度变化的影响明显，所以过氧化氢含量的考察主要依据离子色谱图，故选 4%较合适。刘弈君[15]等研究发现随着过氧化氢含量的增加，分子量降低程度增加，但分子量分布的变化较小，与本实验结论一致。

2.2.3 降解时间对可控降解的影响

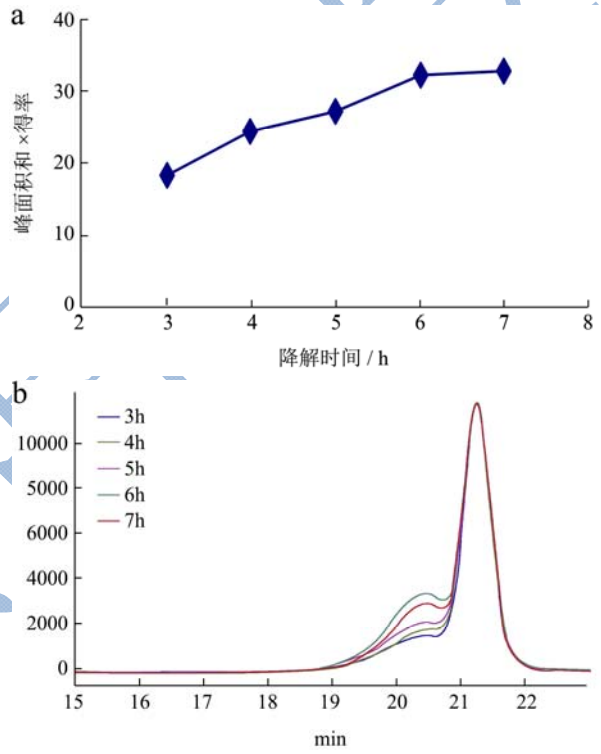


图 4 时间对降解产物的影响

Fig. 4 Effects of time on the degradation products

注：a，离子色谱检测结果；b，GPC 检测结果。

取降解温度为 60 ℃，过氧化氢的百分含量为 4%，考察不同降解时间对降解产物中聚合度在 6 以下壳寡糖含量的影响，结果见图 4。

由 a 图看出，降解时间在 6 h 后目标产物的上升趋势变得迟缓，且时间越长副产物生成的可能性越大，故选择降解时间为 6 h 为宜。由 b 图可知，主峰出峰时间集中在 21 min 后，对应相对分子量为 1000，降解效果较好；在 19~20 min 时间段内的峰型图右移的趋势甚微，说明降解时间对目标产物获得的影响小，故从离子色谱图可得降解时间为 6 h。有研究报道[16]称降解时间对降解产物的影响是随着温度而变化的，45 ℃时，随着反应时间的增加，产物分子量下降趋于缓慢，若温度为 80 ℃，反应只需进行 1 h 就可终止，

所以本研究在单因素基础上进行响应面优化实验，欲得最优降解工艺。

2.3 响应面法对氧化降解过程的优化

2.3.1 响应面分析的水平设计

以反应温度(X_1)、过氧化氢百分含量(X_2)和反应时间(X_3)为试验因素，以+1、0 和-1 分别代表自变量的高、中、低水平设计因素水平表如表 5 所示。实验因素与水平的取值见表 5。

表 5 BBD 设计因素与水平

Table 5 Factors and levels for Box-Behnken design

水平	因素		
	X_1 降解温度/℃	X_2 降解时间/h	X_3 H_2O_2 含量/%
-1	50	5	2
0	60	6	4
1	70	7	6

2.3.2 响应面优化设计结果分析

表 6 响应面试验方案及结果

Table 6 Experimental design and results for response surface analysis

实验号	X_1	X_2	X_3	响应值 R_1
1	-1	-1	0	23.1293
2	1	-1	0	21.5407
3	-1	1	0	25.7153
4	1	1	0	18.5763
5	-1	0	-1	20.3773
6	1	0	-1	21.0112
7	-1	0	1	27.0959
8	1	0	1	12.7220
9	0	-1	-1	18.0136
10	0	1	-1	22.5486
11	0	-1	1	27.5234
12	0	1	1	25.6588
13	0	0	0	31.7585
14	0	0	0	29.9082
15	0	0	0	30.0144

用离子色谱分析壳寡糖含量，以聚合度在 6 以下壳寡糖峰面积总和与降解产物得率的乘积（R_1）作为响应值，实验方案及结果见表 6。对表 6 试验结果进行多元回归拟合，得二次多项式回归模型为：

R_1=-388.76602X_1+8.16541X_2+42.99970X_3-0.13876$X_1$$X_2-0.18697X_1X_3-0.79995X_2X_3-0.057210X_1^2-2.59898X_2^2-1.13132X_3^2$。

表 7 为回归模型方差分析的结果，由表 7 可知，该整体模型的 p 值=0.0296<0.05，模型显著，失拟项 p=0.1014>0.05 不显著，表明所建立的回归二次模型成立，可用该模型来分析和预测壳聚糖氧化降解为聚合度在 6 以下壳寡糖的工艺条件；决定系数 R^2=0.9174，表明回归方程拟合程度较好。表 8 为回归系数显著性检验结果，由各因素 F 值比较得知，所选因素对目标产物生成的影响顺序为：降解温度>过氧化氢百分含量>降解时间；温度与时间、过氧化氢百分含量与时间的交互作用不显著（p>0.05），仅有温度与过氧化氢百分含量(X_1X_3)交互作用达到显著水平(p<0.05)。

表 7 回归模型方差分析结果

Table 7 Results of variance analysis for the established regression model

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值
模型	348.60	9	38.73	6.17	0.0296
残差	31.39	5	6.28		
失拟	29.23	3	9.74	9.03	0.1014
纯误差	2.16	2	1.08		
总和	379.99	14			

决定系数 R^2=0.9174

表 8 回归系数的显著性检验

Table 8 Significance test of each regression coefficient

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值
X_1	62.82	1	62.82	10.01	0.0250
X_2	0.66	1	0.66	0.10	0.7595
X_3	15.40	1	15.40	2.45	0.1781
X_1X_2	7.70	1	7.70	1.23	0.3185
X_1X_3	55.93	1	55.93	8.91	0.0306
X_2X_3	10.24	1	10.24	1.63	0.2577
X_1^2	120.85	1	120.85	19.25	0.0071
X_2^2	24.94	1	24.94	3.97	0.1028
X_3^2	75.61	1	75.61	12.04	0.0178

图 5 是三个因素两两交互的 3D 图及等高线图，变化趋势通过 3D 图来展示表现出其独特的直观性[17,18]。a 图是温度与过氧化氢的相互作用图，当降解时间固定在 0 水平下时，降解温度与过氧化氢含量显示出抛物线的形状，即随着温度和过氧化氢百分含量的同时增大，响应值 R_1 先增大后降低，图形呈钟罩型表明其交互作用显著[19]。然而，只要有降解时间作为变量之一的交互作用中，其 3D 图中的响应值 R1 只表现出微弱的变化，无论是降解温度或者过氧化氢固定在 0 水平条件下。其原因可能是 60 ℃或者 4%的过氧化氢含量已经提供了足够的能量使得 β-1,3 糖苷键发生断裂，故相对而言，降解温度对降解的影响较小。

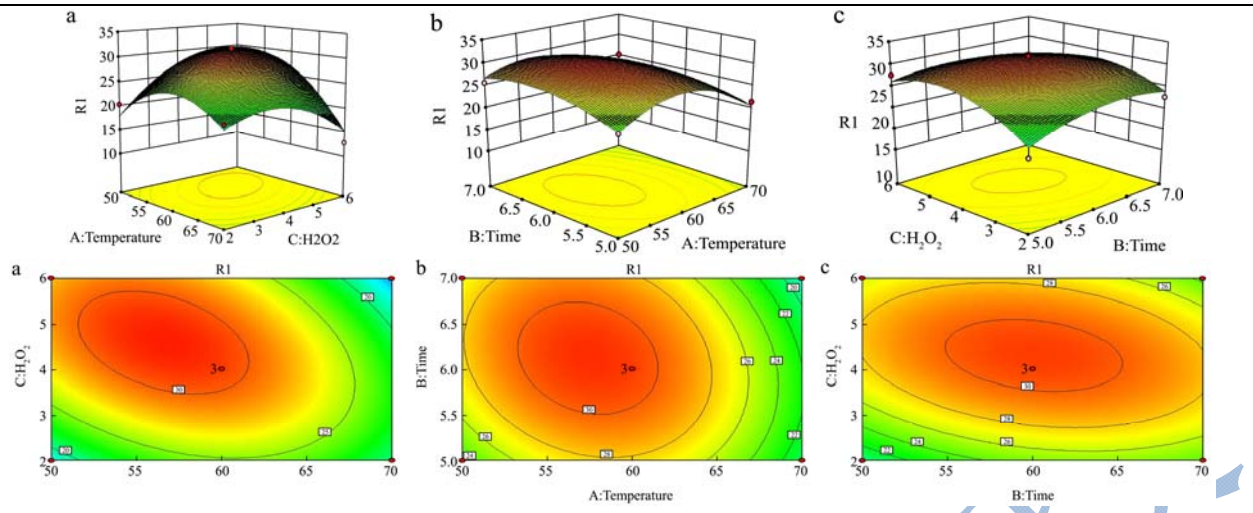


图 5 变量交互作用响应面 3D 图及等高线图

Fig. 5 Response surface 3D plots and contour plots showing the interaction of variables

注：a. 温度与过氧化氢百分含量交互作用；b. 温度与时间交互作用 c. 过氧化氢百分含量与时间交互作用。

2.3.3 响应曲面分析最佳条件优化

对壳聚糖氧化降解制备聚合度在 6 以下壳寡糖的工艺进行响应面分析法实验设计，得到最佳的工艺条件为：降解温度 56.55 ℃，时间为 6.06 h，过氧化氢百分含量为 4.57%，根据实际情况修正如下：降解温度 56 ℃，时间为 6 h，过氧化氢百分含量为 4.50%。验证响应面法的可行性，在该最佳条件下，每次取 2 g 壳聚糖进行氧化降解，经三次平行实验，得到实际的平均响应值为 30.56，与理论值 31.25 相对误差很小，证明该法可行性高。2 g 壳聚糖经氧化降解最终得到的降解产物量为 1.52 g。

2.4 优化条件下降解产物中壳 1~6 糖分析

经响应面优化所得的产物，用 0.1 mol/L CH_3COOH~0.05 mol/L CH_3COONa 缓冲液配制成浓度为 0.50 mg/mL 的待测样品，用离子色谱检测其中的壳 1~6 糖峰面积。离子色谱峰谱图见图 6。

由图 6 可知壳聚糖经过氧化氢降解，采用响应面优化和离子色谱的检测手段进行调控，可有效降解壳聚糖得到壳 1~6 糖，且整个降解产物中，聚合度越低的壳寡糖峰面积越大，说明在降解过程中低分子量壳寡糖更容易获得。通过计算，2 g 壳聚糖经氧化后得到的 1.52 g 降解产物中，壳一糖至壳 6 糖的量及所占百分数如表 9 所示。

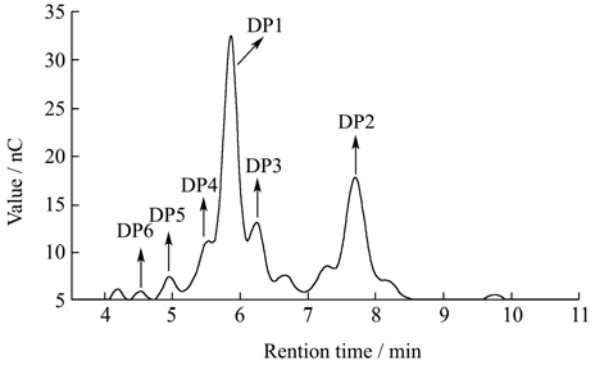


图 6 响应面优化产物中壳 1～6 糖离子色谱图

Fig. 6 Ion chromatography of DP 1–6 oligochitosan products from RSM

表 9 壳聚糖氧化降解各单糖产率

Table 9 Production and yield of DP 1–6 oligochitosan products from the oxidative degradation of chitosan

产物	壳 1 糖	壳二糖	壳三糖	壳四糖	壳五糖	壳六糖	壳七糖及以上
产量/g	0.37	0.26	0.20	0.17	0.12	0.10	0.30
产率/%	24.34	17.10	13.15	11.18	7.89	6.58	19.74

3 结论

离子色谱-脉冲安培法可以用来定性和定量检测聚合度 6 以下壳寡糖。过氧化氢的百分含量、温度和降解时间对壳聚糖氧化降解具有显著的影响。以获得聚合度 6 以下的壳寡糖为目标，通过响应面分析提到最佳的降解条件为：降解温度 56 ℃、降解时间 6 h、过氧化氢的百分含量 4.50%；采用离子色谱检测最优降解条件下的氧化产物壳 1~6 糖的含量分布，发现通过控制变量可实现壳聚糖的有效降解，且聚合度越低的壳寡糖越易得到。

参考文献

[1] 蒋挺大.壳聚糖[M].北京:化学工业出版社,2007

JIANG Ting-da. Chitosan [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007

[2] 杜昱光.壳寡糖的功能研究及应用[M].北京:化学工业出版社,2009
DU Yu-guang. Study on the function of chitooligosaccharides and its application [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2009

[3] Qiu G X, Gao S N, Giacovelli G, et al. Efficacy and safety of glucosamine sulfate versus ibuprofen in patients with knee osteoarthritis [J]. Arzneimittel-Forschung, 1998, 48(5): 469

[4] Vera Balan. Verestiuc L. Strategies to improve chitosan hemocompatibility: a review [J]. European Polymer Journal, 2014, 53(1): 171-188

[5] Fan Y, Bo L, Zhen S, et al. Application of chitooligosaccharides as antioxidants in beer to improve the flavorstability by protecting against beer staling during storage [J]. Biotechnology Letters, 2016: 1-6

[6] Jiang X, Mo H, Su H, et al. The application of chitin and chitosan in agriculture [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013

[7] Jimtaisong A. Utilization of carboxymethyl chitosan in cosmetics [J]. International Journal of Cosmetic Science, 2013, 36(1): 12-21

[8] 牟世芬,刘克纳,丁晓静.离子色谱方法及应用[M].北京:化学工业出版社,2005
MU Shi-fang, LIU Ke-na, DING Xiao-jing. Ion chromatography and its application [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005

[9] 刘向红.离子色谱在食品分析中的应用[J].中国卫生检验杂志,2011,21(7):1837-1839, 1842
LIU Xiang-hong. Application of ion chromatography in food analysis [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2011, 21(7): 1837-1839, 1842

[10] 魏远安,郑惠玲,吴少辉,等.高效离子色谱法分离、检测低聚果糖[J].食品科学,2015,36(14):151-155
WEI Yuan-an, ZHENG Hui-ling, WU Shao-hui, et al. Separation and analysis of fructooligosaccharides by high-performance anion exchange chromatography [J]. Food Science, 2015, 36(14): 151-155

[11] 钟建业,吴成业.几种壳聚糖降解方法探讨[J].福建水产,2008,3:65-69
ZHONG Jian-ye, WU Cheng-ye. Discussion on several methods of degradation of chitosan [J]. Journal of Fujian Fisheries, 2008, 3: 65-69

[12] Silvio Aime, Eliana Gianolio, Fulvio Uggeri, et al. New paramagnetic supramolecular adducts for MRI applications based on non-covalent interactions between Gd(III)-complexes and β-or γ-cyclodextrin units anchored to chitosan [J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2006, 100(5): 931-938

[13] 盛以虞,仲惠娟.高效凝胶渗透色谱法测定壳聚糖的分子量[J].中国药科大学学报,1994,25(4):242-244
SHENG Yi-yu, ZHONG Hui-juan. Determination of molecular weight of chitosan by high performance gelpermeation chromatography [J]. Journal of China Pharmaceutical University, 1994, 25(4): 242-244

[14] 覃彩芹,肖玲,杜予民,等.过氧化氢氧化降解壳聚糖的可控性研究[J].武汉大学学报(理学版),2000,46(2):195-198
QIN Cai-qing, XIAO Ling, DU Yu-min, et al. Prediction and control of extent of deploymerization of chitosan by hydroperoxide [J]. Journal of Wuhan University, 2000, 46(2): 195-198

[15] 刘羿君,楼陈钰,侯智谋,等.过氧化氢在乙酸均相体系中对壳聚糖的降解[J].功能高分子学报,2007,19-20(4):426-430
LIU Yi-jun, LOU Chen-yu, HOU Zhi-mou, et al. Process of Chitosan oxide degradation by hydrogen peroxide in acetic acid homogeneous phase [J]. Journal of Functional Polymers, 2007, 19-20(4): 426-430

[16] 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,2004,17(4):671-674
LIU Yi-jun, JIANG Ying, FENG Yun-fang, et al. Study on the molecular weight and the distribution of chitosan in its oxidative degradation process by GPC [J]. Journal of Functional Polymers, 2004, 17(4): 671-674

[17] 吴冬青,杨昕劼,安红钢,等.响应面法优化罗布麻叶黄酮提取工艺的研究[J].食品工业科技,2012,32(5):327-329
WU Dong-qing, YANG Xin-jie, AN Hong-gang, et al. Optimization of extraction technology of flavonoids from *Apocynun venetum* leaves by resporse surface methodology [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 32(5): 327-329

[18] 周丽卿,杜双奎,赵佳,等.响应面法优化鹰嘴豆蛋白提取工艺[J].食品科学,2012,33(8):66-70
ZHOU Li-qing, DU Shuang-kui, ZHAO Jia, et al. Optimization of chickpea protein extraction using responsesurface methodology [J]. Food Science, 2012, 33(8): 66-70

[19] 王灵昭,邓家权.微波法提取雨生红球藻中虾青素的工艺研究[J].食品工艺,2007,28(12):96-100
WANG Ling-zhao, DENG Jia-quan. Study on the technology

of extracting astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* by microwave method [J]. Food Technology, 2007, 28(12): 96-100

现代食品科技