

一种新型粘多糖结构与性能的检测

丛涛 徐永斌 赵晨希 张淑荣 刘春巧 张鹏*

(北京化工大学 生命科学与技术学院 北京 100029)

摘要: 粘多糖是由糖醛酸和氨基己糖交替连接成的高分子物质,理化性质独特,应用范围广泛。通过对突变株兽疫链球菌 *Streptococcus zooepidemicus* BU100 进行发酵,可产一种新型粘多糖(下文用粘多糖 A 代替)。利用卞啉法、Elson-Morgan 法、考马斯亮蓝法、红外光谱以及 ^{13}C 核磁共振谱测定粘多糖 A 的结构,结果显示粘多糖 A 中糖醛酸和氨基糖的摩尔比例接近 1:1,蛋白含量符合标准(<0.1%);粘多糖 A 图谱中出现的结构特征峰大部分与透明质酸相同。对粘多糖 A 的实用性能进行检测,并用透明质酸做对比,结果表明透明质酸在两种湿度下的吸湿性均要好于粘多糖 A,但粘多糖 A 的保湿性要好于透明质酸。粘多糖 A 总体的抗氧化性好于透明质酸,并且粘多糖 A 耐透明质酸酶。粘多糖 A 可作为保湿剂、润滑剂、抗氧化剂等被更加有效地应用在医疗和化妆品等领域。

关键词: 发酵,粘多糖,结构鉴定,性能检测

The structure and performance testing of a new kind of mucopolysaccharide

CONG Tao XU Yong-Bin ZHAO Chen-Xi ZHANG Shu-Rong
LIU Chun-Qiao ZHANG Peng*

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: Mucopolysaccharide was made of uronic acid and hexosamine. Due to the unique physical and chemical properties, mucopolysaccharides have been used in various fields. After collecting and enrichment culture of active nasal mucosa scraped from newly slaughtered cattle, we got a kind of streptococcus zooepidemicus which was named BU100. With its culture it can secrete a high yield new Mucopolysaccharide A. As there were uronic acid and hexosamine in mucopolysaccharide, the methods of carbazole and Elson-Morgan were used to detect mucopolysaccharide A. In addition, the major impurity (protein) in mucopolysaccharide was detected by the method of Coomassie brilliant blue. According to these methods, it was found that the ratio of uronic acid and hexosamine in mucopolysaccharide A was nearly 1:1 which was the same as that in Hyaluronic Acid (HA), and the quantity of pro-

tein meets the standards (<0.1%) requirements. Furthermore with the IR, NMR, the functional group of mucopolysaccharide A was determined and compared to HA. It therefore indicates that most structure and functional group in mucopolysaccharide A were nearly as the same as that in HA. As there were unique properties in mucopolysaccharide A, a lot of properties were detected, such as moisture absorption, moisture retention, reducing power, clearance of hydroxyl radical, resistance of hyaluronidase. These properties of mucopolysaccharide A were also compared with that of HA. The results showed that the clearance of hydroxyl radical, moisture retention, and reducing power of mucopolysaccharide A was better than HA, but the absorption rate of mucopolysaccharide A was not as well as that of HA, and mucopolysaccharide A could resist to Hyaluronidase. Because the structure and functional group of mucopolysaccharide A was highly similar to HA, meanwhile some characters of mucopolysaccharide A were superior to HA, the conclusions was that mucopolysaccharide A can be more effectively applied in medical, cosmetics, etc.

Keywords: Fermentation, Microbiopolysaccharide, Structure identification, Performance testing

在现有的细菌多糖中,透明质酸是被看做保湿性最好的物质,同时透明质酸还具有润滑关节、改善血管壁的通透性、促进伤口愈合等作用^[1]。由于透明质酸在生产中会受到原料、规模、工艺条件的限制,使得透明质酸价格十分昂贵。利用微生物发酵法所得的新型粘多糖 A 具有稳定性好、产量高、生产工艺简单、生产过程无污染等优势,同时新型粘多糖 A 也具有保湿性、润滑性等性能。目前,国内医疗界相关药物的使用中透明质酸(HA)占了很大的比重,但在人体内会存在一些透明质酸酶,会对透明质酸造成一定程度的降解,影响效果。粘多糖 A 的出现,使得这一问题得以解决。粘多糖 A 的平均水溶液粘度要大于透明质酸,并且通过实验得知粘多糖 A 具有耐透明质酸酶的特点,这对于粘多糖自身降解的抑制和药效的提高都会有积极的影响。

生命体因新陈代谢而得以生存,但也被新陈代谢产生的各种自由基所氧化衰老。自由基产生过量易损伤组织从而导致癌症、动脉硬化、心脑血管损伤和多种老年慢性疾病^[2]。使用生物抗氧化剂切断过氧化链式反应,可以抑制机体的自由基损伤。实验研究表明粘多糖 A 具有清除羟基自由基的作用,延缓衰老。

本研究通过对突变菌株兽疫链球菌 BU100 发酵得到了粘多糖 A,用红外光谱、核磁共振等方法对粘多糖 A 的结构进行了分析,同时对粘多糖 A 的一些实用性能进行了检测,取得的研究结果表明

粘多糖 A 可被更加低成本、高效率地应用在其相关的领域。

1 材料与方法

1.1 材料

透明质酸,山东福瑞达生物化工有限公司; LX300、LX200 硅藻土,江西省萍乡市联星助滤剂厂;三氯甲烷,北京化工厂;盐酸氨基葡萄糖,温岭市东方化工厂;唑啉,上海化工厂;四硼酸钠,沈阳新光化工厂;考马斯亮蓝 G-250,进口分装;无水乙醇,北京化工厂。

1.2 方法

1.2.1 粘多糖 A 粗品的制备^[3-4]:采用兽疫链球菌 BU100,在 30 °C、接种量为 7.5%、风量为 0.5 vvm、搅拌浆转速为 300 r/min 的条件下,发酵 48 h,用乙醇絮凝发酵液,40 °C 真空干燥 4 h,得到粘多糖 A 粗品。

1.2.2 硅藻土除菌体^[5]:将一定质量的粘多糖 A 溶解在去离子水中,并加入硅藻土作为吸附剂,调节溶液 pH 在 4.6-4.8 之间,然后用硅藻土过滤、滤板过滤、中空纤维膜浓缩后用乙醇结晶可得含微量蛋白的粘多糖 A。

1.2.3 Sevag 法除蛋白^[6]:在粘多糖 A 溶液中加入一定比例的正丁醇和三氯甲烷,剧烈振摇后,于 4 000 r/min 离心 10 min,离心后将液体倒入分液漏斗中,保留水相,重复数次,最后将水相保留。用无

水乙醇絮凝,干燥,得到纯品粘多糖 A。

1.2.4 Bitter-Muir 卞啉法检测粘多糖 A 中的糖醛酸^[7]:如果粘多糖 A 含有糖醛酸结构,经强酸水解后生成的糖醛酸在强酸中与卞啉试剂发生缩合反应,生成紫红色化合物,其呈色强度与糖醛酸含量成正比,可比色定量。

1.2.5 Elson-Morgan 法检测氨基葡萄糖^[8]:粘多糖含有的不均一氮往往以氨基糖的形式出现,采用 Elson-Morgan 法检测氨基葡萄糖可以进一步确定粘多糖 A 的结构。在 525 nm 波长处分别测定对照品溶液与供试品溶液的吸光度,按照以下公式计算得到的氨基己糖含量:

$$\text{氨基己糖含量} = \frac{A \times W_{[s]} \times 0.8309 \times 5}{W \times A_{[s]}} \times 100\%$$

公式中 A 为样品吸光度, $A_{[s]}$ 为标准品吸光度, $W_{[s]}$ 为标准品质量分数, W 为样品质量分数, 其中 5 为稀释倍数, 0.830 9 为氨基葡萄糖分子量和盐酸氨基葡萄糖分子量的比值。

1.2.6 Bradford 法测定粘多糖 A 产品中的蛋白含量^[9]:采用考马斯亮蓝法对粘多糖 A 中的蛋白质进行检测。准确吸取样品上清液 1 mL 置干净试管中,加入考马斯亮蓝 G-250 染料 5 mL 并摇匀, 2-5 min 后比色(595 nm),对照标准曲线求出样品蛋白浓度。

1.2.7 红外光谱分析^[10]:以 HA 为对照品,采用中波段红外扫描对粘多糖 A 和 HA 及它们的水解产物进行结构分析。水解条件为 0.1 g 样品溶于 pH 0.55 的 HCl 溶液中 60 °C 水浴,水解 10 d。使用 205 中波段红外光谱仪,对 HA 标准品和粘多糖 A 以及 HA 和粘多糖 A 的酸水解产物进行 KBr 压片扫描分析,扫描范围为 4 000-400 cm^{-1} 。

1.2.8 核磁共振图谱分析^[11]:以 HA 为对照品,采用核磁共振仪分别对 HA 和粘多糖 A 进行 ^{13}C 扫描,得到 HA 和粘多糖 A 的 ^{13}C NMR 图谱。

1.2.9 粘多糖 A 的分子量测定^[12]:使用 0.5-0.6 mm 的乌氏粘度计,配制 0.2 mol/L 的 NaCl 溶液作为空白试剂以及不同浓度的 HA、粘多糖 A 的溶液,用垂熔漏斗过滤,取续滤液在 25 °C 条件下测定流出时间,每个样品测定 3 次,取平均值流出时间 t_0 和 t_x ,

计算出各浓度下的相对粘度 η_r , 由 $\eta_r = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t}{t_0}$,

$\frac{\ln \eta_r}{C} = [\eta] - \beta[\eta]^2 C$, 以 $\frac{\ln \eta_r}{C}$ 对 C 做图,求得截距特性粘度 $[\eta]$,按照麦克非线性方程 $[\eta] = 3.6 \times 10^{-4} M_r^{0.78}$, 计算得出分子量。

1.2.10 吸湿和保湿率的测定^[13-14]:(1) 吸湿率的测定:采用胶带法进行测量。

$$\text{吸湿率}(\%) = (M_2 - M_1) / M_1 \times 100$$

M_1 : 放置前样品重量;

M_2 : 放置后样品重量。

(2) 保湿率的测定:保湿性测定继续采用胶带法。

$$\text{保湿率}(\%) = M_4 / M_3 \times 100$$

M_3 : 放置前水分的重量;

M_4 : 放置后水分的重量。

1.2.11 抗氧化性能测定^[15-16]:首先对粘多糖 A 是否具有还原力进行了验证,其次对粘多糖 A 清除羟基自由基的性能做了检测。抗氧化性能测定中用透明质酸作对比。

(1) 还原力测定。

将粘多糖 A 与磷酸钠缓冲溶液在一定条件下反应 20 min 后于 700 nm 测定其吸光值,以水为空白,吸光值越大表示还原能力越强。

(2) 清除羟基自由基的性能测定。

参照 Fenton 反应建立反应体系模型,采用固定反应时间法。



$$\text{羟基自由基清除率} = \frac{A_{\text{加抗氧化剂}} - A_{\text{羟基}}}{A_{\text{参比}} - A_{\text{羟基}}} \times 100\%$$

1.2.12 耐透明质酸酶性能测定^[17]:采用测溶液粘度的方法,吸取同体积的试样,测定全部流出所需时间做比较。首先配制 0.2 mol/L、pH 5.0 的乙酸-乙酸钠缓冲液,称取相同质量的粘多糖 A 和透明质酸分别溶解于乙酸-乙酸钠缓冲液中,用移液管吸取 9 mL 不同试样,测定全部流出时间。上述试样中加入同质量的透明质酸酶,再定时测定全部流出时间,平行测定 3 次,取平均值。

2 结果

2.1 吡唑法检测粘多糖 A 中的糖醛酸结果

吸光度=0.003 1+ 0.006 5 C, $R^2=0.998 4$ 。

精密称取粘多糖 A 10 mg, 置 100 mL 量瓶中, 制成 0.1 g/L 溶液, 经水解显色后, 测定溶液在 530 nm 的吸光度, 从图 1 的标准曲线上查出相应的 HA 浓度, 得到粘多糖 A 相当于 HA 含量为: 99.99% (W/W), 糖醛酸含量为 47.84% (W/W)。粘多糖 A 能够与吡唑试剂反应显紫红色, 证明粘多糖 A 中含有糖醛酸结构, 其含量与 HA 样品制作的标准曲线相吻合。

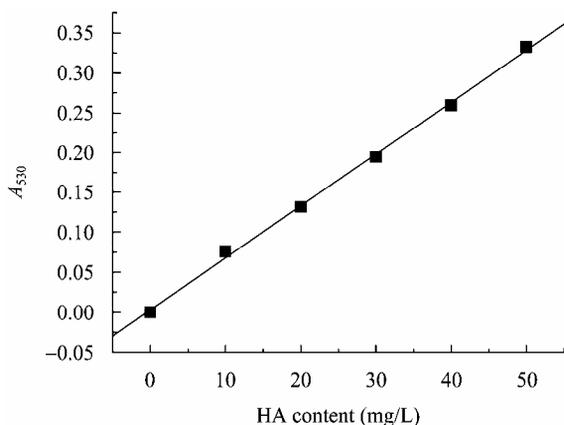


图 1 吡唑反应标准曲线

Fig. 1 The standard curve of carbazole method

2.2 Elson-Morgan 法检测氨基葡萄糖结果

采用 Elson-Morgan 法在 525 nm 测得盐酸氨基葡萄糖的吸光度为 0.217, 粘多糖 A 的吸光度为 0.082, 根据公式计算得粘多糖 A 中氨基葡萄糖的含量为 52.33% (W/W)。可知粘多糖 A 在水解后脱掉乙酰基的氨基糖含量与糖醛酸的摩尔比为 1:1, 和 HA 的理论比例相同。

2.3 粘多糖 A 产品中蛋白质的检测结果

得到回归公式: $C_p=A_{595}/0.606 99$, $R=0.998 9$ 。其中 C_p 为蛋白浓度, A_{595} 为考马斯亮蓝反应后 595 nm 的吸光度。在 595 nm 下, 考马斯亮蓝法检测粘多糖 A 产品的吸光度为 0.013, 对照图 2 的标准曲线得到蛋白含量为 0.021 mg/L, 即蛋白含量为 0.021% (W/W)符合标准(<0.1%)。

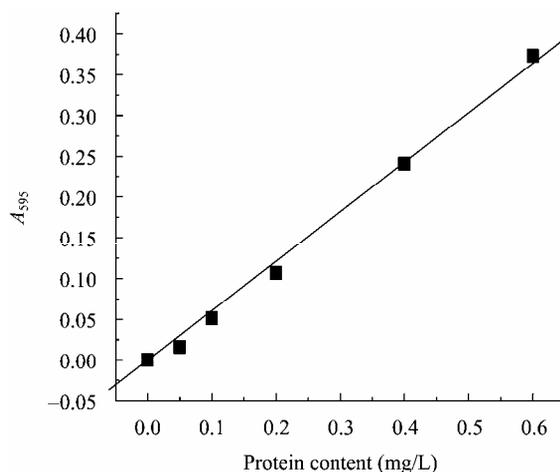


图 2 考马斯亮蓝-蛋白质标准曲线

Fig. 2 Coomassie brilliant blue-protein standard curve

2.4 红外图谱分析结果

图 3 的曲线 1 中 3 414.11 左右为 -OH 震动吸收峰, 2 896.19 左右为 C-H 键, 1 373.47 左右为 -CH₂ 中 C-H 键的吸收峰, 1 616.83、1 410.23 左右为 COO- 中 C-O 键的吸收峰, 1 321.73 左右为 C-N 的吸收峰, 1 150.78 为 C-O-C 的氧桥吸收峰, 1 079.59 为 C=O 的吸收峰, 1 044.85 为 C-OH 的吸收峰。曲线 2 和曲线 1 相比, 有 3 421.35、2 936.90、1 615.07、1 410.04、1 369.21、1 155.15、1 075.16、1 035.59 这些 HA 的特征峰。不同的是 1 075.16 和 1 035.59 两个峰的吸收峰值相对大小不同, 可能是由于粘多糖 A 中糖苷键不同, 使得存在的醇类羟基, 羟基之间发生了较

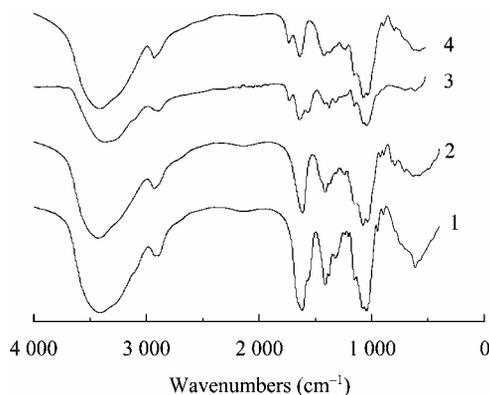


图 3 HA 和粘多糖 A 及其水解产物的红外谱图

Fig. 3 IR spectra of the samples and their hydrolysate

注: 1: HA; 2: 粘多糖 A; 3: HA 的水解产物; 4: 粘多糖 A 的水解产物。
Note: 1: HA; 2: Mucopolysaccharide A; 3: Hydrolysate of HA; 4: Hydrolysate of mucopolysaccharide A.

大程度的分子间缔合,分子内及分子间的氢键作用形成了折叠结构,阻碍了C=O键的伸缩振动。曲线3、4与曲线1、2相比大部分的吸收峰是相同的,不同的是在1729.2处出现水解后-C=O的吸收峰,可能是HA和粘多糖A的折叠结构,影响了部分官能团的振动吸收。

2.5 核磁共振图谱分析结果

从图4中可以看出,HA标准品的核磁谱图中174.2处为-CO的特征峰,-O-C-O-受到2个氧的诱导效应化学位移偏向低场,特征峰出现在101.6,-CH-O的特征峰出现在75.7处,54.6、58.9、62.6为-CH₂-O-的特征峰群,-CO-CH₃末端甲基的特征峰出现在23.7处。与HA标准品相比,粘多糖A的核磁谱图175.5处也存在-CO的特征峰,102.1处有-O-C-O-的特征峰,72.0处的-CH-O的特征峰,59.3左右的峰群与72.0峰部分重叠组成一个宽峰。不同的是,175.5处的-CO特征峰与72.0处的-CH-O特

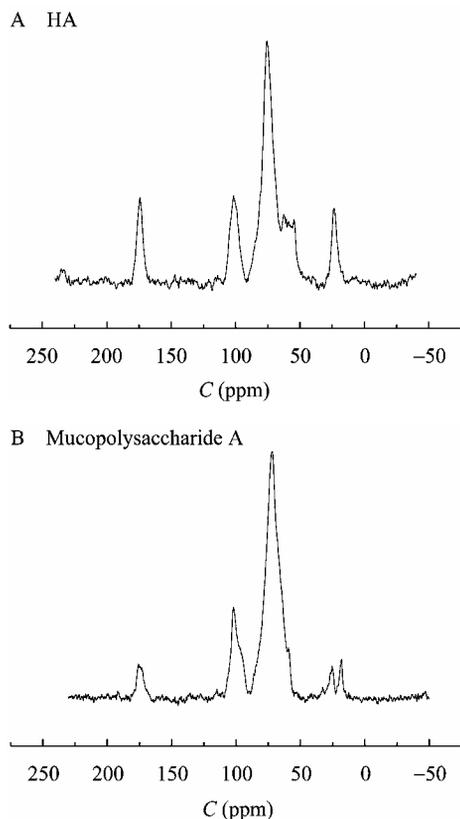


图4 HA (A)和粘多糖A (B)的¹³C核磁共振谱图
Fig. 4 ¹³C NMR spectrum of HA (A) and mucopolysaccharide A (B)

征峰比值偏小,而23.7处的-CO-CH₃末端甲基的特征峰没有出现,可能是由于构象原因产生的。

2.6 粘多糖A分子量测定结果

使用粘度法测得0.2 mol/L的NaCl溶液(空白试剂)的流出时间 t_0 为32.716 67 s,标注 t_1 为HA,标注 t_2 为粘多糖A,数据如表1所示。

表1 粘度测定数据表		
Table 1 The data of the viscosity test		
C (g/L)	流出时间 t_1 (s)	流出时间 t_2 (s)
	Flow time	Flow time
0.2	38.620 00	43.663 33
0.3	41.896 67	48.796 67
0.4	45.433 33	54.756 67
0.5	49.230 00	59.653 33
1.0	72.536 67	87.060 00

由表1的数据做图,结果如图5所示。

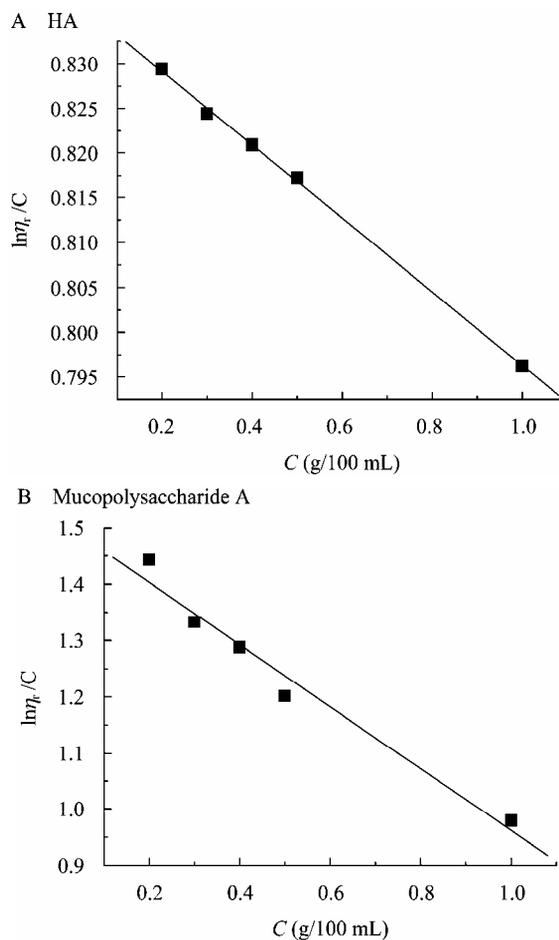


图5 HA (A)和粘多糖A (B)的粘度测定曲线
Fig. 5 The viscosity test of HA (A) and mucopolysaccharide A (B)

从图 5 中得出 HA 中 $\frac{\ln \eta_r}{C}$ 轴上的截距 $[\eta]$ 为 0.837 35, 依据公式得出 HA 的平均分子量为 $2.070 9 \times 10^4$; 粘多糖 A 的截距 $[\eta]$ 为 1.513 38, 计算得出粘多糖 A 的平均分子量为 $4.422 8 \times 10^4$ 。此方法得出结论为粘多糖 A 的平均分子量要大于 HA 的平均分子量。

2.7 吸湿和保湿率的结果

吸湿率测定结果如图 6、7 所示, 从图 6、7 中可以看出在相对湿度 43%和相对湿度 81%环境条件下, 透明质酸的吸湿能力均比粘多糖 A 的吸湿能力强, 透明质酸的吸湿能力更具有优势。

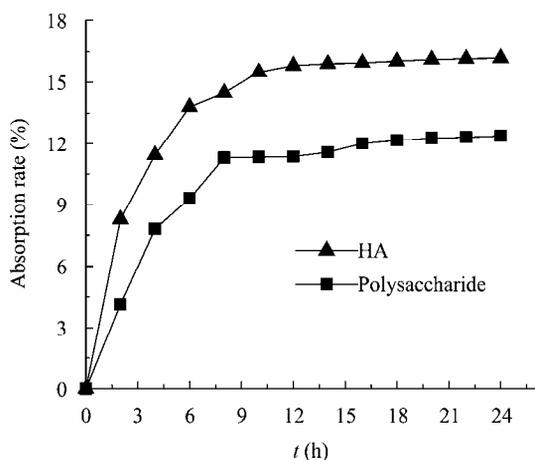


图 6 在(20 °C ± 1 °C)、RH=43%时各试样的吸湿率
Fig. 6 Graph of samples moisture absorption, at (20 °C ± 1 °C), RH=43%

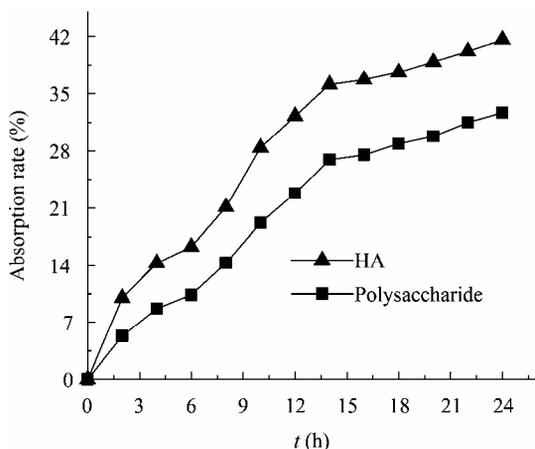


图 7 在(20 ± 1 °C)、RH=81%时各试样的吸湿率
Fig. 7 Graph of samples moisture absorption, at (20 °C ± 1 °C), RH=81%

保湿率测定的结果如图 8、9 所示, 从中可以看出在环境湿度为 43%和 81%的环境下, 粘多糖 A 的保湿效果都要略好于透明质酸, 这表明粘多糖 A 的固水能力比透明质酸好。原因推测是由粘多糖分子的结构不同引起的, 粘多糖 A 的分子网状结构更为紧密, 对水分子自由进出有阻碍作用, 而这种作用力是双向的: 吸湿时, 分子结构阻碍水分子的进入; 而当保湿时, 分子结构又阻碍水分子的流出, 这使得粘多糖 A 的吸湿性能不如 HA, 但保湿性能相对会具有优势。

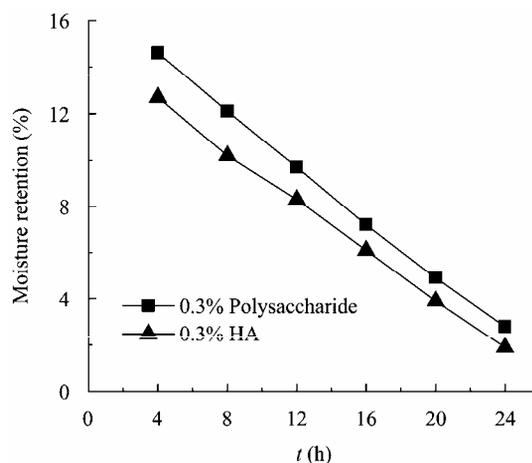


图 8 在(20 °C ± 1 °C)、RH=43%时各试样保湿率
Fig. 8 Graph of samples moisture retention, at (20 °C ± 1 °C), RH=43%

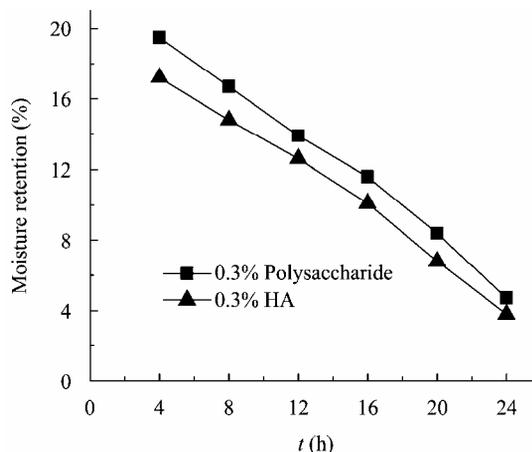


图 9 在(20 °C ± 1 °C)、RH=81%时各试样保湿率
Fig. 9 Graph of samples moisture retention, at (20 °C ± 1 °C), RH=81%

2.8 还原力测定结果

从图 10 可以看出粘多糖 A 与透明质酸均具有较好的还原能力,且还原力都随着糖加入量的增加而提高,粘多糖 A 的还原力要好于透明质酸。

2.9 清除羟基自由基性能测定结果

从表 2 可以看出粘多糖 A 与透明质酸均具有清除羟基自由基的能力,能够抵制羟基自由基的毒性损伤,防止机体衰老。粘多糖的清除能力随多糖的

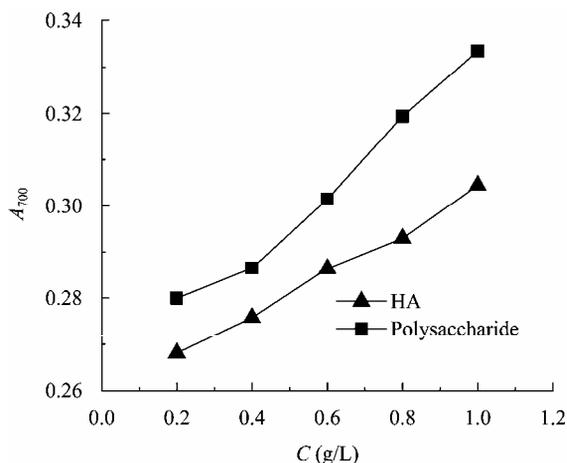


图 10 粘多糖 A 与透明质酸的还原力比较

Fig. 10 Reducing power of HA and Mucopolysaccharide A

加入量增加而提高,特别是当多糖浓度达 1.2 g/L 时,粘多糖 A 对羟基自由基的清除率达 63.35%,而透明质酸的清除率略低些,为 54.56%,粘多糖 A 的清除羟基自由基能力较好。

2.10 耐透明质酸酶性能测定结果

从表 3 可以看出粘多糖 A 溶液在加入透明质酸酶进行酶解 40 min 后全部流出时间,与没有加酶的全部流出时间相比基本没有变化,粘度没有降低,表明了粘多糖 A 耐透明质酸酶。HA 溶液在加入透明质酸酶进行酶解 40 min 之后测得所需全部流出时间逐渐变小,最后与纯缓冲液全部流出时间相近,说明透明质酸被全部酶解成单糖,不耐透明质酸酶。

表 2 对羟基自由基的清除率
Table 2 Clearance of hydroxyl radical

糖浓度 Sugar concentration (g/L)	透明质酸 HA (%)	粘多糖 A Mucopolysaccharide A (%)
0.3	11.73	21.61
0.6	28.95	36.29
0.9	44.13	50.92
1.2	54.56	63.35

表 3 耐透明质酸酶酶解
Table 3 Resistance to hyaluronidase

	缓冲液 Buffer	多糖+缓冲液 Sugar+Buffer	多糖+缓冲液+酶 Sugar+Buffer+Hyaluronidase t (s)		
	t (s)	t (s)	5 min	10 min	40 min
透明质酸 Hyaluronic acid	5.08	6.95	5.56	5.33	5.19
粘多糖 A Mucopolysaccharide A	5.08	7.84	7.86	8.05	8.05

3 讨论

通过对粘多糖 A 的初步研究,结果表明粘多糖 A 中葡萄糖醛酸和氨基葡萄糖的摩尔比例接近 1:1,蛋白含量符合标准(<0.1%),其单糖的组成特点与透明质酸相同。透明质酸的吸湿性要好于粘多糖 A,但粘多糖 A 的保湿性要优于透明质酸。粘多糖 A 的总体抗氧化性要好于透明质酸,粘多糖 A 不能被透明质酸酶水解,具有耐透明质酸酶的特点。

粘多糖 A 的基本结构组成与透明质酸相似,但其实用的医疗、美容性能要比 HA 具有优势。目前国内 HA 类的粘多糖主要应用于医药、临床诊治和化妆品等行业,在食品领域的应用研究还处在探索阶段。口服 HA 类粘多糖主要是通过人体对粘多糖的吸收增加粘多糖的含量,活化全身细胞,发挥保健美容的功能。此外,补充人体内的粘多糖还可以防止动脉硬化、关节炎、眼老化等疾病,保持老龄人群的健康。一些国家已经将 HA 类粘多糖

广泛地应用在美容保健食品上, 如日本透明质酸研究所生产的 Beauty Fast 胶囊、Hyaluronic Acid 片剂等^[18]。

随着对大分子类粘多糖研究方法的不断进步与完善, 技术的不断提高与创新, 国内的生产研究水平必定也会在不远的将来达到世界级的水准。鉴于微生物发酵法所产的新型粘多糖 A 产量高、性能好等优点, 势必会在医疗、化妆品以及保健食品等领域发挥更加显著的作用。

参 考 文 献

- [1] 凌沛学, 贺艳丽, 郭学平, 等. 透明质酸[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000: 240-252.
- [2] 俞慧红, 竺巧玲, 戴飞, 等. 多糖抗氧化作用的研究现状[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(3): 172-175.
- [3] Huang WC, Chen SJ, Chen TL. The role of dissolved oxygen and function of agitation in hyaluronic acid fermentation[J]. Biochemical Engineering Journal, 2006, 32(3): 239-243.
- [4] 叶华, 陈猛, 钟林, 等. 透明质酸发酵流加过程的研究[J]. 北京化工大学学报: 自然科学版, 2006, 33(1): 20-26.
- [5] 盛瑞堂, 孙猛, 谭天伟. 过滤法分离纯化透明质酸[J]. 过程工程学报, 2006, 6(2): 285-288.
- [6] 徐永斌, 张淑荣, 刘春巧, 等. 发酵透明质酸蛋白脱除方法的比较研究[J]. 化学与生物工程, 2009, 26(8): 77-79.
- [7] Bitter T, Muir HM. A modified uronic acid carbazole reaction[J]. Anal Biochem, 1962, 4(4): 330-334.
- [8] Elson LA, Morgan WTJ. A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine[J]. Biochem, 1933, 27(6): 1824-1828.
- [9] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [10] Reich G. Near-infrared spectroscopy and imaging: basic principles and pharmaceutical applications[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2005, 57(8): 1109-1143.
- [11] Veeman WS. Nuclear magnetic resonance, a simple introduction to the principles and applications[J]. Geoderma, 1997, 80(3/4): 225-242.
- [12] Laurent TC, Ryan M, Pletruszkiewicz A. Fraction of hyaluronic acid, the polydispersity of hyaluronic acid from the bovine vitreous body[J]. Biochem Biophys Acta, 1960, 42: 476-485.
- [13] 施昌松, 崔凤玲, 张洪广, 等. 化妆品常用保湿剂保湿吸湿性能研究[J]. 日用化学品科学, 2007, 30(1): 25-30.
- [14] 杜小豪, 徐卫, 杜雪洁. 护肤产品的保湿功能评价[J]. 日用化学工业, 2000, 30(3): 47-52.
- [15] 钟耀广, 林楠, 王淑琴, 等. 香菇多糖的抗氧化性能与抑菌作用研究[J]. 食品科技, 2007(7): 141-146.
- [16] 张艳萍, 尤玉如, 戴志远. 山茱萸多糖体外清除自由基和抗氧化作用研究[J]. 中国食品学报, 2008, 8(6): 18-22.
- [17] 崔向珍, 刘爱华, 王凤山, 等. 透明质酸酶催化透明质酸水解的最适反应条件[J]. 中国生化药学杂志, 2007, 28(3): 161-164.
- [18] 白绘宇, 徐晶, 李慧珺, 等. 透明质酸的制备及应用研究进展[J]. 广东化工, 2010, 37(11): 243-244.