

# 硫酸软骨素的制备研究及发展现状

刘宁 刘雅南 刘涛 李健

(哈尔滨商业大学食品工程学院 黑龙江省高校食品科学与工程重点实验室 黑龙江哈尔滨 150076)

**摘要:** 硫酸软骨素是一类硫酸化链状黏多糖,具有多种重要生物活性,广泛应用于医药、化妆品、食品等领域。本文综述了硫酸软骨素的提取、分离纯化工艺进展,阐述了硫酸软骨素含量测定、结构验证、功能性研究及目前的应用现状,并对其发展前景进行了展望,拟为硫酸软骨素的进一步研究奠定基础。

**关键词:** 硫酸软骨素 提取 应用 前景

## Study on the preparation and current situation of chondroitin sulfate

LIU Ning, LIU Ya-nan, LIU Tao, LI Jian

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

**Abstract:** Chondroitin sulfate (CS) is an acidic polysaccharide and widely applied in the industries of medicine, cosmetics and food for its biological activities. The methods of chondroitin sulfate extraction, purification and separation were briefly reviewed. The content determination, structure validation, functional research and recent application of chondroitin sulfate were described. Moreover, the development prospects was also forecasted, which would lay a foundation for further study on chondroitin sulfate.

**Key words:** chondroitin sulfate; extraction; application; prospect

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)03-0392-05

硫酸软骨素(Chondroitin Sulfate, CS)是来自动物软骨、鼻软骨、气管等富含软骨组织的一类重要酸性高分子黏性多糖<sup>[1]</sup>,具有多种重要生物活性。例如:具有抗炎、抗癌、抗 HIV、降血脂、抗凝血活性的功效;能有效预防关节炎<sup>[2]</sup>、减轻打鼾;还可以改善食物风味、口感、光泽及保湿性<sup>[3-5]</sup>等。鉴于其潜在的医药价值,2010年《中华人民共和国药典》将硫酸软骨素列为防治心血管疾病和关节病的最佳药物。同时硫酸软骨素作为膳食补充剂和保湿剂,广泛应用于食品和化妆品领域<sup>[6-7]</sup>。本文综述了硫酸软骨素的制备及提取纯化工艺、检测方法、性能研究,并阐述了近些年硫酸软骨素在各领域的应用现状,拟为硫酸软骨素的进一步研究与开发奠定基础。

## 1 硫酸软骨素的制备工艺

### 1.1 硫酸软骨素的提取制备方法研究现状

硫酸软骨素是由 D-葡萄糖醛酸和氨基己糖交替连结而成的双糖聚合物。它通常与蛋白质结合成糖蛋白的形式存在,当其水解时发生  $\beta$ -消去反应,使得连接硫酸软骨素与蛋白质的 O-糖苷键的糖-肽

键断裂,释放出游离态的硫酸软骨素,而 O-糖苷键上连接的羟基氨基酸则分别转化为相应的酮酸。

目前,国内外硫酸软骨素的提取多来自猪软骨<sup>[8]</sup>、猪喉骨<sup>[9]</sup>、鸡胸软骨<sup>[10]</sup>;牛或羊鼻骨<sup>[11]</sup>、喉骨、软肋、气管、月牙骨以及各部位的杂软骨<sup>[12]</sup>;鱼软骨<sup>[13-15]</sup>、蛋壳膜<sup>[16]</sup>等。硫酸软骨素主要利用动物提取法和发酵法进行提取制备。

**1.1.1 动物提取法** 动物提取法主要是碱提液醇沉工艺<sup>[17]</sup>、酶法提取工艺<sup>[18-19]</sup>、碱-酶提取法<sup>[8]</sup>、碱提-酶解-醇沉法<sup>[20]</sup>、反向沉淀法<sup>[21]</sup>、超声波辅助法<sup>[22]</sup>、超声波辅助-碱-双酶-乙醇法<sup>[12]</sup>、氯化十六烷基吡啶沉淀法及有机溶剂沉淀法等,但制得的硫酸软骨素均为粗品<sup>[23]</sup>。

高分子量的硫酸软骨素,由于其表观黏度高、结构复杂及细胞膜的选择通透性等因素,造成了其生物利用率低、口服吸收差及疗效不稳定。而低分子量 CS 具有生物利用度高和活性强等功能特性,越来越受到人们的重视。徐峥嵘<sup>[24]</sup>等人以酸性粘多糖酶(透明质酸酶、硫酸软骨素酶和肝素酶)裂解高分子量硫酸软骨素,并用截留分子量为 5000u 的超滤膜将生成的低分子量硫酸软骨素及时滤除,防止其进一步裂解,从而得到高产率的低分子量硫酸软骨素。此方法克服了硫酸软骨素酸水解工艺制备产品的分子量分布宽,产品得率低的缺点,可高效、大批量制备低分子量硫酸软骨素,得率在 80% 以上。史敏娟<sup>[25]</sup>等人以过氧化氢+铜离子(II)体系自由基降解制备了低相对分子质量 CS,结果表明:重均分子

收稿日期:2013-05-31

作者简介:刘宁(1978-),女,博士,副教授,研究方向:农产品化学与综合利用。

基金项目:黑龙江省普通高等学校青年学术骨干支持计划(1252G026);黑龙江省研究生创新科研项目(YJSCX 2012-145 HLJ)。

量从 56596 降到 6906, 己糖醛酸、氨基己糖及硫酸根等主要成分变化不大, 差异不显著, 降解前后热分解特性一致。此方法不会造成硫酸软骨素主要成分的损失, 具有较大的应用前景。

1.1.2 发酵法 硫酸软骨素是动物软骨中蛋白聚糖的主要成分, 是具有少数几种细菌的荚膜多糖。相比于动物提取法, 微生物发酵法具有工艺条件温和, 原料丰富, 无污染等优点, 且产物提取率高, 所含杂质少, 已成为国内外研究的热点。

微生物发酵法提取硫酸软骨素采用的主要菌株有巴斯德杆菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌三种, 它们都能利用以尿苷二磷酸(UDP)前体形式存在的单糖。刘立明<sup>[26]</sup>等人发明了一种产硫酸软骨素菌株(枯草芽孢杆菌)的筛选方法, 将菌种接种于营养肉汤培养基中, 培养 24h 后离心收集发酵液, 发酵液采用内标法经高效液相色谱进行定性分析, 使得硫酸软骨素标准品峰高增高的菌株即为产硫酸软骨素的枯草芽孢杆菌。并用该菌株发酵法生产出硫酸软骨素。

围绕发酵法生产硫酸软骨素这一研究主题, 国内外研究人员已在高产微生物菌株筛选与改良<sup>[27-28]</sup>、发酵条件优化与控制、硫酸软骨素合成机制与调控机理等方面开展了卓有成效的研究工作。为发酵法生产硫酸软骨素的工业化奠定了基础。

## 1.2 硫酸软骨素的分离纯化研究现状

硫酸软骨素的分离纯化, 多采用溶剂分级沉淀法<sup>[29]</sup>、季铵盐法<sup>[14]</sup>、超滤膜法、色谱法、电泳法<sup>[30]</sup>、离子交换法<sup>[32]</sup>、超滤-离子层析法<sup>[33]</sup>等。

李燕妮<sup>[31]</sup>研究了超滤法分离提取鸡胸软骨中硫酸软骨素和 II 型胶原蛋白的工艺。确定超滤工艺为: 鸡胸软骨水解液用截留分子量为 10ku 的超滤膜, 在 0.3MPa、10℃ 截留得到硫酸软骨素, 收率达 97.1%; 超滤透过液用截留分子量为 3ku 的超滤膜, 在 0.6MPa、10℃ 脱盐浓缩, 得到 II 型胶原蛋白, 收率达 95.1%。

谢捷<sup>[32]</sup>等人研究应用离子交换法直接从猪鼻骨酶解液中分离纯化猪硫酸软骨素的工艺, 并与传统酶解-氧化法进行比较。研究表明: HZ-016 型阳离子交换树脂能从猪鼻骨酶解液中分离纯化硫酸软骨素, 优化后的工艺条件: 室温 25℃, 上样质量浓度 20.5mg/mL, 上样流速 1.0mL/min, 最大上样量 1BV。离子交换法与传统酶解-氧化法相比, 收率提高 6.5%, 产品质量分数提高 5.6%, 杂蛋白含量降低 28.6%。

陆钊<sup>[33]</sup>等采用超滤-离子层析法精制猪硫酸软骨素, 研究了超滤液温度、超滤压力、超滤液 pH 对猪硫酸软骨素精制时膜通量和得率的影响。结果表明: 超滤-离子层析技术可应用于精制猪硫酸软骨素。猪硫酸软骨素超滤的工艺条件: 以微孔滤膜处理原料液, 超滤膜的截留分子量 10ku, 超滤压力 0.25MPa, 超滤温度 25℃, 溶液 pH 为 9。产物纯度为 95.74%, 产率为 80.15%。

相比于单一的超滤法或离子交换法来说, 采用

双法联合的超滤-离子层析法对硫酸软骨素可达到精细提取的目的, 且所得产物的产率和纯度都较高, 此法可应用于精制 CS。

## 2 硫酸软骨素的分析研究现状

### 2.1 硫酸软骨素的含量测定方法

随着全球市场硫酸软骨素需求量的增大, 其在保健品和临床中的应用越来越广泛, 不同的产品硫酸软骨素含量不同, 需要对产品进行含量鉴定, 所以硫酸软骨素含量测定方法不论在生产过程还是产品的质量的控制过程中的作用都越来越重要。

研究硫酸软骨素的测定方法主要有高效液相色谱法<sup>[34-35]</sup>、比浊法<sup>[36]</sup>、离子对反相高效液相色谱法<sup>[37]</sup>、分光光度法<sup>[38]</sup>、高效毛细管电泳法<sup>[39]</sup>、荧光定量分析法<sup>[40]</sup>、电化学法<sup>[41]</sup>、双抗体夹心酶联免疫吸附法<sup>[42]</sup>等。分子量的测定方面有分子排阻色谱(SEC)法, 分子排阻色谱和多角度激光光散射联用(SEC-MALLS)法<sup>[43]</sup>。不同方法有其自身的优缺点, 在实际测定中应该根据实际条件和对结果的不同要求选择不同的测定方法。

不同来源, 不同生产工艺的硫酸软骨素在含量和结构方面都不相同。目前 2010 年版《中国药典》第二部针对硫酸软骨素钠(硫酸软骨素钠片和硫酸软骨素钠胶囊)含量测定的方法是通过计算酶解产生的软骨素二糖、6-硫酸化的软骨素二糖和 4-硫酸化的软骨素二糖的峰面积之和, 计算出硫酸软骨素钠的含量<sup>[44]</sup>。而目前文献报道的硫酸软骨素的产率和纯度差别很大, 因此研究简便、低价、快速、精确、安全、稳定、重复性好的测定方法依然是未来发展的趋势。

### 2.2 硫酸软骨素的结构验证方法

陈士国<sup>[45]</sup>等人首次采用高温核磁共振(<sup>1</sup>H NMR)对海参硫酸软骨素结构进行初步鉴别, 结果表明: 高温条件下海参硫酸软骨素的<sup>1</sup>H NMR 图谱具有较好的分辨率。对其支链硫酸化岩藻糖的异头氢进行归属和比较, 并以此作为指标鉴别不同种类海参硫酸软骨素的结构差异, 建立了一种以海参硫酸软骨素结构特征为指标的海参指纹图谱, 为海参硫酸软骨素的构效研究提供理论支持。

孙春艳<sup>[46]</sup>利用近红外光谱仪对硫酸软骨素采集图谱后, 建立相应的数学模型, 为近红外光谱鉴别其他性状外观相似的药物奠定基础。王静<sup>[47]</sup>利用近红外光谱分析技术快速无损定性鉴别硫酸软骨素的来源。分别采用主成分分析法(sIMCA)、偏最小二乘判别分析法(PLS-DA)和支持向量机方法(SVM)三种模式识别方法建立硫酸软骨素来源的判别模型, 对验证集样品进行预测, 研究结果表明: 利用 SVM 方法建立数学模型, 对硫酸软骨素来源进行判别分析, 模型的预测效果较好, 达到了较高的准确度, 可以作为企业的内控标准, 为硫酸软骨素进行溯源分析提供了新的途径。

目前, 质谱技术在寡糖序列分析中也得到了广泛应用<sup>[48-49]</sup>, 但对于 CS 质谱细微结构分析, 还主要采用酶解和多级质谱联用技术, 该技术不仅能确定

IdoA、GlcA 及其硫酸化位置,而且还能确定低硫酸化和多硫酸化寡糖的结构,为各种来源的 CS 结构分析提供可靠依据。Zaia 等<sup>[50]</sup>用电喷雾四级杆飞行时间质谱和电喷雾离子阱质谱串联质谱法成功测定了 CS 二糖和寡糖中硫酸基的位置,并且区分了糖醛酸的差向异构体,得到了近乎完全的 CS 的结构信息。

### 3 硫酸软骨素的功能性研究现状

目前硫酸软骨素的功能性研究主要集中在 CS 的体外抗氧化活性,硫酸软骨素可通过抗氧化活性机制而具有抗纤维化活性,可以清除自由基和延缓衰老。徐瑞聪<sup>[51]</sup>研究了硫酸软骨素对不同自由基的清除能力及硫酸软骨素的还原能力,从而根据对各自由基的清除率和半抑制浓度来评价硫酸软骨素的抗氧化能力。结果表明:硫酸软骨素对超氧阴离子自由基、羟自由基、DPPH 自由基均有清除作用,并随着浓度的增大,清除作用加强,证明了硫酸软骨素具有一定的抗氧化活性。

同时 CS 为结缔组织中天然存在的成分,能够结合水分子用于润滑和支撑关节,使关节活动自如,有效预防关节炎。CS 可作为组织工程化关节软骨天然的生物支架材料,在动物体内可被降解为氨基葡萄糖,参与代谢,表现出良好的生物相容性和生物可降解性。

此外,CS 种类繁多,其功能不尽相同。例如:海参硫酸软骨素对大鼠酒精性胃溃疡具有保护作用<sup>[52]</sup>,对小鼠肿瘤生长和转移有抑制作用<sup>[53]</sup>;从黄鳍中提取出的 CS 具有降血脂和降血糖的功效<sup>[54]</sup>;鲨硫酸软骨素具有抗炎症和抗病毒的作用以及抗动脉硬化的功效。硫酸软骨素-A 对 X 射线造成的小鼠辐射损伤具有保护作用<sup>[55]</sup>,尤其是在 DNA 损伤方面,为发掘天然抗辐射药物提供新思路。

## 4 硫酸软骨素的应用研究现状

### 4.1 硫酸软骨素在医学方面的应用

硫酸软骨素作为风湿病、关节炎<sup>[56-57]</sup>、肩周炎、腰痛、神经痛、偏头痛等的治疗药物具有很好的效果,其机理为 CS 可直接补充软骨的基质成分、减轻软骨成分的降解、促进软骨细胞的代谢、恢复软骨细胞基质分泌功能、抑制关节内多种胶原酶的活性。

硫酸软骨素还具有其他多种药理活性,包括减少玻璃体与视网膜的粘连,保存角膜及治疗角膜损伤,抗肿瘤,降解囊性纤维变性部位的黏液物,促进神经轴的再生以及增强软骨细胞与软骨的黏附力等,可用于新药的开发。如软骨组织工程的可注射壳聚糖/硫酸软骨素复合水凝胶<sup>[58]</sup>,抗急性炎症氨基葡萄糖与 CS 复合片<sup>[59]</sup>的制备,骨修复材料<sup>[60]</sup>、滴眼液抑菌剂<sup>[61]</sup>等方面。

此外,硫酸软骨素与铜等金属离子结合可用于治疗皮肤病,与硝酸铋或氢氧化铝反应得到的络合物可用于治疗消化性溃疡,与苯甲酸酯、利多卡因或布比卡因作用生成的衍生物可用作麻醉剂。

### 4.2 硫酸软骨素在其他方面的应用

近些年,硫酸软骨素还应用在食品及保健食品领域中,被用作食品添加剂<sup>[47]</sup>。加到肉制品中,对于

增强其持水性、保持肉的柔嫩性、掩盖异味、防止褐变等方面起了很大的作用。美国药典-处方集将硫酸软骨素列为膳食补充剂,CS 与其它物质(如苯丙氨酸、V<sub>B3</sub>、V<sub>B5</sub>、V<sub>B6</sub>等)调配可制成止痛膳食。此外,硫酸软骨素钠盐还能消除鱼臭,保护胶性质强,而且在蛋黄酱中添加后,可改善风味、口感及制品的光泽。

硫酸软骨素含有大量的羧基和硫酸基,它们以多聚阴离子的形式存在,具有保水性、保胶性和高粘性,可与某些物质调制成化妆品,具有强化结缔组织、扩张末端血管、促进营养吸收和废物排除、改善皮肤细胞代谢和保持皮肤水分等作用。

## 5 硫酸软骨素的发展前景

### 5.1 存在的不足

全世界硫酸软骨素产业主要集中于我国,约占全球产量的 80%,是 CS 最大生产国和出口国。2010 年上半年,我国 CS 出口量为 1962t,出口额达 1.3 亿美元。全国以山东省为最主要的生产出口省份,每年出口金额达到 2 亿美元。我国目前已有一些医药企业拥有 CS 原料药生产的批准文号,这些企业都以收购 CS 粗提物和半成品为主,作为其药物、食品添加剂原料和中间体,进一步纯化为药品、食品及化妆品添加剂,因此,对粗提物和半成品有广泛需求。

尽管我国硫酸软骨素产业发展强劲,但仍然面临原料生产周期长(动物软骨的生产周期较长)、分布很分散,收集、储存、运输困难,很难实现集中大规模的收购,产业水平不高(工艺繁琐、收率不高、质量不稳)、产品质量缺陷(采用  $\gamma$  射线杀菌导致辐射残留)、污染严重(产生大量的有机物和蛋白废水)等制约产业发展的关键瓶颈<sup>[62]</sup>。因此,如何发展原料丰富、技术先进、质量优异、清洁环保的生产工艺是促进 CS 产业发展的关键。

### 5.2 展望

综上所述,硫酸软骨素的研究仍有广阔的前景和发展空间。开发来源丰富,价格低廉的 CS 资源,解决原料问题;在生产工艺上,力图研究出与目前国内加工水平相适应的生产工艺,降低生产成本;分析技术上建立相应质量监测体系;硫酸软骨素不同组分的分离技术;在活性研究的基础上重视扩展其在功能食品、保健品等领域的应用都将是硫酸软骨素研发重点。

### 参考文献

- [1]于广利,赵峡,张天民.硫酸软骨素的结构特点及其质量控制[J].食品与药品,2010(5):153-157.
- [2]Schiraldi C,Cimini D,De Rosa M.Production of chondroitin sulfate and chondroitin [J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2010,87:1209-1220.
- [3]熊双丽,李安林.酸性多糖的最新研究进展[J].食品科技,2010,35(5):80-83.
- [4]沈渤江,窦韵.硫酸软骨素制剂在澳大利亚的应用概况[J].食品与药品,2009,11(1):4-7.

- [5] Volpi N. Quality of different chondroitin sulfate preparations in relation to their therapeutic activity [J]. *Pharmacol*, 2009, 61: 1271-1280.
- [6] Zhou S. Health food useful for improving water content of skin obtained by mixing components including hyaluronic acid, chondroitin sulfate, fish collagen, vitamin C powder, glycine, proline extract of grape seeds and starch [P]. CN, 102210425A, 2011-10-12.
- [7] Wada T, Mano T, Tanouchi M. Composition useful in pharmaceuticals and food - drinks for treating asthenopia, comprises mixture of chondroitin sulfate [P]. WO, 2011136159 A1 2011-03-11.
- [8] 吴枫楠. 碱-酶法提取硫酸软骨素的工艺研究 [J]. *食品与生物技术学报* 2010 29(1): 81-83.
- [9] 成都市翻鑫家科技有限公司. 一种硫酸软骨素的制备方法 [P]. CN 201010197866.8 2012-07-04.
- [10] 史敏娟, 熊双丽, 卢飞, 等. 鸡胸软骨硫酸软骨素的制备及其稳定性研究 [J]. *食品工业科技* 2012(12): 328-332.
- [11] 李利晓. 基于酶法脱蛋白的硫酸软骨素提取工艺研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学 2012.
- [12] 甘肃农业大学. 一种牛或羊硫酸软骨素生产工艺 [P]. CN 201010248061.1 2012-07-25.
- [13] Im A R, Park Y, Kim Y S. Isolation and characterization of chondroitin sulfate from sturgeon (*Acipenser sinensis*) and their effects on growth of broblasts [J]. *Biol Pharm Bull* 2010 33(8): 1268-1273.
- [14] 杨松戈, 宁海. 鲑鱼软骨制备硫酸软骨素的研究 [J]. *辽东学院学报: 自然科学版* 2011 18(1): 16-19.
- [15] Murado M A, Fraguas J, Montemayor M I, et al. Preparation of highly purified chondroitin sulphate from skate (*Raja clavata*) cartilage by-products. Process optimization including a new procedure of alkaline hydroalcoholic hydrolysis [J]. *Biochem Eng*, 2010 49(1): 126-132.
- [16] Kevin JR, Dale PD, Michael DL, et al. Eggshell membrane: A possible new natural therapeutic for joint and connective tissue disorders. Results from two open-label human clinical studies [J]. *Clin Interv Aging* 2009 4: 235-240.
- [17] 李利晓, 夏延斌. 正交实验法优化牛鼻软骨中硫酸软骨素的醇沉工艺 [J]. *食品工业科技* 2012 33(16): 261-264.
- [18] 张志斌. 硫酸软骨素生产新酶解法工艺 [J]. *河南化工*, 2010 27(4): 98.
- [19] 徐瑞聪, 孙爱东, 张德权, 等. 二次回归正交旋转组合设计优化羊软骨硫酸软骨素提取工艺 [J]. *食品科技*, 2011 36(6): 124-128.
- [20] 陈亚. 猪喉软骨制备硫酸软骨素碱提工艺的优化 [J]. *江苏农业科学* 2012 40(9): 243-246.
- [21] 刘榜惠, 张志斌, 袁红英. 反向沉淀生产硫酸软骨素的方法 [P]. CN 201010112838.1 2012-12-12.
- [22] 田甲春, 韩玲, 杨晓丽. 超声波辅助法提取硫酸软骨素的工艺研究 [J]. *食品科学* 2010 3(2): 79-81.
- [23] 张峥, 耿芳宋, 高华. 猪软骨中硫酸软骨素的分离精制 [J]. *中国生化药物杂志* 2004 25(3): 144-146.
- [24] 徐峥嵘. 一种低分子硫酸软骨素制备方法 [P]. CN 101659973 A 2010-3-3.
- [25] 史敏娟, 熊双丽, 王莹, 等. 低相对分子质量硫酸软骨素的制备及其性质 [J]. *精细化工* 2012 29(11): 1088-1092.
- [26] 刘立明, 吴秋林, 刘佳, 等. 一种产硫酸软骨素菌株的筛选方法及用该菌株发酵生产硫酸软骨素 [P]. CN 201110127831.1 2011-05-18.
- [27] Zanfardino A, Restaino OF, Notomista E, et al. Isolation of an *Escherichia coli* K4 kfoC mutant over producing capsular chondroitin [J]. *Microb Cell Fact* 2010 9(1): 34-41.
- [28] Cimini D, DeRosa M, Viggiani A, et al. Improved fructosylated chondroitin production by kfoC over expression in *E. coli* K4 [J]. *Biotechnol* 2010 150(3): 324-331.
- [29] Nakano T, Betti M, Pietrasik Z. Extraction, isolation and analysis of chondroitin sulfate glycosaminoglycans [J]. *Recent Patents Food Nutr Agric* 2010 2: 61-74.
- [30] Buzzega D, Maccari F, Volpi N. Determination of molecular mass values of chondroitin sulfates by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) [J]. *Pharm Biomed Anal*, 2010 51(4): 969-972.
- [31] 李燕妮. 超滤法分离提取鸡胸软骨中硫酸软骨素和 II 型胶原蛋白 [J]. *化学与生物工程* 2011 28(2): 49-51.
- [32] 谢捷, 罗小芳, 朱兴一, 等. 离子交换法分离纯化猪硫酸软骨素的研究 [J]. *浙江工业大学学报* 2012 40(2): 124-128.
- [33] 陆钊, 董树国, 王玥, 等. 超滤-离子层析法精制猪硫酸软骨素 [J]. *吉林农业大学学报* 2012 34(2): 171-175.
- [34] 狄平平, 劳苑子, 赵立平, 等. HPLC 法测定复方氨基葡萄糖片中盐酸氨基葡萄糖和硫酸软骨素含量 [J]. *中国药事*, 2010 24(3): 283-286.
- [35] 曾芬. RP-HPLC 法测定鲨芪康胶囊中硫酸软骨素含量 [J]. *海峡药学* 2010 22(7): 88-90.
- [36] 谢捷, 汤君敏, 朱兴一, 等. 不同硫酸酯基含量硫酸软骨素的体外抗氧化活性 [J]. *浙江工业大学学报* 2010 38(6): 608-610.
- [37] 陆钊, 杨传禹, 刘晶晶, 等. 离子对反相高效液相色谱法测定猪硫酸软骨素的含量 [J]. *广东化工*, 2011 38(10): 141-142.
- [38] 曹慈, 迟逸仙, 巩民浩, 等. 分光光度法直接测定硫酸软骨素含量 [J]. *食品研究与开发* 2011 32(8): 96-99.
- [39] 沈建如, 陈振德, 于荣敏. 高效毛细管电泳法测定硫酸软骨素含量 [J]. *中国生化药物杂志* 2010 31(3): 197-199.
- [40] 尹璐, 王敬, 黄萍, 等. 阳离子铝酞菁红区荧光探针测定硫酸软骨素 [J]. *中国生化药物杂志* 2011 32(4): 277-280.
- [41] 杜美菊, 张传杰. 铋膜电极伏安法测定硫酸软骨素 [J]. *化学研究与应用* 2010 22(8): 1088-1090.
- [42] 玉崧成, 王威, 李艳平, 等. 定量测定硫酸软骨素的双抗体夹心 ELISA 的建立 [J]. *检验医学* 2011 26(3): 143-146.
- [43] 宋玉娟, 任丽萍, 范慧红. 硫酸软骨素钠分子质量及其分布的测定 [J]. *中国新药杂志* 2011 20(18): 1795-1797.
- [44] 《中国药典》2010 年版. (二部) [S]. 2010: 984-986.
- [45] 陈士国, 李国云, 伊利昂, 等. 高温  $^1\text{H}$  NMR 鉴别 8 种海参硫酸软骨素 [J]. *分析测试学报* 2010 29(8): 782-786.
- [46] 孙春艳. 近红外光谱法用于鉴别透明质酸、肝素和硫酸

- micelle build-up by its "soft" secondary structure [J]. *European Biophysics Journal* 2012 41(11): 959-968.
- [12] Horne DS. Casein micelle structure and stability [M]. In: Abby T, Mike B, Harjinder S, editors. *Milk Proteins*. San Diego: Academic Press, 2008: 133-162.
- [13] Ahmad S, Gaucher I, Rousseau F, et al. Effects of acidification on physico-chemical characteristics of buffalo milk: A comparison with cow's milk [J]. *Food Chemistry*, 2008, 106(1): 11-17.
- [14] Glantz M, Hakansson A, Lindmark Mansson H, et al. Revealing the size conformation and shape of casein micelles and aggregates with asymmetrical flow field-flow fractionation and multiangle light scattering [J]. *Langmuir*, 2010, 26(15): 12585-12591.
- [15] McMahon DJ, Brown RJ. Composition, Structure and Integrity of Casein Micelles: A Review [J]. *Journal of Dairy Science*, 1984, 67(3): 499-512.
- [16] Fox PF, Brodkorb A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance [J]. *International Dairy Journal*, 2008, 18(7): 677-684.
- [17] Nair PK, Alexander M, Dalgleish D, et al. Physico-chemical properties of casein micelles in unheated skim milk concentrated by osmotic stressing: interactions and changes in the composition of the serum phase [J]. *Food Hydrocolloids*, 2013, In the press, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.01.001>.
- [18] Dalgleish DG, Corredig M. The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing [J]. *Annual Review of Food Science and Technology* 2012 3: 449-467.

- [19] Dalgleish DG, Spagnuolo PA, Douglas Goff H. A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy [J]. *International Dairy Journal* 2004, 14(12): 1025-1031.
- [20] Horne DS. Casein micelles as hard spheres: limitations of the model in acidified gel formation [J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2003, 213(2-3): 255-263.
- [21] McMahon D, Oommen B. *Casein Micelle Structure, Functions, and Interactions* [M]. Germany: Springer, 2013: 185-209.
- [22] Ma J, Xu Q, Zhou J, et al. Nano-scale core-shell structural casein based coating latex: Synthesis, characterization and its biodegradability [J]. *Progress in Organic Coatings* 2013, In the press, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.porgcoat.2013.04.006>.
- [23] Qi P, X. Studies of casein micelle structure: the past and the present [J]. *Lait* 2007 87(4-5): 363-383.
- [24] De Kruijff CG, Huppertz T, Urban VS, et al. Casein micelles and their internal structure [J]. *Advances in Colloid and Interface Science* 2012, 171-172(0): 36-52.
- [25] Horne DS. Casein micelle structure: Models and muddles [J]. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2006, 11(2-3): 148-153.
- [26] Phadungath C. Casein micelle structure: a concise review [J]. *Songklanakarinn J Sci Technol* 2005 27(1).
- [27] Holt C, Horne D. The hairy casein micelle: evolution of the concept and its implications for dairy technology [J]. *Nederlands melk en Zuiveltijdschrift*, 1996 50(2): 85-111.

(上接第 395 页)

软骨素的模型研究[D]. 济南: 山东大学, 2010.

- [47] 王静. 近红外光谱分析技术快速鉴别硫酸软骨素来源的建模研究[D]. 济南: 山东大学, 2010.
- [48] Yu G, Yang B, Zhao X, et al. Sequence determination of sulfated carrageenan-derived oligosaccharides by high-sensitivity negative ion electrospray tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chem* 2006 78: 8499-8505.
- [49] Zamfir AD, Flangea C, Sisu E, et al. Analysis of novel over- and under-sulfated glycosaminoglycan sequences by enzyme cleavage and multiple stage MS [J]. *Proteomics*, 2009, 9: 3435-3444.
- [50] Zaia J. Tandem Mass Spectrometric Strategies for Determination of Sulfation Positions and Uronic Acid Epimerization in Chondroitin Sulfate Oligosaccharides [J]. *J Am Soc Mass Spectrom* 2003 14: 1270-1281.
- [51] 徐瑞聪. 羊软骨硫酸软骨素的提取分离及抗氧化活性研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2011.
- [52] 刘艳青, 李国云, 高焱, 等. 海参硫酸软骨素对大鼠酒精性胃溃疡的保护作用[J]. *食品科学*, 2011, 32(19): 201-204.
- [53] 张珣, 王静凤, 李辉, 等. 海参硫酸软骨素抑制小鼠 Lewis 肺癌生长和转移作用的研究[J]. *营养学报*, 2011, 33(6): 597-601.
- [54] 姚晓燕. 黄鳍骨硫酸软骨素多糖降血脂功能研究[J]. 中

国医药导报 2011 8(30): 31-33.

- [55] 谢小冬, 苏刚, 犇晓峰, 等. 硫酸软骨素-A 对 X 射线辐照损伤小鼠的保护作用[J]. *西北师范大学学报: 自然科学版*, 2013 49(1): 86-91.
- [56] 杨勇, 陈旭, 咎中学, 等. 盐酸氨基葡萄糖联合硫酸软骨素治疗腰椎小关节骨关节炎的临床观察[J]. *华西医学*, 2012, 27(12): 1809-1813.
- [57] Legendre F, Baugé C, Roche R, et al. Chondroitin sulfate modulation of matrix and inflammatory gene expression in IL-1 beta-stimulated chondrocytes - study in hypoxic alginate bead cultures [J]. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007 15.
- [58] 袁江, 谭红梅, 郭洪燕, 等. N-琥珀酰壳聚糖/氧化硫酸软骨素水凝胶的制备[J]. *化学推进剂与高分子材料*, 2012, 10(6): 66-69.
- [59] 赵轶, 李亚军. 氨基葡萄糖与硫酸软骨素复合片的制备[J]. *河北联合大学学报: 医学版*, 2012, 14(5): 614-615.
- [60] 王浩, 张里程, 石涛, 等. 胶原-羟基磷灰石-硫酸软骨素-骨形态发生蛋白修复材料的性质评估[J]. *北京大学学报: 医学版*, 2011, 43(5): 730-734.
- [61] 张世磊. 硫酸软骨素滴眼液抑菌剂的选择研究[D]. 济南: 山东大学, 2011.
- [62] 吴秋林, 刘立明, 陈坚. 发酵法生产硫酸软骨素的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2012 28(11): 1281-1293.