

乙醇沉淀结合酶解—高效液相色谱法测定 固体饮料中透明质酸钠

Optimization of extraction technology and determination of sodium hyaluronate in solid drinks by ethanol precipitation combined with enzymatic hydrolysis- reversed phase chromatography

张志舟^{1,2,3}

林嘉婷^{1,2,3}

潘灿盛^{1,2,3}

ZHANG Zhi-zhou^{1,2,3} LIN Jia-ting^{1,2,3} PAN Can-sheng^{1,2,3}

张 飞^{1,2,3}

胡含含^{1,2,3}

ZHANG Fei^{1,2,3} HU Han-han^{1,2,3}

(1. 广东省科学院测试分析研究所[中国广州分析测试中心], 广东 广州 510070;

2. 广东省化学测量与应急检测技术重点实验室, 广东 广州 510070;

3. 广东省保健食品功效成分检测与风险物质快速筛查工程技术研究中心, 广东 广州 510070)

(1. Institute of Analysis, Guangdong Academy of Sciences [China National Analytical Center, Guangzhou], Guangzhou, Guangdong 510070, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Chemical Measurement and Emergency Test Technology, Guangzhou, Guangdong 510070, China; 3. Guangdong Provincial Engineering Research Center for Efficacy Component Testing and Risk Substance Rapid Screening of Health Food, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

摘要:目的:建立反相液相色谱测定固体饮料中透明质酸钠的分析方法。方法:以透明质酸钠含量为评价指标,样品提取液经乙醇沉淀后,采用透明质酸酶对沉淀物进行酶解处理,通过单因素试验和正交试验法优化得到最佳酶解条件:酶解时间 120 min,酶解温度 34 ℃,pH 值 6.5。色谱柱为 Ultimate C₁₈ (4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相:乙腈 10 mmol/L 辛烷磺酸钠溶液($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{辛烷磺酸钠}}=10:90$),流速 0.6 mL/min;检测波长 232 nm,外标法定量。结果:透明质酸钠的相关系数为 0.999 9,加标回收率 96.4%~101%,相对标准偏差 3.16%,检出限为 0.062 g/kg。结论:乙醇沉淀结合酶解—反相色谱专属性强、准确度高、重复性好和干扰较小,适用于固体饮料中透明质酸钠的含量测定。

关键词:固体饮料;透明质酸钠;反相液相色谱法;乙醇沉淀;酶解

Abstract: **Objective:** This study aimed to establish the methods for determining the content of sodium hyaluronate in solid drinks by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Methods:** With sodium hyaluronate content as evaluation index, after the sample extract was precipitated by ethanol, hyaluronase was used to hydrolyze the precipitate. The optimal enzymolysis conditions obtained by single factor test and orthogonal test were as follows: enzymolysis, at 34 ℃ and pH 6.5, for 120 min. The determination was performed on Uliumate C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with mobile phase: acetonitrile 10 mmol/L sodium octane sulfonate solution ($V_{\text{acetonitrile}}:V_{\text{octane sulfonate}}=10:90$) at flow rate of 0.6 mL/min. The detection wavelength was 232 nm and quantified by external standard method. **Results:** The correlation coefficient of sodium hyaluronate was 0.999 9. The recoveries of samples were between 96.1%~101%, and the relative standard deviation was 3.16%. The determination of limit was 0.062 g/kg. **Conclusion:** Ethanol precipitation combined with enzymolysis-reversed phase chromatography has strong specificity, high accuracy, good repeatability and less

基金项目:广东省科学院测试分析研究所(中国广州分析测试中心)自筹科研资金项目(编号:202103)

作者简介:张志舟,男,广东省科学院测试分析研究所(中国广州分析测试中心)工程师,学士。

通信作者:林嘉婷(1984—),女,广东省科学院测试分析研究所(中国广州分析测试中心)助理工程师,学士。

E-mail: 236249624@qq.com

收稿日期:2022-10-03 **改回日期:**2023-03-20

interference, which is suitable for the determination of sodium hyaluronate in solid drinks.

Keywords: solid drinks; sodium hyaluronate; reversed phase chromatography; ethanol precipitation; enzymolysis

透明质酸是由 *D*-葡萄糖醛酸和 *N*-乙酰基-*D*-葡萄糖胺通过 β -(1-3)糖苷键连接而成且具有双糖结构单元的线性多糖,每个双糖单元通过 β -(1-4)糖苷键相连。透明质酸钠(SH)是透明质酸的钠盐形式,性质更趋稳定,是商品透明质酸的常见形式^[1-2],化学式为 $(C_{14}H_{20}NO_{11}Na)_n$ 。不同聚合度 SH 的酶解后的终产物为透明质双糖,透明质双糖是 SH 的最小结构单元^[3]。SH 具有改善皮肤水分^[4]、保湿^[5]、抗氧化^[6-7]、改善肌肤弹性^[8]和促进伤口愈合^[9-10]等作用。《国家卫生健康委关于蝉花子实体(人工培植)等 15 种“三新食品”的公告》(国家卫生健康委员会公告 2020 年第 9 号)批准了透明质酸钠为新食品原料^[11]。迄今为止,全球共有 2 000 多款透明质酸钠食品,然而中国关于 SH 保健食品的获批数量仅有 31 款,因此该类在中国具有广阔的发展空间^[12-13]。固体饮料是一种常见的食品,通常指以糖、乳、果汁或植物提取物等为主要原料,添加适量的辅料或食品添加剂制成的固态制品^[14]。固体饮料具有携带方便,速溶性好等优点,是透明质酸钠产品的主要形式之一。

测定透明质酸钠的方法主要有分光光度法^[15-16]、凝胶色谱法^[17-18]和阳离子交换色谱法^[3,19]。分光光度法易受糖类、蛋白质等成分的影响,干扰较大。凝胶色谱法主要根据物质分子量的不同进行测定,只有确保标准品与样品中透明质酸钠的聚合度相同时,才能实现准确定量和定量^[20]。阳离子交换色谱法需要选用昂贵的专属色谱柱,且在固体饮料检测时存在基质干扰。研究以固体饮料为对象,通过乙醇沉淀的方法将样品提取液中透明质酸钠沉淀,沉淀物复溶后采用透明质酸酶将 SH 酶解为透明质双糖^[3],再采用反相色谱法测定透明质双糖,以期为固体饮料产品中透明质酸钠的测定提供专属性强,操作简便快速,结果准确,重现性良好的方法。

1 材料与方法

1.1 试验仪器

超高压液相色谱仪—二极管阵列检测器(DAD): Agilent 1290 型,安捷伦科技(中国)有限公司;

电热恒温水浴锅:WBK-2A 型,广东环凯微生物科技有限公司;

旋转蒸发仪:R-210 型,瑞士 BUCHI 公司;

超声波清洗仪:KQ-2200 型,昆山市超声仪器有限公司;

电子天平:BT125D 型,德国 Sartorius 公司;

日立多用途冷冻离心机:CF16RXII 型,日立公司;

Multi Reax 多位试管振荡器:M10087 型,德国海道夫公司。

1.2 试剂

透明质酸钠:95%,加拿大多伦多研究级化学公司;

无水乙醇、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸、氢氧化钠:分析纯,广州化学试剂厂;

去离子水:实验室自制;

透明质酸酶:酶活 $\geq 10\,000$ IU,华熙生物科技股份有限公司;

辛酸磺酸钠:分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;

乙腈:色谱纯,霍尼韦尔(中国)有限公司;

磷酸盐缓冲液(5 mmol/L):称取磷酸二氢钠 0.685 g,磷酸氢二钠 0.22 g,置于 1 L 容量瓶中,加入适量的水溶解,用磷酸调节 pH 至 6.5,加去离子水定容至刻度。

1.3 标准溶液配制

标准储备溶液:准确称取透明质酸钠标准品 105.26 mg 于 100 mL 容量瓶,用磷酸盐缓冲液(5 mmol/L)溶解并定容,质量浓度为 1 000 mg/L。

标准工作溶液:将标准储备液用去离子水逐级稀释成质量浓度分别为 25.0,50.0,100,250,500 mg/L 的系列标准工作液。

1.4 样品前处理

(1) 乙醇沉淀:精密称取 0.5~2.0 g 样品于 50 mL 刻度离心管中,精密加入磷酸盐缓冲液(5 mmol/L)10 mL,涡旋振荡 10 min,加入无水乙醇至 50 mL,摇匀后,室温静置 60 min,8 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液后于 50 ℃ 氮气吹干得到残渣,向残渣中加入 15 mL 磷酸盐缓冲液(5 mmol/L)后涡旋提取 20 min,调节 pH 值至 6.5,并转移至 25 mL 容量瓶中,用磷酸盐缓冲液(5 mmol/L)定容至刻度,摇匀。

(2) 酶解反应:分别移取标准工作溶液、样品溶液各 500 μ L 于 10 mL 具塞比色管中,加入 5 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液 1 450 μ L,透明质酸酶 50 μ L,充分混匀后于 34 ℃ 水浴酶解反应 120 min,酶解完毕后,立即置于沸水浴中加热 2 min 使酶失活,冷却后用水定容至刻度,混匀后过滤上机。

1.5 色谱条件

色谱柱:Ultimate C₁₈(4.6 mm $\times$ 250 mm,5 μ m);流速 0.6 mL/min;进样量 20 μ L;柱温 40 ℃;检测波长 232 nm;流动相:乙腈—10 mmol/L 辛酸磺酸钠溶液($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{辛酸磺酸钠}}=10:90$)。

1.6 数据处理

将酶解后的标准工作溶液和试液分别进样,以标准

系列溶液峰面积为纵坐标、浓度为横坐标绘制标准曲线,以保留时间定性,峰面积外标法定量。根据工作曲线得到试样溶液中透明质酸钠的质量浓度。按式(1)计算试样中透明质酸钠含量。

$$X = \frac{C \times V}{m \times 1\,000}, \quad (1)$$

式中:

X ——样品中透明质酸钠的含量, g/kg;

C ——由工作曲线得出的透明质酸钠的质量浓度, mg/L;

V ——定容体积, mL;

m ——试样质量, g。

1.7 乙醇沉淀条件优化

以透明质酸钠含量为评价指标,在 pH 值 6.5、酶解温度 34 ℃、酶解时间 120 min 条件下,考察乙醇与磷酸盐缓冲液(5 mmol/L)配比($V_{\text{乙醇}} : V_{\text{磷酸盐缓冲液}}$ 分别为 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1)对测定结果的影响。

1.8 酶解条件优化

1.8.1 酶解时间对透明质酸钠酶解程度的影响 以透明质酸钠含量为评价指标,在酶解温度为 34 ℃, pH 值为 6.5 的条件下,考察酶解时间(40, 60, 80, 100, 120 min)对透明质酸钠酶解程度的影响,其他前处理步骤见“1.4”。

1.8.2 酶解温度对透明质酸钠酶解程度的影响 以透明质酸钠含量为评价指标,在酶解时间为 80 min, pH 值为 6.5 的条件下,考察酶解温度(30, 34, 38, 42, 46, 50 ℃)对透明质酸钠酶解程度的影响,其他前处理步骤见“1.4”。

1.8.3 酶解 pH 值对透明质酸钠酶解程度的影响 以透明质酸钠含量为评价指标,在酶解时间为 80 min, 温度为 42 ℃的条件下,考察酶解 pH 值(5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5)对透明质酸钠酶解程度的影响,其他前处理步骤见“1.4”。

1.8.4 正交试验设计 根据单因素试验结果,以透明质酸钠含量为评价指标,以酶解时间、酶解温度和酶解 pH 值为试验因素进行正交试验优化酶解参数。

2 结果与讨论

2.1 乙醇沉淀条件优化

由于固体饮料中含有各种蛋白、糖类、甜味剂、添加剂、色素等,成分复杂,样品测定时用磷酸盐缓冲液(5 mmol/L)直接溶解,形成溶液浑浊,即使是离心后也较难得到清澈的溶液,影响酶解过程。试验利用透明质酸钠作为一种多糖,在乙醇溶液中可以沉淀的性质,将其沉淀下来,以减小上清液中杂质对测定过程中的影响。由图 1 可知,随着乙醇的占比逐渐增大,透明质酸钠含量先增加后减小,当 $V_{\text{乙醇}} : V_{\text{磷酸盐缓冲液}}$ 为 4:1 时透明质酸钠含量最高,说明在该比例下,乙醇沉淀效果最好,因此选定该比例作为去除杂质,沉淀透明质酸钠的最佳比例。

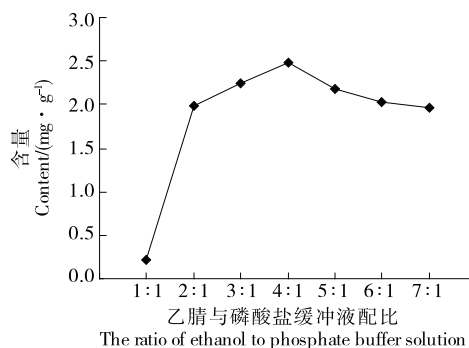


图 1 乙醇与磷酸盐缓冲液比对测定结果的影响
Figure 1 Effects of ratio of ethanol and phosphate buffer on the determination of sodium hyaluronate

2.2 酶解工艺优化

2.2.1 酶解时间对透明质酸钠酶解程度的影响 由图 2 可知,随着酶解时间的增加,透明质酸钠含量先增高后降低,当酶解到 80 min 时透明质酸钠含量最高。因此,最佳酶解时间为 80 min。呈现这种趋势的主要原因是透明质酸钠不断被酶解,到一定时间达到最高值后,目标物随时间增加有一定的降解。

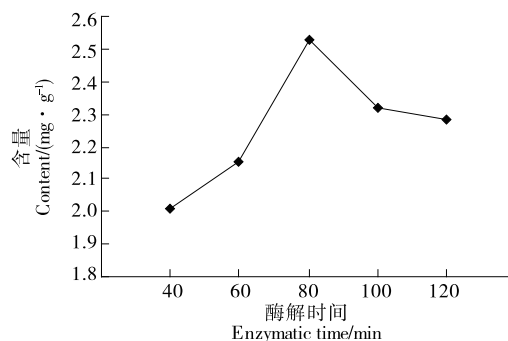


图 2 酶解时间对透明质酸钠酶解程度的影响
Figure 2 Effects of enzymolysis time on the degree of enzymolysis degree of sodium hyaluronate

2.2.2 酶解温度对透明质酸钠酶解程度的影响 由图 3 可知,随着酶解温度的升高,透明质酸钠含量先增高后降低,当温度为 42 ℃时,透明质酸钠含量最高。因此,最佳酶解温度为 42 ℃。导致这种趋势的主要原因是酶作为一种蛋白质,作用于底物时,酶活随温度升高而提高,达到最适温度后,部分酶发生变性,导致酶解效果下降。

2.2.3 酶解 pH 值对透明质酸钠酶解程度的影响 由图 4 可知,随着酶解 pH 值的升高,透明质酸钠含量先增高后降低,当 pH 值为 6.5 时,透明质酸钠含量最高,酶解效果最佳。因此,最佳酶解 pH 值为 6.5。导致这种趋势的主要原因是酶作为一种蛋白质,作用于底物时,酶活随着 pH 值升高而提高,达到最适 pH 值后,部分酶发生变性,导致酶解效果下降。

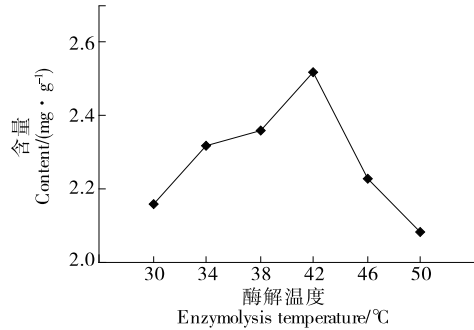


图3 酶解温度对透明质酸钠酶解程度的影响
Figure 3 Effects of enzymolysis temperature on the enzymolysis degree of sodium hyaluronate

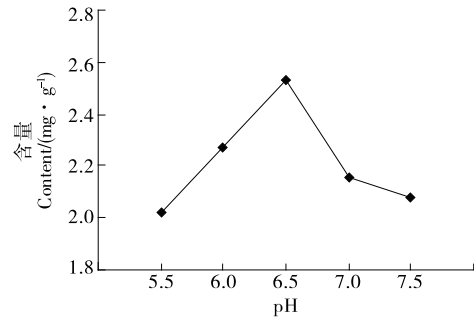


图4 酶解pH值对透明质酸钠酶解程度的影响
Figure 4 Effects of pH value on the enzymolysis degree of sodium hyaluronate

2.2.4 正交试验 根据单因素试验结果确定的正交试验因素与水平见表1。由表2和表3可知,3个因素对透明质酸钠酶解效率的影响大小依次为:酶解pH值>酶解温度>酶解时间。其中,酶解pH值具有显著影响,最佳酶解条件为A₃B₁C₂,即酶解时间120 min,酶解温度34℃,pH值6.5。

2.3 色谱方法选择

分别选用3种类型的色谱柱进行测定,流速均为

表1 因素与水平 Table 1 Factors and levels			
水平	A 酶解时间/min	B 酶解温度/℃	C 酶解pH值
1	40	34	5.5
2	80	42	6.5
3	120	50	7.5

表2 L ₉ (3 ⁴)正交试验及结果 Table 2 L ₉ (3 ⁴) orthogonal test and results					
试验号	A	B	C	D(空白)	含量/(g·kg ⁻¹)
1	1	1	1	1	1.69
2	1	2	2	2	2.26
3	1	3	3	3	1.61
4	2	1	2	3	2.33
5	2	2	3	1	1.85
6	2	3	1	2	0.82
7	3	1	3	2	2.21
8	3	2	1	3	1.59
9	3	3	2	1	2.39
k ₁	1.853	2.077	1.368	1.977	
k ₂	1.668	1.900	2.327	1.764	
k ₃	2.063	1.608	1.890	1.843	
极差	0.395	0.469	0.959	0.213	

表3 正交设计的方差分析 [†] Table 3 Analysis of variance for orthogonal design					
因素	偏差平方和	自由度	F _比	F _{临界值}	显著性
A	0.235	2	0.464	4.460	0.690
B	0.337	2	0.666	4.460	0.579
C	1.383	2	2.733	4.460	0.032*
误差	2.020	8			

[†] 显著性水平为α=0.05; * 为影响显著。

0.6 mL/min,检测波长均为232 nm,其他色谱条件和分离结果见表4。由表4可知,方法1的分离度和理论塔板数最佳,而且方法1选用的色谱柱为C₁₈柱,C₁₈柱成本较低,简单易得,因此选择方法1进行测定。

2.4 方法学评价

2.4.1 线性关系、检出限和定量限 以透明质酸钠浓度为横坐标(X),色谱峰面积为纵坐标(Y),进行线性回归,绘制标准曲线,结果表明透明质酸钠在25.0~500 mg/L的质量浓度范围内,线性关系良好,同时按照1.3的方法配制目标物的基质标准溶液,以外标法进行定量。选用阴性样品进行低浓度加标,根据仪器信噪比,当S/N=3和S/N=10分别确定方法检出限(LOD)和定量限(LOQ),结果见表5。

表4 3种色谱柱分离效果比对数据 Table 4 Comparison of the separation by using 3 kinds of chromatographic columns				
方法	色谱柱	流动相	分离度	理论塔板数
1	Ultimate C ₁₈ (4.6 mm×250 mm,5 μm)	V _{乙醇} :V _{辛烷磺酸钠} =10:90	23.4	10 586
2	MCI GEL CK08EH(7.8 mm×300 mm,5 μm)	1.0%磷酸溶液	5.65	6 403
3	GEL CK08EH(7.8 mm×300 mm,5 μm)	V _{乙醇} :V _{—级水} =70:30	2.13	2 044

表 5 阴性基质中目标物的线性关系、检出限和定量限
Table 5 Linear relationship, limit of detection and quantification limit in blank matrix

测定物质	线性方程	R^2	LOD/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	LOQ/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)
透明质酸钠	$Y=2\,447.03X+1.62$	0.999 9	0.062	0.21

2.4.2 重复性试验 按照优化好的方法条件进行重复性试验($n=6$),求得相对标准偏差为 3.16%,结果表明,方法重复性良好。

2.4.3 准确度试验 称取固体饮料样品 6 份进行低、中、高 3 个水平加标试验($n=2$),计算求得加标回收率,结果见表 6。由表 6 可知,该方法加标回收率为 96.4%~101.0%,相对标准偏差为 2.17%。方法准确度较好,可满足测定要求。

表 6 加标回收率结果[†]

Table 6 Recovery rate of standard addition

添加量/($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	测得量/($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	回收率/%	RSD/%
0.500	2.962	96.4	2.17
2.50	4.895	96.6	
12.50	15.11	101.0	

[†] 本底值 2.48 g/kg。

2.4.4 实际样品测定 选取 7 种不同品牌的固体饮料样品进行测定,对比实际测定结果与标签标示量,结果(见表 7)表明,检测结果与包装标签相符,方法实用性较强。

表 7 实际样品测定

Table 7 Sample determination results

样品	标签标示量/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	实际测定含量/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	是否与理论相符
1	1.0~3.0	2.02	是
2	2.5	2.48	是
3	1.0~3.0	1.80	是
4	3.6	3.50	是
5	2.0	1.90	是
6	1.1~1.8	1.50	是
7	未添加	未检出	是

3 结论

研究通过优化固体饮料中透明质酸钠的前处理过程和色谱条件,建立了乙醇沉淀结合酶解—反相色谱法测定固体饮料中透明质酸钠的分析方法。经验证,该方法前处理针对性强,准确度高,重现性好;色谱条件简便易得,基质干扰较小,可用于该类产品的质量监控。但全球共有 2 000 余款透明质酸钠食品,由于食品的成分多种多

样,基质十分复杂,而且测定过程中干扰较多,后续应进一步优化样品的净化方法,并使用更高柱效的色谱柱进行分离定量。

参考文献

[1] 国家食品药品监督管理总局. 组织工程医疗器械产品 透明质酸钠: YY/T 1571—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
State Food and Drug Administration. Tissue engineering medical device products Sodium hyaluronate: YY/T 1571—2017[S]. Beijing: China Quality and Standards Press, 2017.

[2] 汤祥忠, 刘东, 杨永环. 高吸水性止血材料中透明质酸钠含量的测定[J]. 河南科技, 2019(34): 119-121.
TANG X Z, LIU D, YANG Y H, et al. Determination of sodium hyaluronate in superabsorbent hemostatic materials [J]. Henan Science and Technology, 2019(34): 119-121.

[3] 陈玉娟, 陈雯雯, 乔莉萍, 等. 高效液相色谱法测定透明质酸钠含量的研究[J]. 药学研究, 2020, 39(3): 146-148.
CHEN Y J, CHEN W W, QIAO L P, et al. Determination of sodium hyaluronate by HPLC[J]. Journal of Pharmaceutical Research, 2020, 39(3): 146-148.

[4] 司秋霞. 透明质酸钠改善皮肤水份状态的研究[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2020, 6(31): 79, 89.
SI Q X. Study of sodium hyaluronate on improving skin moisture [J]. Cardiovascular Disease Electronic Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2020, 6(31): 79, 89.

[5] 钱进, 邓慧, 李华真, 等. 化妆品中保湿剂的拮抗与增效作用探究[J]. 广东化工, 2022, 49(19): 49-54.
QIAN J, DENG H, LI H Z, et al. Research on antagonistic and synergistic effects of moisturizers in cosmetics [J]. Guangdong Chemical Industry, 2022, 49(19): 49-54.

[6] 吴国兵. 透明质酸钠治疗膝关节关节炎的研究进展[J]. 中国城乡企业, 2021, 36(4): 26-28.
WU G B. Research progress of sodium hyaluronate in the treatment of knee aosteoarthritis [J]. Chinese Journal of Urban and Rural Enterprise Hygiene, 2021, 36(4): 26-28.

[7] 周致莹, 乔小青, 张旭光. 一款胶原蛋白复合粉改善皮肤水分人体试食试验研究[J]. 食品安全导刊, 2019(26): 68-72.
ZHOU Z Y, QIAO X Q, ZHANG X G. Human experiment on effect of a collagen composite powder on improving human skin moisture [J]. China Food Safety Magazine, 2019(26): 68-72.

[8] 岳虹, 宁月莲, 黄晓燕, 等. 分光光度法测定原料中透明质酸钠含量的不确定度评定[J]. 饮料工业, 2022, 25(3): 39-45.
QIU H, NING Y L, HUANG X Y, et al. Evaluation of uncertainty for determination of sodium hyaluronate in raw materials by spectrophotometry[J]. Beverage Industry, 2022, 25(3): 39-45.

[9] CHOI H K, CHO Y H, LEE E O, et al. Phytosphingosine enhances moisture level in human skin barrier through stimulation of the filaggrin biosynthesis and degradation leading to NMF formation[J]. Archives of Dermatological Research, 2017, 309(10): 795-803.

- [10] 刘硕, 王景召. 透明质酸的特性及其在食品中的应用[J]. 化工设计通讯, 2018, 44(8): 62.
- LIU S, WANG J Z. Characteristics of hyaluronic acid and its application in food [J]. Chemical Engineering Design Communications, 2018, 44(8): 62.
- [11] 国家卫生健康委. 关于蝉花子实体(人工培植)等 15 种“三新食品”的公告(2020 年第 9 号)[J]. 饮料工业, 2021, 24(1): 4-6.
- National Health Commission of the People's Republic of China. Announcement on 15 "three new foods" including cicada flower fruiting body (artificial cultivation) (No. 9 in 2020) [J]. Beverage Industry, 2021, 24(1): 4-6.
- [12] 宋东宇, 王若贤, 李硕, 等. 透明质酸钠功能机理及在食品中的应用进展[J]. 食品安全导刊, 2022(1): 162-165.
- SONG Y D, WANG R X, LI S, et al. Functional mechanism of sodium hyaluronate and its utilization in food [J]. China Food Safety Magazine, 2022(1): 162-165.
- [13] 王胜男, 宫建辉, 徐熙明, 等. 透明质酸钠功能机制及其在食品中的应用进展[J]. 食品安全导刊, 2022(11): 181-183.
- WANG S N, GONG J H, XU X M, et al. The functional mechanism of sodium hyaluronate and its application in food [J]. China Food Safety Magazine, 2022(11): 181-183.
- [14] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 固体饮料: GB/T 29602—2013[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Solid beverages: GB/T 29602—2013 [S]. Beijing: China Quality and Standards Press, 2014.
- [15] 万秀玉, 白若琬, 姜雯, 等. 咔唑法同时测定玻璃酸钠和硫酸软骨素的含量[J]. 药学实践杂志, 2009, 29(4): 282-283.
- WANG X Y, BAI R W, JIANG W, et al. Carbazole method for simultaneous determination of sodium hyaluronate and chondroitin sulfate [J]. Journal of Pharmaceutical Practice, 2009, 29 (4): 282-283.
- [16] 李敏, 侯增森, 李晓颖, 等. 改良咔唑法测定重组人溶酶菌滴眼液中透明质酸钠的含量[J]. 化学分析计量, 2019, 28(1): 95-98.
- LI M, HOU Z M, LI X Y, et al. Determination of sodium hyaluronate in recombinant human lysozyme eye drops by modified carbazole method [J]. Chemical Analysis and Meterage, 2019, 28(1): 95-98.
- [17] 程伟. 浓度对凝胶色谱法测定低分子透明质酸钠分子量的影响[J]. 科技信息, 2010(34): 222.
- CHENG W. Effect of concentration on determination of molecular weight of low molecular sodium hyaluronate by gel chromatography [J]. Science & Technology Information, 2010(34): 222.
- [18] 张莉, 赵鹏, 何涛, 等. 高效凝胶色谱法同时测定眼用粘弹剂中透明质酸钠和硫酸软骨素钠的含量[J]. 理化检验(化学分册), 2018, 54(3): 260-263.
- ZHANG L, ZHAO P, HE T, et al. Simultaneous determination of sodium hyaluronate and sodium chondroitin sulfate in eye viscoelastic agents by high performance gel chromatography [J]. Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chemical Analysis), 2018, 54(3): 260-263.
- [19] 韩志辉, 张艳芳, 杨耀群. 藏红 T 共振瑞利散射光谱法测定保健食品中的透明质酸钠[J]. 化学分析计量, 2017, 26(2): 63-66.
- HAN Z H, ZHANG Y F, YANG Y Q. Determination of sodium hyaluronate in health food with safranine T resonance rayleigh scattering method [J]. Chemical Analysis and Meterage, 2017, 26 (2): 63-66.
- [20] 杨桂兰, 郭学平, 栾贻宏. 不同相对分子质量透明质酸钠的应用[J]. 食品与药品, 2005, 7(12): 1-3.
- YANG G L, GUO X P, LUAN Y H. Applications of sodium hyaluronate with different relative molecular mass [J]. Food and Drug, 2005, 7(12): 1-3.
- (上接第 42 页)
- [18] 屈江玲, 汤华成, 曹冬梅. 红小豆中精喹禾灵及其代谢物残留测定和膳食风险评估[J]. 食品与机械, 2020, 36(5): 84-88.
- QU J L, TANG H C, CAO D M. Residue and dietary risk assessment of quizalofop-p-ethyl and its metabolites in adzuki bean [J]. Food & Machinery, 2020, 36(5): 84-88.
- [19] VAROL M, GÜLDEREN K K, ALP A. Heavy metal and arsenic concentrations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farmed in a dam reservoir on the Firat (Euphrates) River: Risk-based consumption advisories [J]. Science of the Total Environment, 2017, 599/600: 1 288-1 296.
- [20] 孔丹丹, 李歆悦, 闫卉欣, 等. 药食两用植物药中重金属污染及其健康风险评估模型的建立: 以黄芪、党参、昆布为例[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(23): 5 042-5 050.
- KONG D D, LI X Y, YAN H X, et al. Establishment of health risk assessment model for assessing medicinal and edible plants contaminated by heavy metals: Take Astragali Radix, Codonopsis Radix and Laminariae Thallus as examples [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2019, 44(23): 5 042-5 050.
- [21] 吴建杰, 骆骄阳, 谷善勇, 等. 柴胡饮片重金属生物可给性研究及其风险评估[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(22): 4 479-4 485.
- WU J J, LUO J Y, GU S Y, et al. Estimation of bioaccessibility and risk assessment of heavy metals indecoction pieces of Bupleuri Radix [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2018, 43(22): 4 479-4 485.
- [22] 秦双双, 黄静雯, 袁媛, 等. 中药材重金属元素及其与指标性成分相关性分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(6): 66-70.
- QIN S S, HUANG J W, YUAN Y, et al. Correlation analysis of heavy metals and index components in traditional Chinese medicinal materials [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2018, 24(6): 66-70.