

# 柱前衍生—高效液相色谱荧光检测法 测定乳制品中6种母乳寡糖

Determination of six human milk oligosaccharides in dairy product by precolumn derivatization high performance liquid chromatography with fluorescence detection

李绮淇<sup>1,2</sup> 黄嘉乐<sup>1,2</sup> 穆姝夷<sup>1,2</sup> 李绮珊<sup>1,2</sup> 黄靖钧<sup>1,2</sup>

LI Qiqi<sup>1,2</sup> HUANG Jiale<sup>1,2</sup> MU Shuyi<sup>1,2</sup> LI Qishan<sup>1,2</sup> HUANG Jingjun<sup>1,2</sup>

(1. 广州检验检测认证集团有限公司, 广东 广州 511447;

2. 国家加工食品质量检验检测中心〔广东〕, 广东 广州 511447)

(1. Guangzhou Inspection Testing and Certification Group Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong 511447, China;

2. National Quality Testing Center for Processed Food [Guangdong], Guangzhou, Guangdong 511447, China)

**摘要:**目的:建立一种普及性强、灵敏度高,并能同时测定乳制品中6种母乳寡糖的高效液相色谱—荧光检测分析方法。方法:样品经冰醋酸沉淀,滤纸过滤后,经2-氨基苯甲酰胺溶液衍生,离心后经有机滤膜过滤,用AdvanceBio Glycan Map色谱柱分离,以乙腈—50 mmol/L甲酸铵溶液(pH 4.4)为流动相,梯度洗脱分离,并使用荧光检测器检测。结果:6种母乳寡糖在1.00~400.0 mg/L质量浓度范围内线性关系良好,相关系数均 $>0.999$ ,方法检出限为4.1~10.9 mg/kg,回收率为71.3%~90.2%,日内相对标准偏差(RSD)为1.0%~6.3%,日间相对标准偏差 $<10.0\%$ 。结论:该方法简单、快捷,可有效降低衍生峰的干扰,适用于乳制品中3'-岩藻糖基乳糖、2'-岩藻糖基乳糖、乳糖-N-四糖、乳糖-N-新四糖、3'-唾液乳糖和6'-唾液乳糖6种母乳寡糖的日常检测。

**关键词:**柱前衍生法;母乳寡糖;乳制品;2-氨基苯甲酰胺

**Abstract:** Objective: To establish a strong popularity, high sensitivity of six human milk oligosaccharides in dairy product by precolumn derivatization high performance liquid chromatography-fluorescence method. Methods: Aquatic product sample was precipitated with glacial acetic acid, filtration by using the filter paper. It was derived by 2-aminobenzamide solution. The extracts were centrifuged and filtered by using the organic filter membrane and analyzed by using a AdvanceBio

Glycan Map column to be separated and detected, employing acetonitrile-50 mmol/L ammonium formate solution (pH 4.4) as the mobile phase for gradient elution. Results: Under the experimental conditions, six human milk oligosaccharides in dairy product were linear in the range of 1.00~400.0 mg/L, and the correlation coefficients were all over 0.999. The detection limit of the method was 4.1~10.9 mg/kg, the limits of quantification were 12.3~32.7 mg/kg, the mean recoveries rate was ranged from 71.3% to 90.2% with the intra-day precisions ( $n=6$ ) in the range of 1.0%~6.3% and inter-day precisions ( $n=6$ ) less than 10.0%. Conclusion: This method can meet the requirements of the daily detection of six human milk oligosaccharides due to its simplicity and sensitives.

**Keywords:** precolumn derivatization; human milk oligosaccharides; dairy product; 2-aminobenzamide

母乳一直被认为是婴儿最优质的食物来源,也被视为婴儿配方乳粉的黄金标准<sup>[1-2]</sup>。母乳喂养不仅可以减少疾病(如脑膜炎、小肠结肠炎等)的发病率、促进智力发育,对于婴儿胃肠道、免疫系统的发育也起到积极的作用<sup>[3-10]</sup>。其中,母乳寡糖(human milk oligosaccharides, HMOs)是由3~14个单糖组成的低聚糖通过糖苷键连接而成的碳水化合物,其基本单体分为5种,主要以游离形式存在于母乳中<sup>[9]</sup>,这些单糖以不同的方式结合形成200多种结构复杂的低聚糖,构成了母乳低聚糖的多样性<sup>[11-14]</sup>。而存在于人类母乳中的复杂混合低聚糖,是母乳中的重要成分之一,其在促进婴儿肠道菌群生长、提高

基金项目:广东省市场监督管理局科技项目(编号:2023CS03)

作者简介:李绮淇(1997—),女,广州检验检测认证集团有限公司助理工程师,学士。E-mail: 472029934@qq.com

收稿日期:2023-08-22 改回日期:2024-03-21

免疫系统功能、抵抗病原体等方面具有不可替代的作用。其中,3'-岩藻糖基乳糖、2'-岩藻糖基乳糖、乳糖-N-四糖、乳糖-N-新四糖、3'-唾液乳糖和6'-唾液乳糖(见图1)等是母乳中相对丰富的寡糖<sup>[15]</sup>。

母乳寡糖具有调节免疫系统、帮助大脑发育及调节肠道菌群功能,有助于婴幼儿成长发育<sup>[16]</sup>。母乳是极好的蛋白质来源,为婴儿提供了必需氨基酸、非必需氨基酸

和其他氨基酸。因此,国外很多标准已将母乳寡糖中最普遍的成分加至配方奶粉中,以此实现更加深入的母乳结构模拟。在美国和欧盟,2'-岩藻糖乳糖和乳-N-新四糖已获批准添加到婴儿配方粉中,但目前中国还没有相关标准对母乳寡糖作为婴幼儿配方奶粉中的指标做出明确指引及检测方向。为了监测乳制品中6种HMOs含量的添加情况,需要建立相关的检测方法。

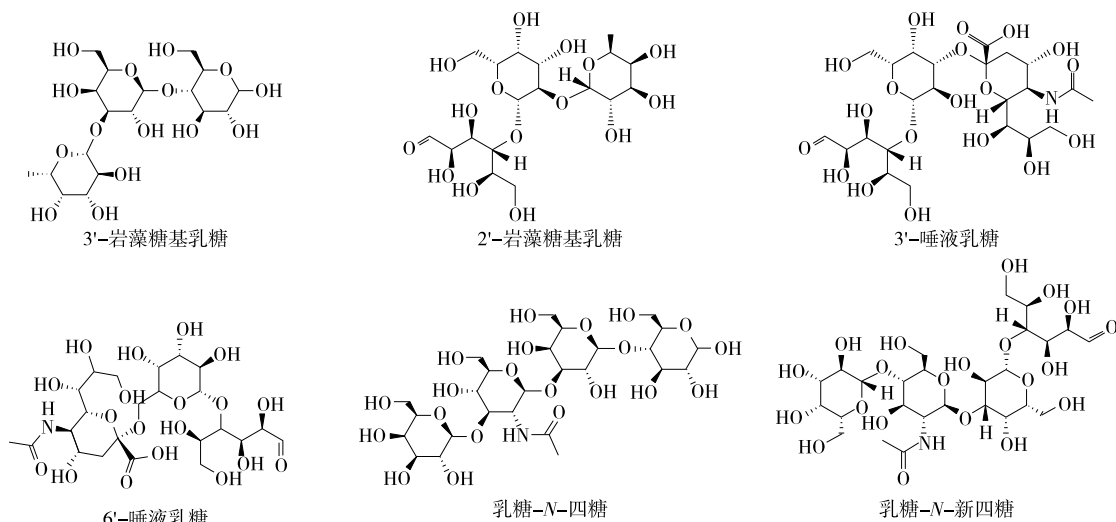


图1 6种母乳寡糖分子结构式

Figure 1 The structure of six human milk oligosaccharides in infant formula

目前,在糖类的分析技术研究过程中,还原氨化反应技术已日趋成熟。尤其是对于2-甲基吡啶-N-甲硼烷这个低毒还原剂的发现,有效取代了以往引用较多的具有较大毒性的还原剂氰基硼氢化钠,大大提高了该方法的安全性和可操作性<sup>[17-18]</sup>。研究拟提出用柱前衍生-高效液相色谱荧光检测法处理多种品牌乳制品同时检测6种母乳寡糖,利用还原氨化反应将奶粉中的母乳寡糖进行荧光标记,经HPLC分离,采用高效液相色谱-荧光检测器进行分离检测,以期对母乳寡糖的相关检测方法的开发提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

#### 1.1.1 仪器

高效液相色谱仪:Ultimate 3000型,配备荧光检测器,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;

漩涡混合器:MS3 basic型,德国IKA公司;

恒温震荡水浴锅:SW22型,德国JULABO公司;

超纯水系统:Direct-Pure UP型,广州硕谱生物科技有限公司;

pH计:FE28,梅特勒托利多科技(中国)有限公司;

高速离心机:k-15型,德国西格玛公司;

多管漩涡振荡器:Multi Reax型,德国Heidolph公司;

台式离心机:3K15,德国Sigma公司。

#### 1.1.2 试剂及材料

二甲基亚砜、冰乙酸:分析纯,上海麦克林生化科技股份有限公司;

2-甲基吡啶-N-甲硼烷(2-PB):德国Sigma公司;

乙醇、氨水:分析纯,广州化学试剂厂;

乙腈:色谱纯,德国Merck公司;

甲酸铵:色谱纯,天津科密欧化学试剂有限公司;

3'-岩藻糖基乳糖(88.9%)、乳糖-N-四糖(97.4%)、乳糖-N-新四糖(89.5%)、6'-唾液乳糖(98.0%):上海安谱实验科技股份有限公司;

2'-岩藻糖基乳糖(97.9%):坛墨质科技股份有限公司;

3'-唾液乳糖(99.2%):天津阿尔塔科技有限公司;

乳制品:市售。

### 1.2 样品的提取和衍生

称取1g试样(精确至0.001g),加入45℃温水涡旋溶解,超声,冷却至室温后定容至100mL,用冰醋酸沉淀蛋白,样液经滤纸过滤,备用(视情况稀释2~5倍)。取

50  $\mu\text{L}$  滤液, 65  $^{\circ}\text{C}$  真空干燥, 加入衍生剂 120  $\mu\text{L}$ , 涡旋振荡溶解, 65  $^{\circ}\text{C}$  水浴 2 h, 冷却, 用 75% 乙腈—水定容至 1 mL, 6 000 r/min 离心 5 min, 经 0.22  $\mu\text{m}$  津腾尼龙 66 滤膜过滤, 待上机分析。

1.3 标准曲线的配制及衍生

称取 3'-岩藻糖基乳糖、2'-岩藻糖基乳糖、乳糖-N-四糖、乳糖-N-新四糖、3'-唾液乳糖和 6'-唾液乳糖各 5 mg, 溶解于 5 mL 超纯水中, 涡旋混匀后得到 6 种标准品储备液, -20  $^{\circ}\text{C}$  贮藏备用。分别取标准储备液逐级稀释得到 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 400 mg/L 的标准工作溶液, 分别取 50  $\mu\text{L}$  标准工作溶液于离心管中, 加入衍生剂 120  $\mu\text{L}$ , 涡旋振荡溶解, 65  $^{\circ}\text{C}$  水浴 2 h, 冷却, 用 75% 乙腈—水定容至 1 mL, 6 000 r/min 离心 5 min, 经 0.22  $\mu\text{m}$  津腾尼龙 66 滤膜过滤, 待上机分析。

1.4 仪器条件

色谱柱: AdvanceBio Glycan Map 色谱柱 (150 mm  $\times$  4.6 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ); 柱温 25  $^{\circ}\text{C}$ ; 流动相: 乙腈 (流动相 A), 50 mmol/L 甲酸铵 (pH 4.4, 流动相 B); 流速 0.5 mL/min; 检测波长: 吸收波长 355 nm, 发射波长 430 nm; 进样量 5  $\mu\text{L}$ ; 梯度洗脱程序见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Table 1 Gradient program of mobile phase

| 时间/<br>min | 流动相<br>A/% | 流动相<br>B/% | 时间/<br>min | 流动相<br>A/% | 流动相<br>B/% |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 0.00       | 2.0        | 98.0       | 41.00      | 18.0       | 82.0       |
| 5.00       | 2.0        | 98.0       | 42.00      | 2.0        | 98.0       |
| 10.00      | 16.0       | 84.0       | 50.00      | 2.0        | 98.0       |
| 30.00      | 18.0       | 82.0       |            |            |            |

1.5 回收率试验设计

通过对批量样品进行初检, 选择 6 种母乳寡糖含量较低的样品。按照本底值的 1.0, 2.0, 10.0 倍添加量进行加标回收率试验。在优化后的方法下, 进行 6 次日内、日间平行测试, 计算相对标准偏差以评价试验重复性。

1.6 方法的应用

将优化后的方法应用于测定多种乳制品, 每个样品平行测定 6 次, 记录相应的平均回收率和相对标准偏差。

2 结果与讨论

2.1 仪器条件优化

在色谱柱的选择上, 考察了氨基柱、酰胺柱、 $\text{C}_{18}$  色谱柱和糖谱色谱柱对分离效果的影响。由图 2 可知, 在 AdvanceBio Glycan Map 色谱柱上 6 种化合物分离较好, 基线平稳且峰形良好。因此, 选择 AdvanceBio Glycan Map 色谱柱作为后续研究的色谱柱。

在流动相的选择上, 比较了甲醇—甲酸铵和乙腈—甲酸铵体系下 pH 为 4.4, 7.0 的 6 种化合物色谱图。结果显示, 当流动相为乙腈—甲酸铵体系, pH 为 4.4 时, 目标物峰形良好, 适用于日常分析。

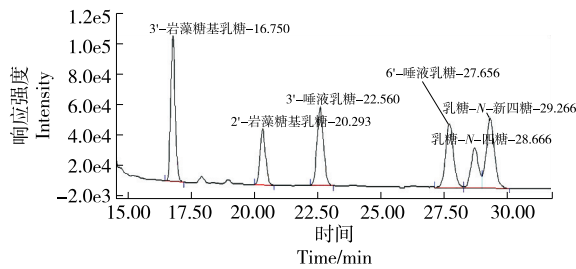


图 2 6 种母乳寡糖色谱图

Figure 2 Chromatogram for six kinds of human milk oligosaccharides in infant formula

2.2 前处理条件优化

2.2.1 蛋白沉淀剂种类的选择 试验比较了 0.1% 氨水溶液、80% 乙醇水溶液、冰醋酸溶液的沉淀效果。结果表明, 用冰醋酸溶液作为沉淀剂时, 蛋白质的溶解性明显降低, 蛋白质凝聚并从溶液中析出。因此, 确定冰醋酸溶液为乳制品样品的蛋白沉淀剂。

2.2.2 提取条件的选择 试验比较了震荡提取和超声提取两种提取方法。结果表明, 超声提取操作简便、提取效率较高, 且可使样品与萃取剂产生高频率运动, 快速达到分配平衡。为了优化超声提取时间, 考察了乳液加标样品在 5, 10, 15, 20, 25, 30 min 下的提取效率, 结果如图 3 所示。由图 3 可知, 随着超声时间的延长, 提取效率逐渐增加, 当超声时间为 15 min 时, 提取效果显著。继续延长超声时间, 6 种母乳寡糖回收率趋于平稳, 提取效率未达到显著变化。因此, 确定超声时间为 15 min。

2.3 线性范围与检出限

由表 2 可知, 6 种目标物在 1.00~400 mg/L 质量浓度范围内线性关系良好, 相关系数均  $>0.999$ 。方法的检出限为 4.1~10.9 mg/kg, 定量限为 12.3~32.7 mg/kg, 表

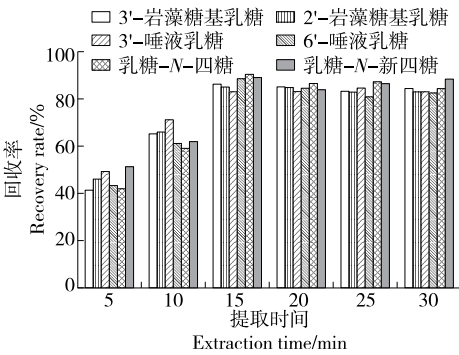


图 3 提取时间对回收率的影响

Figure 3 Effects of extraction time on recovery rate

表 2 6 种母乳寡糖的线性范围及检出限

Table 2 Linear range, LODs for six kinds of human milk oligosaccharides in infant formula

| 母乳低聚糖     | 回归方程                          | $R^2$   | 线性范围/(mg · L <sup>-1</sup> ) | 检出限/(mg · kg <sup>-1</sup> ) | 定量限/(mg · kg <sup>-1</sup> ) |
|-----------|-------------------------------|---------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 3'-岩藻糖基乳糖 | $Y=483.562\ 2x-809.294\ 4$    | 0.999 7 | 1.00~400                     | 4.1                          | 12.3                         |
| 2'-岩藻糖基乳糖 | $Y=224.168\ 7x-393.599\ 6$    | 0.999 6 | 1.00~400                     | 4.9                          | 14.7                         |
| 3'-唾液乳糖   | $Y=370.819\ 8x-649.380\ 3$    | 0.999 7 | 1.00~400                     | 10.9                         | 32.7                         |
| 6'-唾液乳糖   | $Y=366.851\ 0x-764.984\ 5$    | 0.999 6 | 1.00~400                     | 6.9                          | 20.7                         |
| 乳糖-N-四糖   | $Y=215.745\ 4x-268.673\ 4$    | 0.999 8 | 1.00~400                     | 4.3                          | 12.9                         |
| 乳糖-N-新四糖  | $Y=423.218\ 0x-1\ 226.505\ 8$ | 0.999 1 | 1.00~400                     | 8.6                          | 25.8                         |

明该方法具有良好的精确性和准确度。

现性良好,精密度高,达到分析要求。

2.4 方法回收率与精密度

2.5 实际样品的测定

由表 3 可知,6 种化合物的平均回收率为 71.3%~90.2%,日内相对标准偏差(RSD)为 1.0%~6.3%,日间相对标准偏差为 1.5%~8.5%,<10.0%,说明该方法重

采用试验方法对 13 种实际样品中的 6 种母乳寡糖进行检测分析,结果见表 4。由表 4 可知,并非所有乳制品中都含有母乳寡糖,不同样品中母乳寡糖含量差异较大。

表 3 6 种母乳寡糖的加标回收及相对标准偏差

Table 3 Recoveries and precision experiment for six kinds of human milk oligosaccharides in infant formula (n=6)

| 母乳低聚糖     | 添加水平/<br>(10 <sup>-2</sup> mg · g <sup>-1</sup> ) | 平均回收<br>率/% | RSD/<br>% | 日间相对标<br>准偏差/% | 母乳低聚糖    | 添加水平/<br>(10 <sup>-2</sup> mg · g <sup>-1</sup> ) | 平均回收<br>率/% | RSD/<br>% | 日间相对标<br>准偏差/% |
|-----------|---------------------------------------------------|-------------|-----------|----------------|----------|---------------------------------------------------|-------------|-----------|----------------|
| 3'-岩藻糖基乳糖 | 50                                                | 79.5        | 3.0       | 4.5            | 6'-唾液乳糖  | 50                                                | 80.6        | 2.1       | 3.0            |
|           | 100                                               | 82.2        | 2.3       | 3.7            |          | 100                                               | 82.8        | 2.0       | 2.6            |
|           | 500                                               | 88.7        | 3.0       | 4.0            |          | 500                                               | 90.1        | 1.0       | 1.5            |
| 2'-岩藻糖基乳糖 | 50                                                | 72.5        | 6.0       | 8.0            | 乳糖-N-四糖  | 50                                                | 71.3        | 3.1       | 4.6            |
|           | 100                                               | 75.6        | 6.3       | 8.5            |          | 100                                               | 82.5        | 4.3       | 6.1            |
|           | 500                                               | 81.1        | 5.3       | 7.9            |          | 500                                               | 85.4        | 3.8       | 5.2            |
| 3'-唾液乳糖   | 50                                                | 81.2        | 4.2       | 5.8            | 乳糖-N-新四糖 | 50                                                | 76.3        | 5.1       | 6.7            |
|           | 100                                               | 81.7        | 3.4       | 4.2            |          | 100                                               | 82.1        | 5.4       | 8.0            |
|           | 500                                               | 90.2        | 3.0       | 4.0            |          | 500                                               | 86.2        | 5.0       | 7.2            |

表 4 实际样品检测结果<sup>†</sup>

Table 4 Determination results of actual samples

mg/100 g

| 样品         | 3'-岩藻糖基乳糖 | 2'-岩藻糖基乳糖 | 3'-唾液乳糖 | 6'-唾液乳糖 | 乳糖-N-四糖 | 乳糖-N-新四糖 |
|------------|-----------|-----------|---------|---------|---------|----------|
| A 品牌 1 段样品 | ND        | 623       | ND      | ND      | ND      | 357      |
| A 品牌 2 段样品 | ND        | 538       | ND      | ND      | ND      | 186      |
| A 品牌 3 段样品 | ND        | 510       | ND      | ND      | ND      | 181      |
| B 品牌乳粉样品   | ND        | ND        | ND      | ND      | ND      | ND       |
| C 品牌特医样品   | ND        | ND        | ND      | ND      | ND      | 158      |
| D 品牌 1 段样品 | ND        | 853       | 78.9    | 174     | 206     | 358      |
| E 品牌儿童奶粉   | ND        | 260       | ND      | ND      | ND      | ND       |
| F 品牌 1 段样品 | 215       | 472       | 85.8    | 97.3    | 580     | 216      |
| G 品牌深度水解样品 | ND        | ND        | ND      | ND      | ND      | ND       |
| H 品牌鲜牛奶    | ND        | 261       | ND      | ND      | ND      | ND       |
| I 品牌羊奶     | ND        | 236       | ND      | ND      | ND      | ND       |
| J 品牌驼奶     | ND        | 228       | ND      | ND      | ND      | ND       |
| K 品牌牛乳基粉   | ND        | ND        | ND      | ND      | ND      | ND       |

<sup>†</sup> “ND”表示未检出。

### 3 结论

研究利用还原氨化反应将乳制品中的母乳寡糖进行荧光标记,用适用于分离不同类型糖链的糖谱色谱柱经液相色谱进行了分离分析,外标法定量。结果表明,该方法的精密度和回收率均满足试验检测的要求,可用于批量测定乳制品中 6 种母乳寡糖含量。鉴于目前母乳寡糖合成的特殊性及其在乳制品中缺乏的市场现状,针对不同年龄段的婴幼儿健康状况,开发出不同类型、有参考价值的产品需进一步研究。

#### 参考文献

- [1] ZIVKOVIE A M, GERMAN J B, LEBRILIA C B, et al. Human milk glycobiome and its impact on the infant gastrointestinal microbiota[J]. Pnas, 2011, 108(S1): 4 653-4 658.
- [2] BODE L. Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama[J]. Glycobiology, 2012, 22: 1 147-1 162.
- [3] EIDELMAN A I. Breastfeeding and the use of human milk[J]. Pediatrics, 2012, 129(3): E827-E841.
- [4] ANDERSON J W, JOHNSTONE B M, REMLEY D T. Breast-feeding and cognitive development: A meta-analysis[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 1999, 70(4): 525-535.
- [5] VICTORA C G, BAHL R, BARROS A J D, et al. Breastfeeding in the 21<sup>st</sup> century: Epidemiology, mechanisms, and lifelong effect[J]. Lancet, 2016, 387: 475-490.
- [6] DUIJTS L, JADDOE V W V, HOFMAN A, et al. Prolonged and exclusive breastfeeding reduces the risk of infectious diseases in infancy[J]. Pediatrics, 2010, 126(1): E18-E25.
- [7] ROLLINS N C, NDIRANGU J, BLAND R M, et al. Exclusive breastfeeding, diarrhoeal morbidity and all-cause mortality in infants of HIV-infected and HIV uninfected mothers: An intervention cohort study in Kwazulu Natal, South Africa[J]. PLoS One, 2013, 8(12): 10.
- [8] 逯莹莹, 刘鹏, 孙景珠, 等. 母乳低聚糖的研究进展[J]. 中国乳品工业, 2018, 46(12): 23-28, 33.  
LU Y Y, LIU P, SUN J Z, et al. Research progress of human milk oligosaccharides[J]. China Dairy Industry, 2018, 46(12): 23-28, 33.
- [9] 刘甜甜, 徐显皓, 孔晓, 等. 酿酒酵母代谢调控合成功能营养品: 进展与挑战[J]. 食品与生物技术学报, 2022, 41(8): 10-21.  
LIU T T, XU X H, KONG X, et al. Metabolic regulation and synthesis of functional nutrients in *Saccharomyces cerevisiae*: Progress and challenges [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2022, 41(8): 10-21.
- [10] 姜毅康, 董玲, 刘鸿飞, 等. 母乳低聚糖与婴幼儿健康关系研究进展[J]. 食品与机械, 2024, 40(2): 1-8.  
JIANG Y K, DONG L, LIU H F, et al. Research advances on the association between human milk oligosaccharides and infant health [J]. Food & Machinery, 2024, 40(2): 1-8.
- [11] 揭良, 苏米亚, 贾宏信, 等. 母乳寡糖的研究进展[J]. 食品工业, 2020, 41(10): 258-261.  
JIE L, SU M Y, JIA H X, et al. Recent progress in research of human milk oligosaccharides[J]. The Food Industry, 2020, 41(10): 258-261.
- [12] THURL S, HENKER J, SIEGEL M, et al. Detection of four human milk groups with respect to Lewis blood group dependent oligosaccharides[J]. Glycoconjugate Journal, 1997, 14(7): 795-799.
- [13] 韩瑶, 吕志华, 姜廷福, 等. 电喷雾多级串联质谱技术区分人乳寡糖异构体[J]. 分析化学, 2006, 34(9): 1 213-1 218.  
HAN Y, LU Z H, JIANG T F, et al. Application of electrospray ionization-collision induced dissociation-tandem mass spectrometry in differentiation isomers of human milk oligosaccharides[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2006, 34(9): 1 213-1 218.
- [14] RUHAAK L R. Advances in analysis of human milk oligosaccharides[J]. Advances in Nutrition, 2012, 3(3): 406S-414S.
- [15] 陈坚, 邓洁莹, 李江华, 等. 母乳寡糖的生物合成研究进展[J]. 中国食品学报, 2016, 16(11): 1-8.  
CHEN J, DENG J Y, LI J H, et al. Advances in biosynthesis of breast milk oligosaccharides[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(11): 1-8.
- [16] 李晨晨, 李梦丽, 张涛. 人乳寡糖的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(9): 284-292.  
LI C C, LI M L, ZHANG T. Research progress of human milk oligosaccharides[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(9): 284-292.
- [17] RUHAAK L R, STEENVOORDEN E, KOELEMAN C A M, et al. 2-Picoline-borane: Anon-toxic reducing agent for oligosaccharide labeling by reductive amination [J]. Proteomics, 2010, 10(12): 2 330-2 336.
- [18] DALPATHADO D S, JIANG H, KATER M A, et al. Reductive amination of carbohydrates using  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$  [J]. Anal Bioanal Chem, 2005, 381(6): 1 130.  
Chemistry A, 2009, 113(16): 4 403-4 407.
- [25] 余璐涵, 陈旭, 蔡茜茜, 等. 鱼糜蛋白冷冻变性规律及调控方法研究进展[J]. 食品与机械, 2020, 36(8): 1-8.  
YU L H, CHEN X, CAI X X, et al. Research progress of change rules in freezing denaturation of surimi protein and its regulatory methods[J]. Food & Machinery, 2020, 36(8): 1-8.
- [26] KIM J S, DAMODARAN S, YETHIRAJ A. Retardation of ice crystallization by short peptides [J]. The Journal of Physical Chemistry A, 2009, 113(16): 4 403-4 407.
- [27] XIANG H, YANG X H, KE L, et al. The properties, biotechnologies, and applications of antifreeze proteins [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 153: 661-675.
- [28] KHAN N M M U, ARAI T, TSUDA S, et al. Characterization of microbial antifreeze protein with intermediate activity suggests that a bound-water network is essential for hyperactivity [J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 5 971-5 971.

(上接第 12 页)