

薄层层析-图像分析定量热凝胶 β -1,3-葡寡糖

陆光兴¹, 詹晓北^{*1,2}, 朱莉², 郑志永¹, 吴剑荣¹, 罗宸¹

(1. 江南大学 生物工程学院/糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江苏瑞光生物科技有限公司, 江苏 无锡 214125)

摘要: 单向两次薄层层析展开可以显著提高对热凝胶 β -1,3-葡寡糖的分析效果, 以 Silica gel 60 F254 硅胶板为固定相, $V(\text{乙酸}):V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{水})=2:2.4:1.4$ 为展开剂, 展距 20 cm 时, 单向两次展开可以较好地分离聚合度为 2~13 的热凝胶 β -1,3-葡寡糖。此外还建立了 Image J 软件图像分析定量热凝胶 β -1,3-葡寡糖的方法, 在不同糖质量浓度范围 (0.02~0.1、0.1~0.8、0.8~5.0 g/L) 内寡糖显色斑点的灰度积分响应值与糖浓度分别有着很好的线性关系 ($R^2>0.99$)。该方法的灵敏度高达 0.02 g/L, 相对标准偏差为 1%~5%, 稳定性很好。与 HPLC 等方法相比具有操作简便、分析快速、不需专门仪器和特定寡糖标准品等优点。

关键词: 热凝胶; β -1,3-葡寡糖; 薄层层析; 图像分析; Image J 软件

中图分类号: TQ 281 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)11—1156—07

Quantification of Curdlan β -1,3-Glucooligosaccharides by Thin Layer Chromatography and Image Analysis

LU Guangxing¹, ZHAN Xiaobei^{*1,2}, ZHU Li², ZHENG Zhiyong¹, WU Jianrong¹, LUO Chen¹

(1. School of Biotechnology / Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Jiangsu Rayguang Biotech Co. Ltd., Wuxi 214125, China)

Abstract: The study first found that a unidirectional-twice thin layer chromatography significantly improved the analysis of Curdlan β -1,3-glucooligosaccharides. With the best developing reagents acetic acid, ethyl acetate and H₂O in the ratio of 2:2.4:1.4 on the Silica gel 60 F254 plate of 20 cm, Curdlan β -1,3-glucooligosaccharides could be separated from the degree of polymerization 2 to 13. Then, the Image J software was used to quantify Curdlan β -1,3-glucooligosaccharides. A good linear relationship ($R^2>0.99$) existed between saccharides concentration within three ranges of 0.02 g/L~0.1 g/L, 0.1 g/L~0.8 g/L and 0.8 g/L~5.0 g/L and grayscale integration respond. The established quantification had a detection limit of 0.02 g/L and a relative standard deviation of 1%~5% with good stability. Compared with other methods such as HPLC, this method is simple and rapid with no

收稿日期: 2015-02-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171640, 31201384, 31271888); 无锡市科技支撑计划项目(CLE01N1208); 无锡市生物农业领军型创业人才计划项目("130"计划); 无锡中小企业创新基金项目(CBE01G1344)。

* 通信作者: 詹晓北(1962—), 男, 北京人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生物化工与生物反应器研究。

E-mail: xzbzhan@yahoo.com

specialized instruments and oligosaccharides standards.

Keywords: Curdlan, β -1,3-glucooligosaccharide, thin layer chromatography, image analysis, Image J software

热凝胶 (Curdlan) 是一种主要由土壤杆菌 (*Agrobacterium* sp.) 发酵生产的线性 β -1,3-葡聚糖^[1], 已于 1996 年获得 FDA 批准作为食品添加剂使用^[2]。热凝胶因其独特的理化性能和生理活性广泛应用于食品、化工、农业、烟草和医药工业中^[3]。 β -1,3-葡寡糖是一种新型的功能性低聚糖, 具有抗肿瘤^[4]、增强免疫力^[5]、刺激产生细胞因子^[6]和诱导植物产生抗病性^[7]等功能, 受到人们越来越多的关注。目前 β -1,3-葡寡糖可以由化学合成法和多糖水解法制备。化学合成法成本高, 难以实现批量化生产, 而利用通过发酵获得的热凝胶水解获得 β -1,3-葡寡糖具有快速、高效、可批量生产的优点^[8-9], 是目前 β -1,3-葡寡糖制备的主要手段, 但生产的 β -1,3-葡寡糖是寡糖混合体系, 存在快速定性定量分析难, 最终影响产品生产质量等问题。

寡糖的定性定量分析方法主要有薄层层析 (TLC)、高效液相色谱 (HPLC)、气相色谱 (GC)、毛细管电泳 (CE) 等。HPLC、GC、CE 虽然可以较好的寡糖进行定性定量分析, 但存在样品前处理复杂、分析耗时耗力等问题^[10]。而薄层层析具有简便快捷、直观经济、灵敏度高、样品无需特殊处理的优点, 可在短时间内分析大量样品, 已经作为寡糖的初步检测方法得到广泛应用^[11]。

TLC 分析结果可以采用 TLC 扫描法 (TLC-densitometric method) 进行定量分析, 最新研究发现可以利用 TLC 图像分析法 (TLC-image analysis method) 代替扫描法进行定量研究, 并且两种方法得到的结果是一致的, 相较而言图像分析法能够迅速得到整张 TLC 板的数据^[12]。图像分析应用较为广泛的软件有 Image-Pro Plus、Image J、TLSee、ColorDens、JustTLC、Scion 等。国外对 TLC 图像分析有了比较多的研究, 国内研究还比较少。Mustoe 等^[13]利用 Epson GT-9600 平板式扫描仪扫描 TLC 板获得图像后利用 Image-Pro Plus V4.0 软件进行分析, 同时直接利用 TLC 扫描仪进行分析, 比较发现两种分析方式分析荧光染料含量的结果非常接近。Gerasimov^[14] TLC 展开食品染料, 再利用 ColorDens

软件分析平板式扫描仪扫描得到的图像, 实现了对食品染料的定量分析。

作者使用不同展开剂体系对热凝胶水解制备 β -1,3-葡寡糖进行单向两次薄层层析展开, 优化分析 β -1,3-葡寡糖的展开剂。建立 Image J 软件灰度积分快速定量 β -1,3-葡寡糖的方法, 为 β -1,3-葡寡糖的优化生产和应用提供一种简便的分析方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

热凝胶: 食品级, 日本武田-麒麟公司产品; 麦芽糊精 (DE 8~10、DE 9~13、DE 15~20): 山东西王集团产品; 高效硅胶薄层层析铝箔板: Silica gel 60 F254, 德国 Merck 公司产品。

二甲亚砜 (DMSO)、盐酸、甲醇、乙醇、异丙醇、二氯甲烷、氯仿、四氯化碳、苯、丙酮、乙酰丙酮、乙醚、石油醚、丙醛、乙酸乙酯、葡萄糖、麦芽糖、 β -环糊精、糊精 (玉米) 等试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器

AL204 型分析天平: 梅特勒-托利多仪器公司产品; XW-80A 型旋涡混合器: 上海精科实业公司产品; 离心机: Sigma-Aldrich Inc 产品; Epson Perfection 2480 Photo 扫描仪: Seiko Epson Inc 产品; 岛津高效液相色谱仪 LC-2010A (配示差检测器): 日本岛津公司产品等。

1.3 实验方法

1.3.1 热凝胶 β -1,3-葡寡糖的制备 量取 50 mL 二甲亚砜于 100 mL 小烧杯中置于 80 °C 的大功率磁力搅拌器上, 边磁力搅拌、边沿烧杯边缘在 30 s 内加入 500 mg 热凝胶粉末, 继续搅拌直至形成均一透亮的热凝胶溶液 (10 g/L)。取 50 mL 离心管分装热凝胶溶液后加入浓盐酸至终浓度 0.5 mol/L, 封盖后置于 80 °C 水浴锅中水解 90 min。

1.3.2 有机溶剂沉淀热凝胶 β -1,3-葡寡糖 水解结束后加入 1~10 倍体积的有机溶剂, 高速漩涡震荡并观察是否有沉淀析出, 10 000 r/min 离心 10

min,将得到的沉淀用有机溶剂洗涤3次后烘干,去离子水复溶后进行TLC分析。

1.3.3 一次 TLC 展开分析 取 1.5 μ L 待测样品点到 Silica gel 60 F254 薄层层析板上,展距 10 cm,展开剂为 $V(\text{乙酸}):V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{水})=2:2:0.8$ 。室温展开完毕后晾干后喷硫酸-乙醇-地衣酚显色剂, 105 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱烘烤 5 min 显色^[15]。

1.3.4 两次 TLC 展开分析 实验方法同 1.3.3,展距 20 cm,两次展开的展开剂选择 $V(\text{乙酸}):V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{水})=2:2:1.1$ 或 $2:2:1.2$ 或 $2:2:1.3$ 或 $2:2:1.4$ 或 $2:2.2:1.4$ 或 $2:2.4:1.4$ 或 $2:2.6:1.4$ 或 $2:2.8:1.4$,一次展开后将 TLC 板置于鼓风干燥箱 75 $^{\circ}\text{C}$ 烘干 5 min,再次置于展开缸中展开分析。

1.3.5 Image J 灰度积分定量分析 用 Epson 扫描仪扫描显色后 TLC 硅胶板,扫描设定为 24 位彩色、400 dpi,再利用 Image J 对扫描得到的图片进行图像分析,先将图像转换为 8 位灰度,消除背景、噪音等因素后进行灰度积分分析。

1.3.6 HPLC 分析 流动相为 $V(\text{乙腈}):V(\text{水})=70:30$,进样量 100 μ L,流量 1.50 mL/min,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ ^[16]。

2 结果与分析

2.1 有机溶剂沉淀热凝胶 β -1,3-葡寡糖

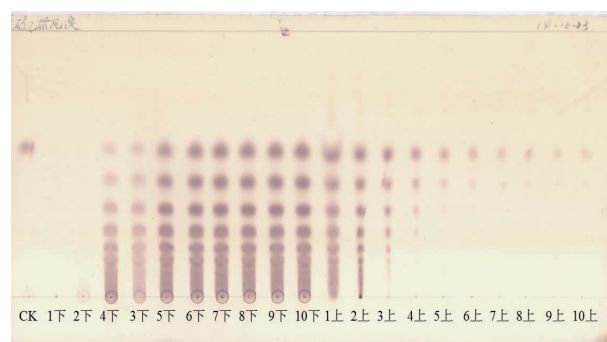
研究发现可以使用丙酮沉淀 DMSO 中的热凝胶 β -1,3-葡寡糖^[17]。作者筛选甲醇、乙醇、异丙醇、二氯甲烷、氯仿、四氯化碳、苯、丙酮、乙酰丙酮、乙醚、石油醚、丙醛、乙酸乙酯等有机溶剂进行实验,探索沉淀热凝胶 β -1,3-葡寡糖的最佳有机溶剂。

二氯甲烷、氯仿、丙酮、苯、乙酰丙酮和乙酸乙酯可以沉淀 β -1,3-葡寡糖,其中效率最高的是氯仿,其次是苯、乙酸乙酯、二氯甲烷、丙酮和乙酰丙酮。考虑到沉淀效果、回收难易、使用安全性和环保等要求,二氯甲烷和乙酸乙酯是较佳的沉淀有机溶剂。10 倍体积乙酸乙酯可以几乎将除微量单糖外的所有 β -1,3-葡寡糖沉淀下来,因此分析时可以用 10 倍体积的乙酸乙酯沉淀热凝胶 β -1,3-葡寡糖,既能终止水解反应又能避免高浓度离子对 TLC 分析造成的拖尾影响,结果见图 1。

2.2 一次 TLC 展开分析热凝胶 β -1,3-葡寡糖

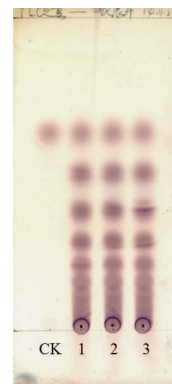
目前寡糖 TLC 分析多为一次展开,由于较高聚合度(DP)寡糖的比移率(R_f)接近、分离度(R_s)较差,严重影响了 TLC 分析寡糖完整性和准确度。如

图 2 所示使用展开剂 $V(\text{乙酸}):V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{水})=2:2:0.8$ 仅能分离到五糖。尽管研究表明本展开剂可以展开到十糖,但是由于较高 DP 寡糖的比移率非常接近、分离度很低造成定性定量分析的困难。此外使用展开剂 $V(\text{正丙醇}):V(\text{水})=7:3$ 和 $V(\text{乙醇}):V(\text{正丁醇}):V(\text{水})=5:5:4$ 展开时,寡糖重叠严重,都不如 $V(\text{乙酸}):V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{水})=2:2:0.8$ 的展开效果好。



注:展开剂为 $V(\text{乙酸}):V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{水})=2:2:0.8$;CK 为 0.5 g/L 葡萄糖,数字表示乙酸乙酯的体积倍数,“上”表示离心上清液,“下”表示离心沉淀复溶液。

图 1 乙酸乙酯沉淀 DMSO 中的热凝胶 β -1,3-葡寡糖
Fig. 1 Sedimentation of Curdlan β -1,3-glucooligo-saccharides in DMSO by ethyl acetate



注:展开剂为 $V(\text{乙酸}):V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{水})=2:2:0.8$;CK 为 0.5 g/L 葡萄糖溶液;1,2,3 为 10.0 g/L 热凝胶 β -1,3-葡寡糖。

图 2 一次 TLC 展开分析热凝胶 β -1,3-葡寡糖
Fig. 2 Development of Curdlan β -1,3-glucooligo-saccharides by thin layer chromatography

2.3 两次 TLC 展开分析热凝胶 β -1,3-葡寡糖

一般可以通过使用更长的 TLC 板、多次展开和优化展开剂^[18]等方法提高 TLC 的分析效果,其中展开剂是决定分离效果的关键因素。杨雅麟等^[19]以硅胶板 GF 254 为固定相,经过展开剂优化后两次展

开最高可分析蔗糖到蔗果十糖之间的低聚糖。作者以原展开剂 $V(\text{乙酸}):V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{水})=2:2:0.8$ 为基础,使用 20 cm 的硅胶板进行展开,调节展开剂不同组分的相对比例对热凝胶 β -1,3-葡寡糖展开剂系统进行优化。

2.3.1 展开剂水的相对比例对热凝胶 β -1,3-葡寡糖展开效果的影响 热凝胶 β -1,3-葡寡糖极性很大,极易溶于水,提高展开剂水的比例会降低容量因子,从而提高寡糖的比移率和对寡糖的展开能力。随着展开剂含水比例的上升,寡糖展开能力逐渐上升,但是寡糖的分离度逐渐下降,4 种展开剂可分析的最高聚合度寡糖依次为九糖、十糖、十一糖、九糖。以 $V(\text{乙酸}):V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{水})=2:2:1.4$ 为基础提高乙酸乙酯的比例,在保证较高展开能力的基础上提高分离度。

2.3.2 展开剂乙酸乙酯的相对比例对热凝胶 β -

1,3-葡寡糖展开效果的影响 乙酸乙酯极性较弱,提高展开剂中乙酸乙酯的相对比例会降低寡糖的展开能力但会提高寡糖分析的分离度,从而对可分析寡糖的聚合度范围产生影响。根据 TLC 结果可以判断展开剂 $V(\text{乙酸}):V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{水})=2:2.4:1.4$ 为较优展开剂,可以较好的分离 DP 2~13 的寡糖,且寡糖的分离度较高。

2.3.3 两种展开剂对热凝胶 β -1,3-葡寡糖展开效果的影响 展开能力和分离度是寡糖 TLC 分析的两个主要指标,但在展开剂的优化筛选时两者相互矛盾,提高展开剂中水的比例可以提高展开能力但会降低分离度,提高展开剂中乙酸乙酯的比例可以提高分离度但会降低展开能力。使用两种组分比例不同的展开剂可以起到协同互补的作用,4 种展开剂系统下可分析的最大聚合度寡糖的依次为十糖、十二糖、十一糖、十糖,且分离度都较高。

表 1 不同展开剂系统对热凝胶 β -1,3-葡寡糖的分离效果

Table 1 Effect of different developing reagent systems on the development of Curdlan β -1,3-glucooligosaccharides by the unidirectional-twice thin layer chromatography

展开剂系统	R_f 值						可分析寡糖聚合度	展开能力	分离度
	八糖	九糖	十糖	十一糖	十二糖	十三糖			
I	0.354	0.300	—	—	—	—	2~9	低	很大
II	0.414	0.375	0.331	—	—	—	2~10	较低	较大
III	0.419	0.376	0.338	0.304	—	—	2~11	较高	较低
IV	0.447	0.412	—	—	—	—	2~9	很高	很低
V	0.432	0.397	0.363	0.328	—	—	2~11	较高	较大
VI	0.412	0.371	0.342	0.302	0.273	0.244	2~13	较高	较大
VII	0.259	0.221	0.190	—	—	—	2~10	较低	很大
VIII	0.223	0.191	—	—	—	—	2~9	较低	很大
IX	0.381	0.334	0.296	—	—	—	2~10	较高	较大
X	0.369	0.326	0.291	0.260	0.231	—	2~12	较高	较大
XI	0.400	0.373	0.331	0.295	—	—	2~11	较高	较大
XII	0.380	0.340	0.297	—	—	—	2~10	较高	较大

注:“—”表示无法有效分离,不能准确得到 R_f 值;展开剂为乙酸、乙酸乙酯、水;I 的展开剂体积比依次为 2:2:1.1,2:2:1.1;II 体积比为 2:2:1.2,2:2:1.2;III 体积比为 2:2:1.3,2:2:1.3;IV 体积比为 2:2:1.4,2:2:1.4;V 体积比为 2:2.2:1.4,2:2.2:1.4;VI 体积比为 2:2.4:1.4,2:2.4:1.4;VII 体积比为 2:2.6:1.4,2:2.6:1.4;VIII 体积比为 2:2.8:1.4,2:2.8:1.4;IX 体积比为 2:2:1.4,2:2.6:1.4;X 体积比为 2:2:1.4,2:2.8:1.4;XI 体积比为 2:2.6:1.4,2:2:1.4;XII 体积比为 2:2.8:1.4,2:2:1.4。

2.4 Image J 灰度积分分析热凝胶 β -1,3-葡寡糖

使用 Epson Perfection 2480 Photo 扫描仪获取 TLC 扫描图像后,探索使用 Image J 图像分析软件灰度积分对热凝胶 β -1,3-葡寡糖进行定量分析。

2.4.1 检出限和定量限 选取 8 种单糖、二糖和寡糖混合物为标准品,分别为葡萄糖、麦芽糖、 β -环糊精、麦芽糊精(DE 8~10)、麦芽糊精(DE 9~13)、麦芽糊精(DE 15~20)、糊精(玉米)和热凝胶 β -1,3-葡

寡糖。分别用去离子水配制为 0.01 g/L~0.2 g/L 糖溶液,点样显色后进行扫描和灰度积分分析。结果显示糖浓度高于 0.02 g/L 时都可以很好的检测出来,且在 0.02 g/L~0.1 g/L 糖浓度范围内也显示了较好的线性($R^2>0.99$),结果见图 3。

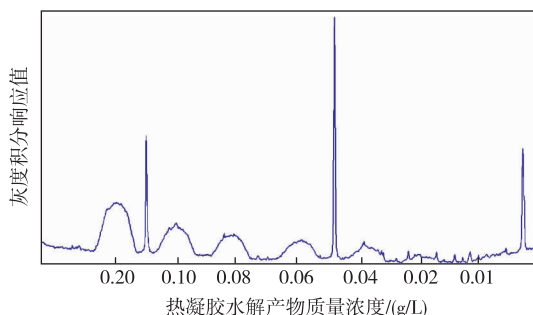


图 3 热凝胶 β -1,3-葡寡糖的检出限和定量限

Fig. 3 Detection limit and the quantitation limit of Curdlan β -1,3-glucooligosaccharides by the TLC-Image J analysis

2.4.2 线性关系和范围 选取上述 8 种糖为标准品,用去离子水配制质量浓度为 0.01~5.0 g/L 的糖溶液,点样显色后进行扫描和灰度积分分析。尽管糖的种类、聚合度和构像不同,但是每种糖的灰度积分响应值和糖浓度具有很好的线性关系。在 0.02~0.1 g/L、0.1~0.8 g/L 和 0.8~5.0 g/L 糖质量浓度范围内,灰度积分的响应值和糖浓度分别有很好的线性关系($R^2>0.99$),显示该方法具有较高的准确性和可信度,但线性斜率逐渐减小。而在 0.02~5.0 g/L 糖质量浓度范围内进行综合分析可知幂函数可以进行较好的拟合定量($R^2>0.99$),这种非线性的结果可以通过 Kubelka-Munk 公式解释,并与用双波长飞点扫描仪的扫描结果类似^[20]。

分析认为由于采用硫酸-乙醇-地衣酚显色剂,显色结果只和寡糖的单糖组成和质量浓度有关,而与寡糖的结构和聚合度无关,表现为 8 种单糖组成相同但结构和聚合度不同的糖的标准曲线的高度一致性,这也显示了 TLC-Image J 灰度积分在定量同聚寡糖时只需用其组成单糖作为标品而不需要特定的寡糖标样的优点。Robyt^[21]单向 4 次薄层层析展开麦芽寡糖和异麦芽寡糖,发现展开次数并不影响糖的光密度响应值,且葡萄糖、麦芽寡糖和异麦芽寡糖的 TLC 光密度响应值与糖的结构和聚合度无关,可以用葡萄糖作为标准品对三类糖进行定量分析。

2.4.3 精密度 选取 10.0 g/L 热凝胶 β -1,3-葡寡糖和麦芽糊精(DE 8~10)、麦芽糊精(DE 9~13)麦芽糊精(DE 15~20)进行实验,单向两次展开后进行 Image J 灰度积分分析,重复 6 次。结果显示热凝胶 β -1,3-葡寡糖和不同 DE 值的麦芽糊精中的每种聚合度寡糖都有极高的重复性,分析每种聚合度寡糖的 RSD 在 1%~5%之间,显示了较好的重复性,结果见图 4。

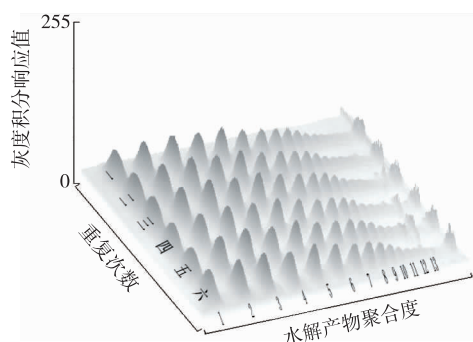


图 4 10.0 g/L 热凝胶 β -1,3-葡寡糖 Image J 三维分析结果

Fig. 4 Three dimensional analysis of 10.0 g/L Curdlan β -1,3-glucooligosaccharides by the TLC-Image J method

2.4.4 稳定性 选取 10.0 g/L 热凝胶 β -1,3-葡寡糖和麦芽糊精(DE 8~10)、麦芽糊精(DE 9~13)麦芽糊精(DE 15~20)进行实验,两次 TLC 展开后分别在 0、1、2、4、8、10 h 扫描并进行 Image J 灰度积分分析。在不同时间点对同一个样品进行分析的实验数据基本保持一致,RSD 大部在 1%~5%之间,说明该方法有着很好的稳定性。但是实验也发现硫酸-乙醇-地衣酚对糖的显色结果不易长时间保存,最好在 12 h 内进行图像扫描保存,否则会导致分析误差增大。

2.4.5 与 HPLC 比较 选取 10.0 g/L 的热凝胶 β -1,3-葡寡糖进行 HPLC 和两次 TLC 展开分析,结果如表 2。对两种测定方法得到的结果进行比较发现并无明显差别,进一步证明了 Image J 灰度积分定量热凝胶葡寡糖的是一种准确可靠的方法。Sakunpak 等^[22]利用 TLC 扫描定量法和图像分析法分析冷压米糠油中的 γ -谷维素含量时发现两种方法检测结果无明显差异。Fazakas 等^[23]采用 4 种图像分析软件 (Sorbfil TLC、Biodit、JustTLC 和 Melanie) 分析荧光化合物 TLC 图像发现 4 种软件都可以对

表 2 TLC-Image J 和 HPLC 分析 10.0 g/L 热凝胶 β -1,3-葡寡糖的结果比较Table 2 Comparison of results between TLC-Image J and HPLC analyses of 10.0 g/L Curdlan β -1,3-glucooligosaccharides

分析方法	β -1,3-糖质量浓度/(g/L)								RSD/%
	二糖	三糖	四糖	五糖	六糖	七糖	八糖	九糖	
HPLC	0.93	0.745	0.63	0.54	0.49	0.46	0.39	0.32	1~2
TLC-Image J 分析	0.90	0.72	0.61	0.56	0.51	0.45	0.41	0.34	1~5

待测物质进行准确定量,且 Biodit 的定量最为准确,误差为 5%左右。

3 结 语

10 倍体积的乙酸乙酯可以将除微量葡萄糖以外的 DMSO 中的热凝胶水解产物沉淀下来,既能终止水解反应又能避免高浓度离子对 TLC 分析造成的拖尾影响。单向两次 TLC 展开可以很好的分析热凝胶 β -1,3-葡寡糖,分析热凝胶 β -1,3-葡寡糖的

最优展开剂为 $V(\text{乙酸}):V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{水})=2:2.4:1.4$,两次展开后可以最高分离到十三糖,同时具有较好的分离度。Image J 软件图像分析定量热凝胶 β -1,3-葡寡糖方便准确,不需要特殊设备。由于硫酸-乙醇-地衣酚显色剂对寡糖的显色结果只与单糖组成和浓度有关,而与构像和聚合度无关,因此该定量方法可以广泛适用于同聚寡糖的浓度分析,而无需购买特定的寡糖标准品,具有简便快速,无需特殊设备等优点。

参考文献:

- [1] MCINTOSH M, STONE B A, STANISICH V A. Curdlan and other bacterial(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucans[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2005, 68(2): 163-173.
- [2] SABINE Demleiter, JOSEF Kraus, GERHARD Franz. Synthesis and antitumour activity of sulfoalkyl derivatives of curdlan and lichenan[J]. **Carbohydrate Research**, 1992, 226(2): 247-252.
- [3] 詹晓北, 韩杰, 朱莉, 等. 一种新型的微生物多糖食品添加剂——热凝胶[J]. 冷饮与速冻食品工业, 2001, 7(1): 27-30, 32. ZHAN Xiaobei, HAN Jie, ZHU Li, et al. A novel microbial homo-exopolysaccharide-curdlan used as food additive [J]. **Beverage & Fast Frozen Food Industry**, 2001, 7(1): 27-30, 32. (in Chinese)
- [4] BALLA Sylla, LAURENT Legentil, SUJATA Saraswat-Ohri, et al. Oligo- β - (1 $\rightarrow$ 3)-glucans: impact of thio-bridges on immunostimulating activities and the development of cancer stemcells [J]. **Journal Of Medicinal Chemistry**, 2014, 57(20): 8280-8292.
- [5] KARINE Descroix, VACLAV Větvicka, ISABELLE Laurent, et al. New oligo- β -(1,3)-glucan derivatives as immunostimulating agents[J]. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2010, 18(1): 348-357.
- [6] HIDA T H, ISHIBASHI K, MIURA N N, et al. Cytokine induction by a linear 1,3-glucan, curdlan-oligo, in mouse leukocytes in vitro[J]. **Inflammation Research**, 2009, 58(1): 9-14.
- [7] LI Jing, ZHU Li, LU Guangxing, et al. Curdlan β -1,3-glucooligosaccharides induce the defense responses against *phytophthora infestans* infection of potato(*Solanum tuberosum* L. cv. McCain G1) leaf cells[J]. **Plos ONE**, 2014, 9(5): 1-9.
- [8] LI Jing, ZHU Li, ZHAN Xiaobei, et al. Purification and characterization of a new endo- β -1,3-glucanase exhibiting a high specificity for curdlan for production of β -1,3-glucan oligosaccharides [J]. **Food Science and Biotechnology**, 2014, 23(3): 799-806.
- [9] GRANDPIERRE C, JANSSEN H G, LAROCHE C, et al. Enzymatic and chemical degradation of curdlan targeting the production of β -(1 $\rightarrow$ 3) oligoglucans[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2008, 71(2): 277-286.
- [10] JAVIER F Moreno, ANTONIA Montilla, MAR Villamiel, et al. Analysis, Structural characterization, and bioactivity of oligosaccharides derived from lactose[J]. **Electrophoresis**, 2014, 35(11): 1519-1534.
- [11] 管宁, 韩建东, 李瑾, 等. 天然寡糖的研究进展[J]. 山东农业科学, 2013, 45(7): 141-145.

- GUAN Ning, HAN Jiandong, LI Jin, et al. Study progress of natural oligosaccharides [J]. **Shandong Agricultural Sciences**, 2013, 45(7): 141-145. (in Chinese)
- [12] PANADDA Phattanawasin, UTHAIthai Sotanaphun, LAWAN Sriphong. A comparison of image analysis software for quantitative TLC of Ceftriaxone Sodium[J]. **Silpakorn University Science and Technology Journal**, 2011, 5(1): 7-13.
- [13] SHAUN Mustoe, SEAN McCrossen. TLC image capture and analysis by use of a prototype device for visualizing fluorescence[J]. **Journal of Planar Chromatography**, 2001, 14(4): 252-255.
- [14] A V Gerasumov. Use of the software processing of scanned chromatogram images in quantitative planar chromatography[J]. **Journal of Analytical Chemistry**, 2004, 59(4): 348-353.
- [15] FRY S C, NESSELRODE B H, MILLER J G, et al. Mixed-linkage (1-3,1-4)-beta-D-glucan is a major hemicellulose of Equisetum (horsetail) cell walls[J]. **New Phytologist**, 2008, 179(1): 104-115.
- [16] 宗玉, 李晶, 朱莉, 等. 两步法硫酸水解热凝胶生产 β -1,3- 葡寡糖[J]. 工业微生物, 2014, 44(1): 22-27.
- ZONG Yu, LI Jing, ZHU Li, et al. Preparation of β -1,3-glucan oligosaccharides by two-step sulfuric acid hydrolysis of curdlan[J]. **Industrial Microbiology**, 2014, 44(1): 22-27. (in Chinese)
- [17] 傅赞彬, 刘启顺, 李曙光, 等. 可德兰寡糖的制备及其组分分析[J]. 食品科学, 2011, 32(3): 6-9.
- FU Yunbin, LIU Qishun, LI Shuguang, et al. Preparation and component analysis of Curdlan oligomers [J]. **Food Science**, 2011, 32(3): 6-9. (in Chinese)
- [18] 杨绪明, 张家骊, 李江华, 等. 庆大霉素发酵液薄层色谱(TLC)分析方法研究[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(5): 128-133.
- YANG Xuming, ZHANG Jiali, LI Jianghua, et al. Studies on determination of gentamicin fermentation broth by TLC[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2008, 27(5): 128-133. (in Chinese)
- [19] 杨雅麟, 王建华, 张帆, 等. 薄层层析法分离菊芋汁中低聚糖[J]. 理化检验 - 化学分册, 2007, 43(3): 229-230, 232.
- YANG Yalin, WANG Jianhua, ZHANG Fan, et al. Separation of oligosaccharides in juice of *Jerusalem Artichoke* by thin layer chromatography [J]. **Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis**, 2007, 43 (3): 229-230, 232. (in Chinese)
- [20] 李晶, 朱莉, 詹晓北, 等. 定量薄层层析法用于内切 β -1,3- 葡聚糖酶筛选纯化过程中酶活力测定[J]. 食品工业科技, 2013, 34(23): 298-302.
- LI Jing, ZHU Li, ZHAN Xiaobei, et al. Determination of enzymatic activity during endo- β -1,3-glucanase screening and purification processes using quantitative thin layer chromatography [J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2013, 34(23): 298-302. (in Chinese)
- [21] JOHN F Robyt, RUPENDRA Mukerjee. Separation and quantitative determination of nanogram quantities of maltodextrins and isomaltodextrins by thin-layer chromatography[J]. **Carbohydrate Research**, 1994, 251: 187-202.
- [22] APIRAK Sakunpak, JIRAPORNCHAI Suksaeree, CHAOWALIT Monton, et al. Quantitative analysis of γ -oryzanol content in cold pressed rice bran oil by TLC-image analysis method[J]. **Asian Pac J Trop Biomed**, 2014, 4(2): 119-123.
- [23] LUCIAN Alexandru Fazakas, RODICA Domnica Nascu-Briciu, COSTEL Sarbu. A comparative study concerning the image analysis in thin layer chromatography of fluorescent compounds [J]. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, 2011, 34(19): 2315-2325.