

草酸水解聚唾液酸分离提纯制备 N-乙酰神经氨酸

吴志波^{1,2,3}, 陈祥松^{1,2,3}, 吴金勇^{1,2}, 孙立洁^{1,2}, 袁丽霞^{1,2}, 姚建铭^{1,2,3}

(1. 中国科学院等离子体物理研究所, 安徽合肥 230031; 2. 淮南新能源研究中心, 安徽淮南 232001; 3. 中国科学技术大学, 安徽合肥 230026)

摘要: 为了探究草酸水解聚唾液酸分离提纯制备高纯度 N-乙酰神经氨酸的工艺条件, 以期简化工艺步骤和降低生产成本; 作者重点考察了草酸对聚唾液酸的水解, 首先对比了草酸和其他常规水解酸的水解效果, 确定了草酸为聚唾液酸的水解酸. 然后通过正交实验确定最佳草酸水解操作参数: 水解温度为 90 °C、水解时间为 3.5 h、水解酸浓度为 0.1 mol/L 和聚唾液酸稀释倍数为 5 倍, 在此条件下, 聚唾液酸的水解率平均可达 94% 以上, 水解收率可达 97% 以上. 通过实验条件及步骤优化, 得到分离提纯制备高纯度 N-乙酰神经氨酸的最佳工艺. 在该工艺下, 红外光谱及 HPLC 分析证实所得产品中主要成分是 N-乙酰神经氨酸, 其纯度为 98.5%, 收率为 58.4%.

关键词: 聚唾液酸; N-乙酰神经氨酸; 草酸; 陶瓷膜; 结晶

中图分类号: TQ46 **文献标识码:** A **doi:** 10.3969/j.issn.0253-2778.2020.05.008

引用格式: 吴志波, 陈祥松, 吴金勇, 等. 草酸水解聚唾液酸分离提纯制备 N-乙酰神经氨酸[J]. 中国科学技术大学学报, 2020, 50(5):605-611.

WU Zhibo, CHEN Xiangsong, WU Jinyong, et al. Separation and purification to prepare N-acetylneuraminic acid after oxalic acid hydrolysis of polysialic acid[J]. Journal of University of Science and Technology of China, 2020, 50(5):605-611.

Separation and purification to prepare N-acetylneuraminic acid after oxalic acid hydrolysis of polysialic acid

WU Zhibo^{1,2,3}, CHEN Xiangsong^{1,2,3}, WU Jinyong^{1,2}, SUN Lijie^{1,2}, YUAN Lixia^{1,2}, YAO Jianming^{1,2,3}

(1. Institute of plasma physics, Chinese Academy of Sciences(ASIPP), Hefei 230031, China;

2. Huainan new energy research center, Hefei 232001, China;

3. University of Science and Technology of China, Hefei, 230026, China)

Abstract: The polysialic acid was obtained from fermentation of *escherichia coli*, and hydrolyzed to separate, purify and prepare the N-acetylneuraminic acid. In order to study the process conditions of separation and purification to prepare high purity of n-acetylneuraminic acid from the polysialic acid which was hydrolyzed by the oxalic acid, so as to simplify the process and reduce the production cost, the authors investigated emphatically the hydrolysis of the polysialic acid by oxalic acid, contrasted firstly the effects on hydrolysis of polysialic acids between oxalic acids as other conventional hydrolytic acids and determined oxalic acids as hydrolytic acids. The best operating parameters of the oxalic acid hydrolysis of the polysialic acid was determined by the orthogonal experiment: hydrolysis temperature 90 °C, hydrolysis time 3.5 h,

收稿日期: 2019-04-16; **修回日期:** 2019-11-25

基金项目: 国家自然科学基金(21506235); 安徽省自然科学基金(C1508085MB38); 淮南市重点研究和开发专项(2017A044); 2016 年度中科院等离子体物理研究所科学基金(DSJ16-YY02); 安徽省面上项目(1808085MB52)资助.

作者简介: 吴志波, 男, 1992 年生, 硕士生, 研究方向: 生物物理学, E-mail: 157283617@qq.com

通讯作者: 姚建铭, 博士/研究员, E-mail: Jmyao@ipp.ac.cn

hydrolysis acid concentration 0.1 mol/L and diluted multiples of polysialic acid 5 times. In these conditions, the hydrolyze rate of the polysialic acid was more than 94 %, and the hydrolyze yield was more than 97 %. The separation and purification conditions were optimized through experiments, and the separation and purification process for the preparation of high purity N-acetylneuraminic acid was obtained. In these process conditions, the analytic results of the infrared spectrum and HPLC showed that the purity of the N-acetylneuraminic acid product was 98.5 %, and the yield was 58.4 %.

Key words: polysialic acid; N-acetylneuraminic acid; oxalic acid; hydrolysis; separation and purification

0 引言

聚唾液酸(polysialic acid, PSA)是游离的唾液酸单体以 α -2,8 或 α -2,9 糖苷键缩聚得到的线性聚合物^[1],分子量在 20~60 kDa,是一种具有链式蛋白酶抗性的大分子^[2].唾液酸(sialic acid, SA)是神经氨酸(neu-raminic acid)的一类衍生物的总称^[3],其中 N-乙酰神经氨酸在唾液酸中占主要地位. N-乙酰神经氨酸广泛存在于动物细胞表面的糖缀物末端,在许多与糖、蛋白或脂质相互作用的生理过程中起着重要作用^[4]. N-乙酰神经氨酸的生物学功能,从作用机理来看,主要分为三类:细胞之间的信息传递、被识别的受体作用、对细胞或分子的特异性识别部位的掩蔽作用^[5]. N-乙酰神经氨酸及其衍生物在治疗流感、神经性疾病、炎症、肿瘤等方面有重要的实用价值^[6].

高剑峰等^[7]从猪血中提取了 N-乙酰神经氨酸,也有报道从鸡蛋^[8]、牛乳乳清^[9]和酪蛋白^[10]中提取得到 N-乙酰神经氨酸;但都操作烦琐、提取难度大、生产成本低,得到的 N-乙酰神经氨酸的纯度和收率较低,难以满足工业化大规模生产需求.

聚唾液酸水解得到 N-乙酰神经氨酸.目前,从聚唾液酸出发水解得到高纯度的 N-乙酰神经氨酸是研究、分离提纯 N-乙酰神经氨酸的新热点.赵慧等^[11]先用乙醇-氯化钙盐析法分离得到粗聚唾液酸,再用盐酸水解得到 N-乙酰神经氨酸水解液,水解液经离子交换树脂洗脱,得到纯度为 96.4 %的 N-乙酰神经氨酸,但其工艺回收率低、成本高,离子交换后的 N-乙酰神经氨酸溶液中含有大量无机盐,严重影响 N-乙酰神经氨酸单体纯度;李文强等^[12]用乙醇沉淀粗聚唾液酸;郁丹凤等^[13]用乙醇-氯化钠盐析法分离提纯粗聚唾液酸,再用硫酸水解得到 N-乙酰神经氨酸水解液,水解液中加入乙醇得到 N-乙酰神经氨酸粗品,再配制成饱和 N-乙酰神经氨酸乙醇溶液用乙酸乙酯溶析得到纯度 90%~92%的 N-乙酰神经氨酸,其工艺回收率低、工艺步骤烦琐、成本高.

作者所在实验室通过微生物发酵制备聚唾液酸^[14].本文采用草酸水解聚唾液酸分离提纯制备 N-乙酰神经氨酸,以期简化 N-乙酰神经氨酸分离提纯步骤,提高 N-乙酰神经氨酸的收率和纯度,降低生产成本,提高经济效益,为聚唾液酸分离提纯制备高纯度 N-乙酰神经氨酸的工业化大规模生产提供指导作用.

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

陶瓷复合膜设备 SJM-FHM-17 为合肥世杰膜工程有限责任公司产品;高效液相色谱 L-16 为日本岛津(上海)公司产品;100 L 发酵罐 PV11074 为镇江东方生物工程设备技术有限责任公司产品;正压平板膜过滤器 YTZ50LSDSS 为浙江省海宁市亚泰制药机械有限公司产品;旋转蒸发仪 R-1050 为郑州长城科工贸有限公司产品;pH 计 FE-20 为梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司产品.

N-乙酰神经氨酸标准品为阿拉丁公司产品,乙醇为食品级,其他试剂为国产分析纯试剂.

1.2 聚唾液酸发酵液的制备

100 L 发酵罐中接种量 5 % (体积分数),发酵条件:发酵温度 37 °C,搅拌转速 200 r/min,通气量 1 vvm,发酵时间 72 h;发酵维持 DO(溶解氧) \geq 30 %,加入 1 mL 泡敌抑制泡沫产生,用氨水维持 pH 为 6.4,底料碳源耗完后,以 2.5 g \cdot L⁻¹ \cdot h⁻¹ 山梨醇补料至发酵结束,得到产量为 19.540 g/L 的聚唾液酸发酵液^[14].

1.3 聚唾液酸溶液的制备

聚唾液酸发酵液经 400 nm 孔径陶瓷复合膜设备菌液分离,过膜压力 0.15 MPa,过膜温度 40 °C 以下,清液加热至 75 °C,搅拌 30 min,用 220nm 孔径正压平板膜过滤器过滤,得到除菌体、除蛋白的聚唾液酸溶液.

1.4 聚唾液酸的水解

量取一定体积的聚唾液酸溶液,将水解所用草

酸配制成一定浓度,再与聚唾液酸溶液等体积混合进行水解.HPLC法测定水解液中的 N-乙酰神经氨酸质量浓度.

1.5 聚唾液酸的测定

间苯二酚-盐酸法^[15]测定水解前的聚唾液酸质量浓度.

1.6 N-乙酰神经氨酸的测定

HPLC法测定 N-乙酰神经氨酸质量浓度. 色谱条件:色谱柱为 ZORBAX 300-SCX;流动相为 1 g 浓硫酸配制成 2 L 的硫酸溶液;流动相体积流量为 0.6 mL/min;柱温为 60 °C;检测器为 UV210 nm;进样量为 20 μ L.

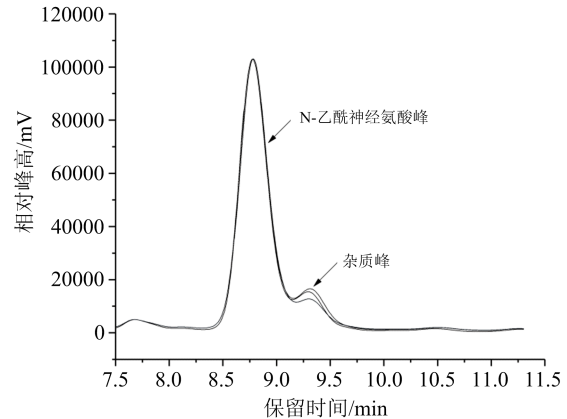
1.7 水解率的测定

水解前和水解后的总 N-乙酰神经氨酸质量浓度(x_0 和 x_1)用间苯二酚-盐酸法测定,水解后游离的总 N-乙酰神经氨酸质量浓度(x_2)用 HPLC 法测定. N-乙酰神经氨酸收率 $y_1 = x_1/x_0$, N-乙酰神经氨酸水解率 $y_2 = x_2/x_0$.

2 结果与讨论

2.1 水解酸的确定

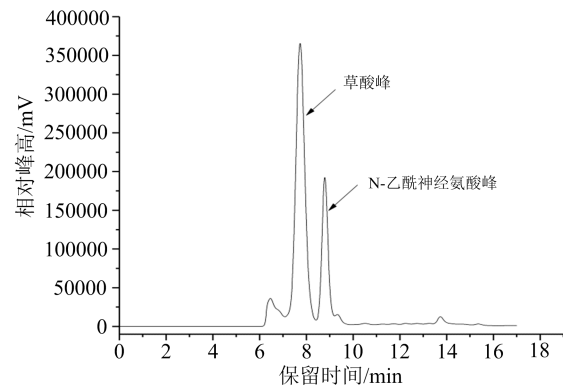
为了获得单体 N-乙酰神经氨酸,需要把聚唾液酸水解. 聚唾液酸的水解方法有酶法和酸法,其中酶水解由于 N-乙酰神经氨酸酶价格较高,且难以获得,不适合工业化应用,故多采用酸法. 一般来说,多糖类物质的水解常用三氟乙酸、硫酸、盐酸、甲酸、乙酸或草酸. N-乙酰神经氨酸在微量三氟乙酸存在的环境中稳定性受到很大的影响,则三氟乙酸不适用于聚唾液酸水解^[11]. 作者所在实验室发现, N-乙酰神经氨酸在强酸和高温的水解环境中容易变性, HPLC 谱图上会在 N-乙酰神经氨酸峰后面显示一个小峰,即为变性物质杂质峰,故硫酸和盐酸也不适于聚唾液酸的水解(见图 1). 同样的色谱条件下,草酸的色谱图中有可识别的色谱峰,但与 N-乙酰神经氨酸标准品的保留时间差距较大(草酸保留时间为 7.677 min, N-乙酰神经氨酸保留时间为 8.759 min)(见图 2), N-乙酰神经氨酸标准品溶于 0.1 mol/L 的草酸水溶液进行色谱分析,两种物质能得到有效分离. 同样浓度下,草酸的酸性较硫酸、盐酸和三氟乙酸弱,较乙酸和甲酸强,实验中发现,在水解温度为 85 °C、水解时间为 2.5 h、试剂浓度为 0.1 mol/L^[11] 以及聚唾液酸稀释倍数相同的条件下,草酸水解效果略高于盐酸,比硫酸好(见图 3). 因此可选择草酸进行聚唾液酸的水解.



(上为硫酸水解的杂质峰;中为盐酸水解的杂质峰;下为草酸水解的杂质峰)

图 1 相同浓度下,三种酸水解聚唾液酸得到 N-乙酰神经氨酸的色谱峰对比

Fig. 1 The chromatographic peak contrast of N-acetylneuraminic acid obtained by three acidic hydrolysis of polysialic acid at the same concentration



(草酸:7.677 min; N-乙酰神经氨酸:8.759 min)

图 2 草酸与 N-乙酰神经氨酸保留时间对比

Fig. 2 The contrast of retention time between oxalic acid and N-acetylneuraminic acid

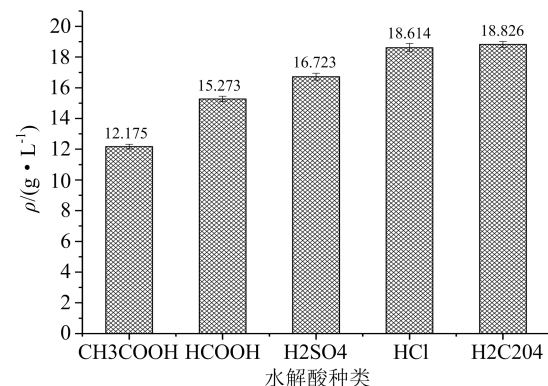


图 3 相同条件下不同酸的水解效果

Fig. 3 The hydrolysis effects of different hydrolytic acid under the same conditions

2.2 水解条件的优化

通过预备实验确立酸浓度、水解温度、水解时间

和聚唾液酸浓度 4 个因素,取 5 个水平,根据 L16

(4⁵)安排正交实验,实验数据如表 1 所示.

表 1 L16(4⁵)正交实验结果Tab. 1 The results of the L16 (4⁵) orthogonal experiment

实验号	因素				水解率	
	温度 A/°C	时间 B/h	草酸浓度 C/mol · L ⁻¹	稀释倍数 D	$x_i/\%$	$x_i^2/\%^2$
1	70	2.0	0.010	5	31.1	967.21
2	70	2.5	0.020	20	48.9	2391.21
3	70	1.5	0.100	0	28.3	800.89
4	70	3.0	0.025	2	32.1	1030.41
5	70	3.5	0.050	10	70.4	4956.16
6	75	2.0	0.020	2	36.3	1317.69
7	75	2.5	0.025	10	58.8	3457.44
8	75	3.0	0.050	0	39.7	1576.09
9	75	1.5	0.010	20	35.3	1246.09
10	75	3.5	0.100	5	85.1	7242.01
11	80	1.5	0.020	10	50.8	2580.64
12	80	3.0	0.100	20	78.9	6225.21
13	80	2.0	0.025	0	42.7	1823.29
14	80	3.5	0.010	2	54.9	3014.01
15	80	2.5	0.050	5	98.1	9623.61
16	85	1.5	0.025	5	59.7	3564.09
17	85	2.0	0.050	20	85.5	7310.25
18	85	3.0	0.010	10	74.2	5505.64
19	85	2.5	0.100	2	85.8	7361.64
20	85	3.5	0.020	0	69.6	4844.16
21	90	1.5	0.050	2	63.3	4006.89
22	90	2.0	0.100	10	90.5	8190.25
23	90	3.0	0.020	5	83.1	6905.61
24	90	3.5	0.025	20	81.9	6707.61
25	90	2.5	0.010	0	59.2	3504.64
K_1	210.8	237.4	254.7	239.5		
K_2	255.2	286.1	288.7	272.4	$\sum x_i =$	$\sum x_i^2 =$
K_3	325.4	350.8	275.2	357.1	1544.2	106152.74
K_4	374.8	308.0	357.0	344.7		
K_5	378.0	361.9	368.6	330.5		
K_1^2	44436.64	56358.76	64872.09	57360.25		
K_2^2	65127.04	81853.21	83347.69	74201.76		
K_3^2	105885.16	123060.64	75735.04	127520.41		
K_4^2	140475.04	94864.00	127449.00	118818.09		
K_5^2	142884.00	130971.61	135865.96	109230.25		
$\sum K_i^2$	498807.88	487108.22	487269.78	487130.76		

计算可得

$$n_{\bar{x}^2} = \frac{1}{n} \left(\sum x_i \right)^2 = 95382.1456,$$

$$Q_A = \frac{1}{a} \sum k_i^2 - n_{\bar{x}^2} = 4379.4304,$$

同理, $Q_B = 2039.4984$, $Q_C = 2071.8104$, $Q_D = 2044.0064$.

而 $Q = \sum x_i^2 - n_{\bar{x}^2} =$

$$106152.74 - 95382.1456 = 10770.5944,$$

则 $Q_e = Q - (Q_A + Q_B + Q_C + Q_D) = 235.8488$.

方差分析的结果如表 2 所示. 根据显著性检验的结果选择最优工艺条件时, 根据方差分析理论, 只

需对显著的因素选择最优水平, 不显著的因素原则上可选实验范围内的任一点. 由表 2 可知, 水解温度 A 的显著性 $\alpha = 0.001$, 水解时间 B 的显著性 $\alpha = 0.015$, 草酸浓度 C 的显著性 $\alpha = 0.010$, 聚唾液酸稀释倍数 D 的显著性 $\alpha = 0.044$, 可见, 显著因素的重要性顺序为: $A > C > B > D$. 因此, 正交实验得到的最佳草酸水解聚唾液酸条件为: 水解温度选择 90°C , 水解时间选择 3.5 h , 水解所用的草酸浓度选择 0.1 mol/L , 聚唾液酸稀释 5 倍. 用以上条件进行了 3 次水解实验, 水解率均达 94% 以上, 回收率均达 97% 以上, 结果如表 3 所示.

表 2 正交实验方差分析

Tab. 2 The analysis of standard deviation

方差来源	Ⅲ型平方和	df(自由度)	平均平方和	F(均方差比值)	显著性
A	4 379.430 4	4	2 189.715 2	18.568 805	0.001
B	2 039.498 4	4	1 019.749 2	8.647 483	0.015
C	2 071.810 4	4	1 035.905 2	8.784 486	0.010
D	2 044.006 4	4	1 022.003 2	8.666 597	0.044
误差	235.848 8	8			
总和	10 770.594 4	24			

表 3 验证实验结果

Tab. 3 The results of validated experiment

实验序号	水解前总唾液酸质量浓度/(g · L ⁻¹)	水解后总唾液酸质量浓度/(g · L ⁻¹)	水解后游离 N-乙酰神经氨酸质量浓度/(g · L ⁻¹)	水解率/%	收率/%
1	19.540	19.024	18.525	94.8	97.4
2	19.540	19.236	18.635	95.4	98.4
3	19.540	19.012	18.333	93.8	97.3

2.3 N-乙酰神经氨酸的分离提纯

将聚唾液酸溶液采用得到的水解条件进行水解, 水解后溶液中总唾液酸质量浓度为 18.622 g/L , 游离的 N-乙酰神经氨酸浓度为 18.387 g/L , 聚唾液酸水解率为 94.1% , 水解收率为 95.3% .

N-乙酰神经氨酸水解液中加入与草酸等物质的量的氢氧化钙中和, 用 220 nm 孔径正压平板膜过滤器过滤; 过滤液加热至 45°C , 加入 0.5% (质量分数) 的活性炭, 搅拌 30 min , 使用 220 nm 孔径正压平板膜过滤器过滤; 用旋转蒸发器将脱色液浓缩至 100 g/L , 加入 5 倍体积的乙醇, 搅拌后静置分层, 用

220 nm 孔径正压平板膜过滤器过滤, 过滤液蒸出乙醇, 反复除杂至加 5 倍乙醇无絮状沉淀; 将除杂液浓缩至 300 g/L , 向浓缩液中加入 7 倍体积的乙酸, 超声震荡, 将混合液置于 4°C 冷藏结晶 24 h , 晶体用乙醇洗涤 3 次, 再在 60°C 烘箱中烘干 2.5 h 得到产品. 经 HPLC 分析 (见图 4) 和红外光谱分析 (见图 5), 证实所得产品是唾液酸系列中的 N-乙酰神经氨酸, 并且与标准品相符. 并且, 对得到的产品进行检测分析, 结果如表 4 所示. 其中 N-乙酰神经氨酸占产品总质量的 98.5% , 产品收率为 58.4% , 则乙酸结晶产品为高纯度的 N-乙酰神经氨酸.

表 4 产品检测分析结果

Tab. 4 The inspection and analysis results of product

产品 纯度/%	白度/%	比旋 光度/[a]	水分 含量/%	菌落总数 /(cfu · g ⁻¹)	乙酸 含量/%	硫酸盐 含量/%	氯化物 含量/%	炽灼 残渣/%
98.5	95.3	-32.469	0.5180	<10	0.0440	<0.0768	<0.0040	0.215

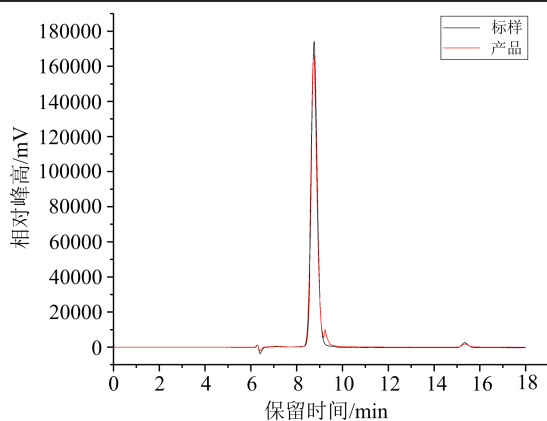


图 4 乙酸结晶产品的 HPLC 图谱

Fig. 4 The HPLC chromatogram of the product crystallized by acetic acid

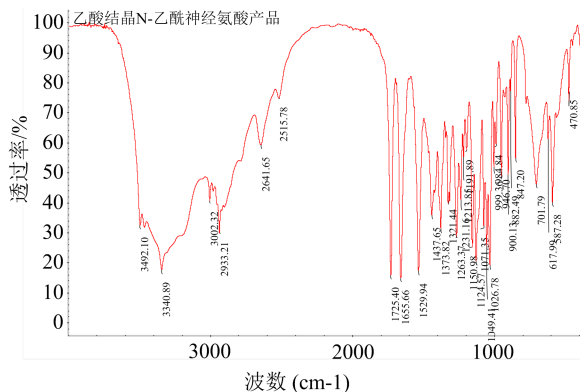


图 5 乙酸结晶产品的红外分析图谱

Fig. 5 The infrared spectrum analysis chromatogram of the product crystallized by acetic acid

3 结论

本文通过探究草酸水解聚唾液酸分离提纯制备高纯度的 N-乙酰神经氨酸的工艺条件,得到以下结论:

(I) 在相同的水解条件下,草酸对聚唾液酸的水解效果较盐酸和硫酸好,对 N-乙酰神经氨酸的变性影响较盐酸和硫酸小;

(II) 草酸水解聚唾液酸的最佳操作参数为:水解温度选择 90 °C,水解时间选择 3.5 h,水解所用的

草酸浓度选择 0.1 mol/L,聚唾液酸稀释 5 倍;

(III) 在最佳水解操作参数条件下,草酸水解聚唾液酸的水解率平均达 94 % 以上,回收率平均达 97 % 以上;

(IV) 在最佳分离提纯工艺条件下,聚唾液酸水解得到的 N-乙酰神经氨酸的纯度为 98.5 %,收率为 58.4 %.

草酸酸性比盐酸和硫酸弱,而比甲酸和乙酸强。N-乙酰神经氨酸在强酸性条件下非常不稳定,因此不宜在强酸条件下水解,且聚唾液酸水解为可逆反应,强酸存在能抑制聚唾液酸水解。本文选择草酸水解聚唾液酸,表现出几个明显的优势:一是水解后得到的 N-乙酰神经氨酸在水解液中较稳定;二是草酸可以通过草酸钙沉淀过滤除去,工艺简单;三是没有引入氯化钠这样的一价盐,无需用有机膜除盐,生产上简化了工艺、降低了成本。草酸水解聚唾液酸提纯工艺,通过水解、除杂、脱色、浓缩、结晶等步骤,可获得高纯度的 N-乙酰神经氨酸。

参考文献 (References)

- [1] REVILLA-NUIN B, REGLERO A, FERRERO M A, et al. Uptake of N-acetyl-D-mannosamine: an essential intermediate in polysialic acid biosynthesis by *Escherichia coli* K92[J]. FEBS Letters, 1999, 449: 183-186.
- [2] BRUSÉS J L, RUTISHAUSER U. Roles, regulation, and mechanism of acid function during neural development[J]. Biochimie, 2001, 83: 635-643.
- [3] BLIX F G, GOTTSCHALK A, KLENK E. Proposed nomenclature in the field of neuraminic and sialic acid[J]. Nature, 1957, 179: 1088.
- [4] SHEN G J, DATTA A K, IZUMI M, et al. Expression of $\alpha 2, 8/2, 9$ -Polysialyltransferase from *Escherichia coli* K92: Characterization of the enzyme and its reaction products[J]. Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(49): 35139-35146.
- [5] 刘景, 任婧, 刘翠平, 等. 动物乳及婴幼儿配方奶中唾液酸的研究及应用进展[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(11): 105-108.

- [6] WITCZAK Z J, KARL A N. Carbohydrate in Drugs Design[M]. New York: Marcel Dekker, 1997.
- [7] 高剑峰, 冯万祥. 血液中唾液酸的提取和结晶纯化[J]. 中国医药工业杂志, 1996, 27(6): 246-247.
- [8] JUNEJA L R, KOKETSU M, NISHIMOTO K, et al. Large-scale preparation of sialic acid from chalaza and egg-yolk membrane[J]. Carbohydrate Research, 1991, 214:179-186.
- [9] WHITEHOUSE M W, ZILLIKEN F. Isolation and determination of neuraminic(sialic) acids[J]. Methods of Biochemical Analysis, 1960, 8: 199-218.
- [10] MASAHARU S, YUKIO U, ICHIROU M, et al. Process for manufacturing sialic acids-containing composition; US5270462[P/OL]. 1993-12-14 [2019-03-15]. <https://europepmc.org/article/PAT/US5270462>.
- [11] 赵慧, 詹晓北, 朱一暉, 等. 聚唾液酸的水解与唾液酸的纯化[J]. 无锡轻工业大学学报, 2004, 23(4): 16-19.
- [12] 李文强. 唾液酸发酵控制及其分离纯化的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2005.
- [13] 郁丹凤. 聚唾液酸和唾液酸提取工艺的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008.
- [14] 吴金勇, 陈祥松, 袁丽霞, 等. 磁场条件下 Fe^{2+} 对产聚唾液酸大肠杆菌的诱变选育[J]. 河南师范大学学报, 2018, 46(6): 80-85.
- [15] SVENNERHOLM L. Quantitative estimation of sialic acids; II. A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1957, 24(4): 604-611.

(上接第 580 页)

- [2] PAZY A. Semigroups of Linear Operators and Applications to Partial Differential Equations [M]. New York: Springer, 1983.
- [3] ROLEWICZ S. On uniform N -equistability [J]. J Math Anal Appl, 1986, 115(2): 434-441.
- [4] PREDA C. On the uniform exponential stability of linear skew-product semiflows [J]. J Funct Spaces Appl, 2006, 4(2): 145-161.
- [5] HAI P V. Continuous and discrete characterizations for the uniform exponential stability of linear skew-evolution semiflows[J]. Nonlinear Anal, 2010, 72(12): 4390-4396.
- [6] PREDA C, PREDA P, BĂȚĂRAN F. An extension of a theorem of R. Datko to the case of (non)uniform exponential stability of linear skew-product semiflows [J]. J Math Anal Appl, 2015, 425(2): 1148-1154.
- [7] PREDA C, ONOFREI O R. Nonuniform exponential dichotomy for linear skew-product semiflows over semiflows [J]. Semigroup Forum, 2018, 96(2): 241-252.
- [8] MEGAN M, SASU A L, SASU B. Perron conditions for uniform exponential expansiveness of linear skew-product flows [J]. Monatsh Math, 2003, 138(2): 145-157.
- [9] MEGAN M, SASU A L, SASU B. Exponential instability of linear skew-product semiflows in terms of Banach function spaces [J]. Results Math, 2004, 45(3): 309-318.
- [10] MEGAN M, SASU A L, SASU B. Exponential stability and exponential instability for linear skew-product flows [J]. Math Bohem, 2004, 129(3): 225-243.
- [11] 岳田, 雷国梁, 宋晓秋. 线性斜演化半流一致指数膨胀性的若干刻画[J]. 数学进展, 2016, 45(3): 433-442.
- [12] PREDA P, POGAN A, PREDA C. Functionals on function and sequence spaces connected with the exponential stability of evolutionary processes [J]. Czechoslovak Math, 2006, 131(56): 425-435.