

超微粉碎对山银花微粒结构、有效成分及其抗氧化能力的影响

Effect of ultrafine grinding on particle structure, effective compositions and antioxidant activity of *L. macranthoides*

吴振¹ 詹永¹ 李红² 杨勇¹

WU Zhen¹ ZHAN Yong¹ LI Hong² YANG Yong¹

谭红军¹ 黄小平¹ 王海燕³

TAN Hong-jun¹ HUANG Xiao-ping¹ WANG Hai-yan³

(1. 重庆市中药研究院, 重庆 400065; 2. 重庆市食品药品检验检测研究院, 重庆 401123;

3. 重庆市畜牧科学院, 重庆 402460)

(1. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China; 2. Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing 401121, China; 3. Chongqing Academy of Animal Sciences, Chongqing 402460, China)

摘要:研究超微粉碎和普通粉碎对山银花(灰毡毛忍冬 *L. macranthoides*)微粒结构、有效成分含量、活性成分溶出率及其抗氧化能力的影响。结果显示,超微粉碎导致了山银花物料微粒结构的改变,即可使组织细胞壁及粗纤维结构破坏;同时提高了绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙、木犀草苷、咖啡酸等活性成分的溶出量;超微粉中绿原酸的溶出度和溶出速率与细粉相比均具有较明显的提高;超微粉清除 DPPH· 的能力是细粉的 1.36 倍(浓度均为 60 mg/mL 时)。超微粉碎技术改善了山银花的物理化学特性,破坏了其原有细胞壁及粗纤维的致密网状结构,提高了活性成分溶出量和抗氧化能力。

关键词:山银花;超微粉碎;普通粉碎;微粒结构;有效成分;抗氧化活性

Abstract: In order to explore the comprehensive utilization value of *L. macranthoides*, investigated the particle structure, effective compositions contents, dissolution rate and antioxidant activity of *L. macranthoides* processed ultrafine and common grinding. It was found that the ultrastructure of *L. macranthoides* was changed by ul-

trafine grinding, and its cell wall and crude fiber structure were destroyed. The dissolution contents of chlorogenic acid, Macranthoidin B, Dipsacoside B, Luteolin 7-glucoside and caffeic acid were increased after ultrafine grinding. The dissolution rate of chlorogenic acid from ultra-fine grinding powder was significantly higher than that of common grinding power of *L. macranthoides*. Furthermore, scavenging ability of DPPH· were investigated. The DPPH· scavenging ability of *L. macranthoides* power were increased to 1.36 times by ultrafine grinding. Ultrafine grinding improved the physical-chemical properties of *L. macranthoides*, destroyed its intact structure of tissues and cells at the original state, improved its antioxidant capacities, and had a certain potential in the application of food and medicine industries.

Keywords: *L. macranthoides*; ultrafine grinding; common grinding; particle structure; effective compositions; antioxidant activity

山银花富含粗多糖、有机酸类、黄酮类、三萜皂苷类、环烯醚萜类、挥发油类及微量元素等活性成分,特别是绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙、咖啡酸等活性成分含量较高,其绿原酸和总皂苷含量一般高于金银花^[1-3]。研究表明,山银花及其提取物具有抗氧化^[4]、抗衰老^[5]、改善肝功能^[6]等生理活性。目前,山银花的研究主要集中在种质资源评价^[7]、产地差异^[8-9]、初加工差异^[10-11]、药效与物质基础的相关性^[4]等方面,而关于其深加工及产品研发等方面则未见报道。

山银花作为重要的原料,在制剂、保健食品、化工等领域

基金项目:重庆市应用开发计划项目(重点项目)(编号: cstc2014yykfB10012);重庆市集成示范计划项目(编号: cstc2015jcsf-kjfp80014);重庆市重点产业共性关键技术创新专项(编号: csct2017zdcy-zdyfx0013)

作者简介:吴振,男,重庆市中药研究院副研究员,博士。

通信作者:李红(1985—),女,重庆市食品药品检验检测研究院高级工程师,硕士。E-mail: lihong198596@163.com

收稿日期:2018-07-02

具有重要的应用价值。一般采用山银花提取物或者浸膏居多^[12-13],但本课题组研究发现,山银花超微粉(全粉)对二甲苯致 KM 小鼠耳肿胀具有非常好的抗炎作用(需进一步探讨揭示其机理)。超微粉碎是近年来食品原料学、生物技术、制剂及材料学方面的一项新技术,利用机械或流体动力的方法克服固体内部凝聚力使之破碎(达到 100 μm 以下);食品原料超微粉碎后其营养成分、理化性能、功能活性及加工性能等方面均得到改善,不仅提高了物料粉体的溶解性、分散性、吸附性、化学反应活性等,甚至还可以将植物的不可食部分(如粗纤维等大分子)通过超微化被人体吸收,赋予产品细腻的口感^[14-15];食品原料的超微粉碎带给它们更多独特性能,将成为食品资源开发的重要手段和主流发展方向。国内外研究^[14-15]均表明,超微粉碎是一种将物料转变为易于生物转化和水解的方法。尽管如此,未见有关超微粉碎对山银花影响的报道。因此,本研究拟通过对山银花进行不同粉碎(即普通粉碎和超微粉碎),比较其微粒结构、活性成分(绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙、木犀草苷、咖啡酸等)含量、绿原酸溶出率和清除 DPPH 自由基(DPPH·)的差异,以期如山银花的综合利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜山银花:忍冬科灰毡毛忍冬(*Lonicera macranthoides* Hand. Mazz.),采集于重庆秀山;

1,1-二苯基-2-苦基苯肼(DPPH):纯度≥98%,美国 Sigma-Aldrich 公司;

氯化钾:色谱纯,天津市光复精细化工研究所;

绿原酸、木犀草苷、灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙对照品:HPLC≥98%,中国药品生物制品检定所;

其他化学试剂:国产分析纯;

所用为双蒸水,所用溶液均自行配制;

电热恒温鼓风干燥箱:DHG-9240A 型,海齐欣科学仪器有限公司;

三孔电热恒温水槽:DK-8D 型,上海齐欣科学仪器有限公司;

紫外可见分光光度计:UV-2450 型,日本岛津公司;

多功能粉碎机:GX-04 型,上海远翔食品机械有限公司;

高频振动式超微粉碎机:WZJ6 型,济南倍力粉技术工程有限公司;

激光粒度仪:Mastersizer 2000 型,英国马尔文 malvern 仪器有限公司;

傅里叶变换红外光谱仪:Spectrum GX 型,美国 Perkin-Elmer 公司;

中红外 DTGS 检测器:ALPAAI-4LSC 型,美国 Christ 公司;

HPLC 仪:2690-2995 型,配蒸发光散射检测器,美国 Waters 公司;

电子天平:CP-224S 型,德国赛多利斯集团。

1.2 方法

1.2.1 普通粉碎和超微粉碎山银花 原料清洗、去除杂质、

干燥(时间 24 h,55 ℃);中药粉碎机或超微粉碎(时间 20 min),过 60 目筛。

1.2.2 傅立叶变换中红外光谱(FT-IR)、扫描电镜(SEM)和粒径分析方法

(1) FT-IR:采用溴化钾压片法。准确取 0.30 g 溴化钾(色谱纯)和 0.03 g 样品粉末混匀后进行压片;条件为压力 27 MPa,时间 1 min;检测条件:DTGS 检测器,光谱分辨率 4 cm⁻¹,扫描范围 4 000~450 cm⁻¹;采用傅立叶变换中红外光谱仪自带的操作软件采集及处理红外图谱。

(2) SEM:采用戊二醛将待测样品进行固定,再用离子溅射仪对样品表面进行镀金,将其置于扫描电镜下观测形态,加速电压为 10 kV。

(3) 粒径:采用激光粒度仪分别对山银花超微粉和普通细粉末样品进行粒度测定。

1.2.3 山银花有效活性成分分析 绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙含量测定参照文献^[16]³⁰;木犀草苷、咖啡酸含量测定参照文献^[16]²²¹。

1.2.4 山银花超微粉和普通粉中绿原酸的溶出度测定 采用浆法^[17]。分别准确称取山银花超微粉和普通粉 30 g,投入溶出仪中,避免产生气泡,以超声脱气的 900 mL 超纯水为溶出介质,转速 100 r/min,温度为(37.0±0.5) ℃,立即启动仪器,计时;分别于 5,15,30,45,60 min 各取样 2 mL,过 0.45 μm 滤膜,得到以超纯水为溶出介质的供试品溶液,HPLC 测定绿原酸含量,同时向杯中补充相同温度和体积的超纯水,计算累计溶出率。

1.2.5 超微粉碎和普通粉碎对山银花清除 DPPH· 能力的影响测定 准确称取山银花超微粉(LMUFP)、普通细粉(LMCP)各 10.00 g,分别加入去离子水 50 mL,混合均匀后置于 50 ℃水浴中超声波提取 2 h,过滤,滤渣用同样的方法提取 1 h,混合 2 次滤液并蒸发浓缩,离心(5 000 r/min,5 min)后定容至 100 mL,即得到 100 mg/mL 的样品提取液,放置冰箱备用。按照 Liu 等^[18]方法并略有修改,将不同浓度(10~50 mg/mL)的样品提取物溶液 3.0 mL 与 DPPH· 溶液 1.0 mL(95%乙醇中配置,浓度为 10⁻⁴ mol/L)混匀后,于波长 517 nm 处测定吸光度(A_i),同时,将 DPPH· 溶液 1.0 mL 与样品空白 3.0 mL 混匀后测定吸光度(A_c),将不同浓度的样品提取物溶液 3.0 mL 与 95%乙醇溶液 1.0 mL 混匀后测定吸光度(A_j),按式(1)计算 DPPH· 清除率:

$$s=(1-\frac{A_i-A_j}{A_c})\times 100\%,$$

(1)

式中:

s——DPPH· 清除率,%;

A_i——样品液组吸光度;

A_j——DPPH· 空白组吸光度;

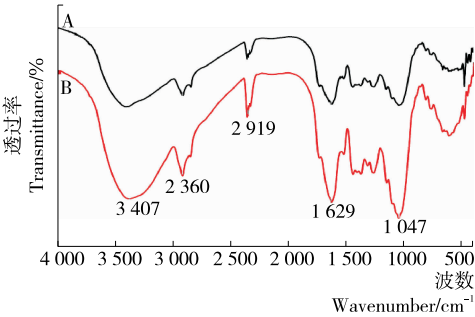
A_c——样品空白组吸光度。

1.2.6 数据统计分析 采用 SPSS 15 数据处理软件,各组数据结果均以平均值±SD(n=3)表示,并进行方差分析,最小显著性差异检验(LSD)进行多重比较,P<0.05 为差异显著性。

2 结果与分析

2.1 超微粉碎和普通粉碎对山银花的颗粒结构和微观形态的影响

山银花超微粉和细粉的 FT-IR 图谱如图 1 所示,二者非常相似,表明超微粉碎对山银花中各组分主要官能团及活性成分的结构影响较小;但与山银花细粉相比,超微粉在 3 407, 2 919, 2 360, 1 629, 1 047 cm^{-1} 等处的吸收峰均增强,说明粗多糖及纤维类特征吸收峰增强,可能是纤维素、半纤维素、木质素等大分子受到剧烈机械力作用,发生分子链断裂现象,分子聚合度有减小趋势,更多葡萄糖苷键、氢键等基团暴露;也可能是超微粉碎后粉体粒径减小,相同条件下颗粒数目相对增多,暴露出更多的亲水基团,使其吸收峰增强^[19]。



A. 细粉 B. 超微粉

图 1 山银花粉的 FT-IR 图谱

Figure 1 The FT-IR of ultrafine and common grinding powder of *L. macranthoides*

山银花超微粉和细粉的扫描电镜 (SEM) 如图 2 所示。山银花细粉形状各异,粒径较大,表面较粗糙。经过超微粉碎后,山银花原片状结构被切断,呈现粒径较小、形状多为圆锥形或束形、纤维单个散在或数个成束的微粒结构特性。由图 3 可知,经过普通粉碎的山银花颗粒分布范围较广,平均粒径为 3 368 nm (分散系数 PDI 为 0.817),经过超微粉碎的山银花颗粒平均粒径为 535.5 nm (分散系数 PDI 为 0.540)。可见,经过超微粉碎后,其粒径分布区域变窄。研究发现,超微粉碎通过剪切力改变了物料大小,未有效改变纤维的结晶结构,只是改变纤维的颗粒大小^[20]。经超微粉碎后,粒径减小,同时粉碎过程中纤维等大分子长链发生断裂,使得羧基、羟基等基团充分暴露出来,从而改善其物化特性。

2.2 超微粉碎和普通粉碎对山银花的有效活性成分含量的影响

山银花超微粉和细粉的绿原酸、总皂苷 (灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙)、木犀草苷、咖啡酸等有效活性成分含量见图 4;其中山银花超微粉的绿原酸、总皂苷和咖啡酸含量显著高于细粉 ($P < 0.05$) 的;木犀草苷含量无显著性差异。结果显示,超微粉碎处理促进山银花活性成分溶出。化学成分是药效物质基础,研究如何提高活性成分含量能够更好地指导山银花的综合利用和成分提取^[5-6]。Xiao 等^[21]研究发现超微粉碎可以提高茶叶粉中水溶性成分茶多酚、咖啡碱、多糖的含量,并认为是由于超微粉的粒径减小,导致细胞壁破损率增加而提高了水溶性成分的溶出。

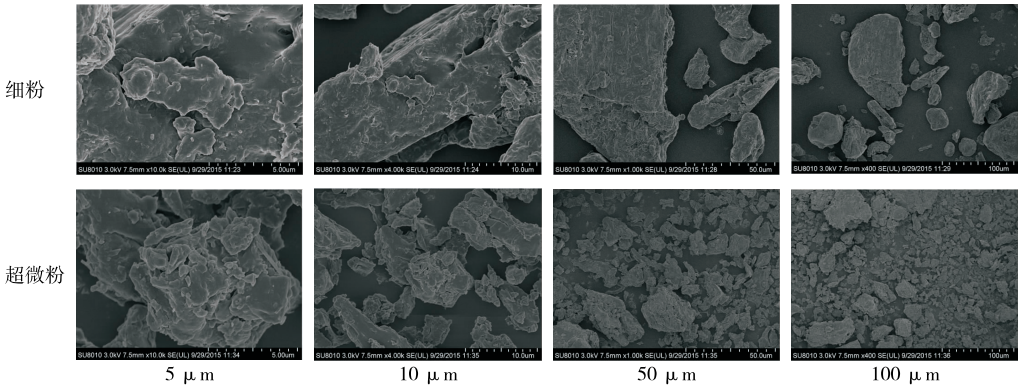


图 2 山银花粉的扫描电镜 (SEM)

Figure 2 SEM of ultrafine and common grinding powder of *L. macranthoides*

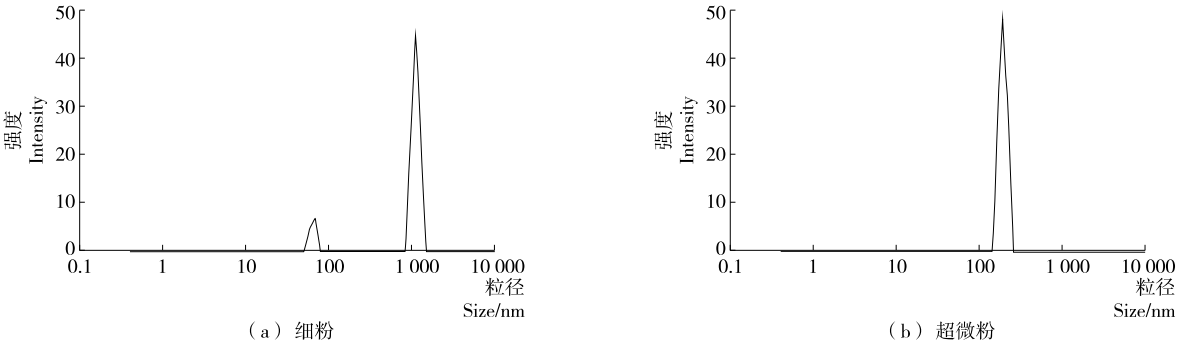


图 3 普通粗碎与超微粉碎对山银花粉末粒径的影响

Figure 3 Effect of ultrafine and common grinding on the size of *L. macranthoides*

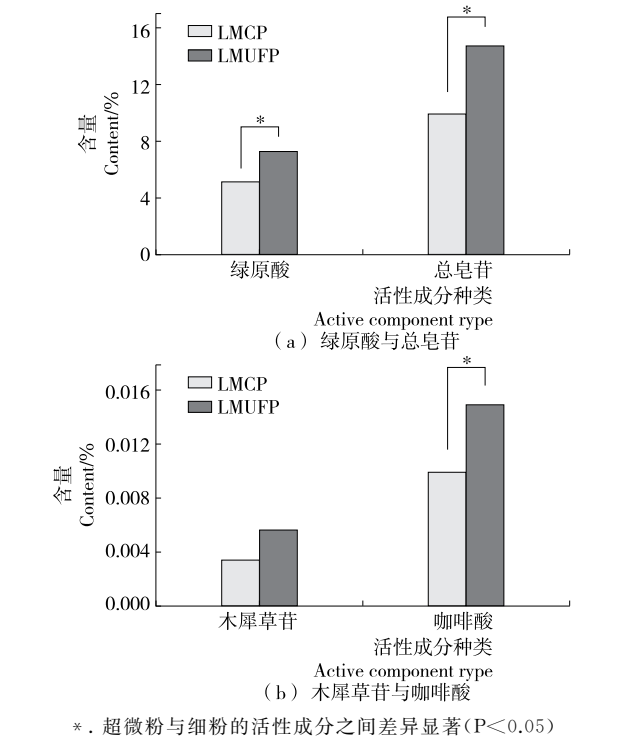


图 4 超微粉碎和普通粉碎对山银花有效成分含量的影响
Figure 4 Effect of ultrafine and common grinding on the contents of effective compositions of *L. macranthoides*

2.3 超微粉碎和普通粉碎对山银花中绿原酸溶出度的影响

以蒸馏水为溶出介质,累计溶出量与测定的绿原酸含量之比即为累计溶出率。山银花超微粉和细粉溶出数据见图 5,结果表明超微粉中绿原酸的溶出度和溶出速率与细粉相比均具有较明显的优势,原因主要归结于超微粉具有良好的粒径、比表面积和颗粒孔隙分布,超微颗粒的微观结构变化影响了提取过程中植物化学物质的扩散过程,导致水提取物中可提取的小分子活性成分含量增加,从而提高了溶出量^[22]。

2.4 超微粉碎和普通粉碎对山银花抗氧化活性的影响

山银花超微粉和细粉清除 DPPH·能力对比如图 6 所示。LMCP 和 LMUFP 清除 DPPH·能力都随着质量浓度的增加而明显增强,均呈剂量效应关系;LMUFP 对 DPPH·

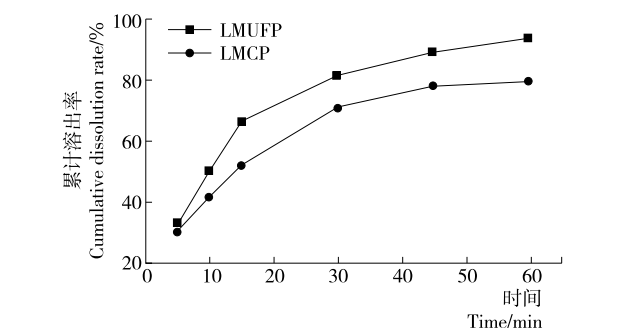


图 5 山银花超微粉和普通细粉中绿原酸的溶出曲线
Figure 5 The dissolution curve of chlorogenic acid of ultrafine and common grinding of *L. macranthoides*

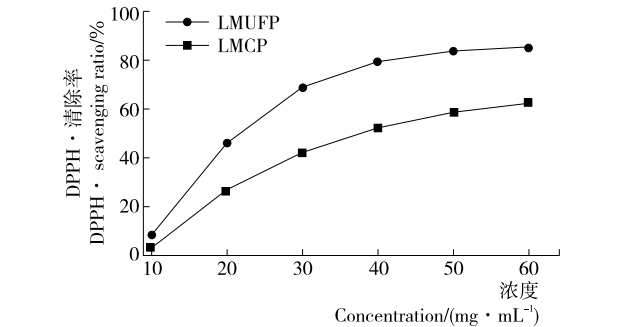


图 6 超微粉碎和普通粉碎对山银花清除 DPPH·能力的影响
Figure 6 Effect of ultrafine and common grinding on the DPPH· scavenging activity of *L. macranthoides*

的清除作用要好于 LMCP,尤其是在浓度增大时;超微粉清除 DPPH·的能力是细粉的 1.36 倍(浓度均为 60 mg/mL 时),说明山银花超微粉抗氧化作用显著高于细粉,与有效成分含量结果一致;原因可能是:① 超微粉碎破坏了原微粒的网状致密结构,暴露出更多的亲水基团,导致亲水性增加,其清除 DPPH·能力随之提高^[22],这与 FT-IR 和 SEM 表征分析结果一致,均证实了超微粉碎对山银花微粒结构的破坏作用^[23];② 超微粉碎破坏了山银花的细胞壁及其内部网状结构,造成更多的可溶性小分子活性成分溶出^[24],这与“2.2 和 2.3 部分”的活性成分含量及其溶出数据一致。此外,传统山银花提取物或浸膏均采用高温处理,而超微粉碎全过程均处于低温状态,有效防止了热敏性成分及多酚的氧化和降解,具有更广泛的应用前景。

3 结论

超微粉碎使山银花药材的微粒结构(细胞壁及粗纤维结构)改变,提高了绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙、木犀草苷、咖啡酸等活性成分的溶出量及溶出速率,所以提高了其清除 DPPH·的能力。通过山银花粉末微粒结构结合活性成分及抗氧化能力评价,揭示了超微粉碎对山银花全粉的影响,对山银花的综合利用和产品开发具有指导意义。目前山银花的研究仍侧重于化学成分与药理作用的研究,将来研究的重点是开展山银花系统研究,针对基原、不同产地、不同加工方法和产品研发及其综合利用进行研究。因此,山银花直接超微粉碎作为一种营养补充剂,替代山银花提取物或者浸膏,在活性成分富集、抗氧化能力增强等方面具有较好的应用前景。

参考文献

[1] 温建辉,倪付勇,赵祎武,等.山银花化学成分研究[J].中草药, 2015, 46(13): 1 883-1 886.
[2] CHEN Yu, SHAN Yu, ZHAO You-yi, et al. Two new triterpenoid saponins from *Lonicera macranthoides* [J]. Chinese Chemical Letters, 2012, 23(3): 325-328.
[3] LIU Jiang, ZHANG Jing, WANG Feng, et al. Isolation and characterization of new minor triterpenoid saponins from the buds of *Lonicera macranthoides* [J]. Carbohydrate Research,

2013, 370(7): 76-81.

[4] HU Xing, CHEN Lin, SHI Shu-yun, et al. Antioxidant capacity and phenolic compounds of *Lonicerae macranthoides* by HPLC-DAD-QTOF-MS/MS[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016, 124: 254-260.

[5] PARK S H, ROH E, KIM H S, et al. Inhibition of IRAK-4 activity for rescuing endotoxin LPS-induced septic mortality in mice by *Lonicerae flos* extract[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2013, 442(3/4): 183-188.

[6] JIANG Ping, SHENG Yu-chen, CHEN Yu-hao, et al. Protection of *Flos Lonicerae* against acetaminophen-induced liver injury and its mechanism[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2014, 38(3): 991-999.

[7] 黄宇南. 金银花与山银花种质资源收集与质量评价[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2018: 14-21.

[8] LIU Jiang, ZHANG Jing, WANG Feng, et al. Chemical constituents from the buds of *Lonicera macranthoides* in Sichuan, China[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2014, 54: 68-70.

[9] 申丽娟, 丁恩俊, 谢德体, 等. 电感耦合等离子体原子发射光谱法测定不同产地山银花金属元素主成分及其聚类分析[J]. *食品科学*, 2014, 35(2): 173-176.

[10] WU Chun, WANG Feng, LIU Jiang, et al. A comparison of volatile fractions obtained from *Lonicera macranthoides* via different extraction processes: ultrasound, microwave, Soxhlet extraction, hydrodistillation, and cold maceration [J]. *Integrative Medicine Research*, 2015, 4(3): 171-177.

[11] 冯小峰, 林昌虎, 王晓, 等. 不同干燥方法对山银花促褐变酶活性和活性成分的影响[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(3): 76-80.

[12] 彭国平, 石国荣, 陈曦, 等. 湖南山银花香精 SFE- CO_2 萃取条件的优化[J]. *食品与机械*, 2007, 23(4): 65-67.

[13] 陈志华, 时港洪, 田海妍, 等. 大孔吸附树脂法去除山银花总皂苷的工艺研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2017, 29(4): 680-685, 694.

[14] ZHANG Yang, XIAO Wei-hua, CAO Yao-yao, et al. The effect of ultrafine and coarse grinding on the suspending and precipitating properties of black tea powder particles [J]. *Journal of Food Engineering*, 2018, 223: 124-131.

[15] ZHU Ke-xue, HUANG Sheng, PENG Wei, et al. Effect of ultrafine grinding on hydration and antioxidant properties of wheat bran dietary fiber [J]. *Food Research International*, 2010, 43(4): 943-948.

[16] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2015 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.

[17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2015 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 122.

[18] LIU Li-xiang, SUN Yi, LAURA T, et al. Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng[J]. *Food Chemistry*, 2009, 112(1): 35-41.

[19] ZHANG Wei, ZHANG Jia-li, JIANG Qi-xing, et al. Physicochemical and structural characteristics of chitosan nanopowders prepared by ultrafine milling [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 87(1): 309-313.

[20] 刘成梅, 刘伟, 林向阳, 等. Microfluidizer 对膳食纤维微粒粒度分布的影响[J]. *食品科学*, 2004, 25(1): 52-55.

[21] XIAO Wei-hua, ZHANG Yang, FAN Chong-xin, et al. A method for producing superfine black tea powder with enhanced infusion and dispersion property[J]. *Food Chemistry*, 2017, 214: 242-247.

[22] ZHANG Yang, XIAO Wei-hua, JI Guan-ya, et al. Effects of multiscale-mechanical grinding process on physicochemical properties of black tea particles and their water extracts[J]. *Food and Bioproducts Processing*, 2017, 105: 171-178.

[23] 吴敬涛. 食品原料超微粉碎后性能的变化[J]. *中国粉体技术*, 2017, 23(6): 96-100.

[24] 申玲玲, 杜光, 郭俊浩. 超微粉碎对中药活性成分溶出度的影响[J]. *中国医院药学杂志*, 2011, 31(14): 1 213-1 214, 1 230.

(上接第 15 页)

[6] 朱玉霞. 壳寡糖的制备、分离分析及抑菌活性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013: 5-6.

[7] 杨国宁, 陈列欢, 曾毅伟, 等. 壳寡糖和壳聚糖酶水解特性的薄层色谱分析[J]. *中国海洋大学学报: 自然科学版*, 2013, 43(2): 33-36.

[8] 牟世芬, 刘克纳, 丁晓静, 等. 离子色谱方法及应用[M]. 北京: 北京化学工业出版社, 2005: 58-59.

[9] 韩永萍, 林强, 王晓琳, 等. 低聚壳聚糖制备液纳滤纯化的可行性研究[J]. *离子交换与吸附*, 2012, 28(1): 86-96.

[10] JEON Y J, KIM S K. Production of chitooligosaccharides using an ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2000, 41(2): 133-141.

[11] 仲伟伟, 夏文水. 壳聚糖酶解液的超滤分离技术研究[J/OL]. 中国科技论文在线 [2018-03-21]. <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201803-177>.

[12] 李博. 止血用壳聚糖的质量和安全管理控制研究[D]. 无锡: 江南大学, 2012: 29-30.

[13] 朱加虹. 壳寡糖质量指标检测方法及其抗菌性能的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2007: 23-24.

[14] CHEN Xiao-qian, YANG Qiu-lin, SI Chuan-ling, et al. Recovery of oligosaccharides from orehydrolysis liquors of poplar by microfiltration/ultrafiltration membranes and anion exchange resin[J]. *Acs Sustainable Chemistry & Engineering*, 2016, 4(3): 225-229.

[15] 蒋慧, 李恒, 张澜, 等. 高效液相色谱法测定壳寡糖的含量[J]. *发酵科技通讯*, 2016, 45(4): 232-236.

[16] CHEN Wen. Method for preparing water-soluble chitosan oligosaccharide by adopting ultrafiltration and nanofiltration[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 18(6): 66-69.

[17] 韩永萍, 林强, 何绪文, 等. 纳滤对壳寡糖制备液的纯化性能研究[J]. *膜科学与技术*, 2009, 29(6): 105-109.

[18] 王鏊, 王湛. 膜分离技术基础[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 59-60.

[19] 张威. 纳米壳聚糖的制备及降脂活性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013: 23.

[20] 董惠忠. 聚合度 6~8 壳寡糖的制备关键技术研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2014: 40.