

# 利用绿潮藻浒苔制备水溶色素的工艺研究

王 鹏,黄志俊,皎 皎,李银平,江晓路\*

(中国海洋大学食品科学与工程学院,山东青岛 266003)

**摘要:**针对绿潮藻浒苔藻体中叶绿素不稳定的特点,本研究提出了一种通过铜代改性、丙酮浸提、成盐等过程制备浒苔水溶色素的新工艺,并对工艺参数进行优化。研究表明,当  $\text{CuSO}_4$  添加量为 0.6% (w/w) 时,浒苔叶绿素得率最高,达 0.17%;采用单因素和响应面优化法对成盐过程的参数进行优化,得到最佳工艺参数:向 50mL、1g/L 浒苔叶绿素浓缩液中添加 50mg NaOH、反应温度 45.8℃、时间 52.2min,在此最优条件下浒苔色素得率为 1.068mg/mL;品质指标测定结果表明该工艺制备的水溶色素符合 GB26406-2011 中的各项指标。

**关键词:**浒苔,提取,水溶色素,响应面优化

## Study on the preparation of water soluble pigment from the green tide algae *Enteromorpha prolifera*

WANG Peng, HUANG Zhi-jun, JIAO Jiao, LI Yin-ping, JIANG Xiao-lu\*

(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** Due to the unstability of chlorophyll in *Enteromorpha prolifera*, a new method for water-soluble pigment preparation was established in this study. The detailed process mainly included  $\text{Cu}^{2+}$  replacement, acetone extraction, and salifying reaction and the related technical parameters were optimized. Results showed that the chlorophyll extraction rate reached 0.17% with 0.6% (w/w)  $\text{CuSO}_4$  addition. Effect of NaOH dose, duration, and temperature on the salifying reaction were also investigated by single factor experiment and response surface methodology. For 50mL 1g/L chlorophyll concentrate, the optimum conditions were NaOH dose 50mg, temperature 45.8℃, and reaction time 52.2min, respectively. And the corresponding pigment production could reach 1.068mg/mL. Main indexes of the pigment product produced by this method met all the requirements of GB26406-2011.

**Key words:** *Enteromorpha prolifera*; extraction; water soluble pigment; response surface experiment

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2015)13-0212-05

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2015.13.036

叶绿素是一种广泛存在于高等植物和藻类细胞中的天然色素。叶绿素在体外不稳定,耐光性差,且不溶于水,应用中通常将其转化为稳定的铜钠盐形式<sup>[1]</sup>,从而得到水溶性叶绿素衍生物。由于具有色泽鲜艳、安全稳定的特点,水溶性叶绿素产品已被广泛用于饮料、果冻、糕点等食品的着色,是一种常见的食品添加剂。

浒苔作为一种广泛分布于我国东海海域的大型绿藻,自 2007 年以来,已呈季节性爆发,形成绿潮,资源量巨大。同时,浒苔藻体内含有丰富的叶绿素<sup>[2]</sup>,是一种潜在的廉价叶绿素生产原料。但是,浒苔在海域打捞、收集,陆域脱水打包及运输处理过程中往往受到光照、高温等因素的影响而导致色素变性退色<sup>[3]</sup>,这使得采用常规生产工艺难以对其进行有效提取利用。迄今为止,国内外有关水溶叶绿素制备方法研究报道大多采用有机溶剂浸提、皂化、酸

化、铜化、成盐等工艺过程<sup>[4]</sup>,制备过程操作复杂,有多次析出、溶解过程,并且需要消耗大量的酸、碱、以及丙酮和石油醚等有机溶剂,不适合于叶绿素部分或严重退色的浒苔原料的加工。因此,寻找一种适合于绿潮藻浒苔藻体特点的色素制备工艺将有助于实现浒苔高值综合利用。

本实验针对绿潮藻浒苔提出一种水溶色素的制备方法,首先通过藻体铜代改性,有机溶剂提取,并经成盐反应制备浒苔水溶色素。采用单因素及响应面优化法,对铜代及成盐工艺参数进行优化,并对获得的色素进行品质检测,为浒苔叶绿素的开发利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

浒苔 原料由青岛海大生物集团有限公司提

收稿日期:2014-10-11

作者简介:王鹏(1989-),男,硕士,主要从事微生物应用方面的研究。

\*通讯作者:江晓路(1959-),女,硕士,教授,研究方向:海洋微生物。

基金项目:国家海洋局公益性专项(201105028-4)。

供,该原料是通过海域打捞收集、陆域脱水打包、二次剪切及快速烘干制得浒苔粉(含水量小于10%);丙酮、硫酸铜、氢氧化钠均为分析纯。

数显式恒温水浴锅 上海启前电子科技有限公司;DL6MB型大容量离心机 西安禾普生物科技有限公司;721型紫外-可见分光光度计 上海精密仪器有限公司;AA320N原子吸收光谱仪 上海达平仪器有限公司;PHS-3C型pH计 上海仪电科学仪器股份有限公司。

## 1.2 实验方法

1.2.1 浒苔水溶色素制备工艺 浒苔→铜代→清洗、过滤→丙酮浸提→成盐→离心→低温烘干沉淀→浒苔水溶色素

1.2.2 叶绿素浓度及得率的测定 参照赵庆生等<sup>[5]</sup>关于叶绿素浓度及得率的测定方法,取2g浒苔粉,以丙酮为提取液,用索氏提取器抽提至提取管中液体无色,收集提取液,在645nm和663nm下测定吸光值,计算公式如下:

$$\text{叶绿素浓度 (mg/L)} = 8.02A_{663\text{nm}} + 20.21A_{645\text{nm}}$$

叶绿素得率(%) = 叶绿素浓度(mg/L) × 提取液体积(L) × 100 / 浒苔粉质量(mg)

1.2.3 CuSO<sub>4</sub>添加量的确定 取5g浒苔粉于三角瓶,加入蒸馏水,同时加入相对于浒苔质量0%、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1%、2%、4%的CuSO<sub>4</sub>,沸水浴1h,过滤,滤渣用水冲洗3次,烘干粉碎滤渣得到铜代浒苔粉,以叶绿素得率为指标,确定最适CuSO<sub>4</sub>添加量。

1.2.4 成盐反应工艺参数优化 在1.2.3中得到的最适CuSO<sub>4</sub>添加量下制备铜代浒苔粉,用丙酮浸提叶绿素,浓缩,获得浓度为1g/L的浒苔叶绿素浓缩液。每组取50mL浓缩液,在不同NaOH添加量、反应温度、反应时间下进行成盐反应,反应过程在加热回流装置中进行,再经离心、烘干得到墨绿色浒苔水溶色素,称量色素质量,并计算色素得率,计算公式如下:

色素得率(mg/mL) = 色素质量(mg) / 叶绿素浓缩液体积(mL)

以色素得率为指标,以NaOH添加量、反应温度、反应时间为考察因素,进行单因素优化实验,实验设计如表1。

表1 单因素实验因素与水平

Table 1 Factors and levels of single factor experiments

影响因素	水平					
NaOH(mg)	20	30	40	50	60	70
反应温度(°C)	20	30	40	50	60	70
反应时间(min)	10	20	30	40	50	60

根据单因素实验结果,利用Box-Behnken中心组和实验设计方法,设计3因素3水平的响应面分析实验。具体实验因素水平及编码见表2。

采用Design Expert 8.0软件对表中因素及实验所得响应值进行分析,研究不同因素对浒苔水溶色素得率的影响,并得到最佳成盐反应条件。

1.2.5 浒苔水溶色素的品质检测 参照国家标准GB 26406-2011《食品添加剂 叶绿素铜钠盐》<sup>[6]</sup>中关

于pH、E<sub>1cm</sub><sup>1%</sup>(405 ± 3)nm、吸光度比值、总铜、游离铜、干燥减量、总砷、铅的测定方法,对最佳工艺条件下得到的浒苔水溶色素品质进行检测。

表2 Box-Behnken实验因素和水平设计

Table 2 Factors and levels in Box-Behnken analysis

因素	水平		
	-1	0	+1
X <sub>1</sub> NaOH添加量(mg)	40	50	60
X <sub>2</sub> 反应温度(°C)	40	45	50
X <sub>3</sub> 反应时间(min)	40	50	60

1.2.6 数据分析方法 优化过程中每组实验重复三次,实验所得数据采用平均值 ± 标准偏差表示,采用SPSS13.0软件进行单因素方差分析(ANOVA)。

## 2 结果与分析

### 2.1 CuSO<sub>4</sub>添加量的确定

分别对不同CuSO<sub>4</sub>添加量处理下的浒苔叶绿素含量进行测定,并计算叶绿素得率,结果见图1。当CuSO<sub>4</sub>添加量为0%至0.6%时,叶绿素得率随CuSO<sub>4</sub>添加量的增加而升高。当CuSO<sub>4</sub>添加量为0.6%时,其得率达到最高,为0.17%,是未经铜代(CuSO<sub>4</sub>添加量0%)浒苔叶绿素得率的2.83倍。王敏等<sup>[7]</sup>研究表明,叶绿素降解产物脱镁叶绿素分子与铜离子结合,使已退色的叶绿素分子呈色功能重新复原,从而使叶绿素得率明显增加。但是,当CuSO<sub>4</sub>添加量超过0.6%后,浒苔叶绿素得率呈现下降趋势,且CuSO<sub>4</sub>添加量高于1%后,叶绿素得率保持在较低的水平。邓丽萍<sup>[8]</sup>认为,非活体绿藻细胞壁中含有氨基、羧基硫酸等带电基团,由于斥力作用而阻碍金属离子对细胞壁的靠近;潘进芬<sup>[9]</sup>在研究中发现,金属离子可以通过物理吸附在藻体细胞壁上形成无机沉淀,并引起细胞外观变形,同时使藻体细胞荧光性丧失。因此,推测引起浒苔叶绿素得率降低的原因可能是浒苔藻体细胞壁中的氨基等带电基团与藻体内部的脱镁叶绿素竞争性与Cu<sup>2+</sup>结合,阻碍了金属离子向藻体细胞内的扩散,同时过量的Cu<sup>2+</sup>可能会对叶绿素分子造成破坏,使其退色。根据实验结果,CuSO<sub>4</sub>最适添加量为0.6%。该条件可以有效对浒苔原料铜代修复。

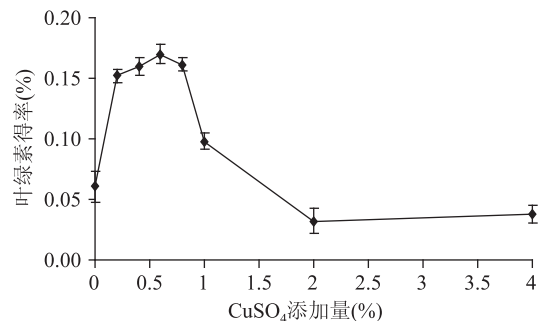


图1 CuSO<sub>4</sub>添加量对叶绿素得率的影响

Fig.1 Effect of CuSO<sub>4</sub> on the chlorophyll extraction rate

### 2.2 成盐反应工艺参数优化

叶绿素分子属卟啉化合物,是由叶绿酸和叶绿醇、甲醇所组成的二醇脂<sup>[10]</sup>。脂类在碱性溶液中可

发生成盐反应,使叶绿素分子脱去脂基,生成鲜绿色的叶绿酸盐,从而使其具有水溶性。该过程受 NaOH 添加量、反应温度、反应时间的影响。

为研究 NaOH 添加量对浒苔水溶色素得率的影响,向叶绿素丙酮提取液中分别加入不同量的 NaOH,在反应温度为 60℃、反应时间为 1h 的条件下进行反应,再经离心、烘干得到墨绿色浒苔水溶色素,并计算色素得率,结果如图 2。随着 NaOH 添加量的增加,色素得率逐渐上升,当添加量达到 50mg 后色素得率为 0.76mg/mL,之后增加 NaOH 浒苔色素得率略有下降。因此,成盐反应所需 NaOH 添加量在 40~60mg 为最适范围。

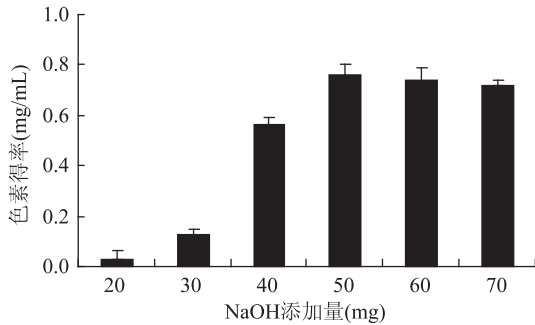


图2 NaOH 添加量对色素得率的影响

Fig.2 Effect of NaOH on the production of pigment

反应温度是影响反应速率的重要因素,本实验研究了在 NaOH 添加量为 1.70mg/g、反应时间为 1h 条件下,不同温度对浒苔水溶色素得率的影响,结果如图 3。随着反应温度的增加,色素得率先升高后降低,最高达到 0.81mg/mL。这主要是随着反应温度的升高,反应速率加快,在一定时间内色素得率随反应温度的升高而增加。当反应温度超过 40℃,色素得率反而下降,可能是在过高温环境,叶绿素分子降解为脱镁叶绿酸及其它小分子物质<sup>[11]</sup>,从而造成得率降低。因此反应温度选择 40~50℃ 为适宜范围。

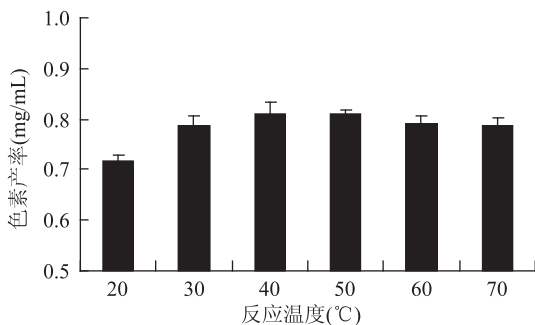


图3 反应温度对色素得率的影响

Fig.3 Effect of reaction temperature on the production of pigment

反应时间是决定成盐反应进行程度的另一个重要因素,本实验在 NaOH 添加量 50mg、反应温度 40℃ 条件下,以反应时间为变量,以色素得率为指标,研究反应时间对浒苔水溶色素得率的影响,结果如图 4。随着反应时间的延长,浒苔水溶色素的得率逐渐升高,当反应时间为 50min 时,得率达到最高

0.94mg/mL,但当反应时间为 60min 时,得率为 0.72mg/mL,这可能是叶绿素分子在高温环境中,随着时间的延长,出现氧化现象<sup>[12]</sup>,造成叶绿素的降解与退色,从而降低了浒苔色素的得率。

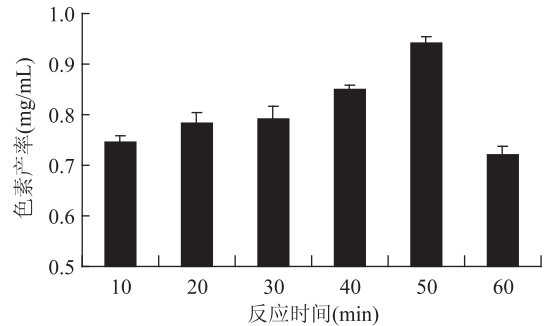


图4 反应时间对色素得率的影响

Fig.4 Effect of reaction time on the production of pigment

为进一步优化浒苔色素的成盐反应工艺条件,本研究选取 NaOH 添加量( $X_1$ )、反应温度( $X_2$ )、反应时间( $X_3$ )为响应变量,以色素得率( $Y$ )为响应值,使用 Design Expert 8.0 软件,采用 Box-Behnken 中心组 and 实验设计方法得到响应面实验设计及结果如下:

表3 Box-Behnken 实验设计与结果

Table 3 Box-Behnken design matrix and experimental results

实验号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	色素得率 (mg/mL)
1	0	1	1	0.646
2	-1	0	-1	0.374
3	0	0	0	1.020
4	0	0	0	1.042
5	0	-1	-1	0.328
6	0	0	0	1.076
7	-1	0	1	0.424
8	1	1	0	0.920
9	0	1	-1	0.636
10	1	0	-1	0.646
11	-1	-1	0	0.230
12	1	0	1	0.858
13	0	0	0	1.020
14	1	-1	0	0.554
15	0	-1	1	0.700
16	0	0	0	1.086
17	-1	1	0	0.212

利用 Design Expert 8.0 软件对表的数据进行处理,并进行非线性回归的二次多项式拟合,得到回归响应值对响应面因素的多元多项回归方程: $Y = 53.36 + 10.36X_1 + 3.64X_2 + 2.65X_3 + 4.8X_1X_2 + 1.03X_1X_3 - 2.78X_2X_3 - 16.88X_1^2 - 14.03X_2^2 - 8.71X_3^2$ 。该回归方程方差分析见表 4。该模型回归极显著( $p < 0.0001$ ),  $R^2 = 0.9937$ ,  $R_{Adj}^2 = 0.9645$ ,线性关系良好,表明实验设计合理可行。失拟项  $p$  值为 0.1504  $> 0.05$  为不显著,失拟性良好,表明在实验条件下,该方程模型能很好地对浒苔色素得率进行预测。

表4 响应面回归结果及方差分析  
Table 4 ANOVA of quadratic polynomial model and significance test

方差来源	平方差	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	3747.72	9	416.41	31.28	<0.0001	**
X <sub>1</sub>	859.05	1	859.05	64.53	<0.0001	**
X <sub>2</sub>	105.85	1	105.85	7.95	0.0258	*
X <sub>3</sub>	56.18	1	56.18	4.22	0.079	
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	92.16	1	92.16	6.92	0.0339	*
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	4.2	1	4.2	0.32	0.5917	
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	30.8	1	30.8	2.31	0.172	
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1199.72	1	1199.72	90.12	<0.0001	
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	828.8	1	828.8	62.26	<0.0001	
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	319.06	1	319.06	23.97	0.0018	
残差	93.19	7	13.31			
失拟项	91.8	3	30.6	87.93	0.1504	
纯误差	1.39	4	0.35			
所有项	3840.9	16				

$R^2 = 0.9937$   $R^2 \text{ Adj} = 0.9645$

注: \*\* 表示极显著( $p < 0.01$ ), \* 表示显著( $p < 0.05$ )。

根据 F 值大小可以得到各因素对浒苔色素得率的影响因素按主次顺序排列为 NaOH 添加量( $X_1$ ) > 反应温度( $X_2$ ) > 反应时间( $X_3$ ), 其中 NaOH 添加量对色素得率的影响极显著( $p < 0.0001$ ), 反应温度对色素得率的影响显著( $p = 0.0258$ ), 反应时间对色素得率的影响不显著。在交互项中,  $X_1X_2$  项  $p$  值为 0.0339, 表明 NaOH 添加量和反应温度对浒苔色素得率的影响显著,  $X_1X_3$  项、 $X_2X_3$  项  $p$  值均大于 0.05, 表明 NaOH 添加量与反应时间、反应时间和反应温度的交互作用对色素得率的影响不显著。三因素的交互作用曲面图见图 5~图 7。

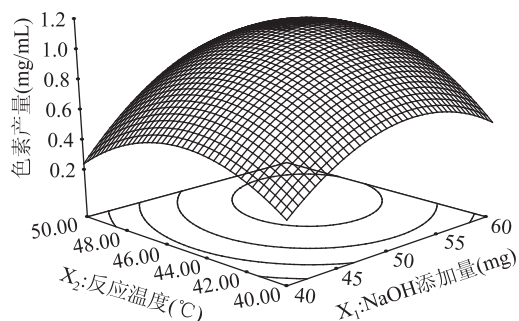


图5 NaOH 添加量和反应温度对色素得率的三维响应分析图

Fig.5 Interactive effect of NaOH supplement and temperature on production of pigment

通过 Design-expert8.0 分析得到成盐反应最佳优化方案为: NaOH 添加量 54.2mg、反应温度 45.8℃、反应时间 52.2min, 在此条件下浒苔色素得率预测值为 1.1mg/mL。为了验证回归方程所得预测值与真实值之间的拟合程度, 根据实际情况 NaOH 添加量选择 50mg, 温度 45.8℃, 时间 52.2min 经测定浒苔色素得率为 1.068mg/mL, 与预测值的相对误差为 3.0%, 与回归方程预测值十分接近, 由此说明该优化成盐工艺稳定可靠。

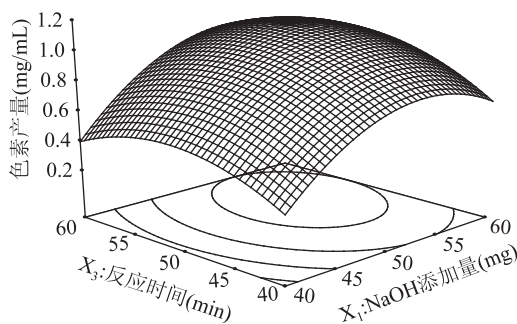


图6 NaOH 添加量和反应时间对色素得率的三维响应分析图

Fig.6 Interactive effect of NaOH supplement and reaction time on production of pigment

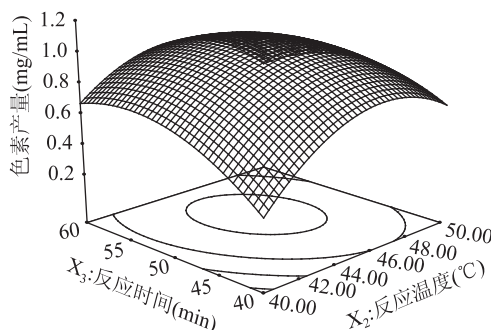


图7 反应温度和反应时间对色素得率的三维响应分析图

Fig.7 Interactive effect of temperature and reaction time on production of pigment

### 2.3 浒苔水溶色素品质检测

经铜代、有机溶剂浸提、成盐、过滤烘干得到的浒苔色素为墨绿色粉末, 易溶于水, 水溶液澄清透明, 不溶于石油醚、氯仿。在 pH6.0 以下有沉淀析出。将色素产物配置成浓度为 1% 的溶液, 用 UV2550 可见分光光度计于 300~800nm 波段进行光谱扫描, 结果如图 8, 可以看出, 浒苔色素产品在 421、630nm 处

有特征吸收峰,这与陈晨<sup>[13]</sup>报道的叶绿素铜钠盐的特征吸收峰 405~414nm 和 627~633nm 接近。

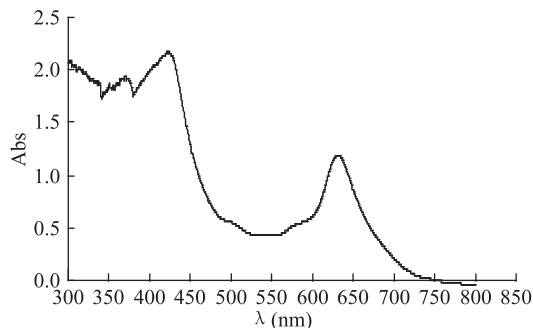


图8 紫外-可见吸收光谱图

Fig.8 UV-Vis absorption spectra

参照食品添加剂叶绿素铜钠盐的标准(GB 26406-2011)对浒苔色素进行测定,结果见表5。被检测的主要指标均符合国家标准,其中总铜和游离铜明显低于标准中规定的最高含量。铜代过程是影响色素产物中总铜和游离铜含量的关键步骤<sup>[14]</sup>,本研究在有机溶剂提取叶绿素之前对原料进行铜代,并通过清洗、过滤将藻体外的  $\text{Cu}^{2+}$  有效去除,从而有效降低了色素产物中游离铜的含量。

表5 浒苔水溶性色素各项指标测定结果

Table 5 Quality indexes of Enteromorpha water soluble pigment

质量指标	测定值	GB 26406-2011
pH	10.96	9.5~11.0
$E_{1\text{cm}}^{1\%}(405 \pm 3)\text{nm}$	569.7	$\geq 568$
吸光度比值	3.41	3.2~4.0
总铜(w%)	4.1	$\leq 8$
游离铜(w%)	0.013	$\leq 0.025$
干燥减量(w%)	3.2	$\leq 5$
铅(mg/kg)	3.87	$\leq 5$

### 3 结论

研究表明,在有机溶剂对绿潮藻浒苔提取色素之前,添加  $\text{CuSO}_4$  有助于脱镁叶绿素转化为叶绿素铜,进而提高叶绿素得率。但并非  $\text{CuSO}_4$  添加量越多得率越高,过高的添加量将导致浒苔藻体细胞壁中的氨基等带电基团与藻体内部的脱镁叶绿素竞争性与  $\text{Cu}^{2+}$

结合,使得叶绿素得率显著降低。通过响应面优化方法,得到浒苔水溶性色素最佳工艺参数为:NaOH 添加量为 50mg、反应温度为 45℃、反应时间为 50min,在此最优条件下浒苔色素得率为 1.068mg/mL。该工艺具有操作简单、高效快速的特点,且反应过程避免酸、碱的过度使用,为绿潮藻浒苔原料提供一条高值利用的新途径。

### 参考文献

- [1] 杨继生,何学志.叶绿素铜钠盐的性质、制备工艺及其应用[J].广州食品工业科技,2002,18(2):33-35.
- [2] 程红艳.浒苔中叶绿素、叶黄素的分析方法建立及叶绿素铜钠的制备初探[D].青岛:国家海洋局第一海洋研究所,2011:25-36.
- [3] 姚东瑞.浒苔资源化利用研究进展及其发展战略思考[J].江苏农业科学,2011,39(2):473-475.
- [4] 郑君秀.叶绿素铜钠盐的制备探讨[J].福建农林科技,1997,24(1):19-21.
- [5] 赵庆生,孙健,肖杰,等.芦笋叶绿素铜钠盐制备过程中提取工艺的研究[J].食品工业科技,2012,33(12):302-305.
- [6] GB 26406-2011.食品添加剂 叶绿素铜钠盐[S].北京,中华人民共和国卫生部.
- [7] 王敏,刘邻渭.叶绿素及衍生物研究进展与护绿工艺分析[J].郑州轻工业学院学报,2001,16(1):63-67.
- [8] 邓丽萍.藻体对水环境中 N、P 及重金属  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{6+}$  的吸附特征研究[D].青岛:中国科学院海洋研究所,2008:71-72.
- [9] 潘进芬.海藻对水体中重金属的吸附研究[D].青岛:中国科学院海洋研究所,2000:17-23.
- [10] 杨桂枝.从海藻中提取、制备叶绿素铜钠盐工艺及稳定性研究[D].天津:天津科技大学,2005:23-24.
- [11] Wang ZP, Shan XF. Study on preparation and stability of sodium copper chlorophyll[J]. Chem Eng, 2004, (9): 50-51.
- [12] 纪平雄,黄自然.氧化糊状叶绿素精制叶绿素铜钠盐研究[J].广东蚕业,1996,30(1):38-32.
- [13] 陈晨,陈军辉,程红艳,等.浒苔叶绿素铜钠盐的制备研究初探[J].中国海洋药物杂志,2012,31(1):21-24.
- [14] 喻薇,纪平雄.铜氨法生产叶绿素铜钠盐工艺优化[J].食品科学,2012,33(12):119-122.

(上接第 211 页)

- [6] 尚军,李来好,吴燕燕,等.响应面优化超声波辅助蛋白酶水解合浦珠母贝肉的条件研究[J].食品科学,2009,30(18):44-49.
- [7] 中国国家标准化管理委员会.GB/T20365-2006.硫酸软骨素和盐酸氨基葡萄糖含量的测定[S].北京:中国标准出版社,2006.
- [8] 杨文雄,高彦祥.响应面法及其在食品工业中的应用[J].中国食品添加剂,2005,2:68-71.
- [9] 黄卉,李来好,杨贤庆,等.响应面法优化罗非鱼油微胶囊壁材的研究[J].食品工业科技,2009,30(12):225-228.

- [10] 戚勃,李来好,杨贤庆,等.响应曲面法优化麒麟菜卡拉胶碱处理工艺[J].南方水产科学,2011,7(6):26-34.
- [11] 郝淑贤,魏涯,李来好,等.鲟鱼软骨素提取工艺研究[J].食品工业科技,2012,33(24):253-255,261.
- [12] 刘安军,王慧,朱振元,等.鲟鱼硫酸软骨素提取工艺的研究[J].现代食品科技,2009,25(6):617-619.
- [13] 徐伟屯,关瑞章,郑江,等.养殖鲟鱼软骨中硫酸软骨素的优化提取工艺研究[J].中国生化药物杂志,2004,30(3):154-157,161.