

文章编号:1673-1689(2007)04-0028-06

盐藻胞外多糖分离纯化方法研究

徐锡莲^{1,2}, 童微星¹, 雷引林¹, 姚善泾²

(浙江大学 宁波理工学院, 浙江 宁波 315100; 2. 浙江大学 材料与化学工程学院, 浙江 杭州 310027)

摘要: 盐藻培养液经离心、超滤浓缩得胞外多糖粗品溶液, 然后用乙醇沉淀, 丙酮及无水乙醚洗涤, 并冷冻干燥得胞外多糖(Exopolysaccharides, EPS)粗品。粗糖经双酶解、透析等初步纯化后, 用 DE-52 离子交换柱层析分离纯化得两种 EPS 组分(EPS I 和 EPS II), 琼脂糖凝胶电泳鉴定各自为均一的成分。经检测, 两组分的糖质量分数以葡萄糖为对照分别为 61.34% 和 52.81%, 蛋白质质量分数 3.97% 和 1.35%, 且核酸质量分数小于 0.025%, 达到了比较高的纯度。

关键词: 盐藻; 胞外多糖; 提取; 分离纯化

中图分类号: O 629.12; Q949.212

文献标识码: A

Separation and Purification of Extracellular Polysaccharides from *Dunaliella salina*

XU Xi-lian^{1,2}, TONG Wei-xing¹, LEI Yin-lin¹, YAO Shan-jing²

(1. Ningbo Institute of Technology, Zhejiang University, Ningbo 315100, China; 2. College of Material Science and Chemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract: The crude solution containing extracellular polysaccharide was obtained by centrifugation and ultrafiltration from the *Dunaliella salina* culture, followed by the ethanol precipitation, washing with acetone and anhydrous ether and freeze drying. After the primary purification using the double-enzyme hydrolyzation and the dialysis, two polysaccharide components (EPS I and EPS II), which were identified using the agarose gel electrophoresis, were purified by the DE-52 ion-exchange chromatography. As a result, the polysaccharide contents of EPS I and EPS II were achieved at 61.34% and 52.81%, and the protein contents were 3.97% and 1.35%, respectively. But the nucleic acid contents were decreased and low than 0.025%. This results indicated that a high purity of polysaccharide was gained.

Key words: *Dunaliella salina*; exopolysaccharides; extraction; separation and purification

盐藻, 又称为杜氏藻(*Dunaliella salina*), 是一种无细胞壁的单细胞绿藻, 归属于绿藻门, 绿藻纲,

团藻目, 杜氏藻科^[1]。该藻突出的生理特征是能在 0.05~5.0 mol/L 的盐水中生长, 具有繁殖快、生活

收稿日期: 2006-10-16.

基金项目: 宁波市青年基金资助项目(2003A62024).

作者简介: 徐锡莲(1982-), 女, 浙江临安人, 生物化工硕士研究生.

通讯作者: 童微星(1963-), 男, 浙江仙居人, 副教授, 主要从事天然产物与生物化工研究. Email: twx@nit.net.cn

力强、易于养殖等特点。同时,盐藻中含有大量的甘油、胡萝卜素、蛋白质、多糖类化合物和微量元素等可利用物质,对盐藻中 β -胡萝卜素和甘油的提取一直是国内外研究开发的重点。近年来,盐藻多糖复合物被研究发现具有较强的药理生物学活性,Fabregas等^[2]曾报道盐藻水提物中的硫酸化多糖在体内对败血症病毒(VHSV)和非洲猪热病毒(ASFV)的复制有抑制作用,尤其在抗肿瘤方面,盐藻多糖复合物能明显抑制实体瘤S₁₈₀的生长,其抑制率高达60%以上^[3]。

顾宁焱等^[4]曾研究了紫球藻胞外多糖在体内对小鼠免疫功能具正调节作用,结果表明能够显著提高小鼠脾细胞增殖水平、NK细胞杀伤活性和IL-2活性。吴洁等^[5]研究了极大螺旋藻胞外多糖(EP II)具有提高小鼠的NK细胞杀伤活力,表明多糖可以促进IL-2产生及淋巴细胞和混合淋巴细胞转化功能。邵雪玲等^[6]也发现了蓝藻*Trichodesmium thiebautii*胞外多糖具有抗癌活性和直接阻碍癌细胞活性。Umemura^[7]等研究表明海藻胞外多糖GA3能对肿瘤K562细胞的DNA拓扑异构酶I和II起双重抑制作用。Heheihel^[8]等发现红藻多糖在离体和体内条件下对单疱疹病毒1型和2型(HSV1,2)及水痘-带状疱疹病毒(VZV)都表现出明显抗性。Shibata等^[9]研究也发现墨角藻聚糖能刺激巨噬细胞分泌TNF- α 从而发挥抑瘤作用。众多研究表明藻类胞外和胞内多糖都具有明显的生物活性。

但是,国内外对盐藻多糖的研究仅仅是瞄准盐藻藻体内的多糖,忽视了胞外培养液中可能存在的具有生物活性的多糖,因此往往将培养液作为废液,一是浪费了资源,二也加重了环境负担。作者在前期的研究中发现,在盐藻的培养液中还存在较多的多糖,质量浓度可以达到260 mg/L以上,而且也具有一定的活性。因此作者以盐藻培养液为研究对象,在盐藻胞外多糖的提取与分离纯化方法上进行一些较为深入的研究,以利于进一步研究盐藻胞外多糖的性质、结构与功能。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

515HD植物生长箱:美国A PLUS公司产品;amicon8400超滤器:美国Millipore公司产品;ALPHA2-4冷冻干燥机:德国CHRIST公司产品;GelDoc XR凝胶成像分析系统:美国Bio-Rad公司产品;TH-1000A梯度混合器、DBS-100电脑全自动

部分收集器、HD-3紫外检测仪:上海沪西分析仪器厂产品;LABOROTA4000旋转蒸发器:德国Heidolph公司产品;Powerpac3000电泳仪:美国Bio-Rad公司产品;UV-2100紫外可见分光光度计:尤尼柯(上海)仪器有限公司产品。

葡聚糖购自sigma公司;DE 52纤维素为Pharmacia公司进口分装;丙烯酰胺和考马斯亮蓝R250为Fluka进口分装;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 盐藻的培养

取盐藻培养基800 mL放入1 000 mL的三角瓶中,接入盐藻藻种后放入植物生长箱中培养,温度控制在25℃,光照为180 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光照时间为每天12 h,相对湿度为75%,每天搅拌3~5次,培养时间为45 d。

1.3 盐藻胞外多糖的提取

离心盐藻培养液得上清液,两层滤纸重复过滤直至上清液无藻体为止。将上清液移入超滤器进行浓缩(截流相对分子质量为5 000),当浓缩到约10 mL时加蒸馏水50 mL继续超滤浓缩,并重复一次,得到胞外多糖粗品溶液,然后加4倍体积的乙醇于-18℃沉淀过夜,离心收集沉淀物,经丙酮、无水乙醚洗涤后,干燥得胞外多糖EPS,称重,测定多糖和蛋白质质量分数^[10-12]。

1.4 盐藻胞外多糖的分离纯化

1.4.1 酶解透析初步纯化多糖 取400~450 mg粗多糖样品用0.2 mol/L PBS(pH 6.8)缓冲液完全溶解后,加质量分数8%木瓜蛋白酶于37℃水浴恒温处理5 h;然后再加质量分数8%胰蛋白酶于37℃水浴恒温处理4 h,透析后加入约4倍体积的乙醇沉淀回收多糖,干燥得胞外多糖初纯品,称重计算回收率,并测定多糖和蛋白质质量分数。

1.4.2 离子交换柱层析法分离纯化 将酶解纯化后的胞外多糖,溶解于0.1 mol/L NaCl溶液中,离心(17 000 g, 5 min)去沉淀后进行DE 52柱层析(1.2 cm $\times$ 40 cm)分离。层析柱用0.1 mol/L NaCl溶液平衡,然后用0.1~2 mol/L NaCl与pH 7.4, 0.025 mol/L Tris-HCl线性梯度洗脱,流量为0.13 mL/min,自动部分收集器分管收集,1.5 mL/管。用苯酚-硫酸法检测,以490 nm吸光度值对洗脱管数作图,收集吸收峰部位洗脱液,减压浓缩得纯多糖溶液,透析脱盐后冷冻干燥得两个多糖组分EPS I和EPS II,分别称重计算回收率,并测定多糖和蛋白质质量分数^[14-15]。

1.5 盐藻胞外多糖的纯度分析

1.5.1 多糖的电泳检测 琼脂糖凝胶质量浓度为

0.8 g/dL; 缓冲液: Tris-硼酸-EDTA 缓冲液, pH8.3; 电泳: 60 mA, 约 1 h; 染色剂为质量分数 0.1% 的甲苯胺蓝溶液。

1.5.2 多糖的紫外光谱分析 用蒸馏水配制 1 mg/mL 浓度的胞外多糖溶液, 以蒸馏水做空白对照, 于波长 190~400 nm 范围进行连续扫描。

1.5.3 多糖中核酸含量的检测方法 以琼脂糖凝胶电泳方法检测胞外多糖的核酸含量。琼脂糖浓度为 0.5 g/dL, 以定量的 λ 噬菌体 DNA 为对照, 多糖样品加样量均为 200 μ g, EB 染色, GelDoc XR 伯乐凝胶成像分析系统检测观察核酸染色情况。

1.5.4 多糖的蛋白质定性分析 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法, 其中浓缩胶和分离胶浓度分别为 5 g/dL 和 10 g/dL, 多糖样品加样量为 600 μ g, 电泳完毕用考马斯亮蓝 R250 对其染色。

1.6 多糖质量分数的测定方法

采用苯酚-硫酸比色法测定多糖质量分数, 参考 Dubis 等^[16]和张惟杰^[17]方法并做修改。分别以葡聚糖和葡萄糖为对照品作标准曲线, 检测波长为 490 nm。吸取合适量的样品液, 加入预先混合好的浓硫酸与苯酚溶液, 摇匀后于 90 $^{\circ}$ C 水浴加热 20 min, 然后于 490 nm 处测定吸光度, 由标准曲线计算总糖质量分数。

1.7 蛋白质质量分数的测定方法

采用福林-酚试剂法^[18]以牛血清白蛋白为标准品, 制作标准曲线, 检测波长为 750 nm。为消除多糖物质对该方法的影响, 计算样品蛋白质质量分数时以葡聚糖标准品为对照。

2 结果与讨论

2.1 盐藻胞外多糖的提取结果

经超滤浓缩并脱盐、乙醇沉淀、丙酮及无水乙醇洗涤、冷冻干燥后, 得粗胞外多糖为白色粉末, 蓬松、无嗅无味、易溶于水、略溶于低体积分数乙醇溶液, 不溶于高体积分数乙醇、丙酮等有机溶剂。与硫酸-苯酚试剂反应呈橙色。胞外多糖质量浓度可高达 268 mg/L, 产率 75.33%。经检测其多糖质量分数为 43.7% (以葡聚糖为对照), 蛋白质质量分数 5.92%。

2.2 盐藻胞外多糖分离纯化结果

经酶解透析初步纯化后, 得多糖初纯品, 以葡聚糖为对照, 测得多糖初纯品的糖质量分数为 53.78%, 平均得率为 91.3%; 以牛血清白蛋白为对照, 测得其蛋白质质量分数为 5.58%。由此可见, 酶解透析后盐藻胞外多糖的多糖质量分数明显增

加, 得率也较高, 蛋白质质量分数也略有降低, 达到了初步纯化的目的。

经 DE-52 纤维素柱层析进一步分离纯化, 得到 2 个洗脱峰 (图 1), 分别收集得 EPS I 和 EPS II, 得率分别为 60.2% 和 12.7%。

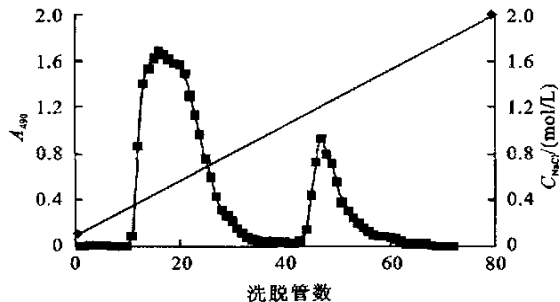


图 1 DE-52 分离盐藻胞外多糖的洗脱曲线

Fig. 1 Elution curve of EPS by DE-52

2.3 盐藻胞外多糖的纯度检测

2.3.1 电泳鉴定结果 对所得样品进行琼脂糖凝胶电泳检测, 结果见图 2。从图中可以看出, 粗多糖有两个多糖显色区, 说明它是两个组分的复合物。这与经 DE-52 纤维素离子交换层析分离纯化得到的结果一致, 可以认定 EPS I 和 EPS II 分别为粗多糖的两个组分。

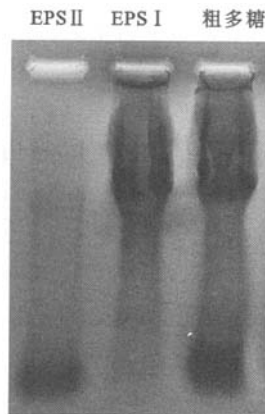


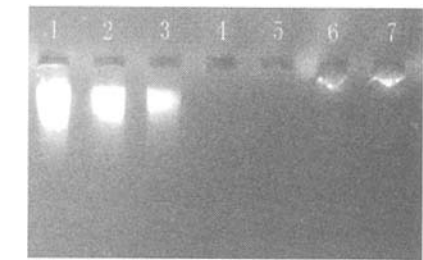
图 2 盐藻胞外多糖的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of EPS

用琼脂糖凝胶电泳 EB 染色进行检测, 结果见图 3。由图可知, 粗多糖、酶解初纯品均可见清晰的核酸条带, 而层析纯化后的两种多糖组分样品 EPS I 和 EPS II 均未见核酸条带, 说明层析后多糖样品核酸不在检测范围内 (质量分数 $< 0.025\%$), 这意味着核酸类物质在离子交换层析过程中已被除去。

盐藻胞外多糖聚丙烯酰胺凝胶电泳结果见图 4, 由图可知, 粗多糖样品可见多条清晰的蛋白质染

色条带,酶解初纯品也有,而层析后的两个组分(EPS I 和 EPS II)都未见蛋白质染色条带,说明粗多糖在酶解过程中部分条带被酶解,酶解初纯品蛋白含量略有减少,但酶解不是很彻底,而离子交换层析分离后得到的纯多糖(EPS I 和 EPS II)蛋白质含量已经明显降低。



1,2,3 分别为对照 DNA(200 ng,100 ng,50 ng);4. EPS II;5. EPS I;6. 酶解初纯品;7. 粗多糖

图 3 盐藻胞外多糖琼脂糖凝胶电泳 EB 染色
Fig. 3 Electrophoresis of EPS used in DNA

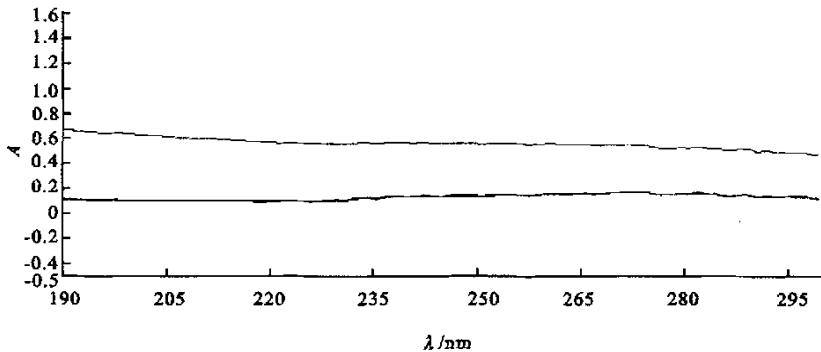
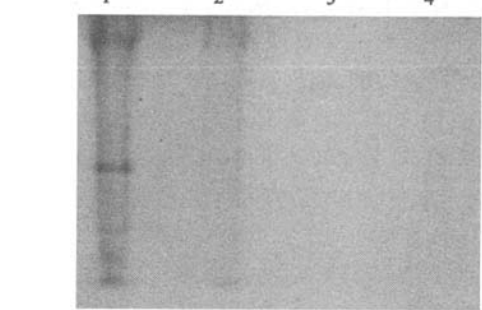


图 5 盐藻胞外多糖的紫外吸收光谱
Fig. 5 Ultraviolet spectrum of EPS

2.4 盐藻胞外多糖质量分数的测定

分别采用了改进后的苯酚—硫酸法和福林—酚试剂法测定了粗糖、酶解初纯品、EPS I 及 EPS II 的总糖质量分数和蛋白质质量分数。根据标准曲线,可以得到换算方程。以葡聚糖为对照时,多糖



1. 粗多糖;2. 酶解初纯品;3. EPS I;4. EPS II

图 4 盐藻胞外多糖聚丙烯酰胺凝胶电泳
Fig. 4 Electrophoresis of EPS used in protein

2.3.2 紫外光谱分析 粗多糖样品液和 EPS I、EPS II 样品液分别在紫外分析仪上扫描,结果(图 5)显示,粗多糖和纯化后两组分均没有明显的蛋白质(280 nm)和核酸(260 nm)吸收峰。但是,粗多糖的吸收值明显大于 EPS I、EPS II 的吸收值,很有可能是粗多糖中过多杂质干扰引起的,从而也进一步说明 EPS I、EPS II 两个组分所含杂质已经明显减少。

质量分数的计算方程为: $y=0.193\ 9x+0.000\ 9$, $R^2=0.999\ 2$;以葡萄糖为对照时,多糖质量分数的计算方程为: $y=0.160\ 9x+0.000\ 9$, $R^2=0.997\ 2$;蛋白质质量分数的计算方程为: $y=0.393\ 1x-0.000\ 1$, $R^2=0.999\ 1$ 。

表 1 EPS 及其离子交换分离组分的定量分析

Tab. 1 Analysis of EPS and its fraction by ion-exchange column chromatography

样 品	以葡聚糖为对照 的总糖质量分数/%	以葡萄糖为对照的 总糖质量分数/%	蛋白质 质量分数/%	核酸 质量分数/%	得率/%
粗多糖	43.70	40.80	5.92		
酶解初纯品	53.78	48.20	5.68		91.3
EPS I	61.34	54.48	3.97	≤0.025	60.2
EPS II	52.81	47.48	1.35	≤0.025	12.7

所计算结果见表1。从表中数据可见,在测定糖含量时以葡聚糖为对照所测得的含量高于以葡萄糖为对照的结果;EPS I 的总糖和蛋白质质量分数均高于 EPS II,与盐藻胞外粗多糖和酶解初纯品相比,EPS I 和 EPS II 的蛋白质质量分数已经明显降低,说明采用 DE-52 离子交换层析条件既可以分离盐藻胞外多糖的两个不同组分,而且可以进一步提高其纯度。

2.5 讨论

作者主要采用了超滤浓缩脱盐、乙醇沉淀、丙酮及无水乙醚洗涤脱脂、双酶解除蛋白和 DE-52 阴离子交换柱层析等单元技术提取纯化盐藻胞外多糖,得到了两个纯度较高的多糖,即 EPS I 和 EPS II。上述工艺过程中,提取率为 75.33%,双酶解除蛋白的得率为 91.3%;离子交换柱层析分离的总得率为 72.9%,而且得到两个单一组分,即 EPS I 和 EPS II。上述提取纯化盐藻胞外多糖的工艺比较简单,而且具有较高的提取率、纯化得率和较高的产品纯度。

在 Dubis 等^[16]和张惟杰^[17]测定多糖质量分数的方法中,水、苯酚、浓硫酸等试剂是分别加入的,而且在测定吸光值之前只在室温下放置 20 min,作者发现这样测得的吸光值很不稳定,标准曲线线性较差。作者对他们的方法进行了两点改进,一是把质量分数 6% 的苯酚和浓硫酸混合均匀后再加入到样品中去,从而使加样操作减少了一次,系统误差减小。二是在加完样品和试剂后进行 90 °C 水浴加热 20 min,使显色反应完全。改进后测定的吸光值

稳定,标准曲线 R^2 达到了 0.999。

分离纯化得到的两个组分 EPS I 和 EPS II,核酸质量分数均小于 0.025%,蛋白质质量分数分别为 3.97% 和 1.35%。作者认为经过多步分离纯化后,除了上述的核酸和蛋白质以外,脂肪和其它杂质已经极微,因此 EPS I 和 EPS II 的实际纯度分别接近于 96.01% 和 98.63%。但是,作者测定的质量分数以葡聚糖为对照时分别为 61.34% 和 52.81%,以葡萄糖为对照时分别为 54.48% 和 47.48%。作者认为这一方面是由于盐藻胞外多糖的单糖基不一定是葡萄糖或者不单单是葡萄糖,从而造成了显色的差异;另一方面即使单糖基组成一致,但是如果糖基连接方式不同也可能引起显色的差异。因此,作者认为以这两种糖为对照测定盐藻胞外多糖的含量时都需要进行校正。

3 结 语

1) 采用超滤浓缩脱盐、乙醇沉淀、丙酮和无水乙醚洗涤去脂、双酶解除蛋白和 DE-52 阴离子交换柱层析等单元技术提取纯化盐藻胞外多糖方法是可行的,能够得到较高纯度的单一组分。

2) 改进后的硫酸-苯酚法具有较好的线性关系, R^2 可以达到 0.999 以上。

3) 无论是用葡聚糖为对照还是以葡萄糖为对照来测定盐藻胞外多糖粗品时都需要进行校正, $K_{\text{(葡聚糖-粗多糖)}}$ 为 1.62, $K_{\text{(葡萄糖-粗多糖)}}$ 为 1.82。

参考文献(References):

- [1] 陈峰,姜悦. 微藻生物技术[M]. 北京:中国轻工业出版社,1999.
- [2] 丁新,李玲凤. 关于盐藻多糖的研究[J]. 盐湖盐与化工,2000,24(6):4-6.
DING Xin, LI Ling-feng. Study on the polysaccharides from *Dunaliella salina* [J]. *Sea-Lake Salt & Chemical Industry*, 2000,24(6):4-6. (in Chinese)
- [3] Fabregas J, Garcia D, Fernandez-Alonso M. *In vitro* inhibition of the replication of haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) and African swine fever virus (ASFV) by extracts from marine microalgae[J]. *Antiviral Res*, 1999, 44 (1):67-73.
- [4] 顾宇琰,刘宇峰. 紫球藻胞外多糖抗辐射的生物学活性研究[J]. 海洋科学,2002,26(12):53-56.
GU Ning-yan, LIU Yu-feng. Antiirradiation activities of extracellular polysaccharide of *Porphyridium sp* [J]. *Marine Sciences*, 2002,26 (12):53-56. (in Chinese)
- [5] 吴洁,张成武,刘义峰,等. 极大螺旋藻胞外多糖 EP II 的分离、纯化及免疫学研究[J]. 药物生物技术,1999, 6 (2): 99-102.
WU Jie, ZHANG Cheng-wu, LIU Yi-feng. Isolation, purification and immunological activities of extracellular polysaccharide EP II from *Spirulina Maxima* [J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 1999, 6 (2): 99-102. (in Chinese)
- [6] 邵雪玲. 蓝藻 *Trichodesmium thiebautii* 细胞外多糖的抗癌活性[J]. 氨基酸和生物资源,2001,34(4):14-16.
SHAO Xue-ling. Antitumor activity of extracellular polysaccharide from *Cyanobacterium Trichodesmium thiebautii* [J]. *Amino Acids & Biotic Resources*, 2001,34(4):14-16. (in Chinese)

- [7] Umemura K, Yanase K, Suzuki M, et al. Toshiwo Inhibition of DNA topoisomerases I and II, and growth inhibition of human cancer cell lines by a marine microalgal polysaccharide[J]. **Biochemical Pharmacology**, 2003, 66(3): 481-487.
- [8] Hehehel M, Ishanu V, Tal J, et al. Activity of *Porphyridium sp.* polysaccharide against herpes simplex viruses *in vitro* and *in vivo*[J]. **J Biochem Biophys Methods**, 2002, 50: 189.
- [9] Shibata H, Kimura-Takagi I, Nagaoka M, et al. Properties of fucoidan from cladosiphon okamuranus tokida in gastric mucosal protection[J]. **Biofactors**, 2000, 11(4): 235-245.
- [10] 赵永芳, 谢志, 谢风祥, 等. 盐藻多糖复合物的提取及性质的研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 1993, 20(3): 126-127.
ZHAO yong-fang, XIE Zhi, XIE Feng-xiang, et al. Studies on the extraction and characterization of polysaccharide complex from *Dunaliella salina*[J]. **Progress In Biochemistry and Biophysics**, 1993, 20(3): 126-127. (in Chinese)
- [11] 韩少卿, 赵芹, 彭奇均. 膜分离技术提取海藻糖的工艺[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(2): 93-96.
HAN Shao-qing, ZHAO Qin, PENG Qi-jun. Trehalose extraction by the technology membrane separation[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2005, 24(2): 93-96.
- [12] 孙锋, 谷文英, 丁霄霖. 山药粗多糖的提取工艺[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(3): 79-83.
SUN Feng, GU Wen-ying, DING Xiao-lin. Study on the extraction technology of polysaccharide from *Dioscorea oppositifolia* Thunb[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2006, 25(3): 79-83. (in Chinese)
- [13] 吴焱秋. 骨骼肌蛋白分解途径的研究进展[J]. 国外医学·创伤与外科基本问题分册, 2000, 21: 216-219.
WU Yan-qiu. The study progress of skeletal muscle proteolysis approach[J]. **Foreign Iatrology · Wound and Surgery Basic Question Fascicule**, 2000, 21: 216-219. (in Chinese)
- [14] 孙玉军, 陈彦, 王洵, 等. 蜜环菌胞外多糖的分离纯化及其性质研究[J]. 安徽大学学报(自然科学版), 2005, 29(5): 87-91.
SUN Yu-jun, CHEN Yan, WANG Xun, et al. Studies on the isolation, purifications and characterization of an extracellular polysaccharide from *Armillaria mellea*[J]. **Journal of Anhui University Natural Science Edition**, 2005, 29(5): 87-91. (in Chinese)
- [15] 孙元琳, 顾小红, 汤坚, 等. 当归水溶性多糖的分离、纯化及结构初步分析[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(1): 1-4.
SUN Yuan-lin, GU Xiao-hong, TANG Jian, et al. The preparation, purification and structure analysis of water-soluble polysaccharides from *Angelica sinensis*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2006, 25(1): 1-4. (in Chinese)
- [16] Dubis M. Colorimetric method for determination of sugar and related substance[J]. **Anal chem**, 1956, 28: 350-354.
- [17] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2004.
- [18] 高英, 俞玉忠. 福林酚法测定脑蛋白水解物溶液中的多肽含量[J]. 海峡药学, 2004, 16(6): 56-58.
GAO Ying, YU Yu-zhong. Determination of the peptide contents in cerebroprotein hydrolysate by Folin-phenol reagent method[J]. **Strait Pharmaceutical Journal**, 2004, 16(6): 56-58. (in Chinese)

(责任编辑: 朱明)