

水蛭的湿法超微粉碎提取及其工艺优化

朱华明¹, 付廷明¹, 郭立玮^{1*}, 刘峰², 张伟²

1. 南京中医药大学 中药复方分离工程重点实验室, 江苏 南京 210029

2. 陕西步长制药有限公司, 陕西 西安 710075

摘要: 目的 优选湿法超微粉碎提取水蛭的最佳工艺。方法 在单因素试验基础上, 以料液比、浸泡时间、提取温度和粉碎时间为自变量, 根据 Box-Behnken 原理采用 4 因素 3 水平的响应面分析法, 以抗凝血酶活性为响应值, 对湿法超微粉碎提取条件进行优化。结果 湿法超微粉碎提取水蛭的最佳工艺条件: 料液比为 1:12, 浸泡时间为 4.9 h, 提取温度为 6.5 °C, 粉碎时间为 12 min, 其抗凝血酶活性达到 20.13 U/g。结论 湿法超微粉碎提取技术适用于水蛭的提取, 本实验优选的提取工艺稳定可行, 适于进一步推广应用。

关键词: 湿法超微粉碎; 水蛭; 响应面分析法; 抗凝血酶活性; 中心组合试验设计

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)15-2079-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.15.011

Optimization of wet ultrafine grinding technology for *Hirudo* extraction

ZHU Hua-ming¹, FU Ting-ming¹, GUO Li-wei¹, LIU Feng², ZHANG Wei²

1. Key Laboratory of Separation Engineering for Chinese Medicine Compound, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

2. Shanxi Buchang Pharmaceutical Co., Ltd., Xi'an 710075, China

Abstract: Objective To study the optimal extraction for *Hirudo* by wet ultrafine grinding technology. **Methods** On the basis of single-factor experiments, the response surface analysis was made for exploring the optimal extraction conditions by wet ultrafine grinding technology for *Hirudo*, with solid-liquid ratio, soaking time, extraction temperature, and grinding time as independent variable and the anticoagulant activity as the response value. According to Box-Behnken principles, the response surface analysis method with four factors and three levels was used. **Results** The optimum extraction condition for *Hirudo* by wet ultrafine grinding technology was as follows: solid-liquid ratio 1:12, soaking time 4.9 h, extraction temperature 6.5 °C, grinding time 12 min; The anticoagulant activity could reach 20.13 U/g. **Conclusion** The extraction by wet ultrafine grinding technology for Chinese materia medica *Hirudo* is stable and feasible, and it could be further promoted.

Key words: wet ultrafine grinding; *Hirudo*; response surface method; anticoagulant activity; central composite test design

水蛭为水蛭科动物蚂蟥 *Whitmania pigra* Whitman、水蛭 *Hirudo nipponica* Whitman 或柳叶蚂蟥 *Whitmania acranulata* Whitman 的干燥全体, 具有破血通经、逐瘀消癥的功效^[1]。传统中医临床用药, 水蛭常用于治疗心血管类疾病^[2-3]。现代药理学研究表明, 中药水蛭提取所得的蛋白质组分, 在抗凝血、抗血栓形成等方面具有很强的生物活性^[4-6]。然而,

采用传统水提或者醇提工艺, 蛋白质会受到高温或者有机溶剂破坏而变性, 进而影响其药理活性。

基于中药材细胞结构的提取动力学研究表明, 减小药材的粒径, 尤其是细胞级超微粉碎能减小扩散的阻力、缩短成分溶出的路径、增加溶出的面积, 有利于有效成分的快速完全溶出。但采用干式超微粉碎技术, 使药材达到细胞级粉碎, 然后再加水煎

收稿日期: 2013-03-03

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(子课题 2011ZX09401-308-008); 国家科技重大专项子课题: 中药大品种脑心通胶囊技术改造研究(2011ZX09201-201-26); 陕西省科技统筹创新工程计划课题(2011KTZB03-01-04)

作者简介: 朱华明, 硕士研究生, 从事药物新剂型与新技术研究。Tel: 13770672459 E-mail: mingzhuta@163.com

*通信作者 郭立玮, 博士生导师, 从事药物新剂型与新技术研究。Tel: 13952091198 E-mail: guoliwei815@yahoo.com.cn

网络出版时间: 2013-07-05 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130705.1557.016.html>

煮的方法,虽然可提高提取效率,却往往导致药材微粒在煎煮时由于粒径过小而出现糊化、粘壁、滤过困难等问题,工艺无法工业化。经过反复研究,笔者科研团队发现采用湿法超微粉碎技术,可使粉碎与提取一步完成,大大提高提取的效率。由于是常温粉碎,所以能避免药材中淀粉类物质的糊化,克服细粒径药材煎煮时固液分离的难题。

湿法超微粉碎提取是在药材与溶剂共存的状态下,应用强大机械振动研磨组织,使溶剂迅速到达组织内部,通过减小药材粒径、增加溶出面积、缩短成分溶出路径、从而提高提取效率的一种提取新技术^[7]。其原理在于湿法超微粉碎过程中,有效成分的溶出除了具有扩散阻力小、溶出路径短、溶出面积大的优势外,吸收了溶剂的药材颗粒还不断的受到机械力的剪切、挤压,直至达到细胞级粉碎,这些机械力极大地增加了溶剂的对流,提高了质量传递系数,促使有效成分迅速地向溶剂转移。该提取技术在较短的时间内即可完成药物提取,且整个操作过程可控制在低温条件下进行,尤其适用于一些热敏性药物的提取,如蛋白质、多肽类成分。

响应面分析法(response surface method, RSM)是一种将数学方法和统计方法结合的产物,可用于确定各因素及其交互作用在加工过程中对非独立变量的影响,精确地表达因素和响应值之间的关系,是一种优化反应条件和加工工艺参数的有效方法^[8-9]。近年来,由于统计学在各个领域中的发展和应用,响应面分析法的应用领域进一步拓展,其广泛应用于化学工业、医药卫生及生物制药领域^[10-12]。

目前,水蛭提取工艺主要为水提和醇提^[13-14],而采用湿法超微粉碎提取技术提取动物类药材报道甚少,本实验采用湿法超微粉碎提取技术,以水蛭的体外抗凝药效为指标,利用响应面分析法对提取参数进行优化,为水蛭的抗血栓药物深度开发提供科学依据。

1 仪器与材料

贝利超微粉碎机(济南倍力粉体技术工程有限公司);Anke TGL—16C型离心机(上海安亭科学仪器厂);HH—6电热恒温水浴锅(上海跃进医疗器械厂);PHS—3C型精密pH计(上海精密科学仪器有限公司);白瓷板(南京大光明器化波经营部)。

水蛭(批号120918,安徽省亳州市中西药有限公司),经南京中医药大学药学院药用植物鉴定教研室刘训红教授鉴定为水蛭科动物蚂蟥 *Whitmania*

pigra Whitman 的干燥全体;牛凝血酶(批号140626-201009)、纤维蛋白原(批号140625-201009)均购自中国药品生物制品检定所。

2 方法与结果

2.1 水蛭提取液的制备

称取干燥水蛭适量,粗粉碎过2号筛,精密称取水蛭粗粉100 g,分别加入5、10、15、20倍量的水,浸泡后将混悬液倒入贝利超微粉碎机中,设定粉碎时间后运行;将得到的水蛭混悬液离心(12 000 r/min)10 min后,取适量上清液,备用。

2.2 水蛭抗凝活性的测定

2.2.1 阴性溶液的制备 精密称取NaCl固体0.9 g,加入100 mL去离子水中,待其溶解后用0.2 μm微孔滤膜滤过,配成0.9%氯化钠溶液作为阴性溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密量取1 mL水蛭提取液于5 mL量瓶中,加0.9%氯化钠溶液稀释至刻度,混合均匀后用0.2 μm微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.2.3 凝血酶溶液的配制 用0.9%生理盐水配制成40 U/mL凝血酶溶液,−40 °C冷冻保存,临用前解冻取少量稀释成10 U/mL。

2.2.4 缓冲液的配制 取0.2 mol/L三羟甲基氨基甲烷溶液25 mL与0.1 mol/L盐酸溶液40 mL,加水至100 mL,调pH值至7.4,加入0.5 g纤维蛋白原溶解,即得0.5%纤维蛋白原的三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲液^[15]。

2.2.5 样品测定 将白瓷板浸于37 °C水浴中温浸5 min,加入缓冲溶液200 μL,分别加阴性溶液与供试品溶液各100 μL,混匀。滴加10 U/mL的凝血酶2 μL,秒表开始计时至1 min,用解剖针不断搅拌,观察白瓷板内溶液是否胶冻化或者出现拉丝,若无,则每隔1 min滴加凝血酶2 μL,直至出现胶冻或者拉丝为止,记录所用时间^[16]。按照下列公式计算其量: $U=t/120$ C, U为每1 g含凝血酶活性单位(U/g), t为供试品的抗凝固时间(s), C为供试品溶液的质量浓度(g/mL)。

2.3 水蛭湿法超微粉碎提取工艺的单因素试验

2.3.1 浸泡时间对抗凝活性的影响 在料液比为1:10,提取温度为25 °C,粉碎时间为5 min的条件下,考察不同浸泡时间(0、4、8、12、24 h)对水蛭抗凝活性的影响,结果抗凝活性分别为16.793、18.780、18.428、18.168、17.602 U/g。当水蛭粗粉不经浸泡而直接进行湿法超微粉碎时,其抗凝活性

明显低于其他经过浸泡处理的4组；当浸泡时间为4 h时，其抗凝活性达到最大值，随着时间的增加，其抗凝活性不增反减，可能是因为在常温25℃环境下其活性成分在微生物作用下发生了分解。因而以浸泡时间4 h为最佳条件。

2.3.2 料液比对抗凝活性的影响 在浸泡时间为4 h，提取温度为25℃，粉碎时间为5 min的条件下，考察不同料液比（1：5、1：10、1：15、1：20）对水蛭抗凝活性的影响，结果抗凝活性分别为15.983、18.859、18.640、18.396 U/g。当料液比为1：5时，其抗凝活性最低，可能是由于原液浓度过高，其活性成分无法充分溶出而导致；而当料液比为1：10、1：15、1：20时，其抗凝活性基本相同。从节能、经济的角度来看，料液比1：10为最佳条件。

2.3.3 提取温度对抗凝活性的影响 在浸泡时间为4 h，料液比为1：10，粉碎时间为5 min的条件下，考察不同提取温度（0、25、50、75℃）对水蛭抗凝活性的影响，结果抗凝活性分别为19.936、18.946、16.170、12.333 U/g。0℃与25℃条件下所得提取液的抗凝活性值相差不大，而当温度高于25℃时，部分蛋白发生变性而沉淀，在高速离心下被除去，其抗凝活性也逐渐降低，当温度升至75℃，其活性值已显著低于其他各组；由于0℃低温提取需要更多的能耗，因此选择最佳提取温度为25℃。

2.3.4 粉碎时间对抗凝活性的影响 在浸泡时间为4 h，料液比为1：10，提取温度为25℃的条件下，考察不同粉碎时间（2、5、10、15 min）对水蛭抗凝活性的影响，结果抗凝活性分别为15.948、19.829、20.235、19.894 U/g。当粉碎时间为2 min时，其抗凝活性明显低于其他时间，可能是因为粉碎时间太短，活性成分无法完全溶出；当粉碎时间为10 min时，其抗凝活性已经达到最高值。

单因素试验结果表明，最佳提取条件：浸泡时间为4 h，料液比为1：10，提取温度为25℃，粉碎10 min。在此基础上，选择浸泡时间0、4、8 h，料液比1：5、1：10、1：15，提取温度0、25、50℃，粉碎时间5、10、15 min进行后续响应面法设计，优化提取工艺参数。

2.4 优选工艺

2.4.1 试验因素与抗凝活性模型建立 以料液比（A）、浸泡时间（B）、提取温度（C）以及粉碎时间（D）作为自变量，以水蛭提取液的抗凝活性为

响应值，根据Box-Behnken原理进行试验。

2.4.2 回归模型的方差分析 根据表1的试验数据，利用Design-Expert 7.1.6软件进行多元回归分析，所得的主要方差分析结果见表2，并得到回归方程 $Y=6.77+1.46 A+0.36 B+0.03 C+0.69 D+0.000\ 863 AB-0.004\ 31 AC-0.001\ 76 AD+0.002\ 2 BC-0.006\ 79 BD+0.001\ 81 CD-0.06 A^2-0.03 B^2-0.001\ 18 C^2-0.03 D^2$ 。

由表2可以看出，用上述回归方程描述各因子与响应值之间的关系和其因变量与自变量之间的关系时，其因变量和自变量之间的线性关系是显著的，

表1 试验设计及结果

Table 1 Test design and results

试验号	A	B/h	C/℃	D/min	抗凝活性/(U·g ⁻¹)
1	1：10 (0)	8 (1)	25 (0)	15 (1)	19.486
2	1：10 (0)	0 (-1)	25 (0)	5 (-1)	17.167
3	1：10 (0)	4 (0)	25 (0)	10 (0)	19.904
4	1：10 (0)	8 (1)	0 (-1)	10 (0)	20.131
5	1：5 (-1)	4 (0)	0 (-1)	10 (0)	17.420
6	1：10 (0)	4 (0)	50 (1)	5 (-1)	16.010
7	1：10 (0)	8 (1)	25 (0)	5 (-1)	18.276
8	1：10 (0)	4 (0)	25 (0)	10 (0)	19.657
9	1：10 (0)	0 (-1)	0 (-1)	10 (0)	19.306
10	1：5 (-1)	0 (-1)	25 (0)	10 (0)	16.756
11	1：5 (-1)	8 (1)	25 (0)	10 (0)	17.233
12	1：10 (0)	4 (0)	0 (-1)	5 (-1)	18.542
13	1：15 (1)	0 (-1)	25 (0)	10 (0)	18.057
14	1：10 (0)	4 (0)	0 (-1)	15 (1)	20.041
15	1：15 (1)	8 (1)	25 (0)	10 (0)	18.603
16	1：10 (0)	4 (0)	50 (1)	15 (1)	18.414
17	1：5 (-1)	4 (0)	25 (0)	15 (1)	17.286
18	1：10 (0)	0 (-1)	25 (0)	15 (1)	18.920
19	1：15 (1)	4 (0)	25 (0)	15 (1)	18.843
20	1：10 (0)	8 (1)	50 (1)	10 (0)	18.169
21	1：10 (0)	0 (-1)	50 (1)	10 (0)	16.466
22	1：5 (-1)	4 (0)	50 (1)	10 (0)	16.658
23	1：15 (1)	4 (0)	25 (0)	5 (-1)	17.905
24	1：15 (1)	4 (0)	50 (1)	10 (0)	16.254
25	1：10 (0)	4 (0)	25 (0)	10 (0)	19.727
26	1：15 (1)	4 (0)	0 (-1)	10 (0)	19.173
27	1：5 (-1)	4 (0)	25 (0)	5 (-1)	16.172
28	1：10 (0)	4 (0)	25 (0)	10 (0)	19.703
29	1：10 (0)	4 (0)	25 (0)	10 (0)	19.418

表2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	F 值	P 值
模型	45.36	14	29.45	<0.000 1
A	4.45	1	40.47	<0.000 1
B	2.28	1	20.68	0.000 5
C	13.32	1	121.04	<0.000 1
D	6.63	1	60.23	<0.000 1
AB	0.001 19	1	0.011	0.918 6
AC	1.16	1	10.57	0.005 8
AD	0.007 744	1	0.070	0.794 7
BC	0.19	1	1.75	0.206 9
BD	0.074	1	0.67	0.426 8
CD	0.20	1	1.86	0.194 1
A ²	14.91	1	135.53	<0.000 1
B ²	1.56	1	14.15	0.002 1
C ²	3.54	1	32.13	<0.000 1
D ²	2.99	1	27.14	0.000 1
残差	1.54	14		
失拟度	1.42	10	4.65	0.076 0
纯误差	0.12	4		
总离差	46.90	28		
$R^2=0.967\ 2$		$R_{adj}^2=0.934\ 3$		

 $P<0.05$ 差异显著; $P<0.01$ 差异极显著 $P<0.05$ significant difference; $P<0.01$ extremely significant difference

决定系数为 0.967 2, 说明回归方程的拟合程度很好; 其模型的 $P<0.000\ 1$, 说明该模型极显著; 失拟度的 $P=0.076>0.05$, 说明失拟程度不显著; 因此, 可以用此模型对湿法超微粉碎提取水蛭活性蛋白进行分析和优化。

通过观察表 2, 可以看出二次项中的 AB、AD、BC、BD、CD 项的概率 P 均 >0.05 , 而 AC 项的 $P=0.005\ 8<0.01$, 由此判断各因素间仅有浸泡时间和提取温度的交互作用对水蛭提取液的抗凝活性影响极为显著, 其他各因素间的交互作用不明显。而 A、B、C、D、A²、B²、C²、D² 项的概率 $P<0.01$, 表明 4 个因素均对水蛭提取液的抗凝活性有极显著影响, 且响应值与因素之间并不仅仅是简单的线性关系。

2.4.3 等高线图和响应面图分析 回归优化所得的响应面曲面图见图 1。根据所得二次多项回归方程, 固定 C (提取温度) 为 25 °C、D (粉碎时间) 为 10 min, 可作出料液比 (因素 A) 与浸泡时间 (因素 B) 的交互图, 该图的曲面较为平缓, 表明因素 A 与 B 交互作用较小。同理, 浸泡时间 (因素 B) 与提取温度 (因素 C)、提取温度 (因素 C) 与粉碎时间 (因素 D) 之间的交互图, 其曲面趋势较为平缓, 各等高线间的距离较大, 表明因素 B 与 C、因素 C 与 D 交互作用不明显。

根据所得二次多项回归方程, 固定 B (浸泡时

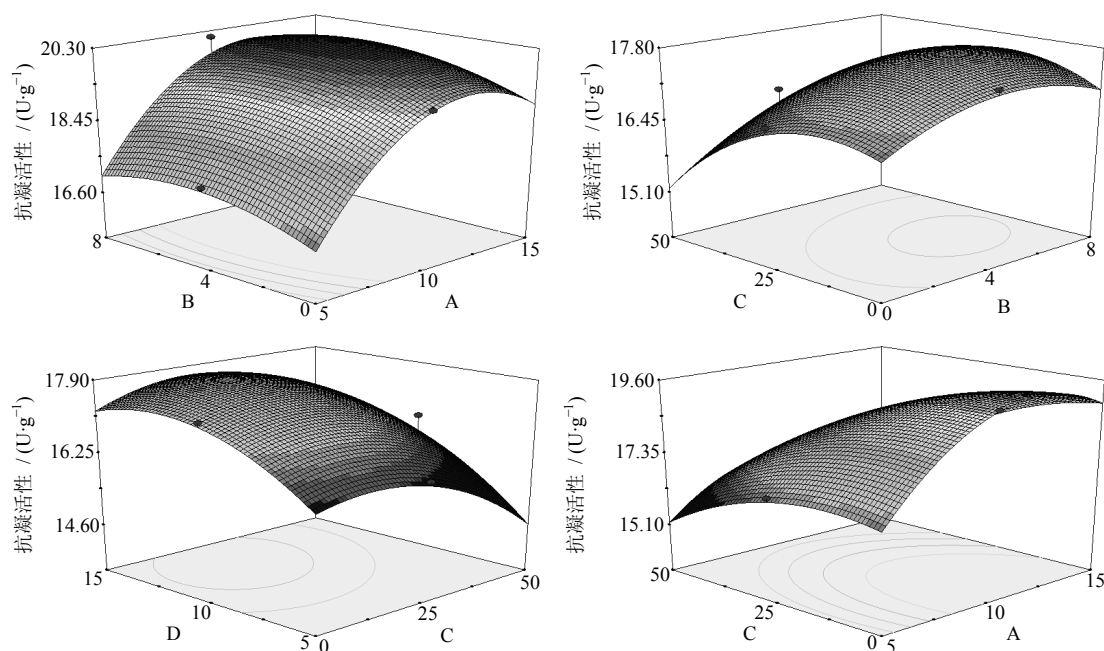


图1 交互作用

Fig. 1 Interaction effects

间)为4 h、D(粉碎时间)为10 min,可作出料液比(因素A)与提取温度(因素C)的交互图,由图可知,随着料液比的增大,响应值为一曲面,在料液比为1:10时,具有极大值,而提取温度与响应值呈负相关,提取温度越高,其响应值越小,当提取温度为0℃时,响应值最大。该图中曲线坡度较陡,其等高线间的距离较为窄小,表明因素A与因素C交互作用明显。

2.5 最优工艺的确定及验证试验

为得到水蛭湿法超微粉碎的最佳提取条件,对回归方程求一阶偏导数等于零,整理得: $1.46+0.000\ 863\ B-0.004\ 31\ C-0.001\ 76\ D-0.12\ A=0$, $0.36+0.000\ 863\ A+0.002\ 2\ C-0.006\ 79\ D-0.06\ B=0$, $0.03-0.004\ 31\ A+0.002\ 2\ B+0.001\ 81\ D-0.002\ 36\ C=0$, $0.69-0.001\ 76\ A-0.006\ 79\ B+0.001\ 81\ C-0.06\ D=0$ 。求解方程组,可以得到湿法超微粉碎提取水蛭抗凝活性成分的最优工艺:料液比为1:12,浸泡时间为4.9 h,提取温度为6.5℃,粉碎时间为12 min,在此条件下得到的样品溶液理论抗凝活性值为20.36 U/g。

采用该最佳工艺条件进行验证,平行3次,其抗凝活性分别为20.07、20.20、20.12 U/g,平均抗凝活性为20.13 U/mL,与模型预测值基本相符,其RSD为0.33%,重复性较好。

3 讨论

传统中医临床用药,水蛭常以水煎入药。然而,传统水煎提取,往往要花费大量的时间,更为重要的是,动物类中药,其活性组分大多为蛋白质,多肽等成分,这类热敏性组分,在加热提取过程中受到破坏,失去了原有的活性,进而影响药效。通过本课题组前期针对地龙、全蝎等动物药相关湿法超微粉碎提取的研究表明^[17-19],该技术能充分将粉碎与提取有机结合,时间短、效率高,并能避免高温对一些活性蛋白成分的破坏,值得进行深入研究和工业推广。

中药水蛭中起抗凝作用的主要为蛋白质组分,但采用Bradford法、Lowry法、BCA法等测定其蛋白的量,并不能精确反映其抗凝活性的大小。1970年Markwardt^[20]报道的凝血酶滴定法,其原理是根据水蛭抗凝活性成分与凝血酶结合比例为1:1,而凝血酶已有国际单位NIH,水蛭素的活性以抗凝血酶活力单位U表示,一个U等于中和一个NIH凝血酶的水蛭素量。此方法简便经济,广为应用,但

在实际滴定操作中发现,在试管中的反应不利于观察其滴定终点,即形成凝固,通过将其置于白瓷板中,滴加溶液混合均匀,并以拉丝为计时终点,观察和计时都较为准确,有利于其抗凝活性的测定。

优化工艺最常用的方法是正交设计法,正交设计能较为全面地考察多因素多水平,所用试验次数少、方法简便、结果可靠、能优选出影响指标的显著因素,得到最佳因素水平组合,但多采用线性模型,存在无法找出整个区域上因素的最佳组合和响应值的缺点,与实际情况可能有偏差。响应面优化法是将回归方法作为函数估算工具,将多因子试验根据回归因子与试验结果的相互关系用多项式近似得把因子与试验结果的关系函数化,能够在整个区域上找到因素和响应值之间明确回归方程,进而得到整个区域里因素的最佳组合和响应值的最佳值,其实验精度更高,具有更好的预测性^[21]。本研究通过响应面分析法对湿法超微粉碎提取水蛭工艺进行优化,结果表明此方法具有良好的应用性和预测性,所得到的水蛭提取液具有较高的体外抗凝活性,其体内发生的抗凝作用是否有显著提高,则有待于进一步研究论证。

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2010.
- [2] 梁文艳.水蛭的临床应用概况[J].吉林中医药,2005,25(10):58-59.
- [3] 张希成,李刚.水蛭的药理与临床应用[J].中医中药,2006,3(17):123.
- [4] 王浴生.中国药理与应用[M].第2版.北京:人民卫生出版社,1998.
- [5] 朱正光,吴曙光,孙燕荣.水蛭水煎液抗栓作用机制的体外实验研究[J].中国生化药物杂志,2001,22(5):229-231.
- [6] 姜波,张志武,张健辉.水蛭提取物抗血栓作用的实验研究[J].中国中医药科技,2004,11(2):83.
- [7] 郭立玮.中药分离原理与技术[M].北京:人民卫生出版社,2010.
- [8] 汪仁官.试验设计与分析[M].北京:中国统计出版社,1998.
- [9] 孟宪颐.响应面法在可靠性优化设计中的应用[J].北京建筑工程学院学报,1999,21(3):31-36.
- [10] Myers R H. Response surface methodology—current status and future directions[J]. J Qual Technol, 1999, 31(1): 30-43.
- [11] Carter W H, Wampler G L, Stablein D M. Review of the

- application of response surface methodology in the combination therapy of cancer [J]. *Cancer Treat Rep*, 1983, 70: 133-140.
- [12] 张 晖. 响应面法分析卫生填埋渗滤液的 Fenton 处理过程 [J]. 环境科学, 2003, 24(4): 140-143.
- [13] 于栋华, 张 颖, 徐红英, 等. 水蛭水煎醇沉工艺的正交设计研究 [J]. 中医药信息, 2011, 28(6): 75-76.
- [14] 吴喜国, 肖光艳, 韩 志. 水蛭醇提物的抗血栓作用研究 [J]. 牡丹江医学院学报, 2009, 30(2): 35-37.
- [15] 范尚坦, 李金兰, 张 勇, 等. 水蛭中水蛭素含量测定的改进 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(19): 2277-2279.
- [16] 万 明, 汪 蜜, 刘义梅, 等. 宽体金钱蛭抗凝血活性物质的提取方法 [J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(6): 414-417.
- [17] 杨丰云, 付廷明, 郭立玮, 等. 响应面分析法优化湿法超微粉碎地龙蛋白的提取工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10): 33-37.
- [18] 杨丰云, 付廷明, 郭立玮, 等. 地龙湿法超微粉碎提取物在模拟胃肠环境中的降解研究 [J]. 药学学报, 2012, 47(1): 110-115.
- [19] 田晓然, 付廷明, 郭立玮. 湿法超微粉碎-超滤法快速提取浓缩全蝎蛋白可行性考察 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(22): 13-16.
- [20] Markwardt F. Hirudin as an inhibitor of thrombin [J]. *Methods Enzymol*, 1970, 69: 924-932.
- [21] 陈 敬, 温庆果, 刘 韶, 等. 正交设计与响应面法优化壳聚糖对莲子心提取液除杂工艺对比研究 [J]. 中草药, 2012, 43(11): 2183-2188.