

牛肺脏中肝素提取工艺优化

杨怀彬¹, 张 丽¹, 韩 玲^{1,*}, 曹 晖²

(1. 甘肃农业大学食品科学与工程学院, 甘肃兰州 730070;

2. 陕西秦宝牧业发展有限公司, 陕西宝鸡 722300)

摘 要:本研究以牛肺脏为原料, 采用盐解-树脂吸附及蛋白质沉淀除去杂质的方法提取和分离肝素。在单因素实验基础上, 选取料液比、盐浓度、树脂用量, 利用旋转正交组合设计原理和响应面分析法进行工艺优化。结果表明, 最佳提取工艺为料液比 1:15 (g:mL), 盐浓度 5%, 树脂量 7%, 此条件下肝素得率理论值为 362.02mg/kg, 验证实验肝素得率为 356.65mg/kg。盐解-树脂吸附方法可行可靠, 重复性好, 提取完全, 更适合工厂化生产, 且为秦宝雪花牛肺脏中肝素的开发利用提供理论依据。

关键词:肝素, 响应面, 盐解-树脂吸附, 提取

Optimization of heparin extraction process from bovine lung

YANG Huai-bin¹, ZHANG Li¹, HAN Ling^{1,*}, CAO Hui²

(1. College of Food Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. Shaanxi Qinbao Animal Husbandry Development Co., Ltd., Baoji 722300, China)

Abstract: The bovine lungs as the research material, extracted and separated heparin with the salt solution-resin adsorption and protein to remove impurities precipitation method. Three extraction parameters including material liquid ratio, salt concentration and resin content were optimized using rotating orthogonal combination design principle and the response surface method for process optimization. The results indicated that the best extraction process were material liquid ratio for 1:15 (g:mL), salt concentration at 5% and resin content of 7%. According to these conditions, the yield of heparin was 362.02mg/kg, and under the verificative test condition the practical values was 356.65mg/kg. Salt solution-resin adsorption method was feasible and reliable, repeatability, extraction completely, more suitable for industrial production and providing the theory for the development and utilization of lungs heparin of QinBao cattle.

Key words: heparin; response surface; salt solution-resin adsorption; extract

中图分类号: TS255.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2012)19-0214-05

中国年产牛肉约 700 万 t, 牛肺脏的量约为 75 万 t, 牛肺脏中含有非常丰富的肝素, 这就为大量生产肝素提供材料来源。肝素 (Heparin), 是由 β -D-葡萄糖醛酸 (或 α -L-艾杜糖醛酸) 和 N-乙酰氨基葡萄糖形成重复二糖单位组成的黏多糖, 其不但有抗凝血、抗血栓形成的作用, 还有抗炎、抗过敏等生物学功能^[1-2]。肝素主要是由紧靠血管的肥大细胞产生, 并贮存于肥大细胞的颗粒中, 一定的刺激下释放^[3-4]。肝素最早从肝脏中提取, 1916 年美国学者 Mcleen 在研究凝血问题中, 成功地从狗的肝脏提取了肝素^[5], 1940 年正式纳入美国药典用于临床医学, 至今已有 70 余年历史。目前国内外肝素都是从动物脏器中提取得到的天然肝素及其化合物, 近半个世纪随着科学技术的发展和深入研究发现动物肺脏和心脏中肝素逐渐

被发现。现有肝素的提取方法有盐解-树脂交换法、酶解-树脂交换法、超声波辅助盐解法和盐解酶解结合法。本实验采用盐解-树脂交换法对牛肺脏肝素提取工艺进行研究和探究, 实验简单、安全、可靠、经济节约, 为工厂化生产和对牛肺脏肝素提取提供理论和技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

牛肺脏 陕西秦宝牧业发展有限公司秦宝雪花牛, 屠宰后直接取肺脏装袋标记放入 -4℃ 冷库中冷冻, 在冷冻条件下运到实验室, 放在 -80℃ 冷冻室, 在 7 天时间内完成实验; 肝素标准品 中国药物生物检定所 (北京); 陶氏 AMBERLITE™ FPA98CL 食品级特种聚合物 (树脂) 上海唯高实业有限公司; 氢氧化钠、硫酸、硼砂、乙醇 (95%) 均为分析纯。

JJ-2B 组织捣碎匀浆机 金坛市医疗仪器厂; PH-3C 计 上海佑科仪器仪表有限公司; 真空干燥箱 上海一恒科学仪器有限公司; 756P 紫外-可见分光光度计 上海光谱仪器有限公司; 洗脱柱

收稿日期: 2012-04-16 * 通讯联系人

作者简介: 杨怀彬 (1989-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 畜产品加工。

基金项目: 国家现代农业 (肉牛牦牛) 产业技术体系项目资助 (CARS-38)。

Φ 30mm × 300mm 大连日普利科技仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 肝素的提取工艺流程 原料→提取→吸附→洗涤→洗脱→沉淀→脱水干燥→肝素钠粗品

1.2.2 具体操作要点

1.2.2.1 预处理 将牛肺样品从冷冻室内取出,在自然条件下解冻。解冻完毕取牛肺样品 100g,按 1:10 (g:mL)加入蒸馏水,在组织捣碎机中充分破碎至肉糜状,转移至 1000mL 烧杯中备用。

1.2.2.2 提取 采用 2mol/L NaOH 溶液调杯内肉糜 pH 至 8.5,加入样品量的 5% 的 NaCl 60℃ 下每间隔 10min 搅拌 30s,连续进行此操作 2h,2h 后立即升温至 100℃,静置 10min 沉淀蛋白,以 100 目筛过滤,收集滤液^[6-8]。

1.2.2.3 吸附 滤液冷却至 50℃,用 2mol/L NaOH 调 pH 至 8.5,加入 8% 树脂(树脂用蒸馏水冲洗至中性),于恒温磁力搅拌器中 50℃ 下,连续吸附 8h,以 100 目筛过滤,收集树脂备用。

1.2.2.4 洗涤和洗脱 将树脂装入洗脱柱,以蒸馏水反复冲洗至无色,用 1.2mol/L 的 NaCl 浸泡洗涤树脂 30min,弃滤液。在树脂洗脱柱中加入 5mol/L 的 NaCl 浸泡 3h,用烧杯收集浸提液;再用 3.5mol/L 的 NaCl 浸泡 2h(连续两次),用同一个烧杯收集液体,滤液烧杯中备用。

1.2.2.5 沉淀蛋白 将滤液用 1:1 (V:V) 的 HCl 调 pH 至 3.5,静置 30min,沉淀酸蛋白,用滤纸过滤;将上次滤液用 2mol/L NaOH 调 pH10,静置 3h,沉淀碱蛋白,用滤纸过滤,滤液备用。

1.2.2.6 乙醇沉淀 取滤液用 1.5 倍体积 95% 乙醇加入烧杯中,摇匀静置 12h,真空抽滤,保留固体,滤液收集进行乙醇回收。

1.2.2.7 粗品干燥 把抽滤得到的固体在真空干燥箱中 60℃ 下真空干燥,用天平称量至两次的称量重量相差在 0.02g 即达到恒重,得到肝素粗品。

1.2.3 肝素提取工艺优化设计 选取料液比 (g:mL)、盐浓度、树脂用量 3 个因素进行肝素得率优化实验,采用旋转正交组合优化设计。

1.2.3.1 肝素提取单因素实验 料液比对肝素得率影响实验:设定蒸馏水和样品的料液比分别为 1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35g/mL 七个水平,盐浓度为 5%,树脂用量为 8%,吸附时间为 8h 条件下实验;盐浓度对肝素得率影响实验:设定盐浓度分别为 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7% 七个水平,料液比为 1:15g/mL,树脂用量为 8%,吸附时间为 8h 条件下实验;树脂用量对肝素得率影响实验:设定树脂用量分别为 1%、3%、5%、7%、9%、11%、13% 七个水平,料液比为 1:15g/mL,盐浓度为 5%,吸附时间为 8h 条件下实验。

1.2.3.2 旋转组合设计优化实验 在单因素实验的基础上,以料液比、盐浓度、树脂量为变化因子,以肝素浓度为响应值,采用响应面旋转组合方式进行对牛肺脏肝素提取工艺进行优化,共设计实验 20 组,每组做三个平行,利用 Design-Expert 8.05b 软件对实

验数据进行分析处理,以获得最佳工艺参数。实验因素分别以 X_1 、 X_2 和 X_3 代表,肝素的得率用 Y 代表,因素水平及编码值见表 1。

表 1 实验因素水平编码表

Table 1 Test factor levels and coding

编码水平	X_1 料液比 (g/mL)	X_2 盐浓度 (%)	X_3 树脂用量 (%)
-1	1:10	4	5
0	1:15	5	7
1	1:20	6	9

1.2.4 肝素浓度测定

1.2.4.1 标准曲线的绘制 使用肝素标准品来制作标准曲线,准确称取肝素标准品,配成 482μg/mL 肝素水溶液,再按 0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、1mL 的梯度,分别吸取不同体积的肝素水溶液,用蒸馏水定容到 1mL,向每份溶液中分别加入 3mL 含 0.025mol/L 硼砂的 90% (V:V) 的硫酸溶液,充分摇匀,置于 90℃ 水浴中,搅动,10min 后取出,冷至室温,30min 后采用紫外-可见分光光度计测定 298nm 下样品光密度(另做不加肝素,以水代之的空白实验作对照),重复 3 次,绘制出标准曲线。

1.2.4.2 肝素浓度的测定 采用浓硫酸氧化法来检测溶液中肝素的浓度^[9]。将肝素粗品用四分法取出定容至 25mL 容量瓶中,吸取 1mL 待测液加入玻璃管中,加入 3mL 含 0.025mol/L 硼砂的 90% (V:V) 硫酸溶液,摇匀,90℃ 下水浴,搅动,10min 后取出,冷至室温,30min 后采用紫外-可见分光光度计测定其 298nm 下光密度(另做不加肝素,以水代之的空白实验作对照),重复 3 次,取平均值。在标准曲线上即可得到提取物中肝素含量。

肝素得率计算公式:

$$\text{肝素得率 (mg/kg)} = \frac{A - 0.052}{0.0039} \times \frac{25 \times M_{\text{总}}}{m_{\text{溶}} \times m_{\text{样}}} \times n$$

式中:A 为样品所测得的吸光度值; $M_{\text{总}}$ 为所得肝素粗品的总重量,g; $m_{\text{溶}}$ 为溶解在 25mL 容量瓶中肝素的重量,g; $m_{\text{样}}$ 为所取牛肺样品的重量,g;25 为定溶于 25mL 容量瓶中;n 为稀释倍数。

1.2.5 验证实验 根据实验所得最佳提取工艺条件进行实验验证。

2 结果与分析

2.1 肝素浓度标准曲线绘制

采用肝素标准品进行浓度测定,根据测定数据做出肝素浓度标准曲线如图 1 所示。

以肝素浓度为横坐标 X,肝素在 298nm 的吸光度为纵坐标 Y,根据测定结果绘制标准工作曲线,线性回归方程为: $Y = 0.0039X + 0.052$, $R^2 = 0.9996$ 。

2.2 单因素实验结果与分析

2.2.1 料液比对肝素得率的影响 不同料液比条件下提取肝素的得率见图 2。由图 2 可知,当液料比在 5~15mL/g 范围内时,随着液料比的增加,肝素得率增加,肝素得率呈上升趋势;当液料比在 15~35mL/g 范围内时,肝素得率没有明显的增加,差异不显著。因原料中肝素的含量有限,随着料液比增大到一定

表3 旋转组合设计回归方程各项方差分析表

Table 3 Rotary combination design regression equation the anova table

变异来源	平方和	自由度	均方差	F 值	p 值	显著性
模型	43033.12	9	4781.46	159.87	<0.0001	**
X ₁	1747.23	1	1747.23	58.42	<0.0001	**
X ₂	655.17	1	655.17	21.91	0.0009	**
X ₃	680.06	1	680.06	22.74	0.0008	**
X ₁ X ₂	18.97	1	18.97	0.63	0.4443	
X ₁ X ₃	1508.65	1	1508.65	50.44	<0.0001	**
X ₂ X ₃	1736.96	1	1736.96	58.08	<0.0001	**
X ₁ ²	15485.7	1	15485.7	517.78	<0.0001	**
X ₂ ²	13049.5	1	13049.5	436.32	<0.0001	**
X ₃ ²	15413.97	1	15413.97	515.38	<0.0001	**
残差	299.08	10	29.91			
失拟项	245.92	5	49.18	4.63	0.0591	
纯误差	53.16	5	10.63			
总值	43332.2	19				

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

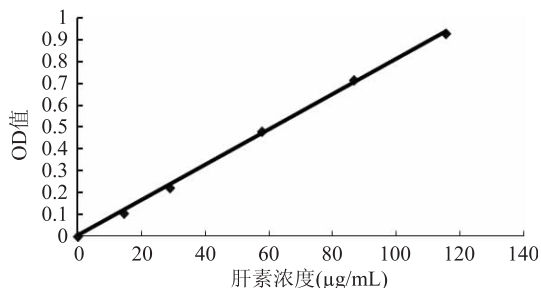


图1 肝素浓度标准曲线

Fig.1 Standard curve of heparin concentration

值时,肝素已经全部溶于溶液中,故料液比达到15mL/g时,肝素得率不再升高。

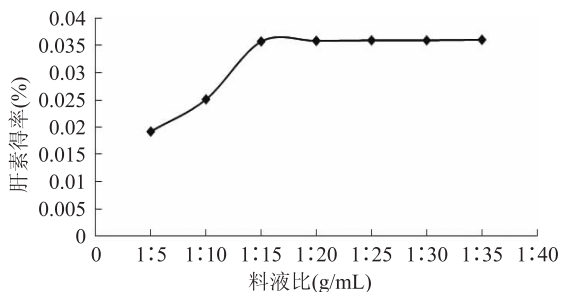


图2 料液比对肝素得率的影响

Fig.2 Effect of material liquid ratio on heparin yield

2.2.2 盐浓度对肝素得率的影响 图3为不同盐浓度条件下提取肝素的得率。由图3可知,盐浓度达到5%时肝素的得率最大,因为盐浓度的大小与肝素活性和溶解度有关,盐浓度过低肝素溶解不完全,提取率低;盐浓度过高肝素会重新析出,故肝素得率随着盐浓度的增大而增大,但达到一定值时会随着盐浓度的增大而减小。

2.2.3 树脂用量对肝素得率的影响 图4是不同树脂用量对肝素得率的影响结果。从图4中可以得到随着树脂用量的增加肝素的得率不断增加,当树脂用量达到7%左右时肝素得率基本保持不变。溶液中肝素的含量一定,当树脂用量较小时,肝素不能全部被吸附,随着树脂用量增加肝素得率增加,当树脂

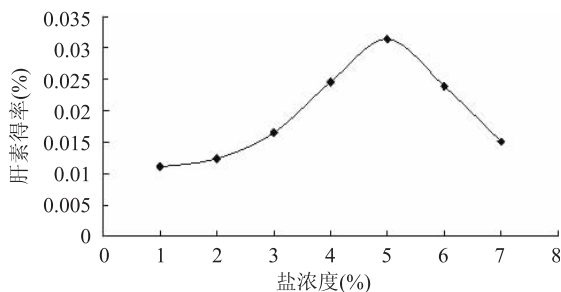


图3 盐浓度对肝素得率的影响

Fig.3 Effect of salt concentration on heparin yield

达到能将所有肝素吸附时,随着树脂用量的增加肝素得率基本不变。

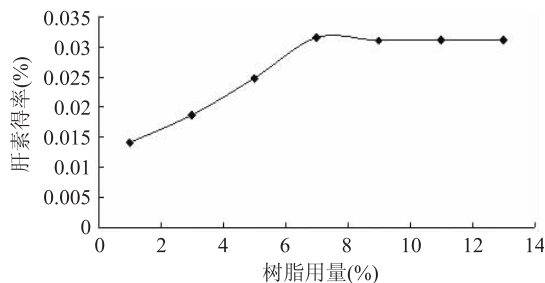


图4 树脂用量对肝素得率的影响

Fig.4 Effect of resin content on heparin yield

2.3 响应面法优化肝素提取工艺

2.3.1 响应面结果 采用 Design-Expert 8.05b 对表2的数据进行多因素回归拟合。回归分析结果及各项方差分析见表3。根据回归方程各项方差分析结果表明,该模型回归显著,说明该模型与实际实验拟合较好,可以作为盐解法提取肝素的理论值。各因素回归拟合后,得到的回归拟合方程为:

$$Y = 365.49 + 11.31X_1 - 6.93X_2 + 7.06X_3 - 1.54X_1X_2 - 13.73X_1X_3 + 14.74X_2X_3 - 32.78X_1^2 - 30.09X_2^2 - 32.70X_3^2$$

从表3中可以得到模型项 $p \leq 0.01$,说明Y与 X_1 、 X_2 、 X_3 的回归方程是极显著的;失拟项对应的 $p = 0.0591 \geq 0.05$,说明所得方程与实际拟合中非正常误差所占比例小,表示Y与 X_1 、 X_2 、 X_3 的回归方程的

关系较好。

表2 中心复合设计方案及实验点实验数据 Y

Table 2 Central composite design scheme and sites experimental data Y				
实验号	X ₁	X ₂	X ₃	Y (mg/kg)
1	-1	-1	-1	257.31
2	1	-1	-1	315.53
3	-1	1	-1	216.54
4	1	1	-1	270.17
5	-1	-1	1	268.56
6	1	-1	1	273.42
7	-1	1	1	288.3
8	1	1	1	285.43
9	-1.682	0	0	257.87
10	1.682	0	0	282.03
11	0	-1.682	0	289.51
12	0	1.682	0	265.6
13	0	0	-1.682	258.21
14	0	0	1.682	282.12
15	0	0	0	370.59
16	0	0	0	363.09
17	0	0	0	361.91
18	0	0	0	368.28
19	0	0	0	365.51
20	0	0	0	364.52

由图 5~图 7 可以看出两两因子之间均有交互作用,为了进一步确定最优化组合,采用 Design-Expert 8.05b 软件进行数据处理,得到肝素提取率最大时的条件,经过分析得出:在 X₁ = 0.08g/mL, X₂ = 4.89%, X₃ = 7.10% 时,肝素最大得率为 366.965mg/kg,根据实际情况确定最佳提取条件为料液比为 1:15,盐浓度为 5%,树脂量为 7%,此时的理论最大值为 362.022mg/kg。

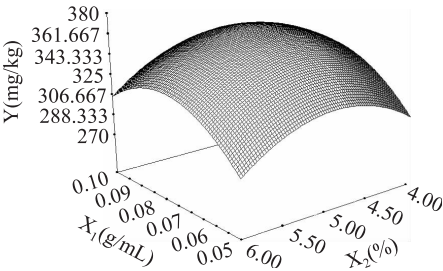


图5 料液比和盐浓度对肝素提取率影响的响应面
Fig.5 Material liquid ratio and salt concentration on the yield of heparin influence the response surface

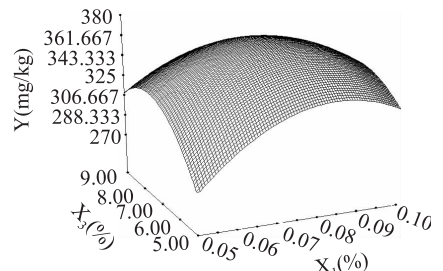


图6 料液比和树脂量对肝素提取率影响的响应面
Fig.6 Material liquid ratio and resin content extraction on the influence of heparin yield response surface

2.3.2 验证实验结果 按照以上最佳提取条件组合

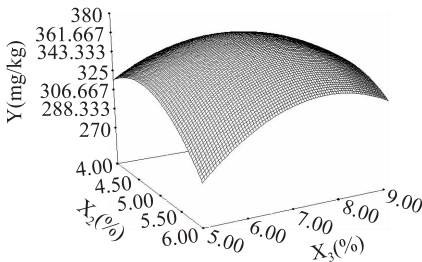


图7 盐浓度和树脂量对肝素提取率影响的响应面
Fig.7 Salt concentration and resin content on the influence of heparin extraction yield response surface

料液比为 1:15,盐浓度为 5%,树脂量为 7% 进行多次实验验证,得到肝素平均得率为 356.65mg/kg,验证值与模型理论值相差 1.48%。结果与肝素提取率预测值较接近,故确定此工艺条件为秦宝雪花牛肺脏肝素提取的最佳工艺条件。

3 结论

3.1 采用盐解-树脂吸附对牛肺脏肝素的提取,通过单因素实验和旋转正交组合设计以及响应面分析法对提取工艺优化,结论如下:拟合了料液比、盐浓度、树脂用量这 3 个因素对肝素提取率的回归模型,经验证实验证明该模型合理可靠,能较好地预测牛肺脏中肝素提取率。通过回归方程系数显著性检验,得到因素的主效应关系为:料液比 > 树脂用量 > 盐浓度。由该模型确定的最优工艺为料液比为 1:15,盐浓度为 5%,树脂量为 7%。在此条件下,牛肺中肝素提取率为 356.65mg/kg。

3.2 目前国内外常采用的提取肝素的方法有很多。刘忠霞^[10]等在肝素的制备与质量控制中采用盐解-树脂交换法在猪小肠粘膜中提取的肝素率为 133.33mg/kg。江燕^[11]等在肝素钠粗品工业化高效生产工艺的探讨中肝素率为 308.00mg/kg。本研究采用盐解-树脂吸附法在最佳提取工艺条件下肝素的提取率高达 356.65mg/kg,经过重复实验结果稳定,与其他文献相比有明显的增加。对已经采用最佳工艺提取的肉样同样采取最佳提取条件进行再一次提取,多次实验结果表明第二次的肝素平均得率为 0.87mg/kg,从而得到第一次的提取已经将肝素提取完全,不需要再进一步提取。实验采用盐解-树脂吸附法对秦宝雪花牛和秦川牛肺脏肝素提取,此方法操作简单,经济节约,重现性好,更适合于工厂化生产。

参考文献

[1] Nader HB, Lopes C, Rocha H, et al. Heparins and heparinoids: occurrence, structure and mechanism of antithrombotic and hemorrhagic activitie [J]. CurrPharm Des, 2004,10(9):951-966.
[2] Wang LC, Brown JR, Varki A, et al. Heparin' s anti-inflammatory effects require glucosamine 6-O-sulfation and are mediated by blockade of L- and P-selectins[J]. ClinInvest, 2002, 110(1):127-136.

(下转第 221 页)

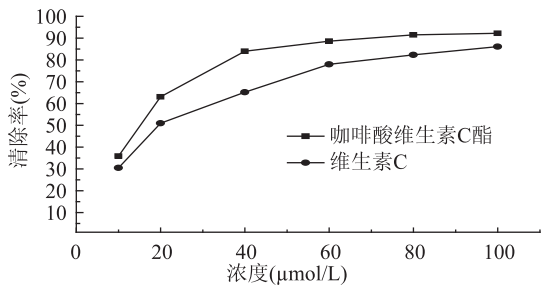


图1 咖啡酸维生素C酯对DPPH自由基的清除活性
Fig.1 DPPH free radical scavenging activity of caffeic acid vitamin C ester

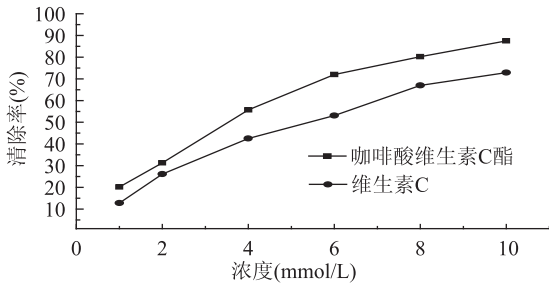


图2 咖啡酸维生素C酯对羟基自由基的清除活性
Fig.2 Hydroxyl free radical scavenging activity of caffeic acid vitamin C ester

目标,开创了一种合成新型食品添加剂的新方法。抑菌活性测试结果显示,浓度为50mg/mL的咖啡酸维生素C酯对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草杆菌、酿酒酵母、青霉、黄曲霉、黑曲霉等均具有较强的抑制作用,抑制率分别为91.7%、89.2%、81.0%、83.5%、76.3%、52.7%、70.6%,最低抑菌浓度分别为0.776、0.388、0.388、0.194、1.552、12.416、3.104mg/mL。抗氧化性测试结果表明,咖啡酸维生素C酯可以有效清除DPPH自由基和羟基自由基,清除效果明显好于对照样品维生素C,清除DPPH自由基比清除羟基自由基需要的样品浓度低。因此,咖啡酸维生素C酯是一种潜在的兼具抑菌活性和抗氧化活性的多功能食品添加剂。

参考文献

[1] 卢定强,蒋奔,王俊,等.咖啡酸苯乙酯的合成研究进展[J].现代化工,2009,29(4):20-24.

(上接第217页)

[3] Milos Hricovini, Marco Guerrini, Antonella Bisio. Conformation of heparin pentasaccharide bound to antithrombin III [J]. Biochem J, 2001, 35(9): 265-272.
[4] Jack H, Robert R. Heparin and low-molecular-weight heparin [C]. The Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy Chest, 2004, 126(2): 188-203.
[5] 郭锡铎. 肝素的提取、医疗价值与市场前景 [J]. 肉类工业, 2008(6): 45-46.
[6] 张丽萍, 宋大魏, 马中苏. 超声波辅助盐析提取猪小肠中肝素的工艺 [J]. 农业工程学报, 2010, 26(5): 379-382.

[2] Altug M E, Serarslan Y, Bal R, et al. Caffeic acid phenethyl ester protects rabbit brains against permanent focal ischemia by antioxidant action: A biochemical and planimetric study [J]. Brain Res, 2008, 1201: 135-142.
[3] Ning Xian-ling, Ma Xiao-yan, Chen Zhu-tuo, et al. Caffeic acid phenethyl ester and its benzoyl derivatives: synthesis and X-ray structural analysis [J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2011, 20: 37-41.
[4] 谢文磊, 李魁, 王宏雁. 酯交换法合成L-抗坏血酸硬脂酸酯及其抗氧化性能 [J]. 高校化学工程学报, 2002, 16(4): 441-445.
[5] 巫晓琴, 乔薇, 闫素君, 等. L-抗坏血酸-6-对羟基苯甲酸酯的合成及抗氧化活性研究 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2007, 46(4): 59-62.
[6] 何莉斌, 宁正祥, 李娜. 甲氧羰基丙烯酸-6-L-抗坏血酸酯的合成及抗氧化活性研究 [J]. 食品工业科技, 2009, 30(2): 265-267.
[7] 战宇, 黄艳, 郑成. 维生素C丙酸酯的合成及其性能研究 [J]. 食品工业科技, 2008, 29(10): 216-219.
[8] 吴亚凉, 宁正祥. 反丁烯二酸-6-L-抗坏血酸甲酯的合成及抑菌性能的研究 [J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(9): 58-61.
[9] Yoshiyuki Watanabe, Yuki Sawahara, Hideyuki Nosaka. Enzymatic synthesis of conjugated linoleoyl ascorbate in acetone [J]. Biochemical Engineering Journal, 2008, 40: 368-372.
[10] 杨云裳, 许建国, 张应鹏, 等. 酶法合成咖啡酸叶黄素酯的研究 [J]. 食品工业科技, 2011, 32(2): 283-284.
[11] Lü Long-xian, Yu Pan, Li Yong-quan. Biosynthesis of ascorbyl benzoate in organic solvents and study of its antioxygenic and antimicrobial properties [J]. Food Chemistry, 2007, 101: 1626-1632.
[12] Reddy B M, Patil M K, Rao K N, et al. An easy-to-use heterogeneous promoted zirconia catalyst for Knoevenagel condensation in liquid phase under solvent-free conditions [J]. J Mol Catal A, 2006, 258: 302-207.
[13] 苏文莉, 刘长春. $\text{SO}_4^{2-}/\text{ZrO}_2$ 催化香料 α -呋喃丙烯酸丁酯的简便合成 [J]. 日用化学工业, 2010, 40(4): 270-272.
[14] 刘长春, 卢卫平, 金德宽. 离子液体中3,4-二羟基苯甲醛的简便合成 [J]. 高校化学工程学报, 2011, 25(4): 724-728.
[15] 肖家军, 王云, 戴仕奎, 等. 苍耳叶挥发油的提取及抑菌和抗氧化性研究 [J]. 食品工业科技, 2011, 32(7): 115-118.

[7] 任红媛, 何波, 李红心. 猪小肠粘膜中肝素钠提取与精制工艺研究 [J]. 食品研究与开发, 2007, 128(1): 78-80.
[8] 谷振华, 金永茂, 徐双艳. 肝素钠分离工艺研究 [J]. 高师理科学刊, 2002, 22(4): 44-47.
[9] Ji ZH, Jiang CK. A simple chemical determination of heparin [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 1980(5): 61-63.
[10] 刘忠霞, 穆军. 肝素制备及质量控制 [J]. 中国伤残医学, 2009, 17(4): 96.
[11] 江燕, 张力跃, 王德斌, 等. 肝素钠粗品工业化高效生产工艺的探讨 [J]. 天然产物研究与开发, 2000, 13(2): 50-54.