

# 尿素-氯化胆碱低共熔体系提取羊毛角蛋白

姜哲, 袁久刚\*, 王平, 范雪荣, 王强, 张连兵

(江南大学生态纺织教育部重点实验室, 江苏无锡 214122)

**摘要:** 以尿素-氯化胆碱低共熔体系为提取剂从羊毛纤维中提取羊毛角蛋白。最佳的条件为: 溶解温度 130 °C、溶解时间 180 min、 $m(\text{羊毛}):m(\text{尿素-氯化胆碱低共熔体系})=1:33$ 。采用 FTIR、Raman、XRD、SDS-PAGE 和 TGA 对原羊毛和再生羊毛角蛋白的结构进行了表征。结果表明: 通过低共熔体系溶解再生得到的羊毛角蛋白, 其主链结构得到了保留, 但是与原羊毛相比, 再生羊毛角蛋白中的  $\alpha$ -螺旋结构数量减少, 耐热性变差。

**关键词:** 羊毛角蛋白; 尿素-氯化胆碱; 低共熔体系; 提取; 分离提纯技术

**中图分类号:** O629.73 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214(2019)02-0257-05

## Extraction of Wool Keratin by Urea-Choline Chloride Deep Eutectic Solvent

JIANG Zhe, YUAN Jiu-gang\*, WANG Ping, FAN Xue-rong, WANG Qiang, ZHANG Lian-bing

(Key Laboratory of Eco-Textiles, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

**Abstract:** The urea-choline chloride deep eutectic solvent was applied to extract the wool keratin. The optimum conditions were dissolution temperature 130 °C, dissolution time 180 min, and mass ratio of wool to urea-choline chloride deep eutectic solvent 1 : 33. FTIR, Raman, XRD, SDS-PAGE and TGA were used to characterize the structure of pristine wool and regenerated wool keratin. The results indicated the backbone of regenerated wool keratin was maintained during the process of dissolution. Compared with pristine wool fiber, the content of  $\alpha$ -helix structure in regenerated wool keratin was decreased, and the heat resistance was reduced.

**Key words:** wool keratin; urea-choline chloride; deep eutectic solvent; extraction; separation and purification technology

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31771039, 31300785, 51673087); National Key R & D Program of China (2017YFB0309200); Independent Research Program of Jiangnan University (JUSRP51717A)

羊毛是极具利用价值的天然纤维, 其角蛋白的含量高达 95%<sup>[1]</sup>。然而, 每年毛纺织行业都会产生大量的废旧毛纺织品, 这不仅对环境产生污染, 也严重浪费了角蛋白资源<sup>[2]</sup>。因此, 如何从羊毛中提取羊毛角蛋白受到了研究人员的关注。近些年, 离子液体被应用于角蛋白的提取。2005年, Xie<sup>[3]</sup>等首次使用离子液体提取羊毛角蛋白。然而, 用于提取角蛋白的离子液体大部分都含有咪唑或吡啶, 这些杂环化合物不仅毒性强<sup>[4]</sup>, 而且生物降解性极差<sup>[5]</sup>。

低共熔体系是一种新型溶剂, 其物理化学性质

与离子液体相似<sup>[6]</sup>。但是, 与离子液体相比, 低共熔体系具有原料来源广泛、不挥发、低毒、可降解、价格低廉以及易制备等优点。目前, 低共熔体系在天然高分子材料方面的应用已经受到了研究人员的极大关注。Tenhunen<sup>[7]</sup>等研究了纤维素与尿素-氯化胆碱低共熔体系的相互作用; Marino<sup>[8]</sup>等研究了木质素在尿素-氯化胆碱低共熔体系中的解聚。但是对于低共熔体系在角蛋白再生方面的研究, 还鲜有报道。

本研究选用尿素-氯化胆碱低共熔体系作为羊毛角蛋白的溶解再生体系, 分别从溶解温度、溶解

收稿日期: 2018-06-21; 定用日期: 2018-10-09; DOI: 10.13550/j.jxhg.20180448

基金项目: 国家自然科学基金项目(31771039, 31300785, 51673087); 国家重点研发计划项目(2017YFB0309200); 江南大学自主科研项目(JUSRP51717A)

作者简介: 姜哲(1993—), 男, 硕士生。联系人: 袁久刚(1982—), 男, 副教授, 硕士生导师, E-mail: jiugangyuan@jiangnan.edu.cn。

时间、羊毛与尿素-氯化胆碱低共熔体系的质量比 3 个方面探讨了其对羊毛的溶解率及再生羊毛角蛋白提取率的影响,并通过红外光谱、拉曼光谱、X 射线衍射、电泳测试、热重测试等对原羊毛和再生羊毛角蛋白的结构特征进行了详细对比,探究低共熔体系下的溶解再生过程对羊毛角蛋白结构的影响。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

羊毛纤维,直径约 23  $\mu\text{m}$ ,无锡协新毛纺织股份有限公司;氯化胆碱,质量分数 98%,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;尿素,分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

FD-1A-50 型冷冻干燥机,北京博医康仪器有限公司; Nicolet is10 傅里叶红外变换光谱仪,美国 Thermo Fisher Scientific 公司; inVia Reflex 显微拉曼光谱仪,英国 Renishaw 公司; D2 Phaser X 射线衍射仪,德国 Bruker 公司; Mini-Protean Tetra Cells 电泳系统,美国 BIO-RAD 公司; Q500 热重分析仪,美国 TA 公司。

### 1.2 羊毛角蛋白的提取

#### 1.2.1 尿素-氯化胆碱低共熔体系的制备

将干燥的尿素和氯化胆碱固体按照物质的量比 2:1 放入三口烧瓶中,在氮气保护下,80  $^{\circ}\text{C}$  油浴加热至烧瓶中的固体变成澄清透明溶液。

#### 1.2.2 羊毛预处理

称取适量羊毛于脂肪提取器中,按体积比 1:1 加入正己烷和二氯甲烷,进行脱脂处理,48 h 后清洗羊毛,去除残留的脱脂剂,50  $^{\circ}\text{C}$  烘干后将羊毛粉碎备用。

#### 1.2.3 羊毛角蛋白的提取

取一定量的脱脂羊毛放入尿素-氯化胆碱低共熔体系中,在氮气保护下于设定温度磁力加热搅拌溶解一段时间后,得到深黄色混合液。

向混合液中加入适量去离子水,过滤,得到未溶解的羊毛,干燥后称重,记为  $m_p$ 。滤液用透析袋(截留相对分子质量 3000 Da)透析,透析后将透析袋中的溶液冷冻干燥,即得到再生羊毛角蛋白。

羊毛溶解率( $S$ )按照式(1)计算:

$$S/\% = \frac{m_w - m_p}{m_w} \times 100 \quad (1)$$

式中: $m_w$ —羊毛初始质量, g;  $m_p$ —未溶解的羊毛质量, g。

再生羊毛角蛋白提取率( $P$ )按照式(2)计算:

$$P/\% = \frac{m_k}{m_w} \times 100 \quad (2)$$

式中: $m_k$ —再生羊毛角蛋白的质量, g。

### 1.3 性能测试

FTIR:采用全反射法分别测试原羊毛和再生羊毛角蛋白的红外光谱。扫描范围 4000~600  $\text{cm}^{-1}$ ,分辨率 0.4  $\text{cm}^{-1}$ ,扫描次数 32 次。Raman:采用拉曼显微镜系统测试拉曼光谱,由 50 mW 氦离子激光器激发 785 nm 的激光。使用 100 倍物镜将样品上的激光束光斑直径聚焦到 1  $\mu\text{m}$ 。光谱扫描区域 400~1800  $\text{cm}^{-1}$ ,总采集时间为 1000 s。XRD 测试条件:Cu 靶,工作电压 30 kV,工作电流 10 mA,扫描范围 5 $^{\circ}$ ~60 $^{\circ}$ ,步长 0.02( $^{\circ}$ )/min。SDS-PAGE:测试使用的 SDS-PAGE 凝胶质量分数为 12%。标准蛋白的指示范围为 10~250 kDa。TGA:分别将干燥的原羊毛和再生羊毛角蛋白放入氧化铝坩埚中,氮气气氛下进行测试,测试温度 30~600  $^{\circ}\text{C}$ ,升温速率 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同因素对羊毛溶解率及再生羊毛角蛋白提取率的影响

#### 2.1.1 溶解温度的影响

按照 1.2 节方法,当  $m(\text{羊毛}):m(\text{尿素-氯化胆碱低共熔体系})=1:33$ 、溶解时间 180 min 时,考察溶解温度对羊毛溶解率和再生羊毛角蛋白提取率的影响,结果见图 1。

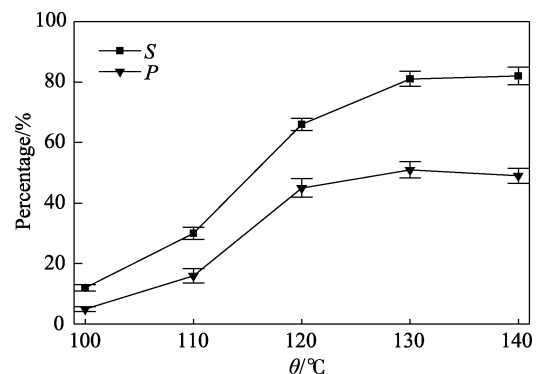


图 1 温度对羊毛溶解率和再生角蛋白提取率的影响  
Fig. 1 Effect of dissolution temperature on the dissolution rate of wool and the extraction rate of regenerated wool keratin

由图 1 可见,溶解温度对羊毛溶解率和再生角蛋白提取率的影响很大,在温度低于 130  $^{\circ}\text{C}$  时,羊毛溶解率和再生羊毛角蛋白提取率都随温度的升高而增大。因为当温度提升时,尿素-氯化胆碱低共熔体系的黏度逐渐降低,流动性逐渐增加<sup>[9]</sup>,因而可以更容易透过鳞片层,对羊毛纤维内部的皮质层进行溶解。另外,高温会使二硫键断裂<sup>[10]</sup>,进而使鳞片层钝化,结构松散,这使得尿素-氯化胆碱低共熔

体系更容易进入羊毛纤维内部。当温度高于 130 °C 后, 羊毛的溶解率基本不变, 这是因为 130 °C 已经足够高, 在相同时间下, 羊毛基本溶解完全, 再升高温度, 会使溶解再生的成本增加。而且温度过高, 会使角蛋白的分子链降解速率加快, 使再生羊毛角蛋白的提取率下降。综上, 选择 130 °C 作为溶解温度比较合适。

### 2.1.2 溶解时间的影响

按照 1.2 节方法, 当溶解温度为 130 °C、 $m(\text{羊毛}) : m(\text{尿素-氯化胆碱低共熔体系}) = 1 : 33$  时, 考察溶解时间对羊毛溶解率和再生羊毛角蛋白提取率的影响, 结果见图 2。

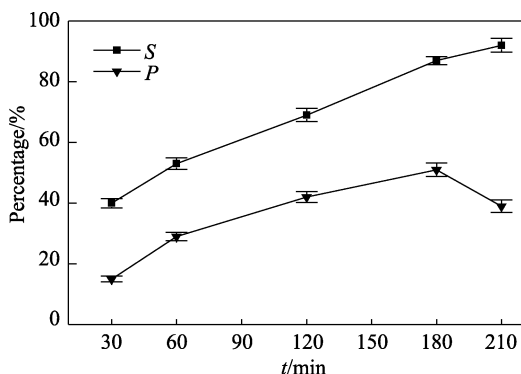


图 2 溶解时间对羊毛溶解率和再生羊毛角蛋白提取率的影响

Fig. 2 Effect of dissolution time on the dissolution rate of wool and the extraction rate of regenerated wool keratin

由图 2 可以看出, 随着溶解时间的增加, 羊毛溶解率和再生羊毛角蛋白的提取率逐渐增大, 但当溶解时间达到 180 min 后, 再生羊毛角蛋白的提取率开始降低, 这是由于高温会使蛋白质的大分子链分解<sup>[11]</sup>, 因而溶解时间过长会使得到的羊毛角蛋白进一步降解, 使再生羊毛角蛋白的分子量降低, 在透析过程中被除掉。综上, 较优的溶解时间为 180 min。

### 2.1.3 羊毛与尿素-氯化胆碱低共熔体系质量比的影响

按照 1.2 节方法, 当溶解温度为 130 °C、溶解时间 180 min 时, 考察羊毛与尿素-氯化胆碱低共熔体系的质量比对羊毛溶解率和再生羊毛角蛋白提取率的影响, 结果见图 3。

由图 3 可知, 随着羊毛与尿素-氯化胆碱低共熔体系的质量比增大, 羊毛溶解率与再生羊毛角蛋白提取率逐渐降低。一方面, 尿素-氯化胆碱低共熔体系的质量逐渐不足, 对羊毛角蛋白分子间氢键的破坏力下降。另一方面, 溶剂的黏度会逐渐增大, 搅拌会逐渐变得困难, 已溶解的羊毛角蛋白对未溶解

的羊毛角蛋白形成了高浓度的包埋作用, 使尿素-氯化胆碱低共熔体系难以与未溶的羊毛角蛋白相接触, 从而阻碍了羊毛角蛋白的完全溶解<sup>[12]</sup>。当  $m(\text{羊毛}) : m(\text{尿素-氯化胆碱低共熔体系}) = 1 : 33$  时, 此时羊毛溶解率与再生羊毛角蛋白的提取率都比较高, 且低共熔体系的用量适当, 故选其为较优质量比。

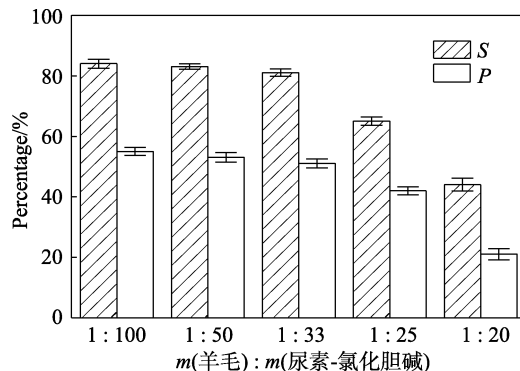


图 3 羊毛与尿素-氯化胆碱低共熔体系的质量比对羊毛溶解率与再生羊毛角蛋白提取率的影响

Fig. 3 Effect of mass ratio of wool to urea-choline chloride deep eutectic solvent on the dissolution rate of wool and the extraction rate of regenerated wool keratin

## 2.2 ATR-FTIR 分析

图 4 为原羊毛与再生羊毛角蛋白的红外光谱图。

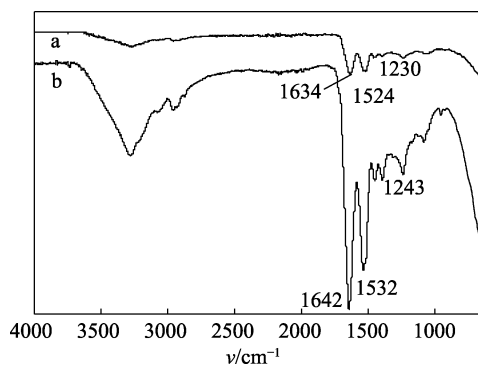


图 4 原羊毛 (a) 和再生羊毛角蛋白 (b) 红外光谱图

Fig. 4 FTIR spectra of pristine wool (a) and regenerated wool keratin (b)

羊毛是蛋白质纤维, 在红外光谱上有明显的酰胺键特征谱带<sup>[13]</sup>。其中, 1640~1610  $\text{cm}^{-1}$  的峰为酰胺 I 带吸收峰, 1532~1516  $\text{cm}^{-1}$  的峰为酰胺 II 带吸收峰, 1245~1230  $\text{cm}^{-1}$  的峰为酰胺 III 带吸收峰。从图 4 中可以看出, 再生羊毛角蛋白的红外光谱上并没有出现其他峰, 这表明在溶解过程中再生羊毛角蛋白的主链结构被保留, 但是, 由于尿素-氯化胆碱低共熔体系与羊毛角蛋白中的酰胺键形成氢键, 使再生羊毛角蛋白的二级结构发生变化, 因而与原羊毛相比, 再生羊毛角蛋白的酰胺吸收峰均向高波数

方向移动。

### 2.3 Raman 分析

由于羊毛角蛋白在 1428~1500 cm<sup>-1</sup> 的 CH<sub>2</sub> 弯曲谱带的峰面积很大且不被溶解过程影响,因而可以此峰对其进行归一化处理<sup>[14]</sup>。图 5 中显示了原羊毛和再生羊毛角蛋白的归一化拉曼光谱。

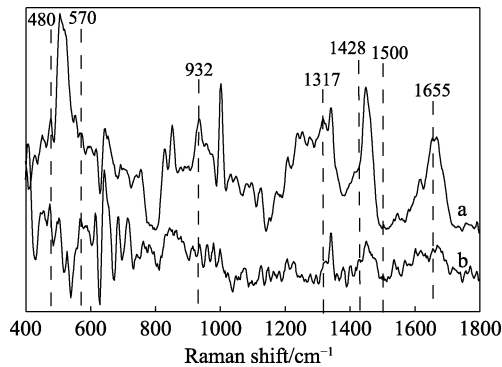


图 5 原羊毛 (a) 和再生羊毛角蛋白 (b) 的拉曼光谱图  
Fig. 5 Normalized Raman spectra of pristine wool (a) and regenerated wool keratin (b)

根据 Kuzuhara<sup>[14]</sup>的研究,二硫键谱带的峰面积 (485~570 cm<sup>-1</sup>) 与 CH<sub>2</sub> 谱带峰面积 (1428~1500 cm<sup>-1</sup>) 的比值可以代表羊毛中二硫键的含量。经过计算,原羊毛的峰面积之比为 2.43,再生羊毛角蛋白的峰面积之比为 1.81。这表明在溶解过程中,尿素-氯化胆碱低共熔体系破坏了羊毛角蛋白中的二硫键。

与原羊毛相比,再生羊毛角蛋白在 932 cm<sup>-1</sup> ( $\alpha$ -螺旋的 C—C 骨架伸展), 1317 cm<sup>-1</sup> ( $\alpha$ -螺旋的 C—H 弯曲) 和 1655 cm<sup>-1</sup> (酰胺 I 带中的  $\alpha$ -螺旋) 处有较低的强度,这表明再生角蛋白中  $\alpha$ -螺旋的数量下降<sup>[15]</sup>。

### 2.4 XRD 分析

图 6 是原羊毛和再生羊毛角蛋白的 XRD 谱图。

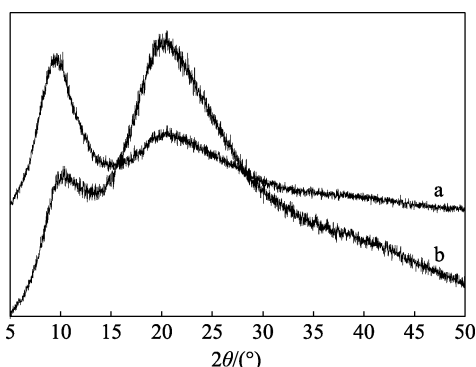


图 6 原羊毛 (a) 和再生羊毛角蛋白 (b) 的 X 射线衍射图  
Fig. 6 XRD patterns of pristine wool (a) and regenerated wool keratin (b)

从图 6 中可以看到,原羊毛有两个特征结晶峰,其中  $2\theta=9^\circ$  的衍射峰主要是由于  $\alpha$ -螺旋所引起,  $2\theta=21^\circ$  的衍射峰主要是由于  $\beta$ -折叠所引起<sup>[11]</sup>。与原

羊毛相比,再生羊毛角蛋白  $2\theta=9^\circ$  的衍射峰峰强下降,  $2\theta=21^\circ$  的衍射峰峰强增大,这表明再生羊毛角蛋白保留了原羊毛的二级结构,但是  $\alpha$ -螺旋的数量下降。

### 2.5 SDS-PAGE 测试

图 7 是原羊毛角蛋白与再生羊毛角蛋白的电泳结果。

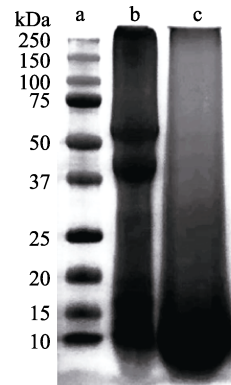


图 7 标准蛋白 (a)、原羊毛 (b) 和再生羊毛角蛋白 (c) 的电泳图

Fig. 7 SDS-PAGE patterns of protein standard (a), pristine wool (b) and regenerated wool keratin (c)

从图 7 可以看到,原羊毛角蛋白的分子量有两个分布区间,分别是位于 37~60 kDa 的低硫角蛋白和位于 10~20 kDa 的高硫角蛋白。与原羊毛角蛋白的电泳图相比,再生角蛋白的电泳图中高分子量区域变淡,低分子量区域颜色加深,这表明溶解过程中伴随着角蛋白的降解。同时,也说明在溶解过程中,要合理选择溶解的温度与溶解时间,从而避免羊毛角蛋白被过度降解。

### 2.6 TG 分析

图 8 是原羊毛与再生羊毛角蛋白的热重曲线。

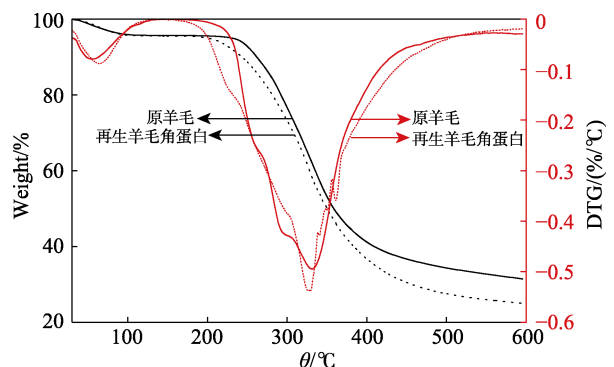


图 8 原羊毛和再生羊毛角蛋白的 TGA 和 DTG 曲线  
Fig. 8 TGA and DTG plots of pristine wool and regenerated wool keratin

由图 8 可知,原羊毛和再生羊毛角蛋白的热分解过程分为两步,100 °C 以下的失重是由于结晶水的蒸发; 250~400 °C 的失重是由羊毛角蛋白分子变

性和降解所引起<sup>[15]</sup>。再生羊毛角蛋白的最大热分解温度略低于原羊毛, 这说明再生羊毛角蛋白的热稳定性略有下降。

### 3 结论

尿素-氯化胆碱低共熔体系可以应用于羊毛角蛋白的溶解, 适宜的溶解条件为温度 130 °C, 溶解时间 180 min,  $m(\text{羊毛}):m(\text{尿素-氯化胆碱低共熔体系})=1:33$ 。再生羊毛角蛋白大分子主链结构完整, 但  $\alpha$ -螺旋结构的数量降低, 热稳定性较差。

尿素-氯化胆碱低共熔体系提取羊毛角蛋白是一种绿色环保的方法, 此方法也为羊毛角蛋白的再生提供了一种新的思路, 同时有助于研究尿素-氯化胆碱低共熔体系与蛋白质的相互作用。

### 参考文献:

- [1] Eslahi N, Dadashian F, Nejad N H. An investigation on keratin extraction from wool and feather waste by enzymatic hydrolysis[J]. *Preparative Biochemistry*, 2013, 43(7): 624-648.
- [2] Liang Xiao (梁潇). Research on wool keratin extraction and its anti-felting application [D]. Shanghai: Donghua University, 2015.
- [3] Xie H, Li S, Zhang S. Ionic liquids as novel solvents for the dissolution and blending of wool keratin fibers[J]. *Green Chemistry*, 2005, 7(8): 606-608.
- [4] Andrew S, Vyvyan T. On the freshwater ecotoxicity and biodegradation properties of some common ionic liquids[J]. *Organic Process Research and Development*, 2006, 10(4): 794-798.
- [5] Garcia M T, Gathergood N, Scammells P J. Biodegradable ionic liquids Part II. Effect of the anion and toxicology[J]. *Green Chemistry*, 2005, 7(1): 9-14.
- [6] Abbott A, John C, Karl S, *et al.* Eutectic-based ionic liquids with metal-containing anions and cations[J]. *Chemistry-A European Journal*, 2007, 13(22): 6495-6501.
- [7] Tenhunen T M, Lewandowska A E, Orelma H, *et al.* Understanding the interactions of cellulose fibres and deep eutectic solvent of choline chloride and urea[J]. *Cellulose*, 2018, 25(1): 137-150.
- [8] Marino D D, Stöckmann D, Kriescher S, *et al.* Electrochemical depolymerisation of lignin in a deep eutectic solvent[J]. *Green Chemistry*, 2016, 18(22): 6021-6028.
- [9] Wang C H, Damodaran S. Thermal destruction of cysteine and cystine residues of soy protein under conditions of gelation[J]. *Journal of Food Science*, 1990, 55(4): 1077-1080.
- [10] Yao Yongbo (姚勇波). Co-dissolution of cellulose/silk fibroin and regeneration of the blended fibers[D]. Shanghai: Donghua University, 2015.
- [11] Lu Zhenxiang (路振翔). Solution of wool keratin/ionic liquid properties and film studies[D]. Zhengzhou: Zhongyuan University of Technology, 2016.
- [12] Ma B M, Xue Q, Hou X L, *et al.* Pure keratin membrane and fibers from chicken feather[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 89: 614-621.
- [13] Wang K, Li R, Ma J H, *et al.* Extracting keratin from wool by using L-cysteine[J]. *Green Chemistry*, 2016, 18(2): 476-481.
- [14] Kuzuhara A. Analysis of structural changes in bleached keratin fibers (black and white human hair) using Raman spectroscopy[J]. *Biopolymers*, 2006, 81(6): 506-514.
- [15] Zhang Z, Zhang X, Nie Y, *et al.* Effects of water content on the dissolution behavior of wool keratin using 1-ethyl-3- methylimidazolium dimethylphosphate[J]. *Science China Chemistry*, 2017, 60(7): 934-941.
- [9] Shen Linhui (申林卉), Liu Lixia (刘丽侠), Chen Guan (陈冠), *et al.* Research progress in structural modification of polysaccharide[J]. *Drug Evaluation Research (药物评价研究)*, 2013, 36(6): 465-468.
- [10] Chen Xiaoming (陈晓明), Tian Gengyuan (田庚元). Advances in studies on phosphorylation of polysaccharides[J]. *Chinese Journal of Organic Chemistry (有机化学)*, 2002, 22(11): 835-839.
- [11] Yang Ping (杨萍). Study on synthesis phosphated derivatives of polysaccharide from Tremellafuciformis Berk and its effects of radiation protection[D]. Beijing: Peking Union Medical College (北京协和医学院), 2013.
- [12] Wang Xiaolin (王晓琳), Yang Ping (杨萍), Kong Lingyu (孔令钰), *et al.* Protection of phosphate esterification polysaccharides from Tremellafuciformis in hematopoietic function in radiation-injured mice[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs (中草药)*, 2013, 44(13): 1811-1813.
- [13] Sun Jie (孙婕), Yin Guoyou (尹国友), Niu Meiyuan (牛美艳), *et al.* Preparation and antioxidation of polysaccharides in phosphorylated Pumpkin[J]. *Journal of Sichuan Agricultural University (四川农业大学学报)*, 2013, 31(3): 322-327.
- [14] Liu Yi (刘毅). Study on scientific evaluation system of the quality standard and standardized cultivation standards of Tussilagofarfara [D]. Chengdu: Chengdu University of TCM (成都中医药大学), 2008.
- [15] Wu Qizhen (吴琪珍), Zhang Chaofeng (张朝凤), Xu Xianghong (许翔鸿), *et al.* Advances in the chemical constituents and biological activities of the flower buds of Tussilagofarfara[J]. *Chinese Wild Plant Resources (中国野生植物资源)*, 2015, 34(2): 33-37.
- [16] Liu Keyue (刘可越), Zhang Tiejun (张铁军), Gao Wenyuan (高文远), *et al.* Phytochemical and pharmacological research progress in Tussilagofarfara[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica (中国中药杂志)*, 2006, 31(22): 1837-1841.
- [17] Roeder E. Medicinal plants in China containing pyrrolizidine alkaloids [J]. *Pharmazie*, 2000, 55(10): 711-726.
- [18] Zhang Xiuchang (张秀昌), Liu Hua (刘华), Liu Yuyu (刘玉玉), *et al.* Apoptosis of K562 cells induced by FlosFarfara polysaccharide in vitro[J]. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research (中国组织工程研究与临床康复)*, 2007, 11(11): 2029-2031.
- [19] Yu Tao (余涛), Song Xiao (宋逍), Zhao Peng (赵鹏), *et al.* Effect of polysaccharides from Tussilagofarfara on tumor-inhibition rate and survival-extending rate in tumor or leukemia bearing mice[J]. *Central South Pharmacy (中南药学)*, 2014, 12(2): 125-128.
- [20] Zhao Peng (赵鹏). Isolation, characterization of polysaccharides from Tussilagofarfara[D]. Xi'an: Northwest University (西北大学), 2010.
- [21] Zhang Jie (张洁), Shen Sheng (沈胜), Shen Shuyi (沈淑仪). Study on phosphorylated modification of blettila triaria polysaccharide[J]. *Chinese Wild Plant Resources (中国野生植物资源)*, 2016, 35(3): 13-16, 20.
- [22] Ning Yuanling (宁苑灵), Meng Fayuan (蒙法艳), Jiang Jie (蒋洁), *et al.* Optimization of preparation technology for phosphorylated polysaccharides from dimocarlongan by response surface method[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae (中国实验方剂学杂志)*, 2013, 19(6): 50-53.
- [23] Guo Rui (郭睿), Liu Aiyu (刘爱玉), Guo Yu (郭煜), *et al.* Process optimization for preparation of carboxymethyl chitosan by response surface methodology[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2016, 33(8): 872-879.

(上接第 249 页)