

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.201903029



催化氢化还原法制备的 *N,N*-双烷基化壳聚糖

王林^{1,2}, 辛梅华^{1,2}, 李明春^{1,2}, 刘旭光^{1,2}, 周向恒^{1,2}

(1. 华侨大学 材料科学与工程学院, 福建 厦门 361021;

2. 华侨大学 环境友好功能材料教育部工程中心, 福建 厦门 361021)

摘要: 以十二烷基磺酸钠为相转移剂, 月桂醛与壳聚糖反应生成西夫碱, 再通过钯碳(Pd/C)催化氢化还原西夫碱制备 *N,N*-双十二烷基化壳聚糖衍生物. 通过试验分析催化氢化反应时间、反应温度、Pd/C 催化剂量等因素对烷基化取代度的影响, 并用元素分析、红外光谱、核磁共振氢谱等对产物进行表征. 正交试验结果表明: 催化氢化制备 *N,N*-双十二烷基化壳聚糖的最佳催化氢化反应时间为 24 h, 反应温度为 30 °C, Pd/C 催化剂的用量占壳聚糖总量的 1%, 制得的 *N,N*-双十二烷基化壳聚糖的烷基化取代度为 189%.

关键词: 壳聚糖; 催化氢化; 烷基化; 钯碳催化剂

中图分类号: O 636.1

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2019)03-0350-06

N,N-Dialkylated Chitosan Made by Catalytic Hydrogenation Reduction

WANG Lin^{1,2}, XIN Meihua^{1,2}, LI Mingchun^{1,2},
LIU Xuguang^{1,2}, ZHOU Xiangheng^{1,2}

(1. College of Materials Science and Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;

2. Engineering Research Center of Environment-Friendly Functional Materials, Ministry of Education,
Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Sodium dodecyl sulfonate was used as the phase transfer agent to react lauraldehyde with chitosan to generate schiff base. Then *N,N*-dialkyl chitosan derivatives were prepared by palladium carbon (Pd/C) catalytic hydrogenation reduction of schiff base. The effects of catalytic hydrogenation reaction time, reaction temperature, Pd/C catalyst dosage on the degree of alkylation substitution were studied. The products were characterized by elemental analysis, infrared spectroscopy and ¹H NMR spectroscopy. Orthogonal experiment results show that the best catalytic hydrogenation reaction conditions for the catalytic hydrogenation preparation of *N,N*-dialkyl chitosan are: reaction time 24 h, reaction temperature 30 °C, Pd/C catalyst 1% of the total amount of chitosan. And the alkylation degree of *N,N*-dialkyl chitosan is 189%.

Keywords: chitosan; catalytic hydrogenation; alkylation; palladium carbon catalyst

N-烷基化改性是壳聚糖(CS)改性研究的热点之一, 通过改变烷基链的长度可以改变壳聚糖在水和有机溶剂中的溶解性. *N*-烷基化改性壳聚糖不仅溶解性能提高, 而且烷基长链的亲酯部分, 壳聚糖的主链作为亲水部分, 还可以赋予壳聚糖流变性能和表面活性性能^[1], 因此, 可用于药物载体、抗菌剂等^[2-4].

收稿日期: 2019-03-12

通信作者: 李明春(1962-), 男, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事功能高分子材料的研究. E-mail: mcli@hqu.edu.cn.

基金项目: 福建省海洋高新产业发展专项项目(201522); 福建省自然科学基金资助项目(2016J01234); 华侨大学研究生科研创新基金资助项目(17013081026)

在烷基化壳聚糖的羟基上引入亲水基团制备的双亲性壳聚糖衍生物可以自组装, 形成胶束, 用于难溶药物的增溶及缓释^[5-8]. 对壳聚糖进行化学修饰, 可以进一步提高壳聚糖载体的稳定性及药物的利用率^[9]. 目前, *N*-烷基化壳聚糖的制备主要采用脂肪醛和壳聚糖形成西夫碱, 再用硼氢化物(硼氢化钠、硼氢化钾、氰基硼氢化钠等)对 C=N 进行还原^[10]. 但是采用硼氢化物还原 C=N 存在硼氢化物用量大、成本高、还原过程中产生大量的氢气、操作过程繁琐等缺点, 并且壳聚糖和醛生成西夫碱的反应是在弱酸性条件下进行, 经硼氢化物还原后溶液呈碱性, 需再次调节反应体系的 pH 值, 从而进行第二次西夫碱反应, 这不利于工业化生产. 催化氢化还原法因具有高效、操作简单、易于工业化生产等优点而备受关注. 催化氢化还原反应常用的催化剂主要有钯、铑、钌等^[11-13], 其中, Pd/C 催化剂由于反应条件温和, 在中性和弱酸性条件下, 均能达到催化效果^[14], 主要用于硝基、亚胺等的还原^[15-17], 但在壳聚糖的 C=N 还原反应中未见报道. 本文以十二烷基磺酸钠为相转移剂, 催化氢化还原制备 *N,N*-双十二烷基化壳聚糖(DLCS); 然后, 采用正交试验法, 系统研究催化氢化反应时间、反应温度及 Pd/C 催化剂用量对 *N,N*-双十二烷基化壳聚糖烷基取代度的影响.

1 实验部分

1.1 实验材料

壳聚糖($\bar{M}_w = 50$ ku, 壳聚糖脱乙酰度(DD)为 89%, 浙江省玉环市澳兴生物技术有限公司); 月桂醛(山东省寿光市金宇化工有限责任公司); 十二烷基磺酸钠(SDS, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 钯碳催化剂(Pd/C, 质量分数为 5%, 陕西省西安市瑞科新材料股份有限公司); 氢气(福建省厦门市林德气体有限公司); 其他试剂均为市售分析纯.

1.2 仪器设备

Vario MICRO cube 型元素分析仪(德国 Elementar 公司); IS50 型傅里叶变换红外光谱仪(美国 Nicolet 公司); Avance III 500 型核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司); DTG-60H 型热重合分析仪(日本 Shimadzu 公司).

1.3 *N,N*-双十二烷基壳聚糖的制备

以十二烷基磺酸钠为相转移剂, 月桂醛和壳聚糖反应生成西夫碱, 再用 Pd/C 为催化剂, 催化氢化还原制备 *N,N*-双十二烷基化壳聚糖, 制备路线如图 1 所示.

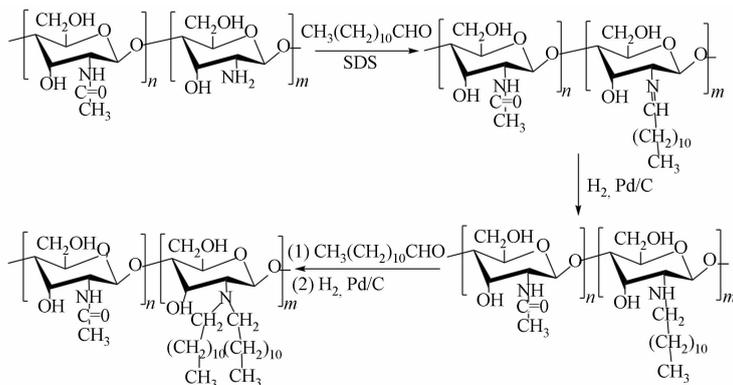


图 1 DLCS 的制备路线

Fig. 1 Preparation route of DLCS

采用正交实验法对催化氢化的条件进行优化, 催化氢化的正交因素水平, 如表 1 所示. 催化氢化的具体实施条件, 如表 2 所示. 表 1, 2 中: t 为反应时间; θ 为反应温度; w_c 为催化剂质量分数.

将 1.61 g 壳聚糖加入 100 mL, 体积分数为 2% 的醋酸水溶液中, 搅拌至壳聚糖溶解. 升温至 98 °C, 加入月桂醛(理论量的 4 倍)和一定量的相转移催化剂 SDS, 搅拌反应 10 h 后,

表 1 催化氢化的正交因素水平表

Tab. 1 Orthogonal factor level table of catalytic hydrogenation

项目	t/h	$\theta/^\circ\text{C}$	$w_c/\%$
1	12	30	1
2	18	45	2
3	24	60	3

自然冷却至 30 ℃, 然后, 加入 0.016 g Pd/C 催化剂, 充入氢气反应 24 h. 重复以上操作, 进行月桂醛反应及氢气还原. 反应结束后, 冷却至室温, 用 NaOH 调节 pH 值至弱碱性. 甲醇沉淀、抽滤、洗涤. 氯仿溶解、旋蒸浓缩、冰丙酮沉淀, 离心得 *N,N*-双十二烷基化壳聚糖粗产物. 将粗产物自然挥干过夜, 再次溶解于氯仿中, 制得纯化后的产物, 40 ℃ 真空干燥至恒质量.

表 2 催化氢化的反应条件

Tab. 2 Conditions for catalytic hydrogenation

参数	项目 1	项目 2	项目 3	项目 4	项目 5	项目 6	项目 7	项目 8	项目 9
<i>t</i> /h	12	12	12	18	18	18	24	24	24
<i>θ</i> /℃	30	45	60	30	45	60	30	45	60
w_c /%	1	2	3	1	2	3	1	2	3

1.4 *N,N*-双十二烷基化壳聚糖的表征测试

1.4.1 产物的取代度测定 壳聚糖和不同条件下得到的 *N,N*-双十二烷基化壳聚糖, 经烘至恒质量后, 用 Vario MICRO cube 型元素分析仪测定 N, C, H 的物质的量, 烷基取代度 (DS)^[5] 为

$$DS = \left[\left(\frac{n(C)}{n(N)} \right)_{DLCS} - \left(\frac{n(C)}{n(N)} \right)_{CS} \right] / 12 \times 100\%.$$

1.4.2 产物的红外光谱 (FT-IR) 分析 采用溴化钾压片法, 以空白溴化钾片为背景, 在 IS50 型傅里叶变换红外光谱仪上测定壳聚糖和 DLCS 的红外光谱, 中红外区扫描范围为 4 000~500 cm^{-1} , 扫描次数为 32 次.

1.4.3 产物的核磁共振 (¹H NMR) 分析 壳聚糖溶解在 CD₃COOD/D₂O 混合溶液中, *N,N*-双十二烷基化壳聚糖溶解在 CDCl₃ 中, 用 AVANCE III 500M 型核磁共振波谱仪测定壳聚糖和 *N,N*-双十二烷基化壳聚糖的 ¹H NMR, 测定温度为 22 ℃, 采样次数为 32 次, 空扫 1 次, 弛豫时间为 2 s.

1.4.4 产物的热重 (TG) 分析 壳聚糖和 *N,N*-双十二烷基化壳聚糖在真空干燥箱中烘干至恒质量, 在 DTG-60H 型热重合分析仪进行热重分析, Ar₂ 为保护气体, 升温速率为 10 ℃·min⁻¹, 测试范围为 30~700 ℃.

2 实验结果与分析

2.1 产物的烷基化取代度分析

采用元素分析法, 壳聚糖的脱乙酰度 (DD) 和双烷基化壳聚糖衍生物的烷基化取代度, 结果如表 3 所示. 表 3 中: $w(N)$ 为 N 的质量分数; $w(C)$ 为 C 的质量分数; $w(H)$ 为 H 的质量分数. 由表 3 可知: 不同反应条件下制得的 *N,N*-双十二烷基化壳聚糖烷基化取代度均超过 160%, 最大可达 190%.

表 3 DLCS 的元素分析及取代度

Tab. 3 Elemental analysis and substitution degree of DLCS

项目	$w(N)$ /%	$w(C)$ /%	$w(H)$ /%	DD/%	DS/%	项目	$w(N)$ /%	$w(C)$ /%	$w(H)$ /%	DD/%	DS/%
CS	7.47	40.25	6.98	85.69	—	5	2.58	61.97	9.63	—	181
1	2.78	61.54	9.60	—	163	6	2.63	62.47	9.71	—	179
2	2.77	61.76	9.67	—	164	7	2.54	63.14	9.75	—	189
3	2.73	61.99	9.67	—	168	8	2.51	62.70	9.83	—	190
4	2.63	61.88	9.73	—	176	9	2.53	62.90	9.78	—	189

2.2 催化氢化反应条件对 DLCS 取代度的影响

采用正交实验, 以烷基化取代度为计算指标, 通过直观分析法^[18], 根据极差 (*R_j*) 的大小分析各因素对烷基化取代度的影响大小. 极差越大, 表明该因素对烷基化取代度的影响越大, 可由各水平对应的取代度平均值选择最佳条件. 实验中, 烷基化取代度的平均值越大越好, 当烷基化取代度的平均值相近时, 则考虑生产成本选择较优的反应条件. 不同反应条件下, 所制备 *N,N*-双十二烷基化壳聚糖的直观分析

结果, 如表 4 所示. 表 4 中: I_j 为第 1 列 1 水平对应的 1, 2, 3 号实验数据取代度平均值; II_j 为第 1 列 2 水平对应的 4, 5, 6 号实验数据取代度平均值; III_j 为第 1 列 3 水平对应的 7, 8, 9 号实验数据取代度平均值.

由表 4 可知: 催化剂用量(质量分数)和反应温度对烷基化取代度的影响较小. 这是因为随着催化剂用量的增加, 烷基化取代度略有增加, 但是由于壳聚糖西夫碱可供催化反应的位点有限, 当催化剂的用量为壳聚糖的 1% 时, 已经能够满足催化氢化反应所需要的催化剂表面活性位点^[19], 由于钯属于贵金属, 从经济成本考虑应该尽量减少催化剂的用量, 选择催化剂的用量为壳聚糖质量的 1%; 反应温度对于烷基化取代度的影响不大, 表明催化氢化反应条件温和, 在较低的温度下已经能够达到催化加氢的效果; 反应时间对壳聚糖烷基化取代度的影响较大, 随着反应时间的延长, 烷基化取代度逐渐增加, 当催化氢化反应时间为 24 h 时, 可供反应的位点趋于饱和, 反应底物中的 C=N 基本上被完全还原. 综合考虑节约能源和生产成本, 选择催化氢化制备 *N,N*-双十二烷基化壳聚糖的 Pd/C 催化剂用量为壳聚糖总量的 1%, 反应温度为 30 °C, 反应时间为 24 h.

最优条件下制备 DLCS 的元素分析及取代度, 如表 5 所示. 由表 5 可知: 最优条件下烷基化取代度为 189%, 高于用硼氢化钠还原法制备的 DLCS 的烷基化取代度 148%^[8].

表 5 最优条件下制备 DLCS 的元素分析及取代度

Tab. 5 Elemental analysis and substitution degree of prepared DLCS under optimal conditions

项目	$w(\text{N})/\%/\%$	$w(\text{C})/\%$	$w(\text{H})/\%$	DD/ $\%$	DS/ $\%$
CS	7.47	40.25	6.98	85.69	—
DLCS	2.53	62.81	9.72	—	189

2.3 产物的 FT-IR 分析

采用溴化钾压片法, 在 4 000~500 cm^{-1} 的中红外区测得壳聚糖和 *N,N*-双十二烷基化壳聚糖的红外光谱, 如图 2 所示. 由图 2 可知: 壳聚糖的 FT-IR 谱图在 3 500~3 000 cm^{-1} 处的宽峰为壳聚糖的羟基及壳聚糖分子间的氢键吸收峰; *N,N*-双十二烷基化壳聚糖的 FT-IR 谱图与壳聚糖相比, 在 3 500~3 000 cm^{-1} 处的吸收峰明显减弱, 这是由于烷基化作用破坏了壳聚糖的氢键, 在 2 921 cm^{-1} 和 2 853 cm^{-1} 处对应的饱和甲基和亚甲基的伸缩振动峰明显增强, 在 1 478 cm^{-1} 处出现新振动峰, 为亚甲基上的 C-H 的变形振动, 在 721 cm^{-1} 处对应的是 $n \geq 4$ 的 $(\text{CH}_2)_n$ 基团的骨架振动峰, 在 1 599 cm^{-1} 处对应 N-H 的吸收峰明显减弱, 说明长链烷基已引入壳聚糖的氨基上^[3].

2.4 产物的 ^1H NMR 分析

壳聚糖和 *N,N*-双十二烷基化壳聚糖的 ^1H NMR 谱图, 如图 3 所示. 图 3 中: δ 为化学位移. 由图 3 可知: 壳聚糖的 ^1H NMR 谱图在 4.71 处对应的是溶剂 D_2O 的特征峰, 在 1.95 处对应的是壳聚糖中未脱除的乙酰氨基上的甲基质子峰, 而在 3.08, 3.66, 3.82 处对应的是壳聚糖主链上的质子峰; DLCS 的 ^1H NMR 谱图在 7.26 对应的是溶剂 CDCl_3 的特征峰, 在 0.90, 1.29 分别对应的是烷基长链末端的甲基 f 以及脂肪长链上的亚甲基 e 的质子峰, 2.45 对应的是烷基长链和氨基相连的亚甲基 d 的质子

表 4 不同反应条件制备 DLCS 的直观分析结果

Tab. 4 Visual analysis results of DLCS prepared under different reaction conditions

参数	t/h	$\theta/^\circ\text{C}$	$w_c/\%$	DS/ $\%$
项目 1	12	30	1	163
项目 2	12	45	2	164
项目 3	12	60	3	168
项目 4	18	30	2	176
项目 5	18	45	3	181
项目 6	18	60	1	179
项目 7	24	30	3	189
项目 8	24	45	1	190
项目 9	24	60	2	189
I _j /3	165	176	177	
II _j /3	179	178	176	
III _j /3	189	179	179	
R_j	24	3	3	

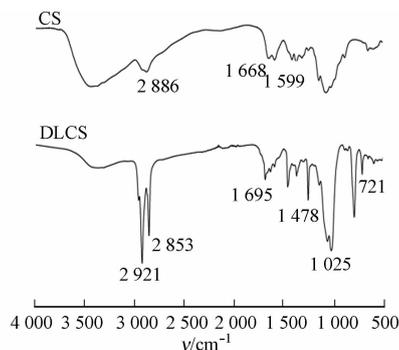


图 2 CS 和 DLCS 的 FT-IR 图

Fig. 2 FT-IR spectra of CS and DLCS

峰^[6];由¹H NMR 谱图进一步说明产物为长链烷基取代壳聚糖衍生物.

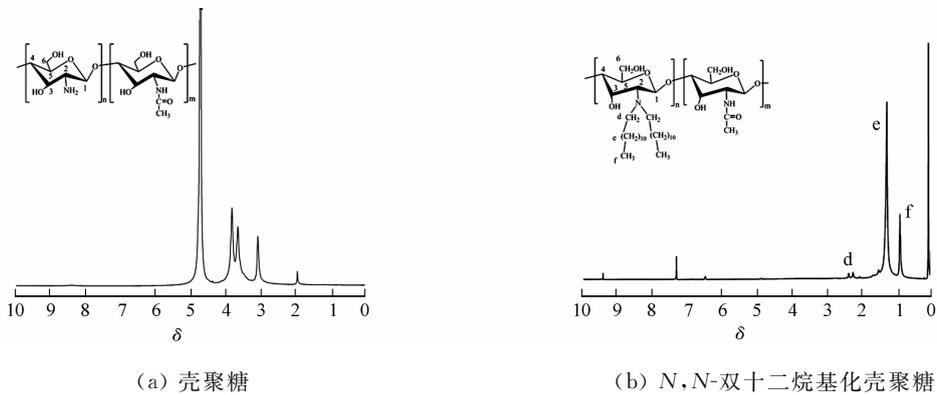


图3 样品的¹H NMR 谱图

Fig. 3 ¹H NMR spectra of samples

2.5 产物的 TG 分析

壳聚糖和 *N,N*-双十二烷基化壳聚糖的 TG 曲线,如图 4 所示.由图 4 可知:壳聚糖在 100,256 °C 附近分别出现了明显的失质量,在 100 °C 附近的失质量是由于壳聚糖失去结晶水,失质量率为 10%,而在 256 °C 附近的失质量是由于壳聚糖的主链发生分解;*N,N*-双十二烷基化壳聚糖的 TG 曲线在 100 °C 附近并没有失质量产生.这是因为在壳聚糖上引入长链烷基后疏水性能增加,在 175 °C 附近出现明显的失质量. DLCS 侧链取代烷基的分解及壳聚糖主链的降解,DLCS 在 150~350 °C 范围内出现了两次失质量,在 175 °C 附近的失质量为 DLCS 烷基取代链的分解,而 240 °C 附近的失质量为壳聚糖主链的降解. DLCS 的主链降解温度比壳聚糖低,这是由于烷基侧链的存在削弱了壳聚糖内部的氢键作用^[20].

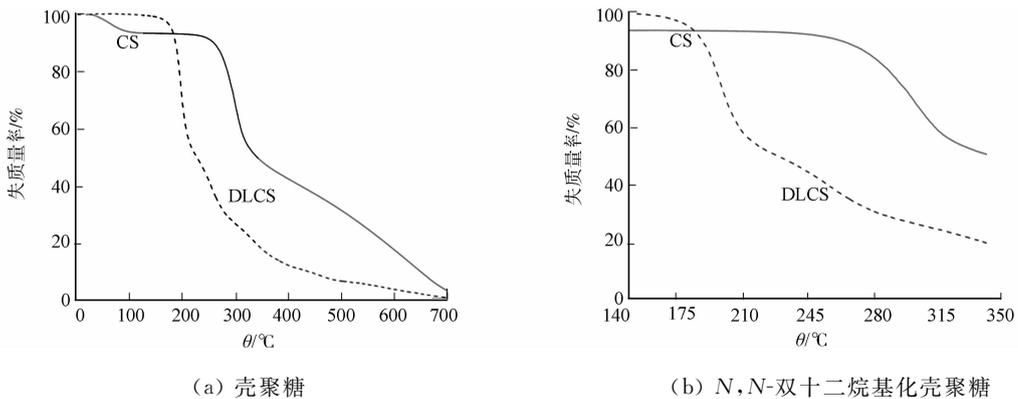


图4 样品的 TG 图

Fig. 4 TG spectra of samples

3 结论

采用月桂醛与壳聚糖反应生成西夫碱,再通过 Pd/C 催化氢化对 C=N 进行还原,成功制备 *N,N*-双十二烷基化壳聚糖衍生物,并用元素分析、红外光谱、核磁共振氢谱等进行表征.通过正交实验法选择最佳反应条件,结果表明,催化氢化温度和 Pd/C 催化剂用量对取代度的影响不大,而催化反应时间对 DLCS 取代度的影响最大,随着反应时间的延长,DLCS 的烷基化取代度呈上升趋势.

综合考虑节约能源和生产成本,得出催化氢化制备 DLCS 的最佳反应时间为 24 h,反应温度为 30 °C,Pd/C 催化剂的用量占壳聚糖总量的 1%,制得的 DLCS 的烷基化取代度为 189%,实验结果为壳聚糖烷基化的工业化生产提供依据.

参考文献:

[1] PETITC,REYNAUDS,DESBRIERES J. Amphiphilic derivatives of chitosan using microwave irradiation. Toward

- an eco-friendly process to chitosan derivatives[J]. Carbohydrate polymers, 2015, 116: 26-33. DOI: 10. 1016/j. carbpol. 2014. 04. 083.
- [2] RABEA E I, BADAWY M, EROGGE T M, *et al.* Enhancement of fungicidal and insecticidal activity by reductive alkylation of chitosan[J]. Pest Management Science, 2006, 62(9): 890-897. DOI: 10. 1002/ps. 1263.
- [3] LI Mingchun, SU Sheng, XIN Meihua, *et al.* Relationship between *N,N*-dialkyl chitosan monolayer and corresponding vesicle[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2007, 311(1): 285-288. DOI: 10. 1016/j. jcis. 2006. 12. 082.
- [4] 洪键淞, 辛梅华, 李明春, 等. *N*-甲基 *N,N*-双十二烷基壳聚糖盐酸盐的合成及自组装囊泡性能[J]. 化工进展, 2014, 33(2): 423-428. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-6613. 2014. 02. 027.
- [5] HUO Meirong, ZHANG Yong, ZHOU Jianping, *et al.* Formation, microstructure, biodistribution and absence of toxicity of polymeric micelles formed by *N*-octyl-*N,O*-carboxymethyl chitosan[J]. Carbohydrate polymers, 2011, 83(4): 1959-1969. DOI: 10. 1016/j. carbpol. 2010. 10. 073.
- [6] RAFAEL D, SCHMITT C C, NEUMANN M G. Syntheses and characterization of amphiphilic quaternary ammonium chitosan derivatives[J]. Carbohydrate polymers, 2016, 147(20): 97-103. DOI: 10. 1016/j. carbpol. 2016. 03. 083.
- [7] HUO Meirong, ZHANG Yong, ZHOU Jianping, *et al.* Synthesis and characterization of low-toxic amphiphilic chitosan derivatives and their application as micelle carrier for antitumor drug[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2010, 394(1): 162-173. DOI: 10. 1016/j. ijpharm. 2010. 05. 001.
- [8] 张晓林, 李明春, 辛梅华, 等. *N,N*-双十二烷基-3,6-*O*-磺丙基壳聚糖对紫杉醇的增溶作用[J]. 化工进展, 2012, 31(12): 2748-2752. DOI: 10. 16085/j. issn. 1000-6613. 2012. 12. 026.
- [9] 曾皓月, 王之, 方美娟, 等. pDNA-巯基壳聚糖纳米粒的制备及 Box-Behnken 效应面法工艺优化[J]. 华侨大学学报(自然科学版), 2017, 38(5): 676-681. DOI: 10. 11830/ISSN. 1000-5013. 201703054.
- [10] 王晓燕. *N* 烷基壳聚糖纤维的制备及其凝血性能研究[D]. 天津: 天津工业大学, 2018.
- [11] CHEN Jianzhong, ZHANG Zhenfeng, LIU Delong, *et al.* Palladium-catalyzed chemo- and enantioselective C—O bond cleavage of alpha-acyloxy ketones by hydrogenolysis[J]. Angewandte Chemie, 2016, 55(29): 8444-8447. DOI: 10. 1002/ange. 201603590.
- [12] LIU Chong, YUAN Jing, ZHANG Jian, *et al.* Rh-catalyzed asymmetric hydrogenation of beta-branched enol esters for the synthesis of beta-chiral primary alcohols[J]. Organic Letters, 2018, 20(1): 108-111. DOI: 10. 1021/acs.orglett. 7b03469.
- [13] LI Jing, MA Yujie, LU Yufei, *et al.* Synthesis of enantiopure γ -lactones via a ruPHOX-ru catalyzed asymmetric hydrogenation of γ -keto acids[J]. Advanced Synthesis and Catalysis, 2019, 365(5): 1-9. DOI: 10. 1002/adsc. 201801186.
- [14] GRAHAM W P, LI Hao, PRANAW K, *et al.* Rapid synthesis of rhodium-palladium alloy nanocatalysts[J]. Chem Cat Chem, 2018, 10(1): 329-333. DOI: 10. 1002/cctc. 201701133.
- [15] GUO Miao, LI He, REN Yiqi, *et al.* Improving catalytic hydrogenation performance of Pd nanoparticles by electronic modulation using phosphine ligands[J]. ACS Catalysis, 2018, 8(7): 6476-6485. DOI: 10. 1021/acscatal. 8b00872.
- [16] SUN Xiaohui, SUAREZ A I, OSADCHII D, *et al.* Single cobalt sites in mesoporous N-doped carbon matrix for selective catalytic hydrogenation of nitroarenes[J]. Journal of Catalysis, 2018, 357: 20-28. DOI: 10. 1016/j. jcat. 2017. 10. 030.
- [17] BAUER H, ALONSO M, FARBER C, *et al.* Imine hydrogenation with simple alkaline earth metal catalysts[J]. Nature Catalysis, 2018, 1(1): 40-47. DOI: 10. 1038/s41929-017-0006-0.
- [18] 陈凯. 5-氟尿嘧啶温敏凝胶的制备工艺及其体外释药研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2018.
- [19] 赵博文. 纳米 Pd 基催化剂的可控制备及其在维生素 E 关键中间体: 炔醇选择性加氢中的应用研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2018.
- [20] LIU Qili, ZHANG Jianxin, LI Dong, *et al.* Inhibition of amphiphilic *N*-Alkyl-*O*-carboxymethyl chitosan derivatives on alternaria macrospora[J]. Biomed Research International, 2018, 2018: 5236324. DOI: 10. 1155/2018/5236324.

(责任编辑: 陈志贤 英文审校: 刘源岗)