

超声辅助提取兔皮胶原蛋白及其理化特性

Ultrasonic-assisted extraction and physicochemical characteristics of collagen from rabbit-skin

张晓洁¹ 张宇昊¹ 马良² 马明思² 郑红² 孙艺²
ZHANG Xiao-jie¹ ZHANG Yu-hao¹ MA Liang² MA Ming-si² ZHENG Hong² SUN Yi²
(1. 西南大学食品科学学院, 重庆 400715; 2. 西南大学国家食品科学与工程实验教学中心, 重庆 400715)
(1. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. National Food Science and Engineering Experimental Teaching Center, Southwest University, Chongqing 400715, China)

摘要:以兔皮为原料,研究超声波在酶法提取胶原蛋白中的应用。结果表明,超声辅助制得的胶原蛋白的提取率为 $(83.69 \pm 0.51)\%$,与传统酶法相比提高了 25%。聚丙烯酰胺凝胶电泳结果表明,超声处理制得的兔皮胶原蛋白主要由 α_1 、 α_2 和 β 亚基组成,并未造成亚基的降解;紫外光谱表明,超声处理后的胶原蛋白的特征吸收波长为 217 nm,说明其较好地保持了 I 型胶原蛋白的特征;傅立叶变换红外光谱表明,经过超声处理后的胶原蛋白分子中的氢键遭到部分破坏,但其三螺旋结构仍保持完整;差示扫描量热仪结果表明,超声法制得的兔皮胶原蛋白的热变性温度和热焓值均略低于传统兔皮胶原,相对而言仍具有较高的热稳定性。

关键词:兔皮;胶原蛋白;超声波;理化特性

Abstract: The application of ultrasonic irradiation to extract pepsin-soluble collagen from the skins of rabbit was investigated in this study. The results showed that the extraction rate of collagen using the ultrasonic irradiation was $(83.69 \pm 0.51)\%$ and the yield increased by 25% in comparison with the conventional pepsin isolation method. The result of polyacrylamide gel electrophoresis confirmed that the subunits structure of collagen using the ultrasonic irradiation was mainly of α_1 , α_2 and β , without subunit degradation. Moreover, the ultraviolet spectrum exhibited a typical absorption peak at 217 nm, indicating that it greatly maintained the characteris-

tics of type I collagen. Additionally, the Fourier transform infrared spectroscopy revealed that hydrogen bond was partially destroyed, but the triple helix structure of collagen remained intact even after the ultrasonic irradiation. However, the result of Scanning Differential Calorimeter analyses showed that the thermal denaturation temperature and enthalpy value of collagen using the ultrasonic irradiation were slightly lower than that of the traditional rabbit collagen, and it still had a relatively higher thermal stability.
Keywords: rabbit skin; collagen; ultrasonic; physicochemical characteristic

胶原蛋白作为一种纤维蛋白,是细胞外基质的主要成分,广泛分布于结缔组织、皮肤、骨骼和韧带等部位,起着支撑器官、保护机体的功能,约占总蛋白的 30% 左右^[1]。胶原蛋白及其水解物具有良好的乳化性、起泡性和低免疫原性,这使其在食品方面^[2]、生物医学^[3]和化妆品等领域有广泛的应用。

目前,胶原蛋白的提取方法主要有中性盐萃取法、酸提取法、碱提取法和酶提取法等,其中,酶法应用最为广泛,酶法提取是利用蛋白酶对胶原纤维的末端肽进行降解,使肽键断裂,再将含有三螺旋结构的主体部分溶解于稀醋酸中而被提取出来。由于酶切位点有限以及端肽中存在较强的共价交联,使得酶解效率较低,提取周期较长^[4]。

超声波提取技术作为一种环境友好型新技术,因其具有提取时间短、能耗少、提取液中杂质少、对有效成分破坏较小等优点^[5],在当今的生产、生活和科学研究中被广泛使用。在超声波辅助提取过程中,快速形成的空化泡破裂时会对介质产生机械、化学和热效应作用,从而显著提高目标物质的提取效率^[6-7]。近年来,对于超声辅助提取胶原蛋白方面已经有一些报道,Ran 等^[8]用超声辅助胃蛋白酶提取牛跟腱中胶原蛋白,酸浸泡 12 h 后,在超声功率 750 W,频率 20 kHz

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:31301425);中央高校基本科研业务费重大项目(编号:XDJK2015A015);中国博士后科学基金面上项目(编号:2014M562267);中国博士后科学基金特别资助项目(编号:2015T80951);重庆市基础科学与前沿技术研究重点项目(编号:cstc2015jcyjBX0116);第四批重庆市高等学校优秀人才培养计划

作者简介:张晓洁,女,西南大学在读硕士研究生。
通信作者:张宇昊(1978—),男,西南大学教授、博士。
E-mail: Zhy1203@163.com

收稿日期:2016—10—28

条件下,先超声处理 18 h,再加入胃蛋白酶酶解 30 h,与常规酶解 48 h 相比,提取率提高了 154.17%。Kyung 等^[9]将超声用于酸法提取鲈鱼皮中的胶原蛋白,在超声功率 150 W,频率 20 kHz 条件下,酸浸泡超声处理 24 h,与传统酸法提取 24 h 相比,胶原蛋白的提取率提高了 116.65%,但凝胶电泳结果表明,胶原发生了降解。这说明,适度超声可以提高胶原蛋白的产率,但超声处理过程中所产生的机械和热效应会导致胶原发生降解。

本研究拟以高蛋白低脂肪的兔皮为原料,考察料液比和超声时间对兔皮胶原蛋白提取率的影响,旨在提高胶原蛋白的产率,并对其理化性质进行研究,以期为其高效生产和潜在应用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

兔皮:胶原蛋白含量为(13.82±0.24) g/100 g,重庆阿兴记食品有限公司,原料获取后洗净冻藏于-20℃冰箱中备用;
氢氧化钠、氢氧化钙、冰醋酸、盐酸、硫化钠、氯化钠、溴化钾、十二烷基硫酸钠:分析纯,成都市科龙化工试剂厂;

β-巯基乙醇(2-ME)、过硫酸铵(APS)、四甲基乙二胺(TEMED):分析纯,美国 BIO BASIC 公司;

Tris、考马斯亮蓝 R-250:优级纯,美国 BIO BASIC 公司;
胃蛋白酶(1:10 000):酶活 800~2 500 U/mg,北京索莱宝科技有限公司;

30%丙烯酰胺:优级纯,北京索莱宝科技有限公司;
标准蛋白:分子质量 10~200 kDa,加拿大 Fermentas 公司。

1.1.2 主要仪器设备

超声波细胞破碎仪:JY92-IIDN 型,宁波新芝生物科技股份有限公司;

电子天平:JA3003B 型,上海精天电子仪器有限公司;
料理机:FYL-C020E 型,九阳股份有限公司;

实验室 pH 计:PE20 型,上海梅特勒-托利多仪器有限公司;

大功率磁力搅拌器:99-1 型,金坛市科析仪器有限公司;
台式高速离心机:5810 型,德国 Eppendorf 公司;

水浴恒温振荡器:SHZ-B 型,上海将任实验设备有限公司;

真空冷冻干燥机:FD-1-50 型,北京博医康实验仪器有限公司;

基础电泳仪:Power PacTM 型,美国 Bio-Rad 公司;
凝胶成像系统:G: BOX EF 型,英国 Syn-gene 公司;
差示量热扫描仪:Pyris4000 型,美国 PerkinElmer 公司;
紫外可见分光光度计:752 型,上海菁华科技有限公司;
红外光谱仪:Spectrun100 型,美国 PerkinElmer 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 酶法提取兔皮胶原蛋白

新鲜兔皮→预处理→去除杂蛋白(用质量浓度为 10 g/L

的 NaCl 溶液处理,浸泡搅拌 6 h,每 2 h 换 1 次液)→清洗→酸浸泡(在 4℃下于 pH 2.2 的醋酸溶液中浸泡 8~10 h)→打浆→胃蛋白酶酶解(酶解液的 pH 1.9,酶用量 1%,酶解时间 4 h)→中和、盐析(使 NaCl 最终浓度为 4~5 mol/L,盐析 12 h)→纯化(以 pH 3.0 的醋酸溶液为透析液透析 1 d,再以纯水为透析液透析 2 d)→冻干→胶原蛋白^[10]

1.2.2 超声辅助酶法提取兔皮胶原蛋白 在 1.2.1 的基础上稍作调整,酸浸泡打浆后先超声处理,再酶解。超声处理基本条件为:超声功率 45%(总功率 650 W),频率为 20 kHz,工作 5 s,间隔 5 s,超声时间 30 min,料液比 1:15(g/mL);重点考察料液比和超声时间对胶原蛋白提取率的影响,料液比水平设置为:1:10,1:15,1:30(g/mL),超声时间水平设置为:0,10,20,25,30,60 min。

1.2.3 胶原蛋白提取率的计算

$$C = \frac{m_1}{m_2} \times 100\%, \tag{1}$$

式中:

C——胶原蛋白的提取率,%

m_1 ——胶原蛋白的冻干重量,g;

m_2 ——兔皮的冻干重量,g。

1.2.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 称取 2 mg 胶原蛋白溶解于 1 mL Tris—HCl(pH 8.0)溶液中^[9],使其蛋白浓度为 2 mg/mL,其中分离胶和浓缩胶的浓度分别为 6%和 5%,具体操作步骤参照文献[11]。染色完成并脱色后,采用 Gene Tools 数据处理软件对电泳图谱进行分析。

1.2.5 紫外光谱分析 以 0.05 mol/L 醋酸为溶剂,将胶原蛋白样品溶于其中,配制浓度为 0.5 mg/mL 的溶液,取 0.05 mol/L 的醋酸溶液作为空白,对样品在 190~400 nm 的近紫外光区进行扫描^[12]。

1.2.6 红外光谱(FT-IR)分析 称取 1 mg 样品与 150 mg 溴化钾(KBr)置于玛瑙研钵中充分混匀研磨,烘干后进行压片,用傅立叶红外光谱仪在 450~4 000 cm⁻¹范围内进行测定,具体参数设置参照文献[13]。

1.2.7 热稳定性分析 准确称量样品 3~5 mg,密封于铝钳锅中,在氮气环境下,以 5℃/min 的速率进行加热,测定温度范围为-5~200℃,记录差示量热扫描(DSC)图谱并进行分析^[14]。

1.2.8 数据分析 每组试验设置 3 个平行,所得数据均采用 origin 8.6 和 SPSS 17.0 软件进行分析,以平均值±标准偏差来表示。

2 结果与分析

2.1 料液比对胶原蛋白提取率的影响

由图 1 可知,随着超声料液比的增加,胶原蛋白的提取率先增加后降低。超声波的机械效应和空化作用有利于溶剂的渗透和扩散^[15],在料液比为 1:10(g/mL)时,溶液粘度较大,不利于超声空化作用的传导,胶原蛋白分子的溶出速率较低;随着液料比增加,当料液比为 1:15(g/mL)时,稀释作用加强,溶液的粘度和蛋白浓度都有所下降,超声波的强

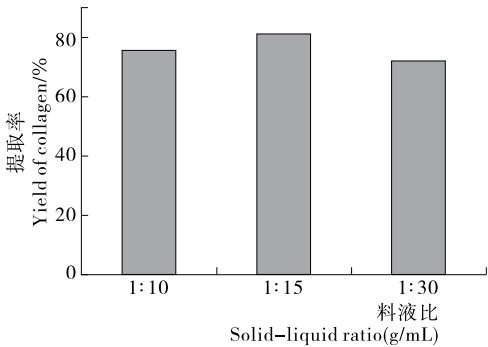


图 1 料液比对胶原蛋白提取率的影响
Figure 1 Effects of the ratio of solid to liquid on extraction rate of collagen

烈振动和空化效应增加,使得胶原纤维结构得以松散,促使分散的胶原分子溶解于稀醋酸中,因而提取率有显著提高($P<0.05$);当料液比为 1:30(g/mL)时,溶液体积的增加反而使得超声的空化作用和机械效应减弱,同样造成胶原蛋白溶出速率减慢。此外,超声作用对蛋白结构的改变会导致更多酶切位点的暴露,料液比为 1:15(g/mL)时,可能更有利于酶切位点的暴露。因此确定最佳料液比为 1:15(g/mL),这与齐越等^[16]研究结果的变化趋势相符。

2.2 超声时间对胶原蛋白提取率的影响

由图 2 可知,随着超声作用时间的增长,胶原蛋白提取率先升高后下降的趋势,在 25 min 时达到最大值(83.69 ± 0.51)%,与对照组(66.66 ± 0.72)%相比,胶原蛋白的提取率有显著提高($P<0.05$)。在超声 25 min 以内,随着超声时间的增加胶原蛋白的提取率呈现上升趋势,这是因为超声作用使得胶原纤维结构松散,促使胶原蛋白三螺旋主体部分溶于酸中而被提取出来^[17-18];随着超声时间的进一步增加,胶原蛋白的提取率逐渐下降,可能是长时间超声处理所产生的热效应和机械效应会破坏胶原蛋白结构,使部分胶原蛋白发生变性,在酸中的溶解度降低,提取率有所下降。综上所述,确定较适超声时间为 25 min,这与杨萌萌等^[19]研究结果的变化趋势一致。

2.3 胶原蛋白的亚基组成

由图 3 可知,对照组和超声处理组提取的兔皮胶原蛋白都具有明显的 α_1 、 α_2 和 β 组分^[20]。在相对分子质量 120 kDa

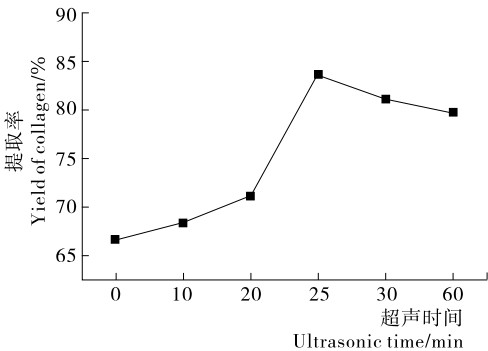
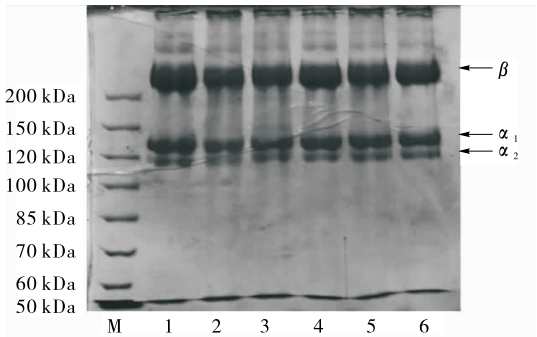


图 2 超声处理时间对胶原蛋白提取率的影响
Figure 2 Effects of ultrasonic time on extraction rate of collagen



M. 标准蛋白,1~6. 超声时间分别为 0,10,20,25,30,60 min

图 3 不同超声处理时间制得的兔皮胶原蛋白的 SDS 电泳图谱

Figure 3 SDS-PAGE pattern of collagen from different ultrasonic time

附近的两个条带分别为 α_1 和 α_2 链,其中 α_1 的强度明显高于 α_2 ,说明胶原是由两条 α_1 和一条 α_2 肽链构成,符合 I 型胶原蛋白的典型特征^[21],在 α_2 链以下未发现其它电泳条带,说明超声处理制得的兔皮胶原蛋白纯度较高,且未发生降解。SDS-PAGE 图谱和胶原蛋白亚基组成证明短时超声可以使胶原纤维底物得到松散,促使胶原分子溶于酸中,不会破坏胶原蛋白结构。

2.4 胶原蛋白的紫外光谱分析

胶原蛋白的近紫外吸收光谱可用于测量它的酪氨酸含量和非螺旋端肽的完整性。Lin 等^[22]报道的哺乳动物或鱼类的 I 型胶原蛋白特征吸收光谱在 218 nm 处,这是由于肽键 C=O 的 $n\rightarrow\pi^*$ 跃迁所致。图 4 中对照组的最大吸收峰在 219 nm 处,超声 25 min 的最大吸收峰在 217 nm 处,说明超声处理后的胶原蛋白较好地保持了 I 型胶原蛋白的特征。此外,在 280 nm 处有微弱吸收,这可能与胶原蛋白中酪氨酸(278 nm),苯丙氨酸(259 nm)的存在相关,正是这些吸收峰的存在说明胶原蛋白非螺旋端肽具有完整性。

2.5 胶原蛋白的红外光谱分析

在红外光谱中,酰胺键常被作为分析和鉴定蛋白质二级结构的特征官能团^[23]。通常,酰胺 A 带位于 $3\ 330\sim3\ 440\text{ cm}^{-1}$,主要与 $\nu\text{N-H}$ 伸缩振动有关,由图 5 和表 1 可知,对照组和超声 25 min 的酰胺 A 带吸收特征峰分别出现

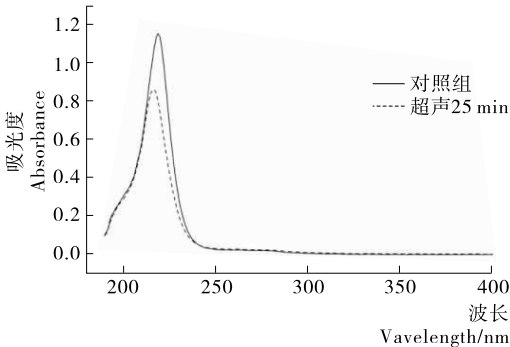


图 4 超声处理 25 min 制得的兔皮胶原蛋白的紫外光谱分析
Figure 4 UV spectra of collagen from 25 min ultrasonic treatment

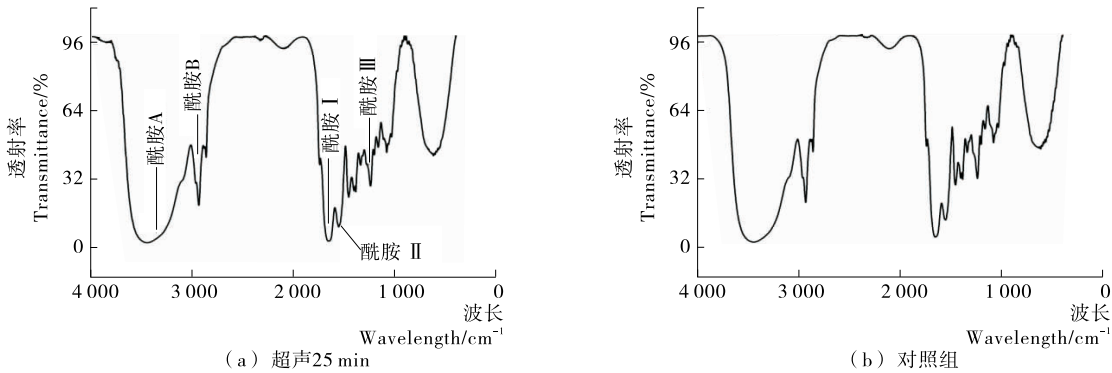


图 5 超声处理 25 min 制得的兔胶原蛋白的红外光谱分析

Figure 5 FTIR spectra of collagen from 25 min ultrasonic treatment

表 1 超声处理 25 min 制得的兔胶原蛋白红外光谱特征峰吸收波长

Table 1 The absorbance positions of collagen from 25 min ultrasonic treatment

处理方式	酰胺 A/ cm ⁻¹	酰胺 B/ cm ⁻¹	酰胺 I/ cm ⁻¹	酰胺 II/ cm ⁻¹	酰胺 III/ cm ⁻¹	A _{III} /A _{1 453}
对照组	3 434.99	2 926.69	1 654.23	1 552.83	1 239.66	1.063
超声 25 min	3 435.45	2 926.82	1 657.22	1 552.91	1 239.99	1.042

在 3 434.99 cm⁻¹ 和 3 435.45 cm⁻¹, 酰胺 A 带向高波数移动, 说明分子中有氢键轻微破坏^[24]; 酰胺 I 带位于 1 636~1 661 cm⁻¹, 与 C=O 的伸缩振动和 ν N-H 弯曲有关, 胶原蛋白肽链间的氢键发生变化时, 可由其吸收强度和波长位置的改变反映出来, 吸收峰向高波数移动表明氢键被破坏, 对照组和超声 25 min 的酰胺 I 带吸收特征峰分别出现在 1 654.23 cm⁻¹ 和 1 657.22 cm⁻¹, 表明超声处理制得的胶原蛋白分子中的氢键遭到部分破坏^[23]; 一般酰胺 III 带的存在与胶原蛋白三螺旋结构的完整性有关^[25], 且其吸收峰通常位于 1 220~1 320 cm⁻¹, 对照组、超声 25 min 的酰胺 III 带的吸收特征峰分别出现在 1 239.66 cm⁻¹ 和 1 239.99 cm⁻¹, 此外, 若胶原蛋白的酰胺 III 峰与 1 453 cm⁻¹ 峰面积比为 1.0 时, 则表明其具有完整的三螺旋结构^[26], 对照组和超声处理组胶原蛋白的酰胺 III 峰与 1 453 cm⁻¹ 峰面积比分别为 1.063 和 1.042, 说明经过超声处理的胶原蛋白较好地保留了三螺旋结构。

2.6 胶原蛋白的热稳定性分析

由表 2 可知, 超声法制得的兔胶原蛋白的热变性温度和热焓值均略低于传统兔皮胶原。天然胶原蛋白是由三条肽链缠绕形成的一个三螺旋结构, 当体系温度达到热变性温度后, 分子内氢键遭到破坏, 分子结构从有序螺旋态变为无

序态, 维系胶原纤维结构稳定的分子间作用力越大, 则其变性温度和热焓值越高^[27]。超声辅助提取的胶原蛋白热变性温度要稍低于对照组, 可能是超声处理会使维系胶原纤维之间的氢键遭到轻微破坏, 使得变性温度降低, 这与红外分析中的酰胺 I 带结果一致。但总体来讲本试验超声条件下提取的兔胶原蛋白较好地保持了天然结构, 热稳定性较高。

3 结论

(1) 在超声功率 45%(总功率 650 W), 频率 20 kHz, 工作 5 s 间隔 5 s, 料液比 1:15(g/mL), 超声时间 25 min 条件下辅助酶法提取兔皮胶原蛋白, 其提取率比相同条件下常规酶解提高了 25%, 提取率达(83.69±0.51)%。

(2) 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果表明, 超声处理制得的兔皮胶原蛋白主要由 α_1 , α_2 和 β 亚基组成, 为典型的 I 型胶原蛋白; 紫外光谱表明, 超声制得的胶原蛋白的特征吸收波长为 217 nm, 较好地保持了 I 型胶原蛋白的特征; 傅立叶变换红外光谱表明, 在本试验超声条件下, 超声波的空化和机械效应等只能使部分氢键轻微破坏, 对胶原蛋白保持三螺旋结构的完整性没有影响; 差示扫描量热仪结果表明, 与传统酶法提取的兔皮胶原蛋白相比, 超声辅助提取的兔皮胶原蛋白热变性温度和热焓值略低, 但总体而言仍具有较高的热稳定性。

参考文献

[1] 蒋挺大. 胶原与胶原蛋白[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 3-45.
[2] BILEK S E, BAYRAM S K. Fruit juice drink production containing hydrolyzed collagen[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 14: 562-569.
[3] CHI H L, SINGLA A, LEE Y. Biomedical applications of colla-

表 2 超声处理 25 min 制得的兔胶原蛋白的热变性温度及热焓值表

Table 2 The *T_m* and ΔH of collagen from 25 min ultrasonic treatment

处理方式	热变性温度 <i>T_m</i> /℃	热焓值 ΔH /(J·g ⁻¹)
对照组	64.79±0.66	521.96±5.76
超声 25 min	64.67±0.54	478.19±6.23

gen[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2001, 221(1/2): 1-22.

[4] 梅鑫东, 曾江南, 蒋柏泉. 酶法提取鱼鳞胶原蛋白的工艺优化[J]. 食品与机械, 2014, 30(6): 156-159.

[5] 焦岩, 王振宇. 蓝锭果花色苷超声波辅助提取优化及其降血脂作用[J]. 中国食品学报, 2010, 10(2): 52-59.

[6] LI Hui, CHEN Bo, YAO Shou-zhuo. Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* Oliv. (*E.ulmodies*)[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2005, 12(4): 295-300.

[7] 杨昱, 白靖文, 俞志刚. 超声辅助提取技术在天然产物提取中的应用[J]. 食品与机械, 2011, 27(1): 170-174.

[8] RAN Xue-guang, WANG Lin-yue. Use of ultrasonic and pepsin treatment in tandem for collagen extraction from meat industry by-products[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2013, 94(3): 585-590.

[9] KYUNG K H, HO K Y, JI K Y, et al. Effects of ultrasonic treatment on collagen extraction from skins of the sea bass *Lateolabrax japonicus*[J]. Fisheries Science, 2012, 78(2): 485-490.

[10] 王雪蒙, 于玮, 马良, 等. 兔皮胶原蛋白的提取及其结构鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2016(4): 209-213.

[11] 陈丽清. 超高压技术制备高品质明胶及其机理研究[D]. 重庆: 西南大学, 2013: 22.

[12] 杨玲, 赵燕, 鲁亮, 等. 鲟鱼鱼皮胶原蛋白的提取及其理化性能分析[J]. 食品科学, 2013, 34(23): 41-46.

[13] 于玮, 王雪蒙, 马良, 等. 猪皮胶原蛋白提取过程中酶解条件优化及其结构鉴定[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2015(4): 106-113.

[14] 周梦柔. 猪皮胶原蛋白明胶化过程中的微观结构变化研究及明胶提取率预测模型的构建[D]. 重庆: 西南大学, 2014: 14.

[15] 吴倩, 张丽芬, 陈复生. 超声波对蛋白质提取及改性影响的研究进展[J]. 食品与机械, 2015, 31(4): 256-259.

[16] 齐越. 超声波辅助法酶解鹿皮胶原蛋白及其产品研发[D]. 吉林: 吉林大学, 2014: 21-30.

[17] KIM H K, KIM Y H, PARK H J, et al. Application of ultrasonic treatment to extraction of collagen from the skins of sea bass *Lateolabrax japonicus* [J]. Fisheries Science, 2013, 79(5): 849-856.

[18] LI De-fu, MU Chang-dao, CAI Su-mei, et al. Ultrasonic irradiation in the enzymatic extraction of collagen[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2009, 16(5): 605-609.

[19] 杨萌萌, 郭兆斌, 余群力, 等. 超声波辅助法提取胶原蛋白工艺研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2013, 48(3): 121-126.

[20] WANG Lin, LIANG Qiu-fang, CHEN Ting-ting, et al. Characterization of collagen from the skin of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*)[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 38(38): 104 -109.

[21] NALINANON S, BENJAKUL S, KISHIMURA H, et al. Type I collagen from the skin of ornate threadfin bream (*Nemipterus hexodon*): Characteristics and effect of pepsin hydrolysis[J]. Food Chemistry, 2011, 125(2): 500-507.

[22] LIN Yung-kai, LIU Deng-cheng. Comparison of physical-chemical properties of type I collagen from different species[J]. Food Chemistry, 2006, 99(2): 244-251.

[23] MUYONGA J H, COLE C G B, DUODU K G. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*)[J]. Food Chemistry, 2004, 86(3): 325-332.

[24] DOYLE B B, BENDIT E G, BLOUT E R. Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides[J]. Biopolymers, 1975, 14(5): 937-957.

[25] LIU Da-song, LIANG Li, REGENSTEIN J M, et al. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) [J]. Food Chemistry, 2012, 133(4): 1 441-1 448.

[26] SYLVESTER M F, YANNAS I V, SALZMAN E W, et al. Collagen banded fibril structure and the collagen-platelet reaction[J]. Thrombosis Research, 1989, 55(1): 135-148.

[27] 康俊霞, 康永锋, 包斌, 等. Na⁺、Ca²⁺和 pH 值对鲟鲨皮胶原蛋白热变性温度的影响[J]. 食品科学, 2011(13): 66-70.

(上接第 155 页)

[2] 全国中草药会编组编. 全国中草药汇编: 下[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1978: 129.

[3] 吴征镒. 新华本草纲要: 第一册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1988: 369.

[4] 张伟, 黄正明, 陈晓农. 水芹总酚酸对正常小鼠免疫功能的影响[J]. 解放军药学报, 2013, 29(1): 17-19.

[5] 刘鹏伟, 曹平良, 罗俊, 等. 水芹水提液抗心律失常的实验研究[J]. 南昌大学学报: 医学版, 2010, 50(3): 40-42.

[6] 张伟, 陈晓农, 黄正明, 等. 水芹总酚酸对人肝癌 2.2.15 细胞周期的影响[J]. 解放军药学报, 2013, 29(4): 369-371.

[7] 朴日龙, 张红英. 水芹正丁醇提取物抗凝血和抗血栓形成作用的研究[J]. 食品科学, 2010, 31(7): 280-283.

[8] 张伟, 黄正明, 陈晓龙. 水芹总酚酸对正常小鼠免疫功能的影响[J]. 解放军药学报, 2013, 29(1): 17-19.

[9] 年国侠, 黄正明, 杨新波, 等. 水芹总酚酸对小鼠 CCl₄ 肝损伤的保护作用[J]. 解放军药学报, 2008, 24(6): 501-504.

[10] 年国侠, 黄正明, 杨新波, 等. 水芹总酚酸退黄作用的实验研究[J]. 解放军药学报, 2009, 25(2): 124-127.

[11] 吴剑峰. 天然药物化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 240-244.

[12] 郭晓青, 陈晓靓, 杨春梅, 等. 紫苏叶活性成分及抗氧化性研究[J]. 食品与机械, 2014, 30(4): 178-181.

[13] 郭晓青, 吴金鸿, 周焱富, 等. 明日叶水溶性总黄酮提纯工艺[J]. 食品科学, 2012, 33(22): 27-32.

[14] MOHD A A, GHANYA A N, MIZATON H, et al. Hypoglycemic effect of Octomelessumatrana aqueous extract in streptozotocin-induced diabetic rats and its molecular mechanisms[J]. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2012, 11: 875-881.

[15] FAIYAZ A N S, SIDDARAJU M H, UROOJ A. Effect of Buteamonosperma Lam. Leaves and bark extracts on blood glucose in streptozotocin-induced severely diabetic rats [J]. Pharmacognosy Res, 2012, 4: 33-36.