

微切变-助剂互作技术制备鹿角盘微切助粉及其活性物质的检测

王菲菲^{1,2,3}, 徐永平^{2,3}, 赵良忠¹, 李淑英³, 李化强^{1,2,3*}

(1. 邵阳学院生物与化学工程系, 湖南邵阳 422000; 2. 大连理工大学

大学生命科学与生物技术学院, 辽宁大连 116024; 3. 大连赛姆生物工程技术有限公司博士后科研工作站, 辽宁大连 116620)

摘要 [目的]检测鹿角盘微切助粉中与骨质疏松症有关的活性物质的含量。[方法]采用微切变-助剂互作技术制备鹿角盘微切助粉,通过与中药粉碎技术相比,考察该技术对鹿角盘颗粒粒径、形态的影响并检测其中活性成分的含量。[结果]经微切变-助剂互作技术处理后,鹿角盘粒径在1~30 μm范围内的颗粒数占82.73%,且细胞已被充分破碎,有效成分呈释放的状态。鹿角盘微切助粉中含有丰富的性激素(包括雌二醇、睾酮、孕酮)、类胰岛素样生长因子-1、柠檬酸钙和钙,且含量均高于其粗粉组,说明微切变-助剂互作技术有利于鹿角盘中活性成分的释放,体现了该技术的优越性。[结论]该研究可为合理开发利用鹿角盘提供一种新的粉碎技术,并为阐明鹿角盘防治骨质疏松症提供理论依据。

关键词 鹿角盘;微切变-助剂互作技术;微切助粉;活性物质

中图分类号 R 282.74 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)20-138-05

Detection of Active Ingredients in Deer Antler Base Powder Processed by Press-shear Assisted Interaction Technology

WU Fei-fei^{1,2,3}, XU Yong-ping^{2,3}, ZHAO Liang-zhong¹, LI Hua-qiang^{1,2,3*} et al (1. Department of Biology and Chemistry Engineering, Shaoyang University, Shaoyang, Hunan 422000; 2. School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning 116024; 3. Postdoctoral Research Stations of Dalian SEM Bio-Engineering Technology Co., Ltd., Dalian, Liaoning 116620)

Abstract [Objective] To detect the active ingredients content which related to osteoporosis in deer antler base PAI powder processed by press-shear assisted interaction technology (PAI). [Method] We first used press-shear assisted interaction technology and traditional Chinese medicine grinding technology to process deer antler base. Effects on particle sizes, micrographs and active ingredients content by different pre-treatments were also investigated. [Result] Particle number of deer antler base PAI powder ranged in 1-30 μm accounted for 82.73%. Cells were broken and the active ingredients were released. Deer antler base PAI powder contained many sex hormone (including estradiol, testosterone, progesterone), IGF-1, calcium citrate and calcium, and the content of several active ingredients in deer antler base PAI powder were superior to its coarse powder. Above results indicated that press-shear assisted interaction technology was beneficial to the release of the active ingredients. [Conclusion] This research could provide a new grinding technology to promote the rational development and utilization of deer antler base, and supply a scientific basis for deer antler base applied for prevention and treatment of osteoporosis.

Key words Deer antler base; Press-shear assisted interaction technology (PAI); PAI powder; Active ingredients

据《神农本草经》记载,鹿角盘味咸、微温、无毒,具有温补肝肾、强筋健骨、活血消肿、治阴症疮疡、乳痈初起、瘀血肿痛等功效,我国民间常用于治疗乳腺炎、恶疮、痈肿等疾病^[1]。现代研究证明,鹿角盘中含有丰富的氨基酸、多肽和蛋白质,还含有多糖、脂类以及钙、磷等矿质元素^[2]。然而,由于鹿角盘经长时间的骨化,十分坚硬,不易粉碎,使得提取分离困难,在很大程度上直接影响其开发和利用^[3]。

微切变-助剂互作技术是机械化学领域的一项新应用,是利用高强度研磨产生的机械化学效应^[4],将固体原材料与各种类型的化学助剂共同研磨,选用水提取有效成分的一项技术。它在植物提取中应用很广泛^[5-7]。Korolev等^[8]采用AGO-2型高能行星磨,将西伯利亚冷杉松针与Na₂CO₃共研磨,用水提取三萜酸,提取率比常规法提高了35.9%;Lomovsky等^[9]将伪泥胡菜与蔗糖共研磨,发现可显著提高伪泥胡菜中植物甾皮类固醇在水中的溶出率,比常规法提高了103.7%。有研究表明,高强度研磨在破碎植物细胞的同时还能促进暴露出的有效成分与助剂接触、反应,改变活性成分的溶解性^[5-6,10-11]。该研究采用微切变-助剂互作技术处

理鹿角盘,制备鹿角盘微切助粉,通过与常规的中药粉碎技术相比,考察该技术对鹿角盘颗粒粒径、形态的影响并检测其中活性成分的含量,包括性激素、胰岛素样生长因子-1、有机酸钙和钙等,以期阐明鹿角盘防治骨质疏松症提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试材。梅花鹿鹿角盘(*Cervus nippon Temminck*)由吉林鹿业生物制品有限公司提供(长春,中国)。

1.1.2 试剂。甲醇(特级)、无水乙醇(特级),科密欧化学试剂有限公司;柠檬酸(特级)、延胡索酸(特级)、环糊精(特级)、聚乙二醇(特级),英国Alfa Aesar公司;碳酸氢钠(分析级)、碳酸钠(分析级),科密欧化学试剂有限公司;磷酸(分析级)、磷酸氢二钾(分析级),北京新工化学试剂厂;钙标准液(分析级),国家标准物质研究中心;雌二醇、孕酮和睾酮放射免疫试剂盒,大连市中心医院;类胰岛素样生长因子-1酶联免疫试剂盒,美国ADL公司。

1.1.3 仪器。超纯水仪(Synthesis A10,美国Millipore公司),中药粉碎机(WK-800A,上海新诺仪器有限公司),高能振动研磨机[WZJ(BFM)-6J,山东济南倍力粉技术工程有限公司],低温冷冻离心机(5804R,德国Eppendorf公司),高压蒸汽灭菌锅(SS-325,日本TOMY公司),原子吸收分光光度计(UNICAM 969,美国热电公司),离子溅射仪(E-1045型,日本日立高新技术有限公司),聚焦光束反射分析仪

基金项目 国家科技部863计划项目(2013AA102805-03);湖南省科技厅重点项目(2015CK3031)。

作者简介 王菲菲(1982-),女,辽宁锦州人,讲师,博士,从事天然产物提取及药理功能研究。*通讯作者,讲师,博士,硕士生导师,从事食品生物技术研究。

收稿日期 2016-05-13

(m600, 美国 Laser - Tech 公司), 扫描电子显微镜 (JEM - 1200EX, 日本电子株式会社), 激光粒度仪 (LS100Q, 美国 Beckman Coulter 公司), HPLC 高效液相色谱仪 (Agilent 1100, 美国 Agilent 公司), pH 计 (PB - 10 型, 德国赛多利斯 sartorius 公司), 电子天平 (FA1604s 型, 上海天平仪器厂), 标准网孔筛 (2.360 ~ 0.037 mm, 新乡市康达新机械有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 鹿角盘微切助粉的制备。将干燥的鹿角盘制成小块投入到中药粉碎机中, 粉碎 5 min, 过 0.25 mm 标准网孔筛, 获得鹿角盘粗粉, 备用。参照前人的研究^[5-7], 使用可食用的糖类、无机盐、小分子有机物和有机酸作为助剂进行筛选和优化, 最终确定复合助剂组成、比例及添加的剂量 (助剂配方保密)。利用微切变-助剂互作技术将鹿角盘粗粉进一步加工成鹿角盘微切助粉。具体操作如下: 将制备的鹿角盘粗粉与 3.0% (w/w) 复合助剂混合后添加到高能振动研磨机 (容积为 1.2 L, 钢棒长 174 mm、直径 18 mm) 中, 在冷却循环水温 20 °C、频率 16 Hz、钢棒加速度 9 g ($g = 9.8 \text{ m/s}^2$) 和总消耗功率 0.75 kW 条件下研磨 40 min, 获得鹿角盘微切助粉 ($D_{95} \leq 44 \mu\text{m}$), 备用。

1.2.2 颗粒粒径检测。称取鹿角盘粗粉和微切助粉各 3 g, 分别加入装有 50% 乙醇溶液的 200 mL 专用量杯中, 置入聚焦光束反射分析仪 (FBRM) 探头, 以 500 r/min 搅拌速率搅拌, 使样品在溶液中均匀分散。FBRM 配套软件自动记录粒径分布, 测量 1 ~ 500 μm 范围内的颗粒粒径总数及各粒径区间的分布^[12-15]。

1.2.3 扫描电镜观察。称取鹿角盘粗粉和微切助粉各 5 mg, 分别加入 1 mL 50% 乙醇溶液中, 超声匀化成悬浊液。将洁净的铝箔片粘附在样品台上, 将上述悬浊液滴于洁净铝箔片上, 在红外灯下烘干液体后, 置于离子溅射仪的样品舱中, 在 15 mA 电流下喷金 90 s。样品取出后, 装入扫描电镜 (SEM) 观察室, 进行鹿角盘粗粉和微切助粉的形态观察。放大倍数为 400 倍, 加速电压均为 10 kV^[16-17]。

1.2.4 性激素含量的测定。称取鹿角盘粗粉和微切助粉各 5 g, 分别加入 100 mL 80% 甲醇溶液, 200 r/min 震荡混匀, 回流提取 3 h。之后在 4 °C、3 000 r/min 条件下离心 20 min, 取上清液; 45 °C 下减压蒸馏浓缩至 50 mL, 得待测样品。然后用放射免疫试剂盒分别检测鹿角盘中雌二醇、孕酮和睾酮的含量, 对数转换法计算测定结果。

1.2.5 类胰岛素样生长因子-1 含量的测定。

1.2.5.1 乙醇提取。称取鹿角盘粗粉和微切助粉各 5 g, 分别加入 100 mL 65% 乙醇溶液中浸泡震荡 3 h, 旋转搅拌; 4 °C、6 000 r/min 条件下离心 20 min, 取上清; 45 °C 下减压蒸馏浓缩至 50 mL, 得待测样品, 用 IGF - 1 ELISA 试剂盒检测^[18-19]。

1.2.5.2 碱溶液提取。称取鹿角盘粗粉和微切助粉各 5 g, 按质量比加入 8 ~ 10 倍的 pH 8 ~ 10 碱性溶液作提取剂, 碱性溶液为 0.2 mol/L 碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲液, 提取温度为 20 ~ 25 °C, 浸泡振荡 3 h; 4 °C、6 000 r/min 条件下离心 15

min, 取上清, 得待测样品, 用 IGF - 1 ELISA 试剂盒检测^[19-20]。

1.2.6 有机酸钙含量的测定。目前国内外普遍采用高效液相色谱 (HPLC) 法测定有机酸^[21-22]。因此, 该研究采用 HPLC 法测定鹿角盘中有机酸钙 (柠檬酸钙和延胡索酸钙) 的含量。具体操作如下: 称取鹿角盘粗粉和微切助粉各 0.25 g, 分别加入到 2.5 mL HCl (1 mol/L) 溶液中混匀, 37 °C 放置 30 min, 冷却、过滤, 用流动相淋洗并定容至 25 mL, 用 0.22 μm 滤膜过滤, 得样品溶液。然后根据有机酸标准溶液, 使用高效液相色谱仪检测样品中有机酸钙的含量。色谱条件: 色谱柱 Century SIL C18 - Eps (5 μm , 250 mm \times 4.6 mm), 流速 0.8 mL/min, 进样体积 10 μL , 检测波长 210 nm, 柱温 30 °C, 流动相为 10 mmol/L KH_2PO_4 (用 H_3PO_4 将 pH 调至 2.7) 与 CH_3OH 混合溶液 ($V/V = 95:5$)。标准曲线和检出限: 以峰面积 Y 与质量浓度 X (mg/L) 求得线性回归方程, 检出限以 3 倍信噪比 (S/N) 计算最小检出限量 (表 1)。

表 1 有机酸的回归分析和检出限

Table 1 Regression analysis and detection limit of organic acid

有机酸 Organic acid	回归方程 Regression analysis	相关系数 Correlation coefficient	检出限 Detection limit mg/L
柠檬酸 Citric acid	$Y = 0.9488X - 1.47083$	0.99999	0.500
延胡索酸 Fumaric acid	$Y = 96.58213X - 32.25147$	0.99999	0.017

1.2.7 钙含量的测定。火焰原子吸收光谱法是检测钙含量的常用方法, 且具有灵敏度高、重复性好的特点^[23-24]。该研究采用火焰原子吸收光谱法测定鹿角盘中钙的含量。具体操作如下: 称取鹿角盘粗粉和微切助粉各 1 g, 分别溶于 1 000 mL 超纯水, 37 °C 搅拌混匀, 过滤, 得样品溶液; 再称取鹿角盘粗粉和微切助粉各 1 g, 分别溶于 1 000 mL HCl 溶液 (pH 3 和 pH 1) 中, 37 °C 搅拌 1 h, 过滤, 得样品溶液。然后用不同浓度梯度的钙标准溶液 (1 g/mL) 绘制标准曲线。按如下检测条件 (灯电流 15 mA, 狭缝宽度 0.5 nm, 波长 422.7 nm, 测定方式为吸收法, 火焰为 Air - C_2H_2 , 气流流速 1.1 L/min, 稳定时间 4.0 s, 重复次数 3) 测定原子吸收光谱, 计算直线回归方程和相关系数分别为: 超纯水组, $Y = 0.02530X - 0.049$ ($r = 0.9999$); pH 3 的 HCl 组, $Y = 0.01852X + 0.047$ ($r = 0.9968$); pH 1 的 HCl 组, $Y = 0.02767X - 0.034$ ($r = 0.9999$)。

1.2.8 统计学分析。试验数据表示为平均值 \pm 标准误差 ($\bar{x} \pm SD$), 运用 Student's t -test 检验进行组间分析。

2 结果与分析

2.1 鹿角盘粉末的颗粒粒径分布 从图 1 可看出, 鹿角盘粗粉和微切助粉的粒径分布曲线均是单峰, 弦长分布较为单一, 说明鹿角盘颗粒多数是球型或近球型。根据 FBRM 测定粒径的原理可知, 由 FBRM 测定出的颗粒弦长分布在很大程度上体现出鹿角盘颗粒的粒径分布, 因此该研究中 FBRM 测出的弦长分布直接表述为粒径分布。

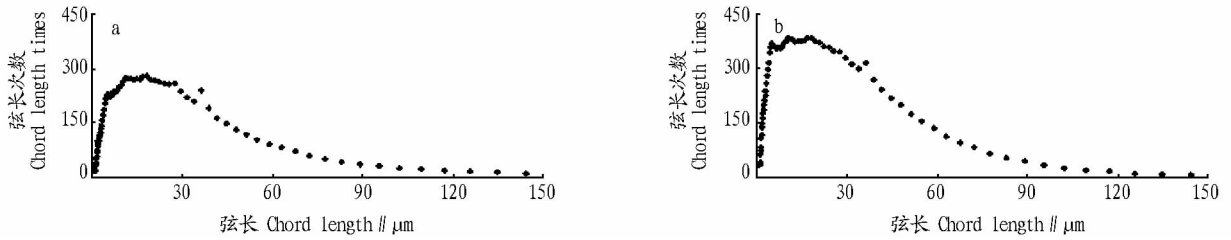


图1 不同处理技术制备的鹿角盘粗粉(a)和微切助粉(b)的粒径分布

Fig.1 Particle size distribution of deer antler base crude powder(a) and PAI powder(b) processed by different pretreatments

此外,FBRM 测量的一个特点是在等体积溶液中,弦长次数累计在一定程度上体现了颗粒浓度的大小^[15]。由图1可知,粒径在1~30 μm 范围内,鹿角盘微切助粉的颗粒弦长次数为350~400,而鹿角盘粗粉则为250~300。鹿角盘粒径分布比例结果(表2)也显示,鹿角盘粗粉粒径在1~30 μm 范围内的颗粒数占80.96%,经过进一步的微切变-助剂互

作技术处理后,鹿角盘微切助粉颗粒数占82.73%,说明微切变-助剂互作技术有助于提高鹿角盘粉末颗粒在1~30 μm 粒径范围内的产率。由于动物细胞大小一般为25~35 μm,因此,经微切变-助剂互作技术处理后,鹿角盘微切助粉中的细胞基本被破碎,这有利于鹿角盘中活性物质充分的释放。

表2 不同处理技术制备的鹿角盘粉末的粒径分布

Table 2 Proportion of particle size distribution of deer antler base powder processed by different pretreatments

样品 Sample	弦长总次数 Chord length times	粒径分布比例 Proportion of particle size distribution//%		
		1~30 μm	30~150 μm	150~500 μm
鹿角盘粗粉 Deer antler base crude powder	11 254.31	80.96	18.73	0.31
鹿角盘微切助粉 Deer antler base PAI powder	16 910.60	82.73	17.15	0.12

2.2 鹿角盘粉末的颗粒形态 与普通光学显微镜相比,扫描电子显微镜具有更高的放大倍数和分辨率。为了清晰地展示不同处理技术制备的鹿角盘粉末在超微形貌上的特征,该研究针对鹿角盘粗粉和鹿角盘微切助粉2种鹿角盘粉末颗粒,给出了400倍放大倍数下的扫描电镜照片。由图2可

见,在扫描电镜下已观察不到完整的细胞,该结果与鹿角盘颗粒粒径分布的检测结果(图1和表2)相一致,再次证明经过微切变-助剂互作技术处理后,鹿角盘微切助粉中的细胞基本被破碎,细胞内的有效成分被暴露出来,呈释放的状态,且增加了目标活性物质的溶出量。

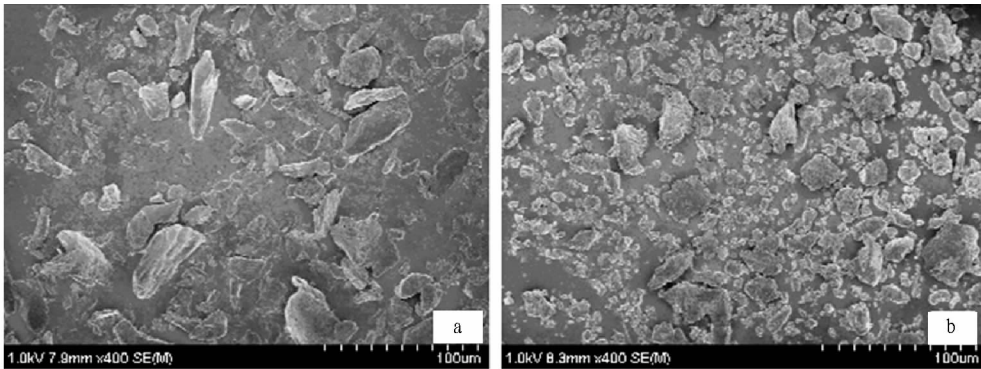


图2 不同处理技术制备的鹿角盘粗粉(a)和微切助粉(b)的扫描电镜形态

Fig.2 SEM micrographs of deer antler base crude powder(a) and PAI powder(b) processed by different pretreatments

2.3 鹿角盘粉末中性激素含量 由表3可知,鹿角盘中除了含有丰富的雌二醇外,还含有睾酮和孕酮,且鹿角盘微切助粉中雌二醇($P < 0.01$)、睾酮($P < 0.05$)和孕酮($P < 0.01$)

的含量分别是其粗粉中雌二醇、睾酮和孕酮含量的130.34%、120.86%和159.20%。表明微切变-助剂互作技术有利于鹿角盘中性激素的释放,提高了性激素的溶出量。

表3 不同处理技术制备的鹿角盘粉末中性激素的含量

Table 3 Contents of sex hormones in deer antler base powder processed by different pretreatments

样品 Sample	雌二醇 Estradiol//pmol/L	睾酮 Testosterone//nmol/L	孕酮 Progesterone//nmol/L
鹿角盘粗粉 Deer antler base crude powder	252.25 ± 54.31	21.00 ± 2.73	11.03 ± 2.31
鹿角盘微切助粉 Deer antler base PAI powder	328.79 ± 34.21**	25.38 ± 4.48*	17.56 ± 3.45**

注:*、**分别表示与鹿角盘粗粉组比,微切助粉组差异显著($P < 0.05$)、差异极显著($P < 0.01$)。

Note:* and ** indicated significant differences ($P < 0.05$) and extremely significant differences ($P < 0.01$) between deer antler base crude powder and PAI powder, respectively.

2.4 鹿角盘粉末中类胰岛素样生长因子-1 含量 采用甲醇和碱性缓冲液 2 种方法提取鹿角盘中胰岛素样生长因子-1(IGF-1),结果表明,鹿角盘中含有大量的 IGF-1,且碱性缓冲液比甲醇溶液更有利于 IGF-1 的溶出。由表 4 可知,无论是采用甲醇溶液还是碱性缓冲液提取,鹿角盘微切助粉中 IGF-1 的含量均明显高于其粗粉中 IGF-1 的含量 ($P < 0.01$),说明微切变-助剂互作技术提高了鹿角盘中 IGF-1 的溶出量。

2.5 鹿角盘粉末中有机酸钙和钙含量 通过与柠檬酸和延胡索酸的标准品对比可知,鹿角盘中含有大量的柠檬酸钙,而没有延胡索酸钙(图 3)。由表 5 可知,鹿角盘微切助粉中柠檬酸钙的含量和钙的溶出量均大于其粗粉,表明微切变-助剂互作技术不仅有利于鹿角盘中柠檬酸钙的溶出,还提高了总钙的溶出量。用 HCl 溶液(pH 1 和 pH 3)制备的鹿角盘

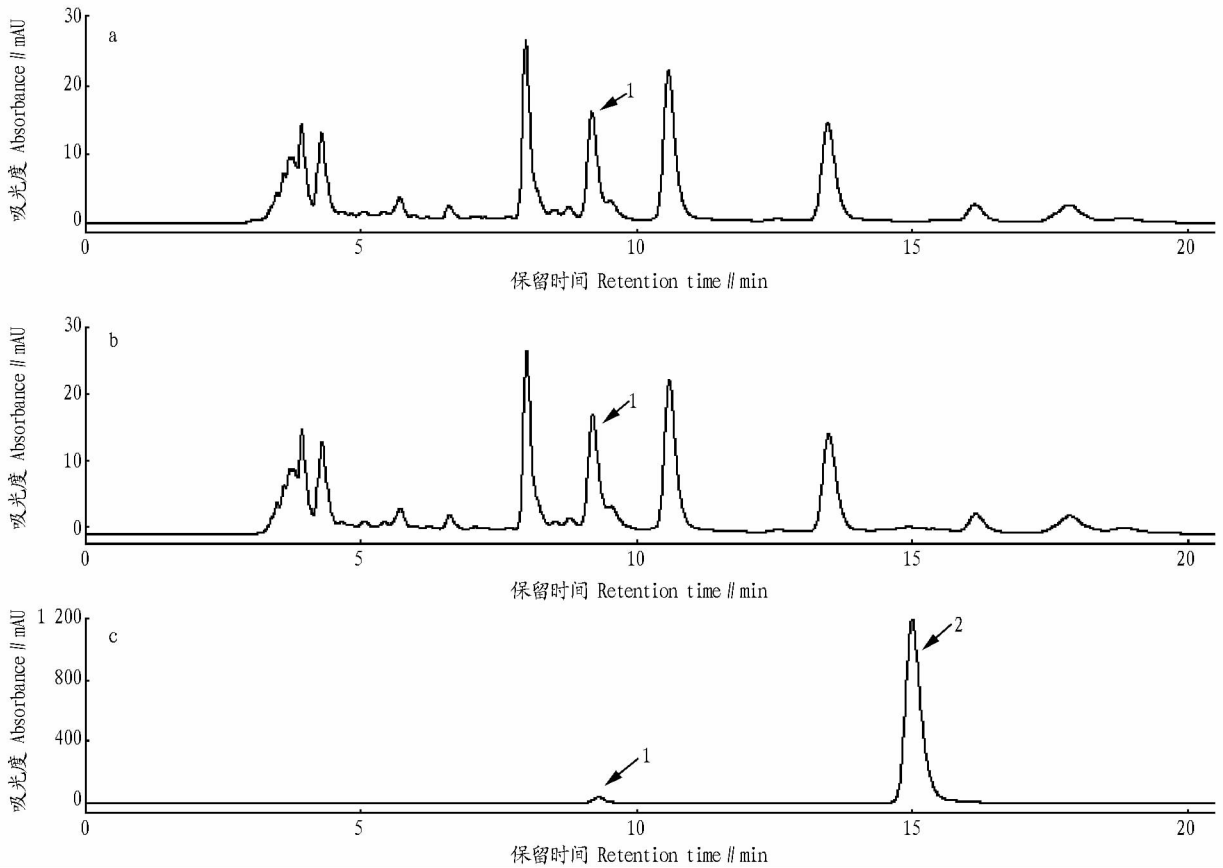
提取物中钙的含量分别为 (133.61 ± 3.55) 和 (17.26 ± 1.34) mg/L,分别是其水提物(pH 7)中钙含量的 51.79 和 6.69 倍,表明低 pH 条件可显著提高钙的溶出量,更利于钙的释放。

表 4 不同处理技术制备的鹿角盘粉末中 IGF-1 的含量

Table 4 Contents of IGF-1 in deer antler base powder processed by different pretreatments $\mu\text{g/g}$

样品 Sample	甲醇溶液 Methanol solution	碱性溶液 Alkaline solution
鹿角盘粗粉 Deer antler base crude powder	0.105 ± 0.015	0.160 ± 0.029
鹿角盘微切助粉 Deer antler base PAI powder	$0.412 \pm 0.023^{**}$	$0.750 \pm 0.033^{**}$

注: ** 表示与鹿角盘粗粉组比,微切助粉组差异极显著($P < 0.01$)。
Note: ** indicated extremely significant differences ($P < 0.01$) between deer antler base crude powder and PAI powder.



注:1 代表柠檬酸;2 代表延胡索酸。

Note:1 was citric acid; and 2 was fumaric acid.

图 3 不同处理技术制备的鹿角盘粗粉(a)、微切助粉(b)及标准品(c)的色谱图

Fig. 3 HPLC chromatogram of standards and deer antler base crude powder (a) and PAI powder (b) processed by different pretreatments

表 5 不同处理技术制备的鹿角盘粉末中有机酸钙和钙的含量

Table 5 Contents of calcium citrate and free calcium in deer antler base powder processed by different pretreatments mg/L

样品 Sample	柠檬酸钙 Calcium citrate	Ca		
		超纯水 Ultrapure water (pH 7)	HCl 溶液 HCl solution (pH 3)	HCl 溶液 HCl solution (pH 1)
鹿角盘粗粉 Deer antler base crude powder	103.85 ± 0.48	2.10 ± 0.37	16.44 ± 0.95	126.95 ± 2.03
鹿角盘微切助粉 Deer antler base PAI powder	$161.72 \pm 0.52^*$	2.58 ± 0.65	17.26 ± 1.34	133.61 ± 3.55

注: * 表示与鹿角盘粗粉组比,微切助粉组差异显著($P < 0.05$)。

Note: * indicated significant differences ($P < 0.05$) between deer antler base crude powder and PAI powder.

3 结论

(1) 粒径分析及扫描电镜观察结果显示,经微切变-助剂互作技术处理后,鹿角盘微切助粉在粒径 $1\sim 30\ \mu\text{m}$ 范围内的颗粒数占82.73%,且鹿角盘微切助粉中的细胞已被充分破碎,细胞内有效成分被暴露出来,呈释放的状态。

(2) 多种活性成分含量分析结果显示,鹿角盘微切助粉中含有 $(328.79\pm 34.21)\ \text{pmol/L}$ 雌二醇、 $(25.38\pm 4.48)\ \text{nmol/L}$ 睾酮、 $(17.56\pm 3.45)\ \text{nmol/L}$ 孕酮、 $(0.750\pm 0.033)\ \mu\text{g/g}$ 类胰岛素样生长因子-1、 $(161.72\pm 0.52)\ \text{mg/L}$ 柠檬酸钙和 $(133.61\pm 3.55)\ \text{mg/L}$ 钙,而不含有延胡索酸钙。

(3) 鹿角盘微切助粉中含有丰富的性激素、类胰岛素生长因子-1、柠檬酸钙和钙,且这些活性物质的含量均高于其粗粉,说明微切变-助剂互作技术增加了目标活性物质的溶出量,有利于鹿角盘中活性成分的释放,体现了该技术的优越性。

参考文献

- [1] WU F F, LI H Q, JIN L J, et al. Deer antler base as a traditional Chinese medicine: A review of its traditional uses, chemistry and pharmacology [J]. *Journal of ethnopharmacology*, 2013, 145(2): 403-415.
- [2] 张宝香, 金春爱, 赵延平. 鹿角盘的化学成分与开发利用[J]. *特种经济动植物*, 2005, 8(12): 7-9.
- [3] 邱芳萍, 马波, 王志兵, 等. 鹿角盘蛋白的分离纯化与活性研究[J]. *长春工业大学学报*, 2007, 28(2): 144-147.
- [4] BOLDYREV V V, TKÁ ČOVÁ K. Mechanochemistry of solids: Past, present, and prospects [J]. *Journal of materials synthesis and processing*, 2000, 8(3/4): 121-132.
- [5] LIU Y, JIN L J, LI X Y, et al. Application of mechanochemical pretreatment (MCPT) to aqueous extraction of isofraxidin from *Eleutherococcus senticosus* [J]. *Industrial & engineering chemistry research*, 2007, 46(20): 6584-6589.
- [6] JIN L J, LI H Q, WU F F, et al. Application of mechanochemical pretreatment prior to aqueous extraction of eleutheroside B from *Eleutherococcus senticosus* [J]. *Industrial & engineering chemistry research*, 2012, 51(32): 10695-10701.
- [7] LI H Q, JIN L J, WU F F, et al. Effect of red pepper (*Capsicum frutescens*) powder or red pepper pigment on the performance and egg yolk color of laying hens [J]. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 2012, 25(11): 1605-1610.
- [8] KOROLEV K G, LOMOVSKII O I, ROZHANSKAYA O A, et al. Mechano-

- chemical preparation of water-soluble forms of triterpene acids [J]. *Chemistry of natural compounds*, 2003, 39(4): 366-372.
- [9] LOMOVSKY O, KOROLYOV K, KWON Y S. Mechanochemical solubilization and mechanochemically assisted extraction of plant bioactive substances [J]. *Science and technology*, 2003, 1(1): 7-20.
- [10] 刘莹, 金礼吉, 宋春娜, 等. 机械化学法辅助提取刺五加总黄酮的工艺研究[J]. *时珍国医国药*, 2007, 18(12): 2889-2891.
- [11] 宋春娜, 王洋, 金礼吉, 等. 微切助互作技术辅助提取穿心莲内酯的工艺研究[J]. *时珍国医国药*, 2008, 19(11): 8362-8365.
- [12] FARMAKIS L, KOLIADIMA A, KARAIKAKIS G, et al. Study of the influence of surfactants on the size distribution and mass ratio of wheat starch granules by sedimentation/steric field-flow fractionation [J]. *Food hydrocolloids*, 2008, 22(6): 961-972.
- [13] KAIL N, MARQUARDT W, BRIESEN H. Process analysis by means of focused beam reflectance measurements [J]. *Industrial & engineering chemistry research*, 2009, 48(6): 2936-2946.
- [14] 陈福泉, 卢海凤, 袁立军, 等. FBRM 测定淀粉颗粒粒径大小的研究初探[J]. *食品工业科技*, 2010, 31(3): 134-136.
- [15] 张本山, 陈福泉, 赵永青, 等. 聚焦光束反射分析仪测定淀粉颗粒粒径分布[J]. *华南理工大学学报*, 2010, 38(4): 55-60.
- [16] WANG S J, YU J L, YU J G. Conformation and location of amorphous and semi-crystalline regions in C-type starch granules revealed by SEM, NMR and XRD [J]. *Food chemistry*, 2008, 110(1): 39-46.
- [17] 王绍清, 王琳琳, 范文浩, 等. 扫描电镜法分析常见可食用淀粉颗粒的超微形貌[J]. *食品科学*, 2011, 32(15): 74-79.
- [18] 李银清, 毕胜男, 韩焯, 等. 醇提法制备鹿茸胶原的初步研究[J]. *特产研究*, 2007(1): 9-11.
- [19] LIU C J, ZHANG S Q, LI D S, et al. Detection and quantitation of insulin-like growth factor-1 in velvet antler by an enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Consumer electronics, communications and networks (CEC-Net)*, 2011, 36: 1162-1168.
- [20] 黄萍, 赵雨, 牛放, 等. 鹿角托盘总蛋白的提取工艺研究[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(14): 7305-7307.
- [21] RODRIGUES C I, MARTA L, MAIA R, et al. Application of solid-phase extraction to brewed coffee caffeine and organic acid determination by UV/HPLC [J]. *Journal of food composition and analysis*, 2007, 20(5): 440-448.
- [22] KELEBEK H, SELLI S, CANBAS A, et al. HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan [J]. *Microchemical journal*, 2009, 91(2): 187-192.
- [23] CHEN J R, TEO K C. Determination of cadmium, copper, lead and zinc in water samples by flame atomic absorption spectrometry after cloud point extraction [J]. *Analytica chimica acta*, 2001, 450(1/2): 215-222.
- [24] 陈艳梅, 程素敏, 李长青. 原子吸收光谱法测定人体血清中的微量元素锌、铜、铁、钙和镁[J]. *光谱实验室*, 2008, 25(5): 974-976.

(上接第125页)

高寒灌丛草甸全磷含量最高,但是速效磷含量却排在第2位,这可能是由于灌丛旁的草本对部分速效磷吸收的结果。而高寒沼泽草甸由于水分大,有助于速效磷的形成,这也是高寒沼泽草甸全磷含量不高但速效磷含量最高的原因。

参考文献

- [1] 李元寿, 张人禾, 王根绪, 等. 青藏高原典型高寒草甸区土壤有机碳氮的变异特性[J]. *环境科学*, 2009, 30(6): 1826-1831.
- [2] 李香真, 陈佐忠. 不同放牧率对草原植物与土壤C、N、P含量的影响[J]. *草地学报*, 1998, 6(2): 90-98.
- [3] 孙庚. 青藏高原东部高山林草交错带不同土地利用方式土壤的氮素特征[D]. 成都: 中国科学院成都生物研究所, 2004.
- [4] 孙娜, 陆晨刚, 高翔, 等. 青藏高原东部土壤中多环芳烃的污染特征及来源解析[J]. *环境科学*, 2007, 28(3): 664-668.

- [5] 何贵永, 孙浩智, 史小明, 等. 青藏高原高寒湿地不同季节土壤理化性质对放牧模式的响应[J]. *草业学报*, 2015, 24(4): 12-20.
- [6] 张裴雷, 方华军, 程淑兰, 等. 增氮对青藏高原东缘高寒草甸土壤甲烷吸收的早期影响[J]. *生态学报*, 2013, 33(13): 4101-4110.
- [7] 王静, 胡靖, 杜国祯. 施氮磷肥对青藏高原高寒草甸土壤线虫群落组成的影响[J]. *草业学报*, 2015(12): 20-28.
- [8] 尤全刚, 薛娴, 彭飞, 等. 高寒草甸草地退化对土壤水热性质的影响及其环境效应[J]. *中国沙漠*, 2015, 35(5): 1183-1192.
- [9] 顾振宽, 杜国祯, 朱炜敏, 等. 青藏高原东部不同草地类型土壤养分的分布规律[J]. *草业科学*, 2012, 29(4): 507-512.
- [10] JACKSON R B, SCHENK H J, JOBBAGY E G, et al. Belowground consequences of vegetation change and their treatment in models [J]. *Ecological applications*, 2000, 10(2): 470-483.
- [11] 李耀, 卫智军, 刘红梅, 等. 不同放牧制度对典型草原土壤中全磷和速效磷的影响[J]. *草原与草业*, 2010, 22(1): 4-6.
- [12] 刘蓉, 张卫国, 江小雷, 等. 垂穗披碱草群落退化演替的植被特性及其与土壤性状的相关性研究[J]. *草业科学*, 2010, 27(10): 96-103.