

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20220126

## 杜仲叶多糖的提取工艺优化及理化特性

闫芝茜, 丁素芸, 刘会平, 畅梦丽, 石淑源, 巩婷婷  
(天津科技大学食品科学与工程学院, 天津 300457)

**摘要:** 为了研究杜仲叶多糖的最佳提取工艺, 采取单因素实验结合响应面实验进行分析, 比较液料比、提取时间、提取次数及醇沉处理的乙醇体积分数对杜仲叶粗多糖得率的影响. 通过测定杜仲叶多糖中的化学组成、利用高效液相色谱仪测定相对分子质量、扫描电子显微镜观察表面形态、圆二色谱仪测定三股螺旋结构对杜仲叶多糖的结构进行初步分析, 采用热重分析仪和差示扫描量热仪对杜仲叶多糖的热稳定性进行研究. 结果表明: 当提取温度为 100 °C 时, 杜仲叶粗多糖的最佳提取工艺条件为液料比 (mL : g) 20 : 1、提取时间 3 h、提取次数 3 次、醇沉处理的乙醇体积分数 60%, 此时杜仲叶粗多糖的得率为  $(4.79 \pm 0.26)\%$ . 纯化后杜仲叶多糖的总糖含量为  $(89.12 \pm 0.92)\%$ , 蛋白质含量为  $(2.03 \pm 0.16)\%$ , 糖醛酸含量为  $(9.45 \pm 0.35)\%$ , 其结构为光滑、卷曲的网状结构, 表明该多糖是一种不含有三股螺旋结构、纯度较高的酸性多糖. 杜仲叶多糖在 200 °C 以下的环境中具有良好的热稳定性.

**关键词:** 杜仲叶多糖; 提取工艺; 结构分析; 热稳定性

中图分类号: O629.12

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2023)02-0011-08

## Extraction Process Optimization and Physicochemical Properties of *Eucommia folium* Polysaccharide

YAN Zhiqian, DING Suyun, LIU Huiping, CHANG Mengli, SHI Shuyuan, GONG Tingting  
(College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** In order to explore the optimal extraction process of *Eucommia folium* polysaccharide, a single factor experiment combined with response surface analysis was conducted to compare the effects of liquid-solid ratio, extraction time, extraction times and alcohol precipitation concentration on the yield of *Eucommia folium* crude polysaccharide. The structure of *Eucommia folium* polysaccharide was preliminary analyzed by determining the chemical composition, its relative molecular weight measured by high performance liquid chromatography, the surface morphology observed by scanning electron microscope, and the triple helix structure detected by circular dichroism. At the same time, thermogravimetric analysis and differential scanning calorimeter were also used to study the thermal stability of *Eucommia folium* polysaccharide. The results showed that when the extraction temperature was 100 °C, the optimal extraction process conditions for crude polysaccharide from *Eucommia folium* were as follows: the ratio of liquid to material was 20 : 1, the extraction time was 3 hours, the extraction times were 3 times, and the alcohol precipitation concentration was 60%. The yield of crude polysaccharide was  $(4.79 \pm 0.26)\%$ . After purification, the total sugar content of *Eucommia folium* polysaccharide was  $(89.12 \pm 0.92)\%$ , the protein content was  $(2.03 \pm 0.16)\%$ , and the uronic acid was  $(9.45 \pm 0.35)\%$ . Moreover, it presented a smooth and coiled network structure which indicated that it is an acidic polysaccharide with no triple helix structure and high purity. It has also been proved that *Eucommia folium* polysaccharide has good thermal stability in the environment below 200 °C.

**Key words:** *Eucommia folium* polysaccharide; extraction process; structural analysis; thermal stability

杜仲是一种杜仲属杜仲科的植物, 具有巨大的经济价值和综合开发潜力<sup>[1-2]</sup>. 在过去的很长一段时间

收稿日期: 2022-05-15; 修回日期: 2022-08-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31801568)

作者简介: 闫芝茜(1997—), 女, 山西太原人, 硕士研究生; 通信作者: 刘会平, 教授, liuhuiping111@163.com

内,只有杜仲的树皮被用作药物.杜仲皮的药用需求日益增长,而杜仲皮的生长周期又比较长,使得这种资源更为稀缺.同时,杜仲也会因传统的剥皮方法而受到损伤,造成一定程度上的资源浪费<sup>[3]</sup>.杜仲叶与杜仲皮的活性成分基本相同,因此杜仲叶作为药用资源可以在一定程度上替代杜仲皮<sup>[4-5]</sup>.同时,杜仲叶具有降血压、降血脂、降血糖、抗氧化、抗炎、保肝、保肾、免疫调节等作用<sup>[6-8]</sup>.因此,杜仲叶中活性物质的提取在近年来受到众多研究者的关注.

多糖广泛存在于植物、微生物、细菌、真菌和海藻中,与生命的许多生理行为密切相关<sup>[9]</sup>.杜仲叶多糖是近年来被发现的活性成分,其主要的生物活性表现在抗氧化、抗疲劳、降血糖、增强免疫力和抗肿瘤等<sup>[10-11]</sup>方面.水提法、超声辅助提取法<sup>[12]</sup>和酶解辅助提取法<sup>[13]</sup>都是目前较为常见的多糖提取方法.由于提取方式的不同,所得多糖的性质也不同,既有中性糖也有酸性糖<sup>[14-15]</sup>.刘军海等<sup>[16]</sup>通过水浸提的方法,在提取温度 84 °C、浸提时间 1.3 h、液料比(mL : g) 14.3 : 1、1 次浸提的条件下,杜仲叶多糖的提取率达到 1.775 6%.董娟娥等<sup>[17]</sup>通过碱提的方法,将杜仲叶浸泡在 1.0% 的碱水中,100 °C 提取 2 次,提取时间为 2 h,此条件下杜仲叶多糖的提取率为 6.634%.夏树林等<sup>[18]</sup>利用超声波提取法,在 30 °C 条件下超声处理 40 min,加入 95% 乙醇溶液进行沉淀,然后再以液料比(mL : g) 35 : 1、80 °C 的条件下超声处理 40 min,一共提取 2 次,经纯化后可得纯度为 86.76% 的杜仲叶多糖.尽管目前杜仲叶多糖的提取方法多样,但热水提取仍是常用的提取方法<sup>[19-20]</sup>,其具有无需特殊设备、成本低、操作方便等优点.为了得到组分单一的纯多糖,还需要进行除去杂蛋白和小分子物质等一系列纯化操作.

目前杜仲叶多糖均采用综合方法进行提取,水提醇沉法提取得到多糖的得率往往较低.因此,本研究对杜仲叶多糖的热水浸提工艺进行优化,探究其最佳提取工艺;同时,对杜仲叶粗多糖进行分离纯化,对纯化后的杜仲叶多糖的化学成分、结构性质和热稳定性进行初步研究.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

杜仲叶为纯天然晾晒干燥,购自安徽省六安市霍山县.

无水乙醇、正丁醇、三氯甲烷、浓硫酸,分析纯,

天津市江天化工技术股份有限公司; 咪唑、考马斯亮蓝、牛血清蛋白,分析纯,北京索莱宝科技有限公司; 实验用水为超纯水.

RE-52 型旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂; Aglient 1200 型高效液相色谱(HPLC)仪,安捷伦科技有限公司; UV-2550 PC 型紫外-可见分光光度计,日本岛津公司; SU1510 型扫描电子显微镜,日本日立公司; DSC-7 型差示扫描量热仪,美国 Perkin Elmer 公司; TGA-Q50 型热重分析仪,美国 TA 公司; MOS-450 型圆二色谱仪,法国 Biologic 公司.

### 1.2 方法

#### 1.2.1 杜仲叶粗多糖的提取工艺

将杜仲叶在 50 °C 的烘箱中烘干至质量恒定,用粉碎机将干燥后的杜仲叶粉碎成粉末,过 60 目筛.采用一定量的石油醚,在 70 °C 水浴条件下对杜仲叶粉末进行脱脂,冷凝回流 6 h 后对杜仲叶粉末进行烘干,得到脱脂后杜仲叶粉末.称量一定量的粉末,用蒸馏水在 100 °C 的条件下进行多次萃取.水提物在 25 °C、4 000 r/min 离心 15 min,然后将多次离心得到的上清液进行混合.用旋转蒸发仪浓缩混合液至原体积的三分之一,再用一定体积的无水乙醇进行沉淀并放置于 4 °C 过夜,4 000 r/min 离心 10 min,获得粗多糖.

#### 1.2.2 提取工艺优化

控制提取温度为 100 °C,对提取工艺中的液料比(10 : 1、15 : 1、20 : 1、25 : 1、30 : 1, mL : g)、提取时间(1、2、3、4、5 h)、提取次数(1、2、3、4、5 次)、醇沉处理的乙醇体积分数(40%、50%、60%、70%、80%)进行单因素实验.

采用 Design Expert 8.0 软件,通过 Box-Behnken 响应面法<sup>[21]</sup>进行杜仲叶多糖的提取工艺优化.

#### 1.2.3 粗多糖的分离纯化

采用 Sevage 法(正丁醇与三氯甲烷的体积比为 4 : 1)脱蛋白<sup>[22]</sup>,然后利用 Sephadex G-200 凝胶柱(1.6 cm × 40.0 cm)进行洗脱,得到纯化后的多糖(EFP).

#### 1.2.4 多糖的化学组成测定

采用苯酚-硫酸法<sup>[23]</sup>测定 EFP 中的总糖含量(标准曲线方程  $y = 5.0671x + 0.0215$ ,  $R^2 = 0.9983$ ),考马斯亮蓝法<sup>[24]</sup>测定蛋白质含量(标准曲线方程  $y = 2.6133x + 0.1472$ ,  $R^2 = 0.9967$ ),硫酸-咪唑法<sup>[25]</sup>测定糖醛酸含量(标准曲线方程  $y = 1.0973x + 0.0974$ ,  $R^2 = 0.9942$ ).

### 1.2.5 多糖相对分子质量测定

利用高效液相色谱仪对多糖的相对分子质量进行测定<sup>[26]</sup>。将杜仲叶粗多糖和纯化后的多糖分别在超纯水中充分溶解,配制成 1 mg/mL 的多糖溶液,过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜。采用高效液相色谱仪和 TSK-GEL G4000PWxl 色谱柱检测杜仲叶粗多糖的相对分子质量分布。检测条件:RID 检测器,检测器温度 35  $^{\circ}\text{C}$ ,柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ,进样量(1 mg/mL) 20  $\mu\text{L}$ ,流动相为超纯水,流量 0.6 mL/min。将已知相对分子质量的葡聚糖 T-10、T-40、T-70、T-110、T-500、T-2000 作为标准品,建立标准曲线,根据保留时间-相对分子质量标准曲线计算纯化后多糖的相对分子质量。

### 1.2.6 扫描电子显微镜观察

通过扫描电子显微镜(SEM)分别在 1 000、2 000 和 3 500 倍的放大倍数下对 EFP 的表面结构和形态进行观察。

### 1.2.7 圆二色谱分析

圆二色谱(circular dichroism spectrum, CD spectrum)是一种光谱方法,可以提供具有光学活性基团的多糖分子的构象信息<sup>[27-28]</sup>。量取 0.5 mg/mL 的 EFP 溶液 2 mL、50  $\mu\text{mol/L}$  的刚果红溶液 2 mL、一定量的 0.1 mol/L NaOH 溶液,将上述溶液进行充分混合,使

混合溶液的 NaOH 最终浓度为 0.05 mol/L,静置在室温下反应 10 min。以蒸馏水为空白对照,利用圆二色谱仪进行检测,检测波长范围设定为 190 ~ 250 nm。

### 1.2.8 热稳定性分析

热重分析是研究多糖热稳定性的一种常用方法<sup>[29]</sup>。将 5 mg 的 EFP 样品放置于坩埚中,通过热重分析仪进行测定,通入氮气,温度设置为 25 ~ 600  $^{\circ}\text{C}$ ,升温速率为 20  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。

差示扫描量热(DSC)法可以判断样品在不同温度下发生的变化<sup>[30]</sup>。将 3 mg 的 EFP 样品放入样品池中,利用差示扫描量热仪在 25 ~ 200  $^{\circ}\text{C}$  范围内进行分析,升温速率为 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。

## 1.3 数据处理

采用 Origin 2018、SPSS 21.0 软件进行数据分析,实验均为 3 组平行实验,测定结果以“平均值  $\pm$  标准差”表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素实验结果

单因素实验结果如图 1 所示。

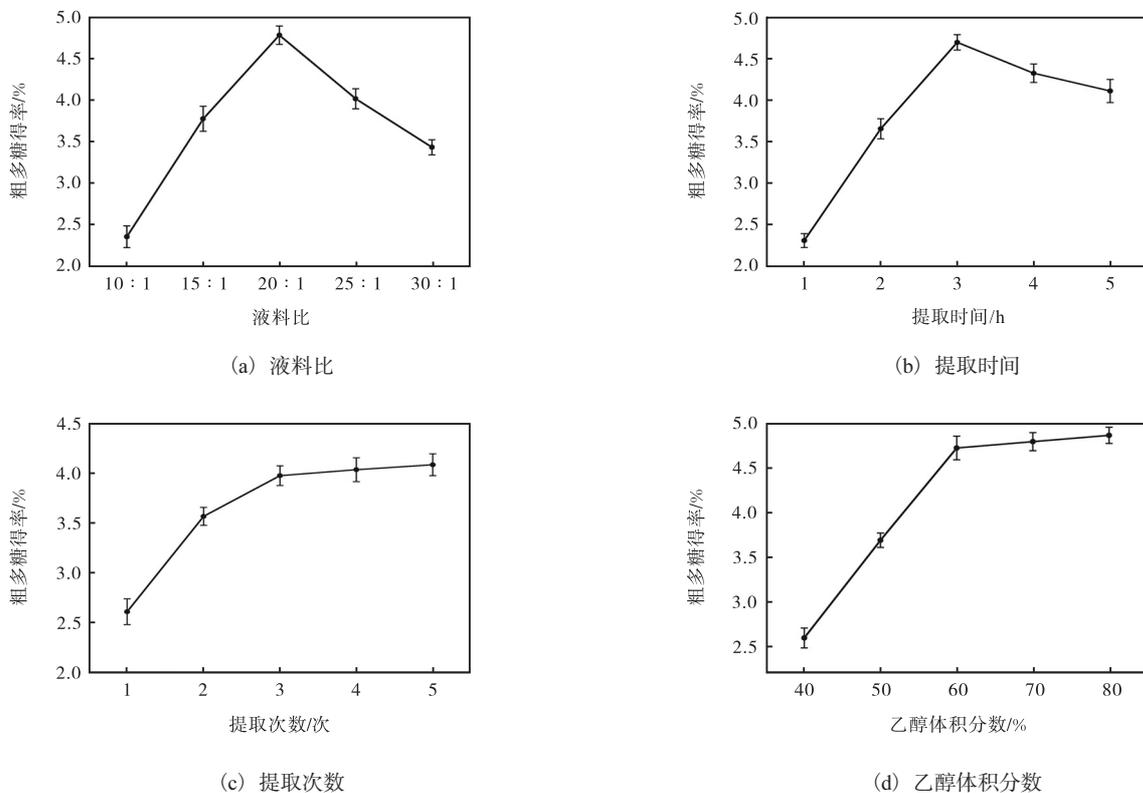


图 1 单因素实验结果

Fig. 1 Single factor experimental results

由图 1(a)可知:随着液料比的增加,杜仲叶粗多糖的得率随之增加,这可能是由于伴随液料比的增加,杜仲叶内外的渗透压也随之增加,使多糖向着提取液的方向进行释放<sup>[31]</sup>;当液料比(mL : g)为 20 : 1 时,杜仲叶粗多糖得率为 4.77%,之后便有所下降,这可能是由于提取液过饱和后限制了多糖的传递<sup>[32]</sup>. 因此,选择液料比(mL : g) 20 : 1 为最佳液料比.

由图 1(b)可知:随着提取时间的延长,杜仲叶粗多糖的得率随之增加;提取时间超过 3 h,杜仲叶粗多糖的得率缓慢下降,这可能是由于过长时间的高温提取造成多糖的降解,从而造成粗多糖的得率有所减少<sup>[33]</sup>. 因此,选择 3 h 作为最佳提取时间.

如图 1(c)所示:随着提取次数的增加,杜仲叶粗多糖的得率显著增加,而当提取次数超过 3 次则不再出现显著的变化. 实验结果证明提取 3 次后,杜仲叶中的大部分多糖已经溶解在提取液中,再增加提取次数对杜仲叶粗多糖的得率已无明显影响. 因此,提取次数选择 3 次.

如图 1(d)所示:当乙醇体积分数不超过 60%时,随着乙醇体积分数的增加,杜仲叶粗多糖的得率随之显著增长;当乙醇体积分数超过 60%后,虽然杜仲叶多糖的得率依然有所增加,但增加量较少. 因此,选择 60%作为提取工艺中的最佳醇沉处理的乙醇体积分数.

## 2.2 响应面优化的结果

利用 Design Expert 8.0 软件,根据 Box-Behnken 响应面实验原理,以提取时间(A)、乙醇体积分数(B)、液料比(C)为自变量,以杜仲叶粗多糖的得率(Y)为评价指标,杜仲叶粗多糖的响应面实验结果见表 1,方差分析见表 2.

进行多元回归拟合分析后,得到二次多项式回归方程为

$$Y = 4.71 + 0.5A + 0.4B + 0.23C + 0.28AB + 0.14AC + 0.078BC - 1.2A^2 - 0.9B^2 - 0.86C^2$$

由方差分析可知,模型  $P < 0.01$ ,表明该回归模型十分显著,拟合性良好,决定系数  $R^2 = 0.9579$ ,校正决定系数  $R^2_{Adj} = 0.9923$ ,证明杜仲叶粗多糖得率实验所得结果与响应面预测值具有良好的一致性. 3 个因素对杜仲叶粗多糖得率影响的大小顺序为提取时间 > 乙醇体积分数 > 液料比. 响应面 3D 图和等高线图可以表明不同变量之间的交互作用<sup>[34]</sup>. 杜仲叶粗多糖得率的响应面 3D 图和等高线图如图 2 所示. 相较于提取时间和乙醇体积分数、提取时间和液料比,

乙醇体积分数和液料比的曲面坡度较缓,证明二者之间的交互作用弱于前两组(图 2),而表 2 的结果表明二者之间的交互作用确实不显著( $P > 0.05$ ),结果呈现一致性. 同时,利用该模型得到杜仲叶粗多糖的最佳提取工艺为提取时间 3.25 h、乙醇体积分数 62.66%、液料比(mL : g) 20.83 : 1,此时杜仲叶粗多糖的得率为 4.85%.

表 1 杜仲叶粗多糖的响应面实验结果

Tab. 1 Response surface experimental results of *Eucommia folium polysaccharide*

实验号	A/h	B/%	C	得率/%
1	3	50	25 : 1	2.75
2	3	50	15 : 1	2.43
3	4	60	15 : 1	2.72
4	3	60	20 : 1	4.68
5	4	60	25 : 1	3.45
6	3	60	20 : 1	4.71
7	2	50	20 : 1	1.89
8	4	50	20 : 1	2.45
9	4	70	20 : 1	3.89
10	3	60	20 : 1	4.75
11	3	70	25 : 1	3.62
12	2	60	25 : 1	2.31
13	2	70	20 : 1	2.21
14	3	60	20 : 1	4.79
15	2	60	15 : 1	2.13
16	3	60	20 : 1	4.63
17	3	70	15 : 1	2.99

表 2 方差分析

Tab. 2 Variance analysis

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	18.13	9	2.01	228.89	<0.000 1	**
A	1.97	1	1.97	223.86	<0.000 1	**
B	1.27	1	1.27	144.54	<0.000 1	**
C	0.43	1	0.43	49.14	0.000 2	**
AB	0.31	1	0.31	35.63	0.000 6	**
AC	0.076	1	0.076	8.59	0.022 0	*
BC	0.024	1	0.024	2.73	0.142 5	
A <sup>2</sup>	6.05	1	6.05	687.22	<0.000 1	**
B <sup>2</sup>	3.44	1	3.44	390.55	<0.000 1	**
C <sup>2</sup>	3.12	1	3.12	354.67	<0.000 1	**
残差	0.062	7	8.801 × 10 <sup>-3</sup>			
失拟项	0.046	3	0.015	4.04	0.105 3	
净误差	0.015	4	3.820 × 10 <sup>-3</sup>			
合计	18.19	16				
相关系数	$R^2 = 0.9579$		$R^2_{Adj} = 0.9923$			

注: \*表示差异显著( $P < 0.05$ ), \*\*表示差异极显著( $P < 0.01$ )

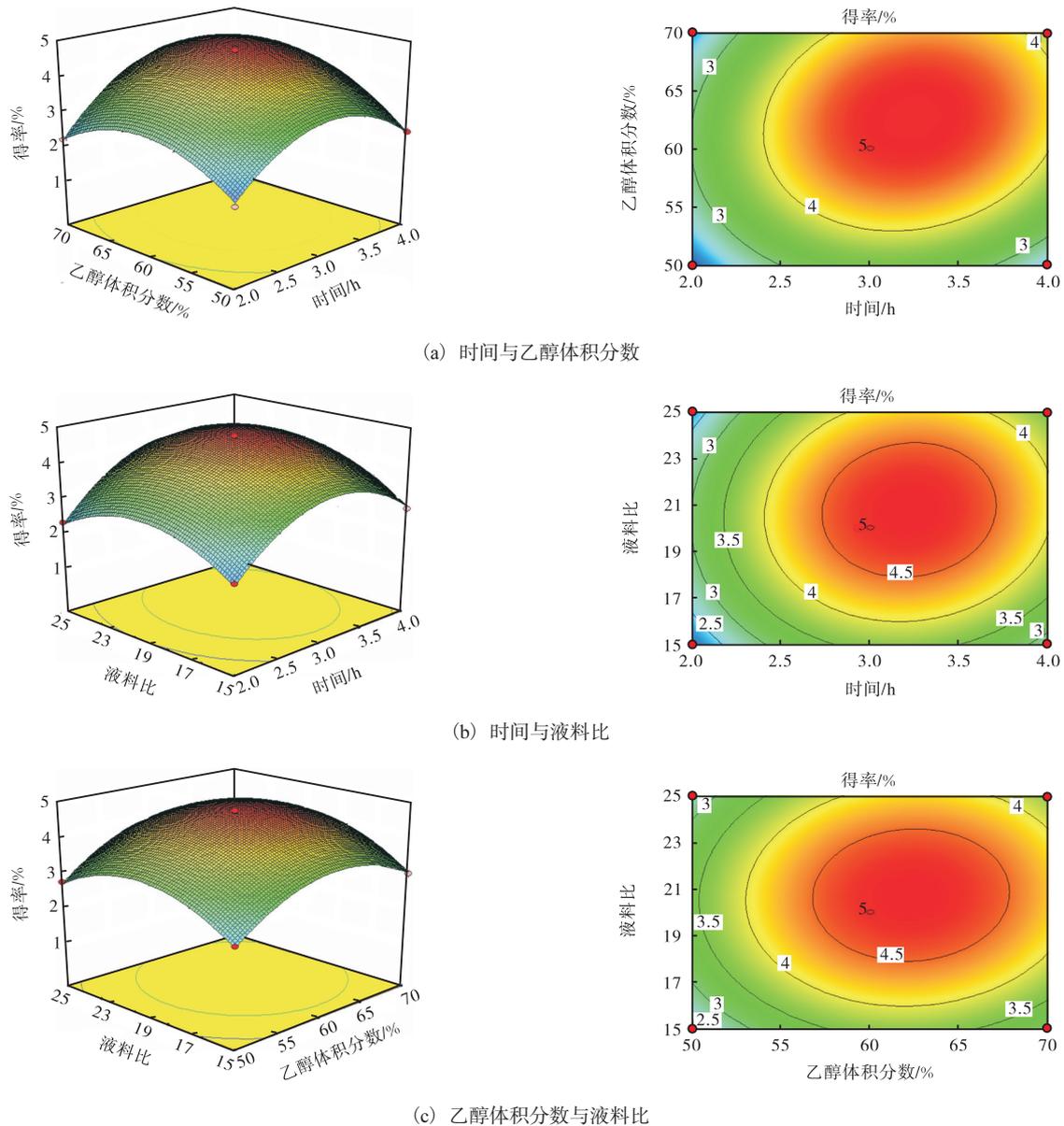


图 2 杜仲叶粗多糖得率的响应面 3D 图和等高线图

Fig. 2 Response surface 3D plots and contour plots of crude polysaccharide yield of *Eucommia folium*

### 2.3 响应面验证实验结果

在实际的提取过程中, 为了更加方便工业化生产, 同时综合考虑各生产环节, 将上述各提取条件修正为提取时间 3 h、乙醇体积分数 60%、液料比 (mL : g) 20 : 1。在修正后的提取工艺条件下进行 3 次重复实验, 得到杜仲叶粗多糖的得率为  $(4.79 \pm 0.26)\%$ , 实际得率与预测值之间的相对误差  $1.24\% < 5\%$ , 说明模型建立成功且修正后的提取条件具备较高的可行性。

### 2.4 多糖的化学组成

纯化后的杜仲叶多糖 (EFP) 的总糖含量为  $(89.12 \pm 0.92)\%$ , 蛋白质含量为  $(2.03 \pm 0.16)\%$ , 糖醛

酸含量为  $(9.45 \pm 0.35)\%$ 。这表明 EFP 是一种纯度较高、存留少量蛋白质的酸性多糖。

### 2.5 多糖的相对分子质量分析

利用高效液相色谱对杜仲叶粗多糖的相对分子质量分布进行了测定, 结果如图 3(a) 所示。从图中可以看到, 杜仲叶粗多糖主要存在 3 个明显的峰, 出峰时间分别为 9.040 min、13.445 min 和 17.105 min, 表明其主要包括 3 个组分。

由图 3(b) 可知, EFP 显示为单一的峰, 表明 EFP 是一种均质多糖, 根据标准曲线方程 ( $y = -0.3173x + 8.9584$ ,  $R^2 = 0.9923$ ) 计算其平均相对分子质量, 为  $9.98 \times 10^5$  (出峰时间为 9.327 min)。

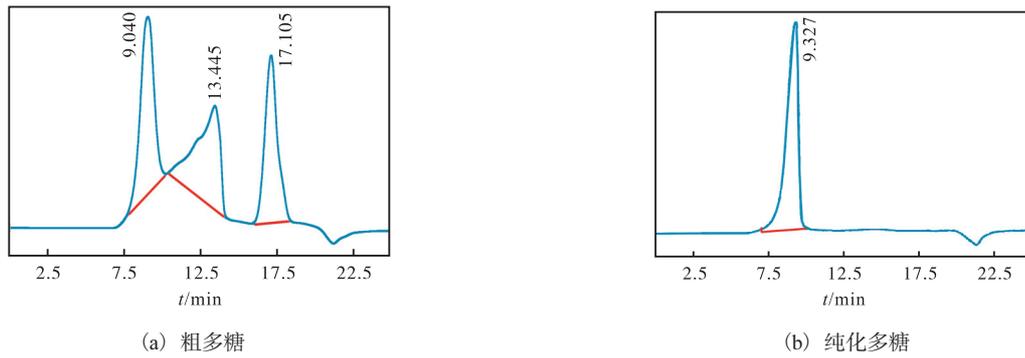


图3 杜仲叶粗多糖和纯化多糖的高效液相色谱图

Fig. 3 HPLC of crude polysaccharide and purified polysaccharide from *Eucommia folium*

2.6 扫描电子显微镜分析

已有研究<sup>[35-36]</sup>发现采用真空冷冻干燥得到的多糖结构大多呈现网状层,具有光滑的表面,结构比较致密. 采用扫描电子显微镜观察不同放大倍数下

EFP 的表面形貌特征(图4).

由图4可知:EFP 呈现致密、光滑、卷曲的网状结构,微米级的网格孔径大小不一,这种结构可能是由于多糖分子链之间交联聚集而形成.

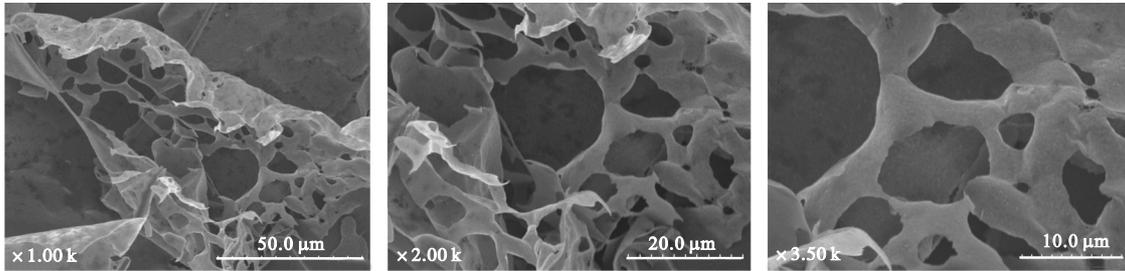


图4 EFP的扫描电子显微镜图

Fig. 4 Scanning electron microscope of EFP

2.7 圆二色谱结果分析

多糖与刚果红混合后产生的络合物其条带一般出现在190~240 nm之间. EFP 和刚果红溶液反应后的圆二色谱图如图5所示:在190~200 nm之间出现1个较大的负峰,表现为负的科顿效应;在201~205 nm之间存在1个正峰,表现为正的科顿效应,说明EFP中不含有三螺旋结构.

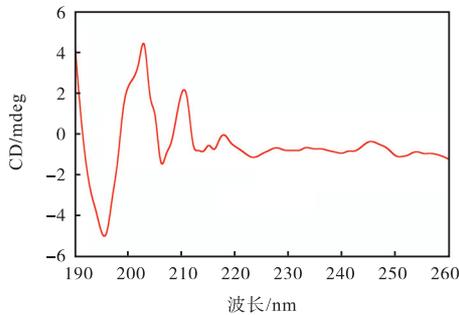
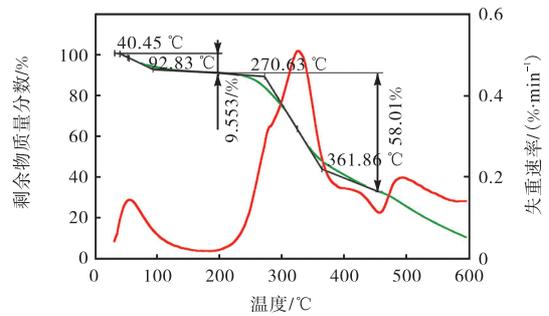


图5 EFP的圆二色谱图

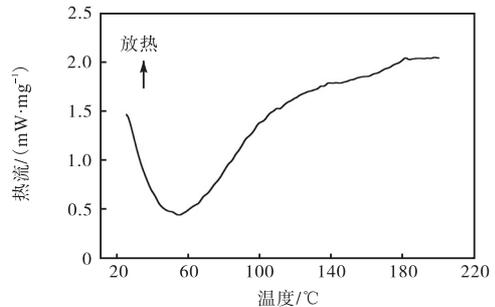
Fig. 5 Circular dichroism of EFP

2.8 多糖的热稳定性分析

EFP 的热稳定性分析如图6所示.



(a) TGA 和 DTG



(b) DSC 分析

图6 EFP的热稳定性分析

Fig. 6 Thermal stability analysis of EFP

图 6(a) 显示了 EFP 的热重分析(TGA)和微商热重分析(DTG)结果. EFP 的热降解过程主要分为 3 个阶段. 第一阶段,在 40 °C 失去吸附水,失重率为 9.553%,此时是由于 EFP 中水分的丢失,可能是样品暴露在空气中吸潮导致的. 第二阶段,温度变化范围为 200 ~ 400 °C,此阶段失重最为明显,为 58.01%,表明 EFP 在该温度范围内出现了分解反应,此阶段内 EFP 的结构可能已经被破坏,同时也说明 EFP 在 200 °C 以下的环境中具有良好的热稳定性. 第三阶段,温度变化范围为 450 ~ 600 °C,样品的质量变化趋于平缓,为缓慢炭化阶段.

由图 6(b)可知,EFP 在 54.7 °C 处出现 1 个强吸热峰,这可能是由于达到玻璃化转变温度后,EFP 中的水分被蒸发. 新的吸热峰直至温度升高至 200 °C 都没有再出现,证明 EFP 在 200 °C 以内没有发生结构的崩解和突变,在此阶段 EFP 具有良好的热稳定性,这与上述 TGA 的分析结果一致.

### 3 结 论

通过控制杜仲叶粗多糖提取过程中的液料比、提取时间、提取次数和乙醇体积分数进行单因素实验,结合响应面实验得到其最佳提取工艺为液料比(mL : g) 20 : 1、提取时间 3 h、提取次数 3 次、乙醇体积分数 60%. 在上述提取条件下,杜仲叶粗多糖的得率为  $(4.79 \pm 0.26)\%$ .

分离纯化后的杜仲叶多糖 EFP 经测定可知:总糖含量为  $(89.12 \pm 0.92)\%$ ,蛋白质含量为  $(2.03 \pm 0.16)\%$ ,糖醛酸含量为  $(9.45 \pm 0.35)\%$ ,相对分子质量为  $9.98 \times 10^5$ . 通过扫描电子显微镜可以观察到 EFP 呈现致密、光滑、卷曲的网状结构,且网格孔径大小不一. 同时,由圆二色谱的分析结果可知 EFP 并不具有三股螺旋结构. 利用 TGA 和 DSC 对 EFP 的热稳定性进行分析,结果证实 EFP 在 200 °C 以下的环境中具有良好的热稳定性.

本研究所得的 EFP 是一种相对分子质量较大且具有良好热稳定性的多糖,本研究为杜仲叶多糖的提取和应用提供了一定的理论基础.

#### 参考文献:

- [1] 龚桂珍,宫本红,张学俊,等. 杜仲叶和杜仲皮中化学成分的比较[J]. 西南大学学报(自然科学版),2010,32(7):167-172.
- [2] HE X, WANG J, LI M, et al. *Eucommia ulmoides* Oliv.: ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine[J]. Journal of ethnopharmacology, 2013, 151(1): 78-92.
- [3] XING Y, HE D, WANG Y, et al. Chemical constituents, biological functions and pharmacological effects for comprehensive utilization of *Eucommia ulmoides* Oliver[J]. Food science and human wellness, 2019, 8(2): 177-188.
- [4] LUO L, WU W, ZHOU Y, et al. Antihypertensive effect of *Eucommia ulmoides* Oliv. extracts in spontaneously hypertensive rats[J]. Journal of ethnopharmacology, 2010, 129(2): 238-243.
- [5] 晏媛,郭丹. 杜仲叶的化学成分及药理活性研究进展[J]. 中成药,2003(6):491-492.
- [6] 罗飞华,杨莉,张萍,等. 杜仲叶中总黄酮抗氧化性能研究[J]. 应用化工,2016,45(5):858-859.
- [7] 吴红艳. 杜仲叶多酚类物质提取工艺及抗氧化抗肿瘤研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2020.
- [8] REN X, HAN Z, SONG L, et al. Four new phenolic compounds from the tender leaves of *Eucommia ulmoides* Oliv. and their anti-inflammatory activities[J]. Phytochemistry letters, 2021, 44: 173-177.
- [9] ZONG A, CAO H, WANG F. Anticancer polysaccharides from natural resources: a review of recent research[J]. Carbohydrate polymers, 2012, 90(4): 1395-1410.
- [10] ZHANG L, RACIPATI A S, KOYYALAMUDI S R, et al. Anti-fungal and anti-bacterial activities of ethanol extracts of selected traditional Chinese medicinal herbs[J]. Asian pacific journal of tropical medicine, 2013, 6(9): 673-681.
- [11] DENG Y, MA F, RUIZ-ORTEGA L I, et al. Fabrication of strontium *Eucommia ulmoides* polysaccharides and in vitro evaluation of their osteoimmunomodulatory property[J]. International journal of biological macromolecules, 2019, 140: 727-735.
- [12] 任丹丹,陈谷. 响应面法优化黄秋葵多糖超声提取工艺[J]. 食品科学,2011,32(8):143-146.
- [13] BERNADETH F T, ZULIYATI R, CARMELO V A, et al. Enzyme-assisted extraction of anticoagulant polysaccharide from *Liparis tessellatus* eggs[J]. International journal of biological macromolecules, 2015, 74: 601-607.
- [14] WANG X, SUN R, ZHANG J, et al. Structure and antioxidant activity of polysaccharide POJ-U1a extracted by ultrasound from *Ophiopogon japonicus*[J]. Fitoterapia, 2013, 84: 100-105.

- 2012, 83 (8) : 1576–1584.
- [ 15 ] WANG Z, PEI J, MA H, et al. Effect of extraction media on preliminary characterizations and antioxidant activities of *Phellinus linteus* polysaccharides[J]. Carbohydrate polymers, 2014, 109: 49–55.
- [ 16 ] 刘军海, 任惠兰, 段玉兰, 等. 杜仲叶多糖提取工艺研究[J]. 食品科学, 2007, 28(7) : 264–267.
- [ 17 ] 董娟娥, 梁宗锁, 靳爱仙, 等. 杜仲叶酸性多糖提取分离及含量测定[J]. 林业科学, 2006, 42(10) : 59–64.
- [ 18 ] 夏树林, 朴晶. 杜仲叶中多糖的提取及其抗疲劳作用的研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(33) : 18747–18748.
- [ 19 ] CHEN F, HUANG G, HUANG H, et al. Preparation, analysis, antioxidant activities in vivo of phosphorylated polysaccharide from *Momordica charantia*[J]. Carbohydrate polymers, 2020, 252: 117179.
- [ 20 ] YANG W, HUANG G, HUANG H, et al. Preparation and structure of polysaccharide selenide[J]. Industrial crops and products, 2020, 154(5) : 112630.
- [ 21 ] TIAN S, HAO C, XU G, et al. Optimization conditions for extracting polysaccharide from *Angelica sinensis* and its antioxidant activities[J]. Journal of food and drug analysis, 2016, 25(4) : 766–775.
- [ 22 ] CHEN F, HUANG G, YANG W, et al. Antioxidant activity of polysaccharides from different sources of ginseng[J]. International journal of biological macromolecules, 2018, 125: 906–908.
- [ 23 ] DUBOIS M, GILLES K A, HANILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. Analytical chemistry, 1956, 28(3) : 350–356.
- [ 24 ] BARBOSE H, SLATER N K H, MARCOS J C. Protein quantification in the presence of poly(ethylene glycol) and dextran using the Bradford method[J]. Analytical biochemistry, 2009, 395(1) : 108–110.
- [ 25 ] BITTER T, MUIR H M. A modified uronic acid carbazole reaction[J]. Analytical biochemistry, 1962, 4(4) : 330–334.
- [ 26 ] CHEN P, LIU H, JI H, et al. A cold-water soluble polysaccharide isolated from *Grifola frondosa* induces the apoptosis of HepG2 cells through mitochondrial pathway[J]. International journal of biological macromolecules, 2019, 125: 1232–1241.
- [ 27 ] ZHOU P, XIE M, NIE S, et al. Primary structure and configuration of tea polysaccharide[J]. Science in China, 2004, 47(5) : 416–424.
- [ 28 ] GUO X, KANG J, XU Z, et al. Triple-helix polysaccharides: formation mechanisms and analytical methods[J]. Carbohydrate polymers, 2021, 262: 117962.
- [ 29 ] LI Q, LI J, LI H, et al. Physicochemical properties and functional bioactivities of different bonding state polysaccharides extracted from tomato fruit[J]. Carbohydrate polymers, 2019, 219: 181–190.
- [ 30 ] 王杰晶, 李银峰, 李佩, 等. 差示扫描量热法在药物定性分析中的应用[J]. 现代药物与临床, 2013, 28(5) : 815–818.
- [ 31 ] MARAN J P, MEKALA V, MANIKANDAN S. Modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of polysaccharide from *Cucurbita moschata*[J]. Carbohydrate polymers, 2013, 92(2) : 2018–2026.
- [ 32 ] MARAN J P, SIVAKUMAR V, THIRUGNANASAMBANDHAM K, et al. Optimization of microwave assisted extraction of pectin from orange peel[J]. Carbohydrate polymers, 2013, 97(2) : 703–709.
- [ 33 ] CHENG Z, YANG Y, LIU Y, et al. Optimization of microwave-assisted enzymatic extraction of polysaccharides from the fruit of *Schisandra chinensis* Baill[J]. International journal of biological macromolecules, 2015, 76: 161–168.
- [ 34 ] MARAN J P, SIVAKUMAR V, SRIDHAR R, et al. Development of model for mechanical properties of tapioca starch based edible films[J]. Industrial crops and products, 2013, 42: 159–168.
- [ 35 ] HU S, ZHAO G, ZHENG Y, et al. Effect of drying procedures on the physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharides from *Crassostrea gigas*[J]. PLOS ONE, 2017, 12(11) : 1–13.
- [ 36 ] ZHAO Q, DONG B, CHEN J, et al. Effect of drying methods on physicochemical properties and antioxidant activities of wolfberry (*Lycium barbarum*) polysaccharide[J]. Carbohydrate polymers, 2015, 127: 176–181.

责任编辑: 郎婧