

超声波-微波辅助提取杜仲叶多糖工艺优化及其体外抗凝血活性分析

陈艳萍, 贺菊萍, 刘意, 杨万根

Optimization of Ultrasonic-Microwave Assisted Extraction of Polysaccharides from *Eucommia ulmoides* Leaves and Its Anticoagulant Activity *in Vitro*

CHEN Yanping, HE Juping, LIU Yi, and YANG Wangen

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022100189>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

响应面法优化超声波协同酶法提取杜仲叶多糖工艺

Optimization of Ultrasonic and Enzymatic-assisted Extraction of Polysaccharides from *Eucommia ulmoides* Oliver Leaves by Response Surface Method

食品工业科技. 2020, 41(22): 193-198, 220 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020020298>

响应面法优化白灵菇多糖超声辅助提取工艺及其体外抗氧化性

Optimization of ultrasonic-assisted extraction process of polysaccharides from *Pleurotus nebrodensis* by response surface methodology and evaluation of antioxidant activity *in vitro*

食品工业科技. 2017(10): 247-252 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.10.039>

血红铆钉菇多糖超声微波联合提取工艺优化及其抗氧化活性

Optimization of Ultrasonic-Microwave Combined Extraction Process and Antioxidant Activity of Polysaccharides from *Chroogomphus rutilus*

食品工业科技. 2020, 41(22): 165-171 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020020086>

响应面法优化超声辅助提取蔓菁多糖工艺及其体外抗氧化性研究

Optimization of Ultrasonic Assisted Extraction Process by Response Surface Methodology and Antioxidant Activity *in Vitro* for Polysaccharides from Turnip

食品工业科技. 2020, 41(7): 139-145 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.07.024>

黄秋葵超微粉多糖提取工艺的优化及其抗氧化活性测定

Optimization of extraction technology and determination of antioxidant activity of polysaccharides from superfine powder of okra

食品工业科技. 2018, 39(7): 175-180 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.07.032>

响应面法优化筍头多糖微波-超声波辅助提取工艺

Optimization of Microwave-Ultrasonic Assisted Extraction of Polysaccharides from Basal Part of Bamboo Shoot by Response Surface Methodology

食品工业科技. 2020, 41(16): 201-206, 291 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.16.032>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

陈艳萍, 贺菊萍, 刘意, 等. 超声波-微波辅助提取杜仲叶多糖工艺优化及其体外抗凝血活性分析 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(17): 202–211. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022100189

CHEN Yanping, HE Juping, LIU Yi, et al. Optimization of Ultrasonic-Microwave Assisted Extraction of Polysaccharides from *Eucommia ulmoides* Leaves and Its Anticoagulant Activity *in Vitro* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(17): 202–211. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022100189

· 工艺技术 ·

超声波-微波辅助提取杜仲叶多糖工艺优化及 其体外抗凝血活性分析

陈艳萍¹, 贺菊萍², 刘意³, 杨万根^{1,3,*}

(1. 吉首大学林产化工工程湖南省重点实验室, 湖南张家界 427000;
2. 徐州工程学院江苏省食品资源开发与质量安全重点建设实验室, 江苏徐州 221018;
3. 吉首大学食药两用资源研究与高值化利用湖南省重点实验室, 湖南吉首 416000)

摘要: 为开发我国丰富的杜仲叶资源, 研究超声波-微波辅助提取杜仲叶多糖的最优工艺条件及其理化性质和体外抗凝血活性。首先通过单因素实验确定超声波功率、提取温度、微波功率、料液比、提取时间等影响多糖得率因素的范围, 然后通过 Plackett-Burman 试验筛选关键影响因素, 再采用 Box-Behnken 试验对工艺条件进行优化, 分析了所得杜仲叶精制多糖的分子量、单糖组成等理化性质及活化部分凝血酶原时间 (APTT)、凝血酶原时间 (PT)、凝血酶时间 (TT) 等抗凝血指标。结果表明, 料液比、提取时间、提取温度为关键影响因素, 最优提取工艺条件为超声波功率 130 W、提取温度 49 °C、微波功率 200 W、料液比 1:30 (g:mL)、提取时间 20 min。在此条件下, 杜仲叶多糖的实际得率为 4.02%±0.03%, 与理论得率 4.08% 接近。所得杜仲叶精制多糖的重均分子质量 (M_w) 为 1653 kDa, 单糖组成及摩尔比为果糖 37.3%、葡萄糖 35%、N-乙酰-D 氨基葡萄糖 14.6%、半乳糖 8.6%、阿拉伯糖 4.4%。分析结果显示, 杜仲叶多糖为 β 型酸性多糖。与阴性对照相比, 杜仲叶多糖能极显著延长 APTT ($P<0.01$), 而当杜仲叶多糖浓度为 8 mg/mL 时, PT、TT 亦能极显著延长 ($P<0.01$), 说明杜仲叶多糖主要通过内源性途径影响凝血系统, 同时也能够通过外源性、共同途径来影响凝血过程。此研究可为我国丰富的杜仲叶资源的高值化开发利用提供理论依据和技术参考。

关键词: 杜仲叶, 多糖, 超声波-微波辅助提取, 响应面优化, 理化性质, 体外抗凝血活性

中图分类号: TS202.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2023)17-0202-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022100189

本文网刊:



Optimization of Ultrasonic-Microwave Assisted Extraction of Polysaccharides from *Eucommia ulmoides* Leaves and Its Anticoagulant Activity *in Vitro*

CHEN Yanping¹, HE Juping², LIU Yi³, YANG Wangen^{1,3,*}

(1. Key Laboratory of Hunan Forest and Chemical Industry Engineering, Jishou University, Zhangjiajie 427000, China;

2. Jiangsu Key Laboratory of Food Resource Development and Quality Safe, Xuzhou University of Technology, Xuzhou 221018, China;

3. Hunan Provincial Key Laboratory of Research, Resource Mining and High-valued Utilization on Edible and Medicinal Plant, Jishou University, Jishou 416000, China)

Abstract: To develop the rich resources of *Eucommia ulmoides* leaves in China, the optimal conditions of extracting

收稿日期: 2022-10-19

基金项目: 湖南省教育厅重点科学项目 (19A396); 湖南省科技成果转化及产业化计划——高新技术产业科技创新引领计划 (科技攻关类) 项目 (2020SK2028); 中药饮片全产业链质量标准体系构建 (2019KT1261); 广东省药品监督管理局中药全产业链质量评价重点实验室 (2020ZDB25); 吉首大学研究生科研项目 (Jdy22073)。

作者简介: 陈艳萍 (1996-), 女, 硕士, 研究方向: 森林食品资源开发, E-mail: c17369423183@163.com。

* 通信作者: 杨万根 (1974-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品功能因子, E-mail: yangwangen08@163.com。

polysaccharides from *Eucommia ulmoides* leaves by ultrasonic and microwave, the physicochemical properties and the anticoagulant activity *in vitro* of the extracted polysaccharides were studied. Firstly, the ranges of factors affecting the yield of polysaccharide, such as ultrasonic power, extraction temperature, microwave power, ratio of solid to liquid, extraction time, were determined by single factor experiment. The key factors were further screened by Plackett-Burman test, and the Box-Behnken test was used to optimize the process conditions. Finally, the physicochemical properties, such as molecular weight and monosaccharide composition, and the anticoagulant indices, such as activated partial prothrombin time (APTT), prothrombin time (PT), thrombin time (TT) of the refined *Eucommia ulmoides* leaf polysaccharides, were analyzed. The results showed that the ratio of solid to liquid, the extraction time and the extraction temperature were the key factors. The optimal extraction conditions were the ultrasonic power of 130 W, the extraction temperature of 49 °C, the microwave power of 200 W, the solid-liquid ratio of 1 to 30 (g:mL) and the extraction time of 20 min. Under these conditions, the actual yield of *Eucommia ulmoides* leaf polysaccharides was 4.02%±0.03%, close to the theoretical yield of 4.08%. The weight-average molecular mass (M_w) of the refined polysaccharide was 1653 kDa, and the composition and molar ratio of monosaccharide were 37.3% fructose, 35% glucose, 14.6% n-acetyl-d-glucosamine, 8.6% galactose and 4.4% arabinose. The results showed that the polysaccharides of *Eucommia ulmoides* leaves was β -type acidic polysaccharide. Compared with the negative control, the *Eucommia ulmoides* polysaccharides significantly increased APTT ($P<0.01$), and significantly increased PT and TT ($P<0.01$) at the concentration of 8 mg/mL, indicating that it mainly affected coagulation system through endogenous pathway, could also affect the coagulation process through exogenous and common pathways. This study could provide theoretical basis and technical reference for the high-value utilization of *Eucommia ulmoides* leaves in China.

Key words: *Eucommia ulmoides* leaves; polysaccharides; ultrasonic-microwave assisted extraction; optimization by response surface method; physicochemical properties; anticoagulant activity *in vitro*

杜仲树是我国的特有树种, 其叶在 2018 年被列为我国的新食品原料。目前, 我国的杜仲树栽植面积已达 35 万 hm², 在国内 27 个省(区、市)均有栽植, 杜仲叶资源非常丰富^[1]; 但我国对杜仲叶开发研究的时间还不长, 目前主要产品是杜仲叶茶、动物饲料添加剂等初级加工产品, 亟需对其开展深入研究, 开发高附加值产品。现代研究发现, 植物多糖往往具有抗肿瘤^[2-3]、抗氧化^[4]、抗凝血^[5]、调节肠道菌群^[6]等生物活性, 而多糖也是杜仲叶的主要成分之一, 因此开发杜仲叶多糖的研究正变得日益广泛。

杜仲叶多糖开发面对的问题之一是如何快速提取。常用的植物多糖提取技术有热水提取、超声波、微波、酶辅助提取等。热水提取以水为提取溶剂, 耗时长、效率低。超声波辅助提取是利用频率大于 20 kHz 的超声波产生强大压力、剪切力破坏细胞结构, 加速多糖向水中扩散, 提高提取效果。微波辅助提取是高频电磁波使植物细胞内外的温度快速上升, 植物细胞内压力超过细胞壁承受能力, 细胞壁遭到破坏, 其内的有效成分流出^[7]。超声波提取有强烈的物理破碎和混合传质作用, 但为提取溶液体系快速加热的能力弱, 而微波提取则相反, 因此超声波、微波辅助提取之间的互补性很强。近年出现了将两种技术结合的超声波-微波辅助提取技术, 该技术呈现出高效、绿色等诸多优势, 如 HU 等^[8]将此技术应用于提取虎果仁油, 提取率达到 85.23%, JIANG 等^[9]采用该技术从玉米麸皮中提取阿拉伯木聚糖, 提取率达 27.7%。目前还没有发现超声波-微波辅助提取技术在杜仲叶多糖提取中的应用研究。

因此, 本文以杜仲叶多糖为研究对象, 开展超声波-微波辅助提取杜仲叶多糖工艺条件优化研究, 并

对所得精制多糖的单糖组成、分子量、体外抗凝血活性进行分析, 旨在为我国丰富的杜仲叶资源的高值化利用提供理论依据和技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

杜仲叶 采摘要于吉首大学林产化工工程湖南省重点实验室杜仲基地; 血浆 由湘西州人民医院提供; 石油醚(沸程 30~60 °C)、苯酚、浓硫酸、醋酸钠、三氟乙酸、氯化钠、氢氧化钠、无水乙醇 国药集团化学试剂有限公司; 溴化钾 Sigma-Aldrich 公司; 葡萄糖标准品、肝素钠 北京索莱宝科技有限公司; APTT、PT、TT 试剂盒 武汉中太生物技术有限公司; 葡萄糖、甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、半乳糖、葡萄糖醛酸、阿拉伯糖、木糖、岩藻糖、盐酸氨基葡萄糖、N-乙酰-D-氨基葡萄糖、D-果糖、D-核糖、氨基半乳糖盐酸盐、L-古洛糖醛酸、D-甘露糖醛酸 博睿糖生物公司; 所有分离用有机溶剂均为国产分析纯。

XH-300PE 超声波高压微波协同组合工作站 北京祥鹤科技发展有限公司; XN06-II 半自动凝血分析仪 武汉景川诊断技术股份有限公司; Evolution 201 紫外可见光光度计、ICS5000 离子色谱仪(IC)、D-37520 离心机 ThermoFisher 公司; UGC-24M 干式氮吹仪 力辰科技公司; LC-10A 高效液相色谱仪 Shimadzu 公司; TENSOR 27 傅里叶红外光谱仪 Bruker 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 杜仲叶预处理 杜仲叶于 60 °C 干燥至恒重, 粉碎后, 过 60 目筛。用 5 倍体积的石油醚于 80 °C 水浴除去杜仲胶和脂类, 再用 5 倍体积的 80% 乙醇

于 80 ℃ 水浴除去单糖、双糖、寡糖等物质^[10], 过滤, 滤渣晾干后装入塑封袋, 4 ℃ 下保存备用。

1.2.2 杜仲叶多糖提取工艺 称取 3.0 g 处理后的杜仲叶粉, 以一定的料液比加入蒸馏水, 置于超声波微波协同组合工作站中在常压下以一定的超声波功率、微波功率和提取温度提取一定的时间。提取结束后, 4000 r/min 离心 10 min, 上清液即为多糖提取液, 重复提取三次, 将提取液合并。多糖提取液于 55 ℃ 减压浓缩, 在浓缩溶液中慢慢加入乙醇, 4 ℃ 静置 12 h 后, 4000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 沉淀用无水乙醇洗 2 次, 再将沉淀分散在少量蒸馏水中并冻干, 得到杜仲叶粗多糖。

1.2.3 杜仲叶多糖含量测定及提取得率计算 采用苯酚-硫酸法^[11] 测多糖含量。以蒸馏水为空白对照, 标准葡萄糖质量浓度 C(mg/mL) 为横坐标, 吸光度 A 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得其回归方程 $A=14.595C+0.00727$, $R^2=0.999$ 。将 1.2.2 提取三次合并的多糖提取液定容于 250 mL 容量瓶中, 精密吸取 1.0 mL, 加蒸馏水补足至 2 mL, 测吸光度 A, 根据回归方程计算多糖的质量浓度 C。按下式计算杜仲叶多糖得率 Y(%)。

$$Y(\%) = \frac{CVn}{1000m} \times 100$$

式中: C: 待测液中的多糖质量浓度, mg/mL; V: 待测样品液的体积, mL; n: 样品液的稀释倍数; m: 杜仲叶粉的质量, g。

1.2.4 单因素实验 单因素实验常规量设为: 超声波功率 110 W, 提取温度 50 ℃, 微波功率 250 W, 料液比 1:20(g:mL), 提取时间 20 min。依次考察超声波功率(50、70、90、110、130、150 W)、提取温度(40、45、50、55、60、65 ℃)、微波功率(100、150、200、250、300、350 W)、料液比(1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35(g:mL))、提取时间(15、20、25、30、35、40 min)对多糖得率的影响。

1.2.5 Plackett-Burman 试验 在单因素实验基础上, 利用 Plackett-Burman 试验筛选出关键因素, 因素与水平设计见表 1。

表 1 Plackett-Burman 试验设计

Table 1 Design of the Plackett-Burman experiment

因素	水平	
	-1	1
提取时间(min)	15	25
提取温度(℃)	45	55
超声波功率(W)	110	150
微波功率(W)	150	250
料液比(g:mL)	1:25	1:35

1.2.6 响应面法优化提取工艺 根据 Plackett-Burman 试验, 对筛选出的 3 个关键因素采用 Box-Behnken 设计对工艺参数进行优化, 因素与水平设计见表 2。

表 2 Box-Behnken 响应面试验设计

Table 2 Design of the Box-Behnken experiment

因素	水平		
	-1	0	1
提取时间(min)	15	20	25
提取温度(℃)	45	50	55
料液比(g:mL)	1:25	1:30	1:35

1.2.7 粗多糖的精制方法 Sevage 法^[12] 去蛋白: 粗多糖溶液与 Sevage 试剂(三氯甲烷:正丁醇=4:1, v/v)混合, 去除游离蛋白, 重复操作 5 次, 收集脱蛋白水相。

脱色: 用 1% 活性炭进行脱色。60 ℃ 条件下于摇床上 120 r/min 振荡 30 min, 过滤。

透析: 用截留分子量 3500 Da 的透析袋蒸馏水透析 72 h, 中间换水多次。

醇沉: 将透析后的多糖溶液用 95% 乙醇调节至 80%, 4 ℃ 条件下静置 12 h, 4000 r/min 离心 10 min, 用无水乙醇洗涤沉淀 2 遍, 冻干。

离子层析: 称取约 100 mg 透析后多糖溶解在少量蒸馏水中, 4000 r/min 离心 10 min, 取上清液加入 DEAE-52 纤维素离子交换色谱柱(2.6×40 cm)中, 先后用蒸馏水、1 mol/L NaCl 溶液洗脱, 洗脱液流速 5 mL/min。收集 NaCl 溶液的洗脱液, 经截留分子量 3500 Da 透析除去盐离子, 再 60 ℃ 减压浓缩至原体积 1/10, 冻干后得到杜仲叶精制多糖。

1.2.8 精制多糖的分子量分布分析 采用高效凝胶渗透色谱法^[13] 测定杜仲叶精制多糖分子量。色谱条件: 色谱柱: BRT105-104-102 串联凝胶柱(8×300 mm); 流动相: 0.05 mol/L NaCl 溶液; 流速: 0.6 mL/min; 柱温: 40 ℃; 进样量: 20 μL; 检测器: RI-10A 示差检测器。样品配制成 5 mg/mL 溶液, 12000 r/min 离心 10 min, 上清液用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 然后将样品转置于 1.8 mL 进样瓶中测样。

1.2.9 精制多糖的单糖组成分析 精密称量 5.0 mg 样品置于安瓿瓶中, 加入 3 mol/L 三氟乙酸 2 mL, 120 ℃ 水解 3 h。准确吸取酸水解溶液转移至玻璃管中用氮气吹干, 加入 5 mL 去离子水涡旋混匀, 吸取 100 μL 加入 900 μL 去离子水, 12000 r/min 离心 5 min。取上清进 IC 分析。

色谱条件: 色谱柱 Dionex CarboPacTM PA20 (3×150 mm); 流动相: A: H₂O; B: 15 mmol/L NaOH; C: 15 mmol/L NaOH & 100 mmol/L NaOAc; 流速: 0.3 mL/min; 进样量: 5 μL; 柱温: 30 ℃; 检测器: 电化学检测器^[13]。

1.2.10 精制多糖的光谱分析 取适量杜仲叶精制多糖溶液于石英比色皿中, 用紫外分光光度计进行扫描, 扫描波长 200~400 nm, 扫描频率为 2 nm/s。

称量 1.0 mg 杜仲叶精制多糖样品和 100.0 mg 溴化钾于玛瑙研钵中, 研磨混匀成细粉后, 压制成透

明薄片, 用傅里叶红外光谱仪扫描, 扫描范围 4000~500 cm^{-1} , 分辨率为 4 cm^{-1} , 累积扫描 64 次。

1.2.11 精制多糖的体外抗凝血活性测定 参照文献 [14] 测定。将杜仲叶精制多糖溶于生理盐水, 分别配成 2、4、8 mg/mL, 再将待测多糖与血浆以 1:4 体积比混合均匀。分别以生理盐水、肝素钠溶液 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 做阴性和阳性对照, 然后测定活化部分凝血酶原时间 (APTT)、凝血酶原时间 (PT)、凝血酶时间 (TT) 三个指标评价其抗凝血活性。

a. APTT 的测定: 取 100 μL 预热的 37 $^{\circ}\text{C}$ 待测混合血浆, 加入 100 μL 的 APTT, 预热 3 min, 再加 100 μL 预热的氯化钙溶液 (0.025 mol/L) 并混合均匀, 仪器计时。

b. PT 的测定: 取 100 μL 预热的 37 $^{\circ}\text{C}$ 待测混合血浆, 加入 200 μL 预热的 PT, 混合均匀, 仪器计时。

c. TT 的测定: 取 100 μL 预热的 37 $^{\circ}\text{C}$ 待测混合血浆, 加入 100 μL 预热的 TT, 混合均匀, 仪器计时。

1.3 数据处理

所有试验重复三次操作, 结果用平均值±标准偏差表示。Design-Expert 8.0.6 软件分析响应面试验结果, SPSS Statistics 22.0 软件进行 ANOVA 分析, Origin 2019b 软件作图。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 超声波功率对杜仲叶多糖得率的影响 图 1 显示, 随着超声波功率由 50 W 增大到 70 W, 杜仲叶多糖得率呈增长趋势, 这是因为超声波空化效应产生的微射流和冲击波有利于植物材料中多糖的溶解和扩散^[15]; 但继续增大超声波功率, 多糖降解, 多糖得率比之前降低; 但是超声波功率继续增大到 130 W 时, 由于超声波的空化作用更大, 植物材料结构受到更大的影响, 多糖更易从植物组织里溶出, 这时多糖得率达到最大值 3.45%±0.12%。然而, 继续增大超声波功率, 多糖得率下降, 这是因为过高的超声波功率会产生大量的微小气泡, 使空化效应下降^[16]。超声波功率 130 与 110、150 W 之间的多糖得率差异显著 ($P<0.05$), 因此后续试验中超声波功率取值范围为 110~150 W。

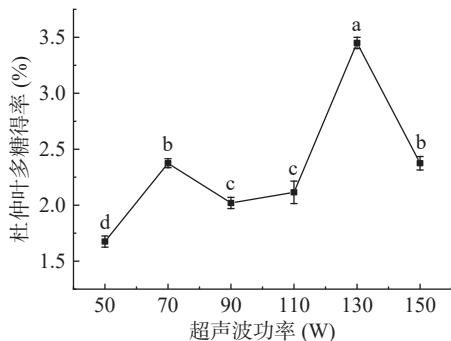


图 1 超声波功率对杜仲叶多糖得率的影响

Fig.1 Effect of ultrasonic power on the yield of polysaccharides from *Eucommia ulmoides* leaves

注: 不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$); 图 2~图 5 同。

2.1.2 提取温度对杜仲叶多糖得率的影响 图 2 显示, 当提取温度从 40 $^{\circ}\text{C}$ 升高到 50 $^{\circ}\text{C}$ 时, 杜仲叶多糖得率逐渐增大, 在 50 $^{\circ}\text{C}$ 时达到最大值 3.54%±0.05%, 但进一步升高温度至 55 $^{\circ}\text{C}$, 杜仲叶多糖得率反而下降。这可能是由于温度在一定范围内的升高有利于多糖从细胞中溶出, 但随着系统温度的升高, 超声空化气泡的温度和压力也会降低, 过高的系统温度会降低空化效应, 从而导致多糖得率下降^[17]。而温度升至 60 $^{\circ}\text{C}$ 时, 使空化气泡压力有所上升, 多糖得率呈小幅增大, 继续升至 65 $^{\circ}\text{C}$ 后, 空化气泡变得细密, 空化效应下降, 多糖得率下降。提取温度 50 $^{\circ}\text{C}$ 与 45、55 $^{\circ}\text{C}$ 之间的多糖得率差异显著 ($P<0.05$), 因此后续试验中提取温度取值范围为 45~55 $^{\circ}\text{C}$ 。

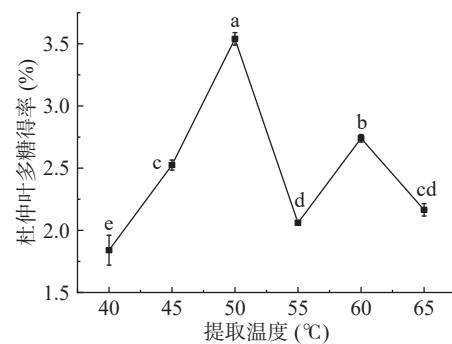


图 2 提取温度对杜仲叶多糖得率的影响

Fig.2 Effect of extraction temperature on the yield of polysaccharides from *Eucommia ulmoides* leaves

2.1.3 微波功率对杜仲叶多糖得率的影响 图 3 显示, 微波功率由 100 W 增大至 150 W 时, 多糖得率有小幅下降, 但微波功率升至 200 W 时, 多糖得率大幅上升, 达到最大值 3.76%±0.04%。多糖得率的增加是由于微波使植物细胞内受热膨胀并导致细胞壁破裂, 多糖溶出增加, 但是微波功率过高, 多糖被降解, 导致多糖得率下降^[18]。在微波功率 200 W 与 150、250 W 之间, 多糖得率差异显著 ($P<0.05$), 因此后续试验中微波功率取值范围为 150~250 W。

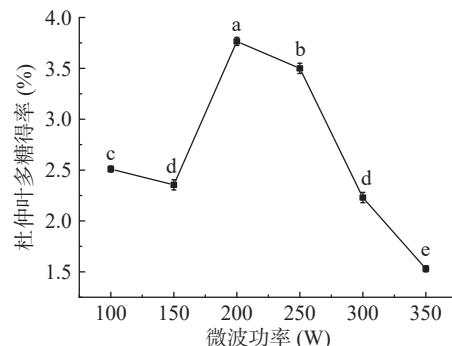


图 3 微波功率对杜仲叶多糖得率的影响

Fig.3 Effect of microwave power on the yield of polysaccharides from *Eucommia ulmoides* leaves

2.1.4 料液比对杜仲叶多糖得率的影响 图 4 显示, 在料液比为 1:10、1:15(g:mL) 时, 多糖得率较低; 但当料液比增大到 1:20(g:mL) 时, 多糖得率有大

幅增加,在料液比 1:30(g:mL)时有最大值 3.94%±0.02%。这是因为溶剂比例较低时,杂质的析出量增多,抑制了杜仲叶多糖的析出;继续增大溶剂比例,杂质基本溶出,此时多糖溶出不受抑制,得率增大^[19]。因此后续试验中料液比取值范围为 1:25~1:35(g:mL)。

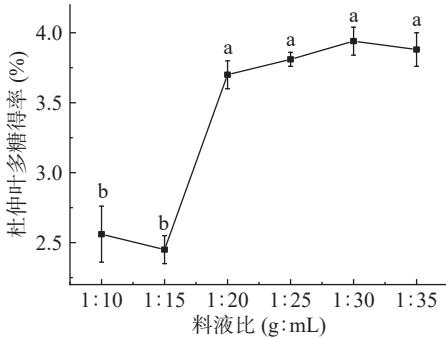


图 4 料液比对杜仲叶多糖得率的影响
Fig.4 Effect of ratio of solid to liquid on the yield of polysaccharides from *Eucommia ulmoides* leaves

2.1.5 提取时间对杜仲叶多糖得率的影响 图 5 显示,提取时间从 15 min 增加至 20 min 时,杜仲叶多糖的得率上升并达到最大值 3.94%±0.1%,之后继续增加提取时间,杜仲叶多糖得率下降。这是由于多糖的溶出需要一定时间,但提取时间过长,超声会破坏多糖的分子结构引起多糖降解,导致多糖得率下降^[20]。在提取时间 20 min 与 15、30 min 之间,多糖得率差异显著($P<0.05$),在 20 与 25 min 之间,多糖得率差异不显著($P>0.05$),考虑后续试验中提取时间取值范围为 15~25 min。

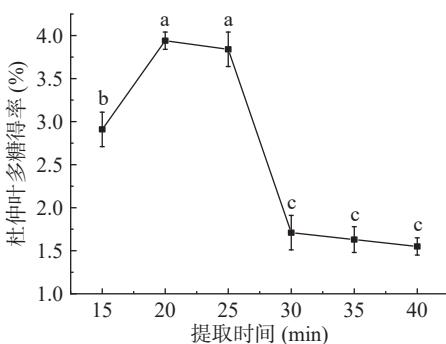


图 5 提取时间对杜仲叶多糖得率的影响
Fig.5 Effect of extraction time on the yield of polysaccharides from *Eucommia ulmoides* leaves

2.2 Plackett-Burman 试验结果

Plackett-Burman 试验结果见表 3, 方差分析结果见表 4。

由表 4 可知,提取时间、提取温度和料液比对杜仲叶多糖得率的影响均达到显著水平($P<0.05$),其中料液比为达到极显著水平($P<0.01$)。超声波功率和微波功率为非显著影响因素,故选择提取时间、提取温度和料液比进行响应面优化试验,而超声波功率、微波功率则分别固定为 130 和 200 W。

表 3 Plackett-Burman 试验设计及结果

Table 3 The design and results of the Plackett-Burman experiment

实验号	提取时间(min)	提取温度(℃)	超声波功率(W)	微波功率(W)	料液比(g:mL)	多糖得率(%)
1	1(25)	-1(45)	-1(110)	-1(150)	1(1:35)	2.06±0.1
2	-1(15)	-1	-1	-1	-1(1:25)	2.65±0.08
3	1	1(55)	-1	-1	-1	2.63±0.06
4	-1	-1	1(150)	-1	1	2.12±0.12
5	-1	1	1	1(250)	-1	2.22±0.09
6	1	-1	1	1	-1	2.74±0.07
7	1	-1	1	1	1	2.93±0.05
8	1	1	-1	1	1	2.76±0.1
9	1	1	1	-1	-1	2.78±0.06
10	-1	-1	-1	1	-1	2.69±0.05
11	-1	1	1	-1	1	3.06±0.08
12	-1	1	-1	1	1	2.70±0.04

表 4 Plackett-Burman 试验各因素效应评价

Table 4 Effect evaluation of the factors of Plackett-Burman experiment

因素	效应	系数	系数标准误	T值	P值	显著性
常量		4.1240	0.042	95.54	0.000	
A-提取时间	0.4306	0.2153	0.042	3.24	0.0379	*
B-提取温度	-0.4274	-0.2137	0.042	-3.97	0.0406	*
C-超声波功率	0.1237	0.0618	0.042	2.15	0.0812	
D-微波功率	-0.2964	-0.1442	0.042	-3.56	0.1148	
E-料液比	0.1664	0.0832	0.042	1.86	0.0095	**

注: $R^2=94.95\%$, $R^2_{Adj}=89.23\%$; *表示影响显著($P<0.05$), **表示影响极显著($P<0.01$)。

2.3 Box-Behnken 响应面试验结果

Box-Behnken 响应面试验结果见表 5。

表 5 Box-Behnken 响应面试验设计及结果

Table 5 Design and results of the Box-Behnken experiment

实验号	A提取时间	B提取温度	C料液比	多糖得率(%)
1	-1	-1	0	1.97±0.06
2	1	-1	0	2.74±0.04
3	0	1	1	2.82±0.05
4	0	0	0	3.99±0.07
5	-1	0	-1	2.5±0.08
6	0	1	-1	2.07±0.06
7	-1	0	1	1.85±0.1
8	0	-1	-1	3.74±0.04
9	1	1	0	2.22±0.05
10	1	0	-1	2.64±0.06
11	0	0	0	3.98±0.06
12	1	0	1	2.17±0.1
13	0	-1	1	1.20±0.06
14	0	0	0	4.05±0.08
15	0	0	0	4.12±0.04
16	0	0	0	3.94±0.08
17	-1	1	0	2.57±0.05

对实验结果进行回归拟合,得到显著影响杜仲叶多糖得率(Y)因素的多元二次回归方程: $Y=4.02+0.11A+3.750\times10^{-3}B-0.36C-0.282AB+0.045AC+0.82BC-0.90A^2-0.74B^2-0.82C^2$ 。表 6 为回归模型的方差分析结果。结果显示,在该模型中一次项

A 具有显著影响($P<0.05$), 一次项 C 和二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 以及交互项 AB、BC 具有极显著影响($P<0.01$)。此外, 该回归模型 $P<0.01$, 说明该模型可靠。 $R^2=0.9944$, 说明模型拟合程度良好, 模型的校正相关系数($R^2_{\text{Adj}}=0.9871$)说明自变量之间的相关性良好。

表 6 回归模型方差分析结果

Table 6 Results of variance analysis of response surface quadratic model

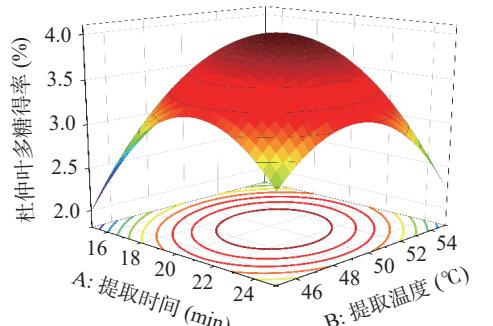
参数	平方和	自由度	均方和	F值	P值	显著性
模型	13.75	9	1.53	136.89	<0.0001	**
A-提取时间	0.097	1	0.097	8.67	0.0216	*
B-提取温度	1.125×10^{-4}	1	1.125×10^{-4}	0.010	0.9229	
C-料液比	1.06	1	1.06	94.82	<0.0001	**
AB	0.31	1	0.31	28.09	0.0011	**
AC	8.100×10^{-3}	1	8.100×10^{-3}	0.73	0.4225	
BC	2.71	1	2.71	242.40	<0.0001	**
A^2	3.44	1	3.44	308.40	<0.0001	**
B^2	2.29	1	2.29	204.73	<0.0001	**
C^2	2.84	1	2.84	254.69	<0.0001	**
残差	0.076	7	0.011			
失拟项	0.058	3	0.019	3.95	0.1088	
纯误差	0.020	4	4.930×10^{-3}			
总和	13.83	16				

注: $R^2=0.9944$, $R^2_{\text{Adj}}=0.9871$, *表示影响显著($P<0.05$), **表示影响极显著($P<0.01$)。

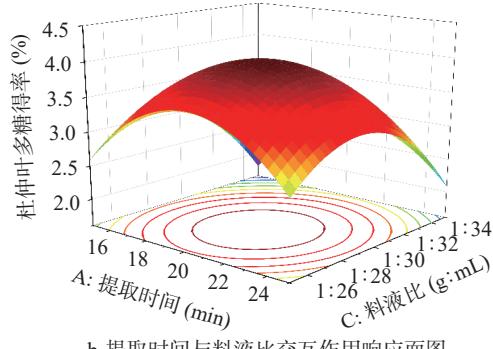
由模型分析得出, 杜仲叶多糖的超声波-微波辅助提取最优工艺条件为提取温度 49.06 °C、料液比 1:28.44(g:mL)、提取时间 20.41 min。此条件下预测的杜仲叶多糖得率为 4.08%。为了在实际中具有可操作性, 将最优工艺参数确定为提取温度 49 °C、料液比 1:30(g:mL)、提取时间 20 min。为了验证模型的可靠性, 在此最佳条件下进行了验证实验, 测出多糖得率为 4.02%±0.03%, 该值与预测值十分接近。表明响应面优化试验可以合理优化杜仲叶多糖的超声波-微波辅助提取工艺条件。

宫本红^[21]采用热水提取杜仲叶多糖, 最优提取工艺条件为: 料液比 1:20, 提取温度 100 °C, 浸提时间 120 min, 在此条件下粗多糖的提取率有 3.7%。刘晓河等^[22]研究了酶对杜仲多糖提取率的影响, 发现酶的添加对多糖的提取有显著作用, 其中果胶酶效果最为显著。陈雪花^[10]采用的超声波协同酶法提取杜仲叶多糖, 最佳提取工艺条件为复合酶添加量 3.7%、pH4.0、超声波功率 100 W、提取温度 45 °C、料液比 1:20(g:mL)和提取时间 15 min, 多糖得率达 4.79%±0.02%。虽然本研究的多糖得率与超声波协同酶法的得率相比较低, 但本文所采用的超声波-微波辅助提取方法因减少了用酶成本和灭酶的能耗成本, 经济上更具优势。

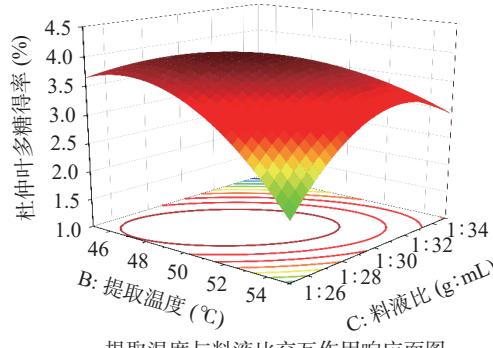
图 6 为两因素间交互作用响应面图。可以直观地观察到杜仲叶多糖得率较高分布区域范围以及两者之间的交互作用。交互作用对杜仲叶多糖得率的影响大小顺序为: BC>AB>AC。



a-提取时间与提取温度交互作用响应面图



b-提取时间与料液比交互作用响应面图



c-提取温度与料液比交互作用响应面图

图 6 两因素间交互作用响应面图
Fig.6 Response surface plots of interaction between two factors

2.4 杜仲叶多糖的 DEAE-52 纤维素离子交换层析柱纯化

以管号为横坐标, 吸光度(A)为纵坐标绘制杜仲叶多糖经离子交换层析纯化的洗脱曲线, 如图 7 所示。收集 5 号管至 11 号管的洗脱液, 透析冻干后多

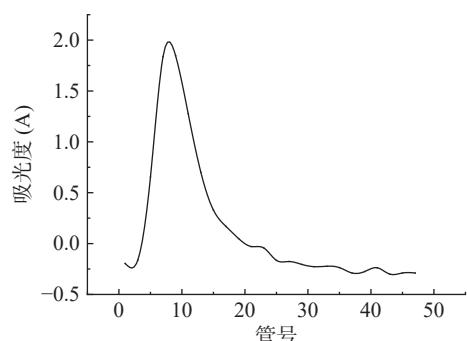


图 7 杜仲叶多糖的 DEAE-52 洗脱曲线

Fig.7 DEAE-52 elution curve of Polysaccharides from *Eucommia ulmoides* leaves

糖得率为 26.16%，精制多糖的糖含量为 50% (以葡萄糖计)。不同单糖标准品在相同浓度下的吸收值相差较大，而葡萄糖是单糖中显色较强的一种^[23]。杜仲叶多糖为杂多糖，此研究中用葡萄糖制作标准曲线，因杜仲叶多糖中的其他单糖显色不如葡萄糖而使多糖的糖含量测定结果偏低。

2.5 分子量测定结果

图 8 显示，杜仲叶精制多糖的主要洗脱峰单一且较对称，说明多糖纯度较高，其重均分子质量 M_w 为 1653 kDa，数均分子质量 M_n 为 1431 kDa，峰值分子质量 M_p 为 1647 kDa，分子量分布系数 M_w/M_n 为 1.16。FENG 等^[24] 从杜仲茎皮部提取的杜仲多糖平均分子量为 1146 kDa，ZHU 等^[25] 从杜仲茎皮部提取的杜仲多糖平均分子量为 1000~2000 kDa。结果说明杜仲叶与皮中多糖的分子量相近。陈雪花^[10] 采用超声波辅助酶法提取的杜仲叶多糖时，其分子量仅为 180 kDa，其值偏小，是与该提取方法中使用纤维素酶有关。

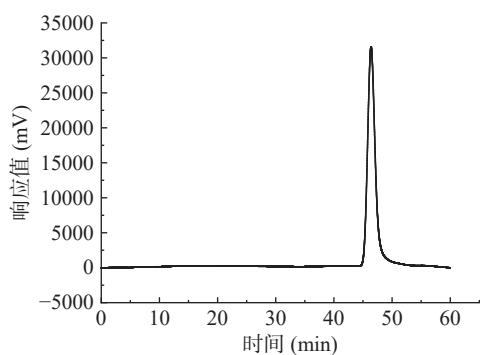


图 8 杜仲叶精制多糖的分子质量色谱图

Fig.8 Chromatogram of molecular weight of refined polysaccharides from *Eucommia ulmoides* leaves

2.6 单糖组成测定结果

图 9 显示，杜仲叶精制多糖中含有果糖、葡萄糖、N-乙酰-D 氨基葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖等 5 种单糖。各单糖摩尔百分含量为：果糖 37.3%、葡萄糖 35%、N-乙酰-D 氨基葡萄糖 14.6%、半乳糖 8.6%、阿拉伯糖 4.4%，表明果糖与葡萄糖是杜仲叶多糖的主要成分。陈雪花^[10] 采用超声波-酶法得到的杜仲叶多糖主要成分是甘露糖、半乳糖和阿拉伯糖，与本研究结果产生差异，是因为提取工艺不同以及本研究所测定多糖是精制多糖而致。

2.7 光谱分析结果

图 10 为杜仲叶精制多糖溶液在 200~400 nm 紫外波长范围的吸收曲线。可以看出，在 280 nm 和 260 nm 处未有明显的蛋白和核酸吸收峰，说明为较纯的多糖。图 11 为杜仲叶精制多糖的红外光谱图，具有多糖的特征吸收峰，在 3419 cm^{-1} 为 O-H 伸缩振动， 2925 cm^{-1} 处为 CH_3 、 CH_2 、 CH 等的 C-H 伸缩振动、 1126 cm^{-1} 处为 C-N 伸缩振动^[26]， 1603 cm^{-1} 处为糖醛酸 COO^- 伸缩振动， 1389 cm^{-1} 处为甲基的

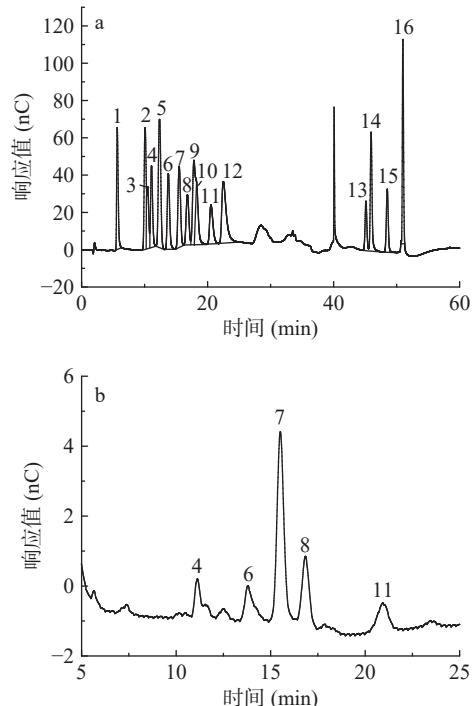


图 9 杜仲叶精制多糖的单糖组成色谱图

Fig.9 Chromatogram of monosaccharide composition of polysaccharides from *Eucommia ulmoides* leaves

注：1：岩藻糖；2：盐酸氨基半乳糖；3：鼠李糖；4：阿拉伯糖；5：盐酸氨基葡萄糖；6：半乳糖；7：葡萄糖；8：N-乙酰-D 氨基葡萄糖；9：木糖；10：甘露糖；11：果糖；12：核糖；13：半乳糖醛酸；14：古罗糖醛酸；15：葡萄糖醛酸；16：甘露糖醛酸。

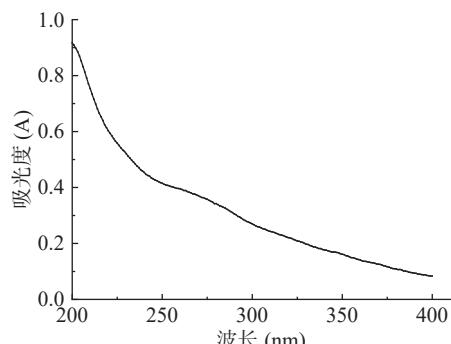


图 10 杜仲叶精制多糖紫外光谱图

Fig.10 UV spectrum of refined polysaccharides from *Eucommia ulmoides* leaves

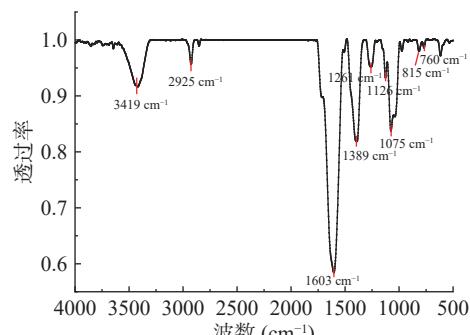


图 11 杜仲叶精制多糖红外光谱图

Fig.11 IR spectra of refined polysaccharides from *Eucommia ulmoides* leaves

变形吸收峰^[27]， 1261 cm^{-1} 处为 C-O 伸缩振动，证明

了乙酰基的存在^[28]。1075 cm⁻¹ 处为吡喃糖的糖环伸缩振动^[29]。此外, 在 760 cm⁻¹ 处的吸收峰显示糖单元的 β 构型^[28], 而 815 cm⁻¹ 处的吸收峰表示端基碳为 β 型^[10]。综上表明, 本研究得到的杜仲叶多糖为 β 型酸性多糖。

2.8 体外抗凝血活性结果

2.8.1 杜仲叶精制多糖对 APTT 的影响 肝素是一种硫酸化多糖, 在临幊上常被用作抗凝剂和抗血栓剂, 但有严重的出血和血小板减少等副作用, 且肝素来源于动物肠组织, 存在机体感染病毒的风险^[14]。因此, 从天然产物中提取抗凝剂具有重要意义。目前已经发现多种植物多糖具有抗凝血活性, 如黑木耳多糖^[30], 香椿子多糖^[14], 红枣多糖^[31]等。虽然杜仲叶多糖已经被证实具有抗氧化^[32]、降血糖^[33]、抗结肠癌^[10]等活性, 但其抗凝血活性还未见研究报道。

表 7 显示, 与阴性对照相比, 在杜仲叶多糖浓度 2 mg/mL 时, APTT 即增大, 说明有抗凝效果; 随多糖浓度增大, APTT 延长($P<0.01$); 当多糖浓度达到 8 mg/mL 时, APTT 超过 120 s($P<0.01$)。闻志莹^[14]研究香椿子多糖抗凝血活性时发现, 当多糖浓度为 4 mg/mL 时, 对 APTT 的延长到 36.6 s, 而本研究杜仲叶精制多糖浓度为 4 mg/mL 时, APTT 的延长时间为 73.05 s, 表明杜仲叶精制多糖对 APTT 有显著影响, 实验结果表明杜仲叶多糖是通过参与内源性凝血途径来起到抗凝血作用。

表 7 杜仲叶精制多糖对 APTT 的影响

Table 7 Effect of refined polysaccharides from *Eucommia ulmoides* leaves on APTT

样品	浓度(mg/mL)	APTT(s)
杜仲叶多糖	2	80.90±0.99**
杜仲叶多糖	4	73.05±0.49**
杜仲叶多糖	8	>120**
生理盐水		28.80±5.94
肝素钠	2 μg/mL	41.00±1.13**

注: *表示与阴性对照相比, 达到差异显著水平($P<0.05$); **表示与阴性对照相比, 达到差异极显著水平($P<0.01$); 表8-表9同。

2.8.2 杜仲叶精制多糖对 PT 的影响 表 8 显示, 与阴性对照相比, 当多糖浓度在 2~8 mg/mL 范围内, 杜仲叶多糖对 PT 有一定的延长作用, 表明杜仲叶多糖也可以通过参与外源性凝血途径起到抗凝血作用。当杜仲叶多糖浓度为 8 mg/mL 时, 对 PT 的影响达到极显著水平($P<0.01$), 延长到 42.30 s。

表 8 杜仲叶精制多糖对 PT 的影响

Table 8 Effect of refined polysaccharides from *Eucommia ulmoides* leaves on PT

样品	浓度(mg/mL)	PT(s)
杜仲叶多糖	2	10.67±1.27
杜仲叶多糖	4	10.07±1.50
杜仲叶多糖	8	42.30±8.56**
生理盐水		8.80±0.10
肝素钠	2 μg/mL	18.77±0.06*

2.8.3 杜仲叶精制多糖对 TT 的影响 表 9 显示, 与阴性对照相比, 当杜仲叶多糖为 2 mg/mL 时, 延长时间为 14.4 s, 当杜仲叶多糖浓度为 8 mg/mL 时, 延长时间超过了 120 s, 且影响达到极显著水平($P<0.01$), 说明杜仲叶多糖对 TT 有显著影响作用, 进而说明杜仲叶多糖也可以通过参与共同途径来影响凝血过程。闻志莹^[14]研究的香椿子多糖浓度为 2 mg/mL 时, 延长时间仅为 12.63 s, 说明杜仲叶多糖对 TT 作用的影响比香椿子多糖大。本文发现杜仲叶多糖的单糖组成主要是果糖、葡萄糖、N-乙酰-D 氨基葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖。宋苗苗^[34]报道, 抗凝血榴莲皮多糖组成有大量的鼠李糖、半乳糖酸存在, 而 Martinichen-Herrero 等^[35]报道, 具有半乳糖-甘露聚糖结构的地衣多糖有抗凝血和抗血栓活性。因此初步推测杜仲叶多糖的抗凝血活性可能与半乳糖糖基的存在有关。

表 9 杜仲叶精制多糖对 TT 的影响

Table 9 Effect of refined polysaccharides from *Eucommia ulmoides* leaves on TT

样品	浓度(mg/mL)	TT(s)
杜仲叶多糖	2	14.40±1.04**
杜仲叶多糖	4	11.50±1.55
杜仲叶多糖	8	>120**
生理盐水		9.33±0.21
肝素钠	2 μg/mL	20.27±1.59**

3 结论

本研究采用超声波-微波辅助法提取杜仲叶多糖, 经单因素实验和 BBD 试验, 得到最优提取工艺条件为: 超声波功率 130 W、微波功率 200 W、提取温度 49.06 °C、料液比 1:28.44(g:mL)、提取时间 20.41 min, 得率 4.08%。在此条件下实际多糖得率为 4.02%±0.03%。经 DEAE-52 离子层析纯化后, 精制多糖的重均分子质量(M_w)为 1653 kDa, 单糖组成及摩尔比为: 果糖 37.3%、葡萄糖 35%、N-乙酰-D 氨基葡萄糖 14.6%、半乳糖 8.6%、阿拉伯糖 4.4%, 并确定其为 β 型酸性多糖。与阴性对照相比, 杜仲叶多糖能极显著延长 APTT($P<0.01$), 对 PT、TT 有一定的延长作用, 且当多糖浓度为 8 mg/mL 时, 对 PT、TT 有极显著影响($P<0.01$), 说明其可以通过内源性、外源性、共同途径来影响凝血过程, 其中是以内源性途径为主。本研究结果表明, 与传统水浸提法和单一的超声波、微波法相比, 超声波-微波辅助提取法能高效提取杜仲叶多糖, 与酶法相比, 超声波-微波辅助提取法有利于降低生产成本, 并且发现杜仲叶多糖具有较强的体外抗凝血活性。本研究对我国丰富的杜仲叶资源开发具有一定的理论和技术参考价值。

参考文献

- [1] 刘攀峰, 王璐, 杜庆鑫, 等. 杜仲在我国的潜在适生区估计及其生态特征分析[J]. 生态学报, 2020, 40(16): 5674~5684. [LIU P F, WANG L, DU Q X, et al. Estimation of potential suitable distribu-

- tion area and the ecological characteristics of *Eucommia ulmoides* Oliv. in China[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2020, 40(16): 5674–5684.]
- [2] 边亮, 陈华国, 周欣. 植物多糖的抗肿瘤活性研究进展[J]. *食品科学*, 2020, 41(7): 275–282. [BIAN L, CHEN H G, ZHOU X. Recent advances in understanding the antitumor activity of polysaccharides from plants[J]. *Food Science*, 2020, 41(7): 275–282.]
- [3] DAMMAK M I, SALEM Y B, BELAID A, et al. Partial characterization and antitumor activity of a polysaccharide isolated from watermelon rinds[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 136: 632–641.
- [4] MENG Y, YI L, CHEN L, et al. Purification, structure characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Saposhnikovia divaricata*[J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2019, 17(10): 792–800.
- [5] HO T C, KIDDANE A T, SIVAGNANAM S P, et al. Green extraction of polyphenolic-polysaccharide conjugates from *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk: Chemical profile and anticoagulant activity[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 157: 484–493.
- [6] 贾丽娜, 马倩, 王新月, 等. 基于体外发酵模型分析植物多糖对 T2DM 患者肠道菌群及代谢的影响[J]. *食品科学*, 2023, 44(2): 248–261. [JIA L N, MA Q, WANG X Y, et al. Effects of plant polysaccharides on intestinal flora and metabolism in patients with T2DM based on *in vitro* fermentation model[J]. *Food Science*, 2023, 44(2): 248–261.]
- [7] 马斌. 微波辅助提取植物中挥发油的方法研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2010. [MA B. Study on methode of microwave assisted extraction of essential oil from plant[D]. Chongqing: Chongqing University, 2010.]
- [8] HU B, LI Y, SONG J, et al. Oil extraction from tiger nut (*Cyperus esculentus* L.) using the combination of microwave-ultrasonic assisted aqueous enzymatic method-design, optimization and quality evaluation[J]. *Journal of Chromatography A*, 2020, 1627: 461380.
- [9] JIANG Y, BAI X, LANG S, et al. Optimization of ultrasonic-microwave assisted alkali extraction of arabinoxylan from the corn bran using response surface methodology[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 128: 452–458.
- [10] 陈雪花. 杜仲叶多糖的提取分离、结构表征与 HT-29 结肠癌细胞抑制活性研究[D]. 吉首: 吉首大学, 2021. [CHEN X H. Extraction, isolation, structural characterization and inhibition on HT-29 colon cancer cells of *Eucommia ulmoides* leaf polysaccharides[D]. Jishou: Jishou University, 2021.]
- [11] KUSHWAHA S C, KATES M. Modification of phenol-sulfuric acid method for the estimation of sugars in lipids[J]. *Lipids*, 1981, 16(5): 372–373.
- [12] YI P, LI N, WAN J B, et al. Structural characterization and antioxidant activity of a heteropolysaccharide from *Ganoderma capense*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 121: 183–189.
- [13] 张韬. 一枝黄花植物粗多糖提取工艺及抗氧化活性研究[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2021. [ZHANG T. Study on extraction technology and antioxidant activity of crude polysaccharide from *Solidago*[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2021.]
- [14] 闻志莹. 香椿子多糖的提取、分离纯化及其抗凝血活性研究[D]. 芜湖: 安徽工程大学, 2020. [WEN Z Y. Study on extraction, purification and anticoagulant activity of polysaccharides from seeds of *Toona sinensis*[D]. Wuhu: Anhui Polytechnic University, 2020.]
- [15] AFSHARI K, SAMAVATI V, SHAHIDI S A. Ultrasonic-assisted extraction and *in-vitro* antioxidant activity of polysaccharide from *Hibiscus* leaf[J]. *International Journal of Biological Macromolecules Structure Function & Interactions*, 2015, 74: 558–567.
- [16] WANG L, LI T, LIU F, et al. Ultrasonic-assisted enzymatic extraction and characterization of polysaccharides from dandelion (*Taraxacum officinale*) leaves[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 126: 846–856.
- [17] MENG Q, CHEN Z, CHEN F, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from *Hemerocallis citrina* and the antioxidant activity study[J]. *Journal of Food Science*, 2021, 86(7): 3082–3096.
- [18] SUN H, LI C, NI Y, et al. Ultrasonic/microwave-assisted extraction of polysaccharides from *Camptotheca acuminata* fruits and its antitumor activity[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 206: 557–564.
- [19] ZHENG Y, CUI J, CHEN A H, et al. Optimization of ultrasonic-microwave assisted extraction and hepatoprotective activities of polysaccharides from *trametes orientalis*[J]. *Molecules*, 2019, 24(1): 147.
- [20] LIU Y, QIANG M, SUN Z, et al. Optimization of ultrasonic extraction of polysaccharides from *Hovenia dulcis* peduncles and their antioxidant potential[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 80: 350–357.
- [21] 宫本红. 杜仲叶多糖的提取分离及生物活性研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2008. [GONG B H. Study on extraction, isolation and biological activity of polysaccharides from *Eucommia ulmoides* leaves[D]. Guiyang: Guizhou University, 2008.]
- [22] 刘晓河, 张海燕, 梁惠花. 酶法提取杜仲多糖的工艺研究[J]. 河北北方学院学报(医学版), 2009, 26(3): 24–26. [LIU X H, ZHANG H Y, LIANG H H. Study on extraction process of *Eucommia ulmoides* oliv polysaccharide[J]. Journal of Hebei North University (Medical Edition), 2009, 26(3): 24–26.]
- [23] 杨勇杰, 姜瑞芝, 陈英红, 等. 苯酚硫酸法测定杂多糖含量的研究[J]. *中成药*, 2005(6): 706–708. [YANG Y J, JIANG R Z, CHEN Y H, et al. Determination of sugars in heteropolysaccharide by phenol-sulfuric acid method[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2005(6): 706–708.]
- [24] FENG H, FAN J, SONG Z, et al. Characterization and immunoenhancement activities of *Eucommia ulmoides* polysaccharides[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 136: 803–811.
- [25] ZHU H, DI H, ZHANG Y, et al. A protein-bound polysaccharide from the stem bark of *Eucommia ulmoides* and its anti-complementary effect[J]. *Carbohydrate Research*, 2009, 344(11): 1319–1324.
- [26] 杨杰. 杜仲叶多糖偶联 OVA 脂质立方液晶对小鼠免疫活性探究[D]. 重庆: 西南大学, 2021. [YANG J. Study on the immune activity of *Eucommia ulmoides* leaf polysaccharide coupled with ovalbumin Cubosomes in mice[D]. Chongqing: Southwest University, 2021.]
- [27] YE G, LI J, ZHANG J, et al. Structural characterization and antitumor activity of a polysaccharide from *Dendrobium wurdianum*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 269: 118253.
- [28] XU J, HOU H, HU J, et al. Optimized microwave extraction, characterization and antioxidant capacity of biological polysaccharides from *Eucommia ulmoides* Oliver leaf[J]. *Scientific Report*, 2018, 8(1): 6561.
- [29] 王文卿. 杜仲果胶的分离纯化及结构分析[D]. 长春: 东北师范大学, 2021. [WANG W Q. Isolation, purification and structure analysis of pectin from *Eucommia ulmoides*[D]. Changchun: Northeast Normal University, 2021.]

- Northeast Normal University, 2021.]
- [30] 卞春. 黑木耳抗凝血多糖分离与结构表征及对血栓形成抑制机制[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2020. [BIAN C. Extraction and structural characterization of auricularia auricula anticoagul antpolysaccharide and its inhibition mechanism on thrombosis[D]. Haerbin: Harbin Institute of Technology, 2020.]
- [31] 冯艳风. 大枣多糖体外抗凝血活性研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2013. [FENG Y F. Study on the anticoagulant activity in vitro of juiube polysaccharide[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2013.]
- [32] LIU M P, LU W, KU K, et al. Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharides from *Eucommia ulmoides* leaf[J]. Pakistan Journal of Pharmaceutical Science, 2020, 33(2): 581–588.
- [33] 郎茜, 龚蕾, 叶婧, 等. 杜仲叶多糖对糖尿病大鼠的降血糖作用[J]. 现代食品科技, 2020, 36(10): 27–32. [LANG Q, GONG L, YE Q, et al. Hypoglycemic effect of the polysaccharide from *Eucommia ulmoides* leaves in diabetic rats[J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(10): 27–32.]
- [34] 宋苗苗. 榴莲皮多糖结构表征及抗凝血活性研究[D]. 开封: 河南大学, 2019. [SONG M M. Structural characterizationand anticoagulantactivity of polysaccharide from durio zibethinus murr peel[D]. Kaifeng: Henan University, 2019.]
- [35] MARTINICHEN-HERRERO J C, CARBONERO E R, SASAKI G L, et al. Anticoagulant and antithrombotic activities of a chemically sulfated galactoglucomannan obtained from the lichen *Cladonia ibitipocae*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2005, 35(1-2): 97–102.