

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201706021

引文格式: 韦晓洁, 银慧慧, 孟菲, 等. 超临界 CO₂ 流体萃取苦丁茶多糖的工艺优化 [J]. 广西植物, 2018, 38(5): 590-595
WEI XJ, YIN HH, MENG F, et al. Supercritical CO₂ fluid extraction process optimization for polysaccharides from *Ilex kudingcha* [J].
Guihaia, 2018, 38(5): 590-595

超临界 CO₂ 流体萃取苦丁茶多糖的工艺优化

韦晓洁^{1,2*}, 银慧慧^{1,2}, 孟菲^{1,2}, 赵武^{1,2}, 刘伟^{1,2},
姜源明^{1,2}, 覃振华^{1,2}, 孙建华^{1,2}, 陈海兰³

(1. 广西壮族自治区兽医研究所, 南宁 530001; 2. 广西兽医生物技术重点实验室,
南宁 530001; 3. 广西大学 动物科学技术学院, 南宁 530001)

摘要: 为了探讨超临界 CO₂ 萃取广西苦丁茶中多糖的工艺条件, 该研究采用超临界 CO₂ 流体萃取技术分离苦丁茶多糖, 利用苯酚-硫酸法对苦丁茶多糖含量进行测定, 并考察不同萃取温度 (35、40、45、50、55、60 °C)、萃取压力 (20、25、30、35、40、45、50 MPa)、萃取时间 (30、60、90、120、150 min)、夹带剂 (甲醇、95% 甲醇、50% 甲醇、无水乙醇、95% 乙醇、50% 乙醇) 以及夹带剂 (95% 乙醇) 用量 (2.0、2.5、3、3.5、4.0、4.5、5.0 mL · min⁻¹) 对多糖得率的影响, 通过设计正交实验方案, 对超临界 CO₂ 萃取广西苦丁茶多糖的提取工艺进行优化。结果表明: 通过单因素和正交实验考察了苦丁茶多糖提取的主要影响因素, 得到的最佳萃取工艺条件为萃取温度 50 °C, 萃取压力 40 MPa, 夹带剂流量 3.5 mL · min⁻¹, 萃取时间 150 min; 采用苯酚-硫酸法对苦丁茶多糖含量进行测定。在最优萃取条件下得到的苦丁茶多糖的提取率为 7.05%。由此可知, 采用超临界 CO₂ 流体萃取, 具有提取温度低、萃取率高、萃取周期短、低耗以及污染小等优点, 适用于苦丁茶多糖的提取。

关键词: 超临界 CO₂, 苦丁茶, 多糖, 单因素, 正交实验

中图分类号: Q946.889 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2018)05-0590-06

Supercritical CO₂ fluid extraction process optimization for polysaccharides from *Ilex kudingcha*

WEI Xiaojie^{1,2*}, YIN Huihui^{1,2}, MENG Fei^{1,2}, ZHAO Wu^{1,2}, LIU Wei^{1,2},
JIANG Yuanming^{1,2}, QIN Zhenhua^{1,2}, SUN Jianhua^{1,2}, CHEN Hailan³

(1. *Guangxi Veterinary Research Institute*, Nanning 530001, China; 2. *Guangxi Key Laboratory of Animal Epidemic Etiology and Diagnostic*,
Nanning 530000, China; 3. *Institute of Animal Science and Technology of Guangxi University*, Nanning 530001, China)

Abstract: In order to discuss the process conditions for extracting polysaccharides from *Ilex kudingcha* by supercritical CO₂ fluid, the polysaccharides from *I. kudingcha* were extracted and analyzed by supercritical CO₂ fluid extraction. Phenol-sulfuric acid method was applied for the determination of polysaccharides. Effects of different extraction temperatures

收稿日期: 2017-09-21

基金项目: 中国博士后科学基金 (2017M613271XB); 广西畜禽疫苗新技术重点实验室开放基金 (15-140-31-B-2) [Supported by the Postdoctoral Science Foundation of China (2017M613271XB); Open Foundation of Guangxi Key Laboratory of Animal Vaccines and New Technology (15-140-31-B-2)]。

作者简介: 韦晓洁 (1985-), 女, 广西河池人, 博士, 助理研究员, 主要从事天然药物开发与应用研究, (E-mail) 116190888@qq.com。

* 通信作者

(35, 40, 45, 50, 55, 60 °C), extraction pressures (20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 MPa), extraction time (30, 60, 90, 120, 150 min), cosolvents (methanol, 95% methanol, 50% methanol, ethanol, 95% ethanol, 50% ethanol) and cosolvent flow rates (95% ethanol) (2.0, 2.5, 3, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 mL · min⁻¹) on the polysaccharides extraction rate were investigated and the process conditions for extracting polysaccharides from *I. kudingcha* by supercritical CO₂ fluid were optimized through orthogonal experiments. Single factor and orthogonal experiments were used to investigate the factors on the yield of polysaccharides. The optimal operation conditions included extraction temperature 50 °C, extraction pressure 40 MPa, extraction time 150 min, cosolvent flow rate 3.5 mL · min⁻¹. The concentration of polysaccharides was determined by phenol-sulfuric acid method and the extraction rate was 7.05% under the optimal extraction conditions. The results showed that supercritical CO₂ fluid extraction technology was favorable for extracting polysaccharides from *I. kudingcha* with the advantages of low extraction temperature, high extraction rate, short extraction period, the environment-friendly and energy-saving.

Key words: supercritical CO₂ fluid, *Ilex kudingcha*, polysaccharides, single factor, orthogonal experiments

苦丁茶(*Ilex kudingcha*), 属于冬青科冬青属苦丁茶种常绿乔木, 主要分布在我国两广地区和福建等地(Li et al, 2013)。其含有茶多酚、黄酮、多糖、生物碱以及多种微量元素等药效成分(车彦云等, 2017)。茶多糖是一种复合多糖, 作为一种天然活性物质已被证实具有防治心血管疾病、抗氧化、降血脂、抗病毒以及降血糖等保健及药用功效(Zhu et al, 2014)。随着对苦丁茶有效成分的研究, 苦丁茶多糖得到了越来越多研究者的重视(Xu et al, 2015)。目前, 提取多糖的传统方法有热水浸提(谢旻皓等, 2015)、酸提法(许春平等, 2014)、醇提取法(Zha et al, 2014)、水浴回流法(孙小梅等, 2014)以及超声波提取法(Li et al, 2015)等。其中: 酸提法的提取时间和温度控制较严格, 提取条件不易掌控; 热水浸提、水浴回流等提取法容易导致多糖物质产生氧化、分解等反应, 极大地影响多糖类物质的生物活性。这些方法都存在溶剂消耗大、环境污染、操作繁琐、提取率低等缺点。超临界 CO₂ 流体萃取技术(Sharif et al, 2014; de Melo et al, 2014)是一种新型的绿色提取技术, 广泛应用于食品、化工、生物、中药等研究中(Sahena et al, 2009)。该技术能够防止多糖物质被氧化, 使其生物活性得到最大限度保留, 并且操作简便, 在萃取过程中无试剂残留、无污染以及低耗等。目前尚未见有超临界 CO₂ 萃取苦丁茶多糖的相关报道, 因此使用超临界 CO₂ 萃取工艺改革传统的苦丁茶多糖提取工艺具有重要意义。

本研究对超临界 CO₂ 萃取广西苦丁茶中多糖的工艺条件进行了分析, 采用苯酚-硫酸法对苦丁茶多糖含量进行测定, 考察了萃取温度、萃取压力、萃取时间、夹带剂以及夹带剂浓度对多糖得率的影响, 通过设计正交实验方案, 对其提取工艺进行了优化, 旨在为苦丁茶的质量标准制定、应用以及药物开发提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 仪器与材料

仪器: 泰尔超临界 CO₂ 萃取系统 Thar-SFE-5000; Milli-Q 超纯水仪(Millipore 公司); F160 型粉碎机(北京中兴伟业); SQP 型(精度 0.01 mg)电子天平(德国 Sartorius 公司); CAP225D 型(精度 0.1 mg)电子天平(德国 Sartorius 公司); 气体 CO₂ (99.99%, 购于广西柳州富斯特工业气体有限责任公司)。材料: 苦丁茶(购于广西太华医药有限公司, 产地为广西崇左)。

1.2 方法

1.2.1 单因素实验设计(Orosz et al, 2016) 根据实验条件以及影响超临界 CO₂ 萃取的各因素的重要性, 选取萃取温度、萃取压力、萃取时间、夹带剂、萃取夹带剂用量 5 个因素进行单因素实验, 考察苦丁茶多糖的萃取得率。实验萃取温度分别选择 35、40、45、50、55、60 °C; 萃取压力分别为 20、25、30、35、40、45、50 MPa; 萃取时间分别为 30、

60、90、120、150 min 以及夹带剂分别选择甲醇、95%甲醇、50%甲醇、无水乙醇、95%乙醇、50%乙醇;夹带剂(95%乙醇)用量选择分别为 2.0、2.5、3、3.5、4.0、4.5、5.0 mL · min⁻¹。

1.2.2 正交实验设计 根据单因素实验的结果,以苦丁茶多糖得率为实验的考察指标。实验从中选择合适的萃取温度、萃取压力、萃取时间以及夹带剂用量进行四因素三水平的正交实验(Zhao et al, 2013)。因素水平表见表 1。

表 1 正交实验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平 Level	因素 Factors			
	A 萃取温度 Extraction temperature (°C)	B 萃取压力 Extraction pressure (MPa)	C 萃取时间 Extraction time (min)	D 夹带剂流量 Cosolvent flow rate (mL · min ⁻¹)
1	45	35	60	3.0
2	50	40	120	3.5
3	55	45	150	4.0

1.2.3 苦丁茶多糖测定 采用苯酚-硫酸法(黄敏桃等, 2014)对苦丁茶多糖进行测定:精密称取无水葡萄糖纯品 12.45 mg,超纯水定容于 50 mL 容量瓶中作为标准溶液,分别吸取 0、0.1、0.2、0.5、0.8、1.0、1.2、1.5、1.8 mL,置 10 mL 棕色容量瓶中,随后再分别加入 1.0 mL 的 6% 苯酚溶液,轻摇混匀后再加入 7.0 mL 硫酸,混匀后于室温下放置 30 min,以超纯水定溶,混匀,于 482 nm 波长下测定吸光度。

以横坐标为葡萄糖含量(mg · mL⁻¹),纵坐标为吸光度值做曲线,得到标准曲线回归方程为 $A = 0.0499C - 0.0015$ ($n = 7$), $r = 0.9991$ 。由标准曲线方程计算萃取得到的苦丁茶样品中多糖的质量浓度 C ,并计算萃取率(李加兴等, 2013)。

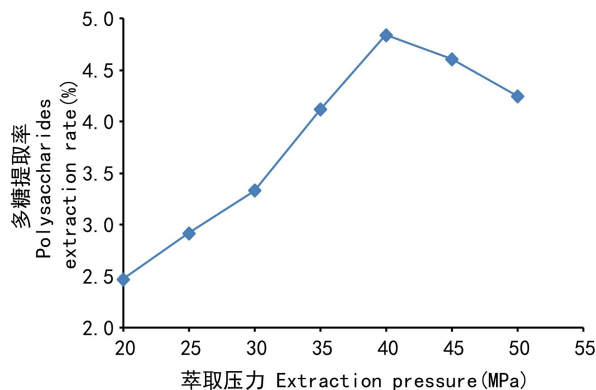
苦丁茶多糖萃取率(%) = $C \times V / m \times 100$ 。

式中, C 为苦丁茶多糖的质量浓度, m 为苦丁茶的质量(g), V 为经超临界萃取所得总苦丁茶多糖样品溶液的体积(mL)。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 萃取压力对萃取率的影响 采用 95%乙醇作为夹带剂,在萃取实验温度为 40 °C、夹带剂流量为 2.0 mg · mL⁻¹、萃取时间为 60 min 的条件下,分别测定不同萃取压力下对苦丁茶多糖萃取率的影响(图 1)。由图 1 可知,苦丁茶多糖的萃取率随着萃取压力的增高而升高,当压力超过 40 MPa 时,苦丁茶多糖的萃取率变化不大,甚至有下降的趋势。当增大萃取压力时,使得萃取过程中超临界 CO₂ 的密度增加,溶质和溶剂之间的传质效率得到了提高,从而增大了苦丁茶多糖的溶解度,提高了萃取率。当萃取压力升高到一定程度时,目标萃取物的萃取率并无明显变化,并且,压力过高使得萃取成本增高,同时高压不安全因素也增多。根据方差分析,萃取率在低于或高于 40 MPa 时具有显著差异($P < 0.05$)。因此,选取萃取压力为 35、40、45 MPa 进行正交实验。



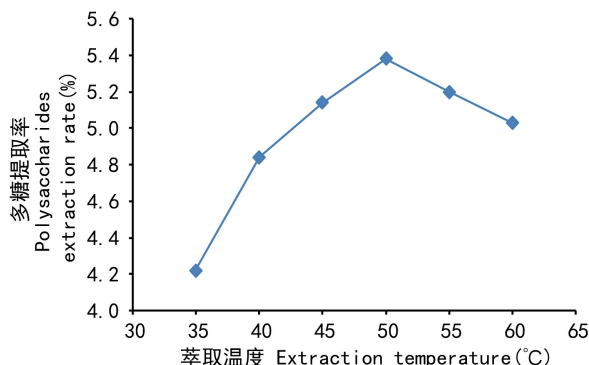
注:萃取温度 40 °C;夹带剂(95%乙醇)流量 2.0 mL · min⁻¹;萃取时间 60 min。

Note: Extraction temperature 40 °C; Cosolvent flow rate (95% ethanol) 2.0 mL · min⁻¹; Extraction time 60 min.

图 1 萃取压力对苦丁茶多糖提取率的影响
Fig. 1 Effects of extraction pressure on polysaccharide extraction rate

2.1.2 萃取温度对萃取率的影响 在萃取压力为 40 MPa,提取时间为 60 min,夹带剂(95%乙醇)流量为 2.0 mL · min⁻¹的条件下,考察不同萃取温度

(35、40、45、50、55、60 ℃) 对苦丁茶多糖萃取率的影响(图 2)。图 2 结果显示,苦丁茶多糖的萃取率随温度增高而升高,当温度高于 50 ℃ 时,过高的温度使得 CO₂ 的密度降低溶解能力也随之下降,从而使得苦丁茶多糖的溶解度发生下降,同时过高的温度会导致苦丁茶多糖的不稳定性增加,使得其提取含量受到一定影响。根据此单因素实验,选择正交实验的萃取温度为 45、50、55 ℃。

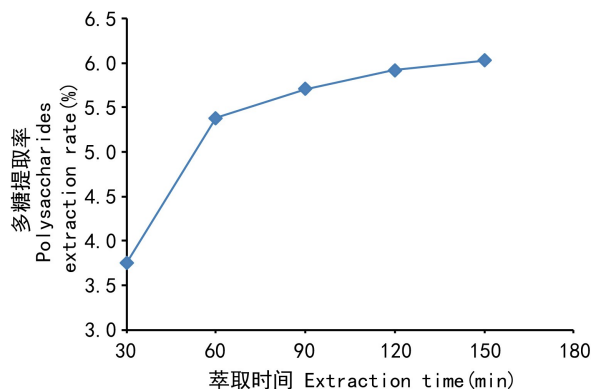


注: 萃取压力 40 MPa; 夹带剂(95%乙醇)流量 2.0 mL · min⁻¹; 萃取时间 60 min。
Note: Extraction pressure 40 MPa; Cosolvent flow rate (95% ethanol) 2.0 mL · min⁻¹; Extraction time 60 min.

图 2 萃取温度对苦丁茶多糖提取率的影响
Fig. 2 Effects of extraction temperature on polysaccharide extraction rate

2.1.3 萃取时间的影响 图 3 结果显示,随着萃取时间的增加,苦丁茶多糖的萃取率不断增高,在萃取时间为 120 min 后,萃取率增加缓慢。由于萃取时间越长,CO₂ 流体能更充分地接触苦丁茶物料,萃取越完全,并提高了萃取率。但当萃取达到一定时间后,萃取率无明显变化,此外萃取时间过长也可能导致多糖产生不稳定性而影响提取率,过长时间的萃取还会带来过高的萃取成本。因此,在本研究中,根据此单因素实验,选择 60、120、150 min 萃取时间进行正交实验分析。

2.1.4 夹带剂的影响 由于糖类化合物的羟基较多、分子量较大且极性较大,所以很难用低极性溶剂进行萃取,因此为了提高提取率可在萃取过程中加入极性较高、选择性好、安全的夹带剂对多糖进行提取。本研究分别选择甲醇、95%乙醇、50%



注: 萃取压力 40 MPa; 夹带剂(95%乙醇)流量 2.0 mL · min⁻¹; 萃取温度 40 ℃。
Note: Extraction pressure 40 MPa; Cosolvent flow rate (95% ethanol) 2.0 mL · min⁻¹; Extraction temperature 40 ℃.

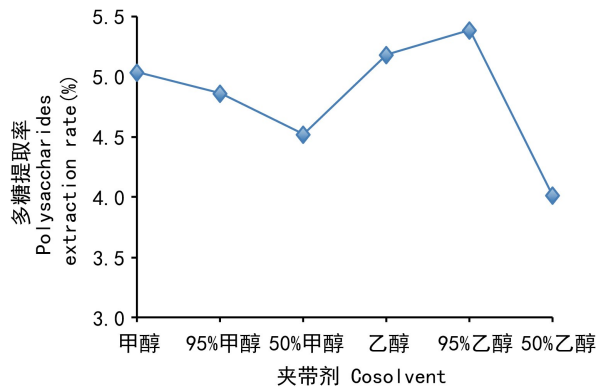
图 3 萃取时间对苦丁茶多糖提取率的影响
Fig. 3 Effects of extraction time on polysaccharides extraction rate

甲醇、无水乙醇、95%乙醇、50%乙醇作为夹带剂,考察夹带剂在萃取过程中对多糖提取率的影响,结果如图 4 所示。流量为 2.0 mL · min⁻¹ 时,95%乙醇作为萃取夹带剂具有较高提取率,因此,选择 95%乙醇作为苦丁茶多糖萃取的夹带剂。

2.1.5 夹带剂流量的影响 用萃取压力 40 MPa、萃取温度 50 ℃、提取时间 90 min,分别设置夹带剂流量在 2.0、2.5、3、3.5、4、4.5、5.0 mL · min⁻¹ 时进行实验,考察夹带剂流量对萃取苦丁茶多糖萃取率的影响(图 5)。方差分析表明,苦丁茶多糖得率与 3.0~4.0 mL · min⁻¹ 的夹带剂流量差异显著 ($P < 0.05$)。因此,根据此单因素实验,选择 3.0、3.5、4.0 mL · g⁻¹ 的夹带剂流量进行正交实验分析。

2.2 正交实验结果与分析

根据 2.1 的单因素试验结果,选定萃取温度、萃取压力、萃取时间、夹带剂流量进行四因素三水平的正交试验,结果见表 2。由表 2 可知,影响苦丁茶多糖萃取得率最显著的因素是萃取温度,其次为萃取压力、萃取时间、夹带剂流量,各因素不同水平影响次序为 A₂>A₃>A₁, B₂>B₃>B₁, C₃>C₂>C₁, D₂>D₃>D₁, A₂B₂C₃D₂ 为极差分析得到的最优萃取条件组合,即萃取温度 50 ℃、萃取压力 40 MPa,夹带剂流量 3.5 mL · min⁻¹、萃取 120 min。在

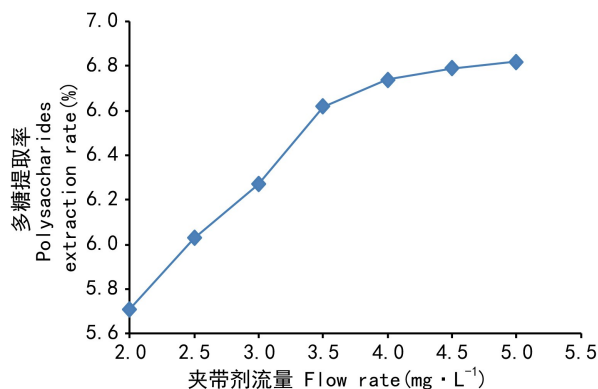


注: 萃取压力 40 MPa; 夹带剂流量 $2.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 萃取温度 $40 \text{ }^\circ\text{C}$; 萃取时间 60 min。

Note: Extraction pressure 40 MPa; Cosolvent flow rate $2.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; Extraction temperature $40 \text{ }^\circ\text{C}$; Extraction time 60 min.

图 4 夹带剂对苦丁茶多糖提取率的影响

Fig. 4 Effects of cosolvent on polysaccharides extraction rate



注: 萃取压力 40 MPa; 萃取时间 90 min; 萃取温度 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

Note: Extraction pressure 40 MPa; Extraction time 90 min; Extraction temperature $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

图 5 夹带剂流量对苦丁茶多糖提取率的影响

Fig. 5 Effects of cosolvent flow rate on polysaccharides extraction rate

最佳工艺条件下对苦丁茶进行 3 次萃取平行试验, 平均萃取得率为 7.05%。

3 讨论与结论

萃取压力 (Wen et al, 2015) 对于目标萃取物的萃取具有重要影响, 萃取压力是影响苦丁茶多糖超临界 CO_2 萃取过程中溶解度的一个重要参数。

表 2 正交实验设计结果

Tbale 2 Result and analysis of orthogonal test

实验号 Test number	A	B	C	D	萃取率 Extraction rate (%)
1	1	1	1	1	5.36
2	1	2	2	2	6.06
3	1	3	3	3	6.63
4	2	1	2	3	5.68
5	2	2	3	1	7.03
6	2	3	1	2	6.78
7	3	1	3	2	6.53
8	3	2	1	3	6.39
9	3	3	2	1	5.86
k_1	5.48	5.82	6.33	6.45	
k_2	6.72	6.55	6.42	7.01	
k_3	6.41	6.38	6.94	6.86	
R	0.93	0.73	0.61	0.56	

萃取温度对于苦丁茶多糖提取率也具有一定的影响 (Dent et al, 2013)。在超临界萃取过程中夹带剂起到助溶作用 (Daporto et al, 2014), 能够更有效地将目标物提取出来。本研究通过单因素实验得到的结果, 确定了萃取温度、萃取压力、萃取时间以及夹带剂用量四个主要影响因素进行四因素三水平的正交实验, 探索出了苦丁茶多糖超临界 CO_2 流体萃取的最佳提取工艺, 建立了一种超临界 CO_2 流体萃取法从苦丁茶中提取多糖的方法。相较于传统的提取方法, 超临界 CO_2 流体萃取能够在低温下萃取苦丁茶多糖并能够最大限度保留多糖的生物活性; 在整个萃取过程中唯一使用的有机试剂为夹带剂 (95% 乙醇), 能够与 CO_2 流体混溶提高了多糖的在 CO_2 流体中的溶解度, 并能够在萃取结束后对夹带剂进行回收, 无有机试剂残留、无污染以; 此外, 超临界 CO_2 流体萃取苦丁茶多糖操作简便、低耗、生产周期短。

本研究建立的苦丁茶多糖超临界 CO_2 流体萃取法工艺条件稳定可行, 具有较好重现性, 苦丁茶多糖的萃取得率达 7.05%, 优于施思等 (2010) 和于淑池等 (2015) 的报道, 与传统的热热水浸提相比萃取得率提高了将近两倍, 可为苦丁茶多糖的有

效提取以及苦丁茶的药用价值以及保健作用的深入开发提供新的参考依据。

综上所述,超临界 CO₂ 流体萃取具有提取温度低、萃取率高、萃取周期短、低耗以及污染小等优点,适用于苦丁茶多糖的提取。

参考文献:

- CHE YY, ZHANG JY, ZHANG YQ, et al, 2017. Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Ilex kudingcha* C. J. Tseng [J]. *Centr S Pharm*, 15(1): 75-80. [车彦云, 张加余, 张雅琼, 等, 2017. 苦丁茶冬青化学成分和药理作用研究进展 [J]. *中南药学*, 15(1): 75-80.]
- DAPORTO C, NATOLINO A, DECORTI D, 2014. Extraction of proanthocyanidins from grape marc by supercritical fluid extraction using CO₂ as solvent and ethanol-water mixture as co-solvent [J]. *The J Supercrit Fluid*, 87(7): 59-64.
- DE MELO MMR, SILVESTRE AJD, SILVA CM, 2014. Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: applications, trends and future perspectives of a convincing green technology [J]. *J Supercrit Fluid*, 92(3): 115-176.
- DENT M, DRAGOVIC-UZELAC V, PENIC M, et al, 2013. The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in Dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts [J]. *Food Technol Biotechnol*, 51(1): 84.
- HUANG MT, WU YJ, CAI J, et al, 2014. Dynamic accumulation analysis of total polysaccharides content in different harvesting time of *Ilex Kudingcha* C. J. Tseng [J]. *Food Res Dev*, 35(22): 1-4. [黄敏桃, 吴尤娇, 蔡鹃, 等, 2014. 苦丁茶不同采收期多糖含量的动态累积分析 [J]. *食品研究与开发*, 35(22): 1-4.]
- LI L, XU LJ, MA GZ, et al, 2013. The large-leaved Kudingcha (*Ilex latifolia* Thunb and *Ilex kudingcha* C.J Tseng): a traditional Chinese tea with plentiful secondary metabolites and potential biological activities [J]. *J Nat Med*, 67(3): 425-437.
- LI JX, SUN JY, CHEN SP, et al, 2013. Optimiazation of supercritical CO₂ extraction processing of flavonoids in *Eucommia ulmoides* [J]. *Sci Technol Food Ind*, 34(7): 252-255. [李加兴, 孙金玉, 陈双平, 等, 2013. 超临界 CO₂ 萃取杜仲叶黄酮类化合物工艺优化 [J]. *食品工业科技*, 34(7): 252-255.]
- LI C, FU X, HUANG Q, et al, 2015. Ultrasonic extraction and structural identification of polysaccharides from *Prunella vulgaris* and its antioxidant and antiproliferative activities [J]. *Eur Food Res Technol*, 240(1): 49-60.
- OROSZ G, DOMBI E, ANDREASSEN CS, et al, 2016. Analyzing models of work addiction: Single factor and bi-factor models of the Bergen Work Addiction Scale [J]. *Int J Ment Health Ad*, 14(5): 662-671.
- SAHENA F, ZAIDUL ISM, JINAP S, et al, 2009. Application of supercritical CO₂ in lipid extraction—a review [J]. *J Food Eng*, 95(2): 240-253.
- SHARIF KM, RAHMAN MM, AZMIR J, et al, 2014. Experimental design of supercritical fluid extraction—a review [J]. *J Food Eng*, 124(1): 105-116.
- SUN XM, DAI J, CHEN SW, et al, 2014. Optimization of extraction conditions of *G. lucidum* fruiting bodies polysaccharides and comparison of molecular weight of polysaccharides [J]. *Food Fermm Ind*, 40(7): 212-217. [孙小梅, 戴军, 陈尚卫, 等, 2014. 灵芝子实体多糖提取方法优化及不同来源赤芝子实体的多糖分子质量比较 [J]. *食品与发酵工业*, 40(7): 212-217.]
- SHI S, CHEN LH, WU H, 2010. Studies on optimizing technique of tea-polysaccharide extraction in Kudingcha [J]. *J SW Minzu Univ (Nat Sci Ed)*, 36(6): 983-987. [施思, 陈炼红, 伍红, 2010. 苦丁茶多糖提取工艺条件的优化研究 [J]. *西南民族大学学报(自然科学版)*, 36(6): 983-987.]
- WEN HU, TING GUO, JIANG WJ, et al, 2015. Effects of ultrahigh pressure extraction on yield and antioxidant activity of chlorogenic acid and cynaroside extracted from flower buds of *Lonicera japonica* [J]. *Chin J Nat Med*, 13(6): 445-453.
- XU D, WANG Q, ZHANG W, et al, 2015. Inhibitory activities of caffeoylquinic acid derivatives from *Ilex kudingcha* C.J Tseng on α -glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *J Agric Food Chem*, 63(14): 3694-3703.
- XU CP, YANG CC, ZHENG JQ, et al, 2014. Review on extraction and biological activity of polysaccharides from plant leave [J]. *Food Res Dev*, 35(14): 111-114. [许春平, 杨琛琛, 郑坚强, 等, 2014. 植物叶多糖的提取和生物活性综述 [J]. *食品研究与开发*, 35(14): 111-114.]
- XIE MH, WANG QC, XU DL, et al, 2015. Comparative study of the effects on colonic microbiota fermentation *in vitro* of extracts from *Ilex kudingcha* C. J. Tseng and 3, 5-Dicaffeoylquinic acid [J]. *Food Sci*, 36(17): 124-129. [谢旻皓, 王晴川, 徐冬兰, 等, 2015. 苦丁茶冬青苦丁茶提取物与 3,5-双咖啡酰奎尼酸对肠道微生物体外发酵的影响 [J]. *食品科学*, 36(17): 124-129.]
- YU SC, WANG P, XU LL, et al, 2015. Extraction technology of Hainan Kuding tea polysaccharides and its protective effects on erythrocyte hemolysis [J]. *J Qiongzhou Univ*, 22(5): 50-55. [于淑池, 王珮, 许琳琅, 等, 2015. 海南苦丁茶多糖的提取及对红细胞溶血的保护作用研究 [J]. *琼州学院学报*, 22(5): 50-55.]
- ZHU K, LI G, SUN P, et al, 2014. *In vitro* and *in vivo* anticancer activities of Kuding tea (*Ilex kudingcha* C.J Tseng) against oral cancer [J]. *Exp Ther Med*, 7(3): 709-715.
- ZHAO X, WANG Q, QIAN Y, et al, 2013. *Ilex kudingcha* C.J Tseng (Kudingcha) prevents HCl/ethanolinduced gastric injury in Sprague Dawley rats [J]. *Mol Med Rep*, 7(5): 1613-1616.
- ZHA S, ZHAO Q, CHEN J, et al, 2014. Extraction, purification and antioxidant activities of the polysaccharides from maca (*Lepidium meyenii*) [J]. *Carbohydr Polym*, 111: 584-587.
- ZHAO S, ZHANG D, 2013. Supercritical fluid extraction and characterisation of *Moringa oleifera* leaves oil [J]. *Sep Purif Technol*, 118(5): 497-502.