

紫金蜜桑叶活性成分的提取工艺优化 及其抗氧化能力评价

黄雪娇¹, 吴元辉², 吴娟², 迟原龙¹, 何强¹, 任尧¹

(1. 四川大学轻工科学与工程学院, 四川成都 610065) (2. 泸州源辉农业有限公司, 四川泸州 646000)

摘要: 本文以紫金蜜桑叶为研究对象, 采用超声波辅助乙醇同时提取紫金蜜桑叶活性成分(多酚、黄酮和多糖), 并制备桑叶提取物。以3种活性成分含量为考察指标, 通过单因素试验考察乙醇浓度、料液比、提取温度和提取时间对活性成分提取效果的影响, 在此基础上进行正交试验以优化得到最佳提取工艺, 并对桑叶提取物的抗氧化能力进行探究。结果表明, 紫金蜜桑叶活性成分的最佳提取工艺条件为乙醇浓度60%、料液比1:35 g/mL、提取温度45℃、提取时间70 min。在此条件下, 紫金蜜桑叶活性成分的提取率高达20.49%, 其中, 多酚、黄酮和多糖的平均含量分别为12.13 mg/g、1.79 mg/g和58.74 mg/g。所得桑叶提取物对DPPH自由基、羟自由基以及超氧阴离子自由基的半数清除率(IC₅₀)分别为0.06 mg/mL、3.13 mg/mL和1.15 mg/mL。由此可见, 紫金蜜桑叶提取物具有较强的抗氧化能力。

关键词: 紫金蜜桑叶; 活性成分; 超声波辅助提取; 抗氧化能力

文章编号: 1673-9078(2021)06-193-200

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.6.1081

Optimizing the Extraction of Active Compounds from *Morus macroura* and the Evaluation of Their Antioxidant Capacities

HUANG Xue-jiao¹, WU Yuan-hui², WU Juan², CHI Yuan-long¹, HE Qiang¹, REN Yao¹

(1.College of Biomass Science and Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

(2.Luzhou Yuanhui Agricultural Co. Ltd., Luzhou 646000, China)

Abstract: A combination of ultrasound-assisted and ethanol extraction was used to simultaneously isolate several active compounds, including polyphenols, flavonoids, and polysaccharides, from *Morus macroura*. The relative content of each these three classes of active compound were then used as indicators to explore the effects of various factors, including ethanol concentration, raw material-to-solvent ratio and extraction temperature and duration, on the efficacy of compound extraction using single-factor experiments. Orthogonal tests based on the experimental results were conducted to optimize the extraction parameters. In addition, the antioxidant capacities of the extracts were also analyzed. The results of these assays reveal that the most favorable conditions for extracting active components from *Morus macroura* are as follows: an ethanol concentration of 60%, a raw material-to-solvent ratio of 1:35 g/mL, an extraction temperature at 45 °C, and an extraction duration of 70 min. Under these conditions, the active component extraction rate reaches up to 20.49%. In particular, the average polyphenol, flavonoid, and polysaccharide content increased to 12.13 mg/g, 1.79 mg/g, and 58.74 mg/g, respectively. The 50% inhibitory concentrations (IC₅₀) of the mulberry leaf extracts against DPPH, hydroxyl, and superoxide anion free radicals were also shown to increase to 0.06 mg/mL, 3.13 mg/mL, and 1.15 mg/mL, respectively, when using these extraction conditions. Thus, *Morus macroura* extracts can produce promising antioxidant effects when produced using optimized extraction conditions.

Key words: *Morus macroura*; active compounds; ultrasound-assisted extraction; antioxidant capacity

引文格式:

黄雪娇,吴元辉,吴娟,等.紫金蜜桑叶活性成分的提取工艺优化及其抗氧化能力评价[J].现代食品科技,2021,37(6):193-200

HUANG Xue-jiao, WU Yuan-hui, WU Juan, et al. Optimizing the extraction of active compounds from *Morus macroura* and the evaluation of their antioxidant capacities [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(6): 193-200

收稿日期: 2020-11-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(31701565); 川大-泸州市科技项目(2017CDLZ-N19); 烹饪科学重点实验室开放基金项目(2017LF3020); 川菜发展研究中心规划项目(CC17Z14)

作者简介: 黄雪娇(1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物活性物质; 通讯作者: 任尧(1987-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品生物活性物质

桑叶是桑科植物桑的叶子,是一种药食同源的原料,其药用价值在我国源远流长^[1]。桑叶中富含多种生物活性成分,如多酚、黄酮、多糖、 γ -氨基丁酸和生物碱等^[2],具有抗氧化^[3,4]、辅助降血糖^[5,6]和降血脂^[7]等功效。研究发现,桑叶中多酚、黄酮和多糖类物质具有良好的抗氧化作用。桑叶多酚和黄酮具有较强的DPPH自由基、羟自由基和超氧阴离子自由基清除能力,且与抗坏血酸较为接近^[8,9]。而桑叶多糖抗氧化活性相对较弱,但其对多酚和黄酮物质的抗氧化活性具有明显增强作用^[10],三者是桑叶中起到抗氧化作用的主要物质。我国桑叶资源丰富,在传统蚕桑业中,桑叶主要用来饲养家蚕或作为畜禽、鱼类的饲料,整体上用途单一,每年都有大量桑叶被废弃。开发桑叶新用途,对提高经济和社会效益、拓宽桑叶资源利用方式都具有重要意义。桑叶提取物作为一种天然功能性原料,将桑叶通过水提或醇提后干燥而成,保留了桑叶中大量的生物活性成分,可添加到普通食品或保健食品中,具有良好的应用前景^[11]。

紫金蜜桑,又名台湾长果桑,其果实较长、成熟期早,是一种通过大果桑和野生长果桑授粉后改良而成的优良品种,叶片较大。目前,针对紫金蜜桑的研究相对较少,且大多集中在桑树的种植要求和栽培技术以及桑果的形态特征、营养成分和产品加工上,而对于紫金蜜桑叶的相关研究未见报道^[12]。

桑叶提取物的制备采用超声波辅助乙醇提取法,可高效提取桑叶中的抗氧化活性成分。但在提取过程中,由于料液比、乙醇浓度、提取温度和提取时间的差异,桑叶提取物中活性成分含量及其抗氧化能力都会受到影响^[13]。本文通过单因素和正交试验研究紫金蜜桑叶活性成分的最佳提取工艺条件,进一步对桑叶提取物的抗氧化能力进行分析,为紫金蜜桑叶在食品领域的开发和应用提供试验和理论基础。

1 材料与方法

1.1 原料

桑叶产于四川泸州,品种为紫金蜜桑,采摘于2020年7月,选取嫩度均匀、无污染、无病虫害的桑叶供试。

1.2 主要试剂

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、Folin-Ciocalteu试剂, Sigma公司;没食子酸、芦丁,阿拉丁公司;无水乙醇、碳酸钠、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、葡萄糖、苯酚、

硫酸、硫酸亚铁、过氧化氢、水杨酸、邻苯三酚、Tris-HCl缓冲液、盐酸等试剂均为分析纯。

1.3 主要仪器

KQ-300VDE 三频数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;UV-1800PC紫外-可见分光光度计,上海美普达仪器有限公司;RE-52旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;SCIENTZ-10N真空冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.4 方法

1.4.1 桑叶预处理

桑叶洗净沥水后去柄切条,烘干粉碎后过40目筛,得到干燥桑叶粉,备用。

1.4.2 提取方法

准确称取桑叶粉1.0g,在一定乙醇浓度、料液比、提取温度和提取时间下进行超声波辅助乙醇提取。

1.4.3 桑叶提取物中活性成分含量测定

多酚测定参考T/AHFIA 005-2018《植物提取物及其制品中总多酚含量的测定 分光光度法》^[14];黄酮测定参考DB34/T 2743-2016《槐米及其制品中总黄酮含量的测定 分光光度法》^[15];多糖测定参考SN/T 4260-2015《出口植物源食品中粗多糖的测定 苯酚-硫酸法》^[16]。

1.4.4 单因素试验

1.4.4.1 乙醇浓度对桑叶提取效果的影响

准确称取桑叶粉1.0g,料液比为1:30g/mL,提取时间为60min,提取温度为40℃,乙醇浓度分别为40%、50%、60%、70%、80%和90%,在此条件下提取,测定活性成分的含量。

1.4.4.2 料液比对桑叶提取效果的影响

准确称取桑叶粉1.0g,乙醇浓度为60%,提取时间为60min,提取温度为40℃,料液比分别为1:20、1:25、1:30、1:35、1:40和1:45,在此条件下提取,测定活性成分的含量。

1.4.4.3 提取温度对桑叶提取效果的影响

准确称取桑叶粉1g,料液比为1:30,乙醇浓度为60%,提取时间为60min,提取温度分别为30℃、35℃、40℃、45℃、50℃和55℃,在此条件下提取,测定活性成分的含量。

1.4.4.4 提取时间对桑叶提取效果的影响

准确称取桑叶粉1.0g,料液比为1:30,乙醇浓度为60%,提取温度为40℃,提取时间分别为30min、40min、50min、60min、70min和80min,在此条件下提取,测定活性成分的含量^[17]。

表 1 正交试验因素水平

Table 1 The design for orthogonal test of four factors at three different levels

| 水平 | 因素 | | | |
|----|----------|--------------|-----------|------------|
| | A 乙醇浓度/% | B 料液比/(g/mL) | C 提取温度/°C | D 提取时间/min |
| 1 | 50 | 1:25 | 35 | 50 |
| 2 | 60 | 1:30 | 40 | 60 |
| 3 | 70 | 1:35 | 45 | 70 |

1.4.5 正交试验

根据单因素试验结果,在乙醇浓度、料液比、提取温度和提取时间 4 因素下分别设置 3 水平,以多酚、黄酮和多糖含量为考察指标进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,确定最佳提取工艺条件。因素水平设计见表 1。

1.4.6 提取工艺验证试验

为验证正交试验所得条件的合理性和正确性,进行 3 次验证试验。

1.4.7 桑叶提取物冻干粉的制备

将提取得到的桑叶提取液经旋蒸后预冻,随即放入真空冷冻干燥机中干燥 48 h,取出粉碎过 60 目筛,得到桑叶提取物冻干粉。存于 -20 °C 冰箱中,备用。

1.4.8 抗氧化实验

1.4.8.1 DPPH 自由基清除实验

测定参考文献(韦献雅等,2014)所述方法^[18]。

1.4.8.2 羟自由基清除实验

测定参考文献(李冠楠等,2015)所述方法^[19]。

1.4.8.3 超氧阴离子自由基清除实验

测定参考文献(任尧,2011)所述方法^[20]。

1.5 数据统计分析

每组试验均设置 3 个重复。采用 Origin 8.0、SPSS v23 软件进行数据分析。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验

2.1.1 乙醇浓度对桑叶提取效果的影响

不同乙醇浓度对桑叶中多酚、黄酮和多糖的提取结果见图 1。

由图 1 可知,随着乙醇浓度的增大,活性成分含量呈先上升后下降的趋势。当乙醇浓度为 60% 时,多酚和多糖含量达到最大值,分别为 12.03 mg/g 和 55.43 mg/g;乙醇浓度为 70% 时,黄酮含量呈最大值,为 1.60 mg/g。当乙醇浓度从 60% 到 70%,多酚得率降低 8.41%,黄酮得率提高 2.56%,多糖得率降低 13.42%,综合考虑浓缩干燥的成本,选择乙醇浓度为 60%。

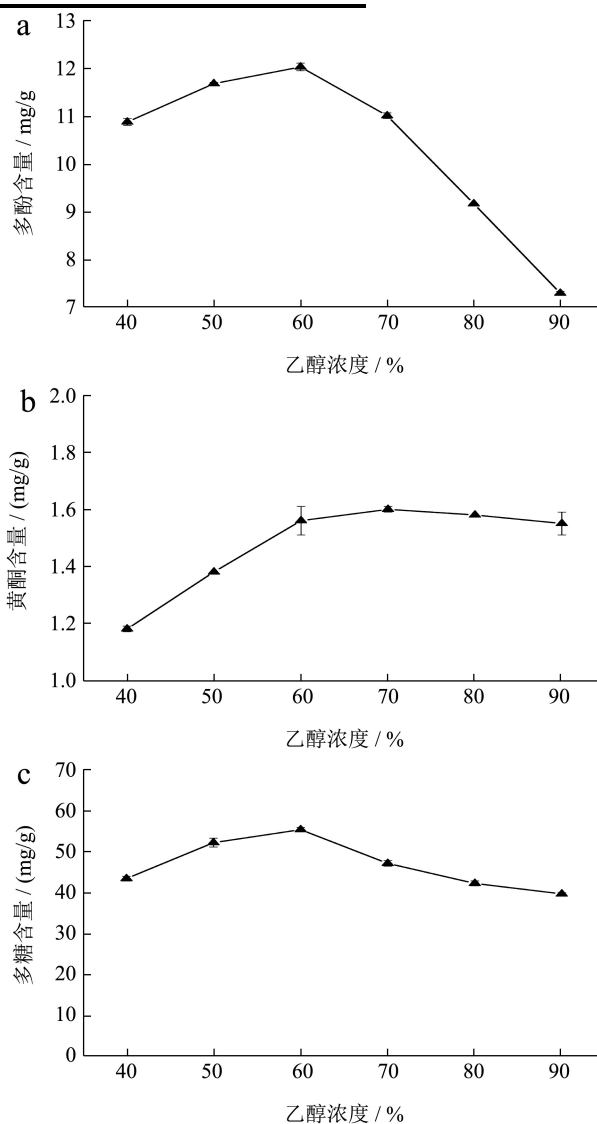


图 1 乙醇浓度对桑叶提取效果的影响

Fig.1 Effect of ethanol concentration on the extraction of mulberry leaf

2.1.2 料液比对桑叶提取效果的影响

不同料液比对桑叶中多酚、黄酮和多糖的提取结果见图 2。

由图 2 可知,随着溶剂体积的增加,活性成分含量先上升后下降或基本趋于不变。当料液比为 1:30 g/mL 时,多酚、黄酮和多糖含量都达到最大值,分别为 10.96 mg/g、1.63 mg/g 和 49.02 mg/g,故选择料液比为 1:30 g/mL。

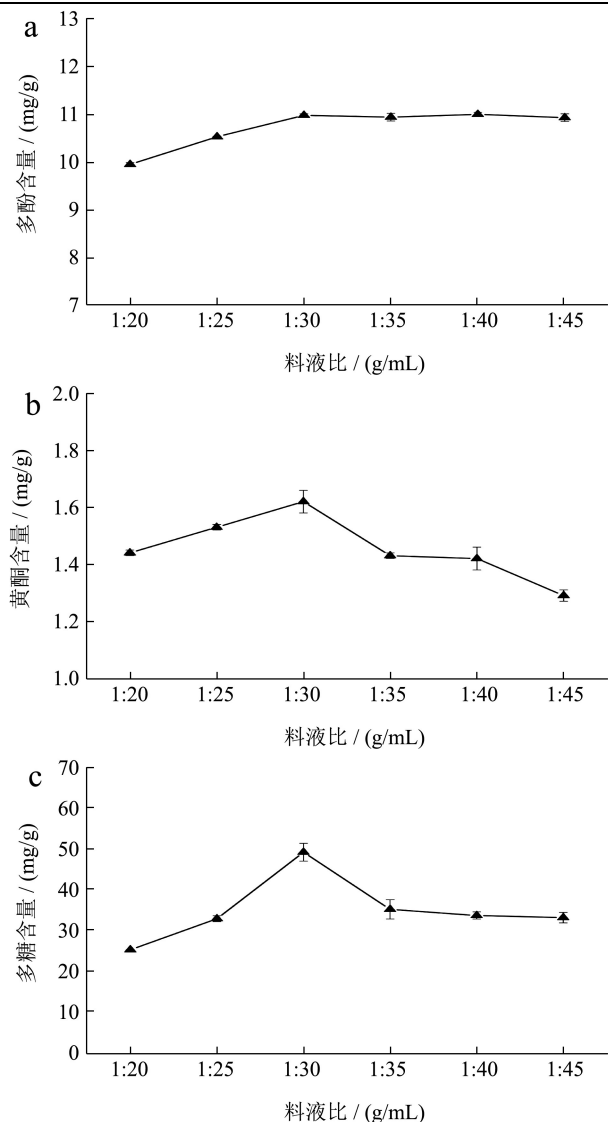


图2 料液比对桑叶提取效果的影响

Fig.2 Effect of solid-liquid ratio on the extraction of mulberry leaf

2.1.3 提取温度对桑叶提取效果的影响

不同提取温度对桑叶中多酚、黄酮和多糖的提取结果见图3。

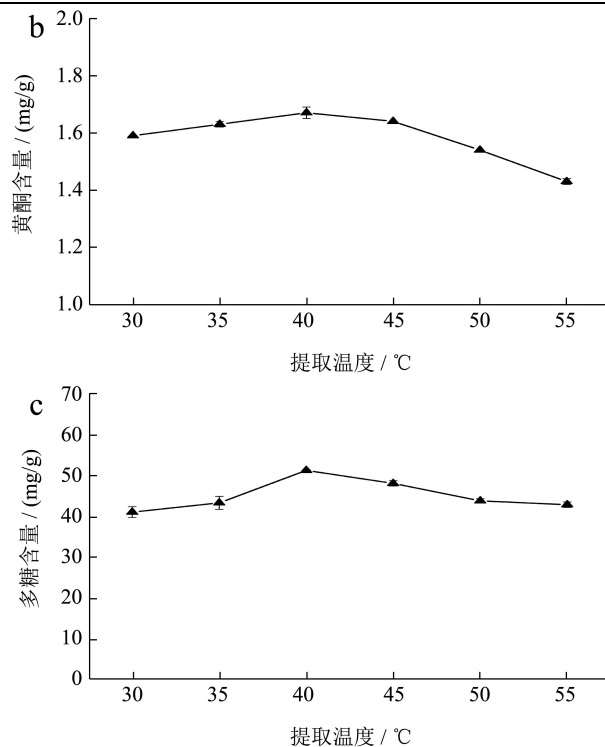
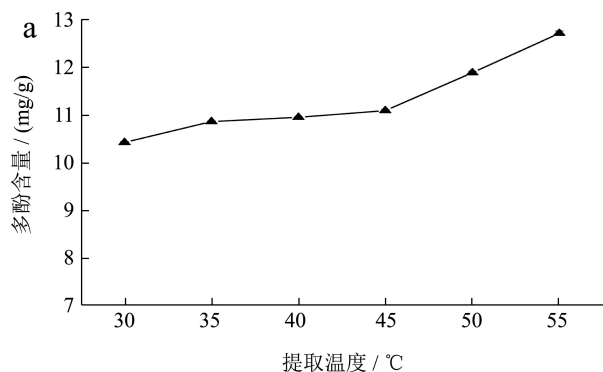


图3 提取温度对桑叶提取效果的影响

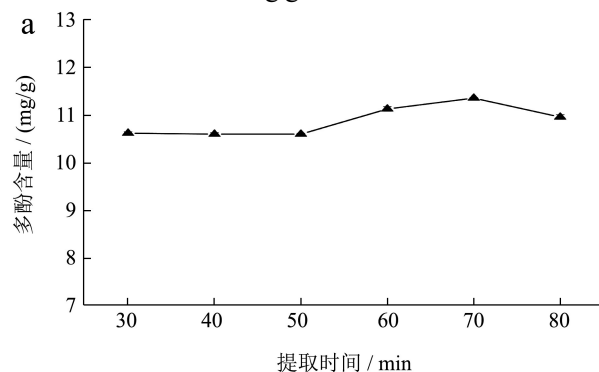
Fig.3 Effect of extraction temperature on the extraction of mulberry leaf

由图3可知,随着提取温度的提高,多酚含量持续上升;黄酮和多糖含量先上升后下降,在40°C时达到最大值,分别为1.67和51.18 mg/g。考虑到温度上升会破坏黄酮和多糖,故选择提取温度为40°C。

2.1.4 提取时间对桑叶提取效果的影响

不同提取时间对桑叶中多酚、黄酮和多糖的提取结果见图4。

由图4可知,多酚含量在提取时间为70 min时达到最大值,为11.36 mg/g;黄酮含量在30~60 min基本保持不变,当时间大于60 min时,黄酮含量逐渐下降;随着时间的增加,多糖含量先升高后降低,在60 min时达最大值,为60.75 mg/g。故选择提取时间为60 min。



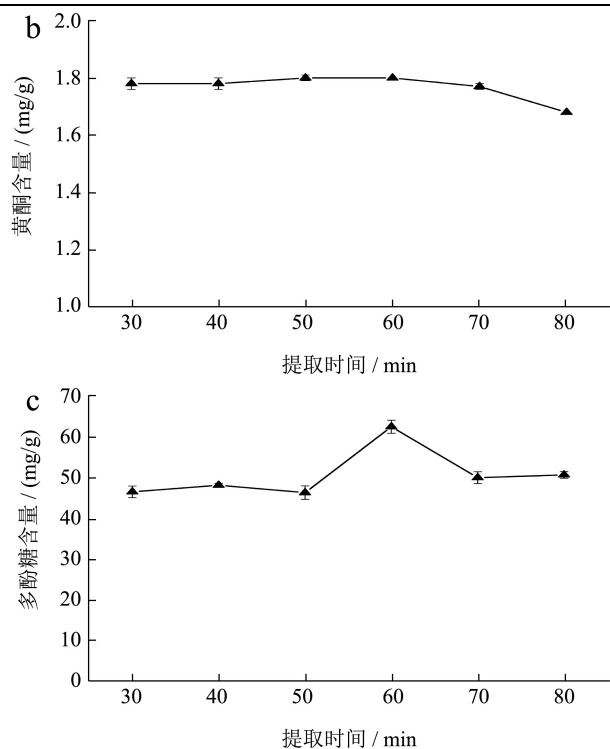


图4 提取时间对桑叶提取效果的影响

Fig.4 Effect of extraction time on the extraction of mulberry leaf

2.2 正交试验

根据单因素试验结果,按照表1进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,试验安排及结果见表4。按照多指标无空列重复试验的方差分析方法对结果进行分析,方差分析结果见表5。

由表4、5可知,影响桑叶提取物中多酚含量的主次因素为 $B>C>A>D$,料液比对多酚含量有极显著影

响,乙醇浓度和提取温度有显著影响,提取多酚的最佳工艺条件为 $A_1B_3C_3D_3$;影响黄酮含量的主次因素为 $D>C>A>B$,提取时间对黄酮含量有极显著影响,乙醇浓度和提取温度有显著影响,提取黄酮的最佳工艺条件为 $A_1B_3C_3D_3$;影响多糖含量的主次因素为 $A>C>B>D$,乙醇浓度、料液比和提取温度对多糖含量有极显著影响,提取时间有显著影响,提取多糖的最佳工艺条件为 $A_2B_2C_3D_3$ 。综上,从正交优化试验可以得出紫金蜜桑叶超声波辅助乙醇提取的最佳工艺条件为 $A_2B_3C_3D_3$,即乙醇浓度60%、料液比1:35 g/mL、提取温度45℃、提取时间70 min。

2.3 提取工艺验证试验

按最佳提取工艺条件进行3次平行试验。结果显示桑叶提取物平均得率为20.49%,多酚、黄酮和多糖的平均含量分别为12.13 mg/g、1.79 mg/g和58.74 mg/g,3组试验数据相差较小,证明正交试验优选得出的工艺条件可靠且稳定。

王瑞娴^[21]研究15种桑叶的3种活性成分发现,多酚含量介于0.36 mg/g~4.26 mg/g之间,黄酮为14.39 mg/g~32.20 mg/g,多糖为10.40 mg/g~101.90 mg/g。紫金蜜桑叶在本试验优化的最佳工艺下提取的多酚含量远高于15种桑叶的最大值,多糖含量比15种桑叶平均多糖含量高28.39%。而黄酮含量较低,这可能与桑叶的生长季节有关,于小凤^[22]研究发现温度对桑叶黄酮的积累有较大影响,桑叶黄酮在5月份含量较高,6月份随着气温升高开始下降,8月份含量最低;而本试验供试桑叶采自7月,此时桑叶黄酮含量下降至较低值。

表4 桑叶提取工艺正交试验结果

Table 4 Results of orthogonal test on extraction process of mulberry leaf

| 编号 | 试验因素 | | | | 多酚含量 | | | 黄酮含量 | | | 多糖含量 | | |
|----|------|---|---|---|-------|-------|-------|------|------|------|-------|-------|-------|
| | A | B | C | D | I | II | III | I | II | III | I | II | III |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 9.54 | 8.29 | 10.49 | 1.52 | 1.41 | 1.53 | 50.39 | 49.43 | 47.16 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 10.05 | 10.58 | 11.23 | 1.46 | 1.53 | 1.69 | 51.04 | 52.01 | 52.21 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 11.51 | 11.83 | 11.99 | 1.58 | 1.65 | 1.69 | 51.87 | 53.64 | 57.94 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 10.16 | 9.26 | 10.42 | 1.49 | 1.48 | 1.50 | 55.51 | 55.39 | 54.51 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 10.89 | 10.48 | 10.77 | 1.54 | 1.30 | 1.54 | 57.38 | 57.73 | 56.86 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 10.33 | 10.68 | 10.29 | 1.48 | 1.41 | 1.39 | 50.99 | 51.59 | 51.48 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 9.63 | 9.63 | 9.86 | 1.49 | 1.48 | 1.52 | 50.60 | 50.55 | 50.38 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 10.16 | 9.83 | 10.27 | 1.49 | 1.40 | 1.42 | 57.64 | 61.07 | 54.06 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 9.20 | 9.70 | 10.55 | 1.33 | 1.27 | 1.38 | 42.48 | 46.57 | 45.20 |

表5 正交试验结果方差分析

Table 5 Variance analysis of orthogonal test

| 项目 | 变异来源 | 偏差平方和 | 自由度 | 方差 | F值 | 临界值 F_{α} | 显著性 |
|----|------|--------|-----|--------|-------|------------------|-----|
| 多酚 | A | 2.57 | 2 | 1.29 | 4.40 | 3.55 | * |
| | B | 4.80 | 2 | 2.40 | 8.19 | 6.01 | ** |
| | C | 2.82 | 2 | 1.41 | 4.83 | 3.55 | * |
| | D | 1.70 | 2 | 0.85 | 2.91 | 3.55 | - |
| | 误差 e | 5.27 | 2 | 0.29 | | | |
| 黄酮 | A | 0.056 | 2 | 0.028 | 5.07 | 3.55 | * |
| | B | 0.0057 | 2 | 0.0028 | 0.51 | 3.55 | - |
| | C | 0.064 | 2 | 0.032 | 5.84 | 3.55 | * |
| | D | 0.10 | 2 | 0.052 | 9.34 | 6.01 | ** |
| | 误差 e | 0.099 | 2 | 0.0055 | | | |
| 多糖 | A | 88.60 | 2 | 44.30 | 13.23 | 6.01 | ** |
| | B | 56.86 | 2 | 28.43 | 8.49 | 6.01 | ** |
| | C | 77.66 | 2 | 38.83 | 11.60 | 6.01 | ** |
| | D | 31.17 | 2 | 15.59 | 4.65 | 3.55 | * |
| | 误差 e | 60.28 | 2 | 3.35 | | | |

注: **表示极显著差异 ($p < 0.01$); *表示显著性差异 ($p < 0.05$); -表示无显著性差异。

2.4 抗氧化能力的测定

2.4.1 桑叶提取物对 DPPH 自由基清除能力的测定

桑叶提取物对 DPPH 自由基清除能力见图 5。

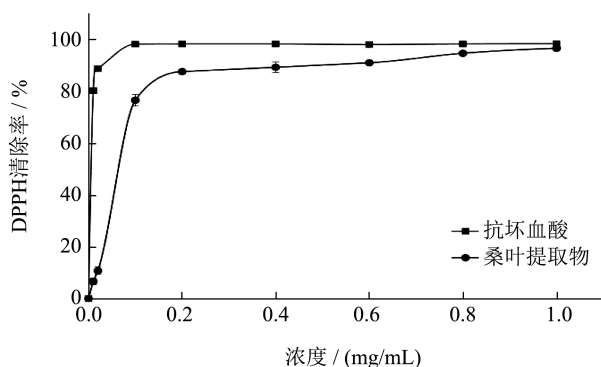


图5 桑叶提取物对 DPPH 自由基的清除能力

Fig.5 The DPPH scavenging ability of mulberry leaf extract

由图 5 可知, 桑叶提取物浓度在 0~0.2 mg/mL 范围内, 其 DPPH 自由基清除能力随浓度的增加而上升, 具有明显的量效关系。当浓度为 0.6 mg/mL 时, 清除率达到 93.38%, 同浓度抗坏血酸的 DPPH 自由基清除率为 97.88%, 两者相当相近。结果显示, 桑叶提取物对 DPPH 自由基清除率的 IC_{50} 为 0.06 mg/mL, 具有很强的 DPPH 自由基清除能力。

2.4.2 桑叶提取物对羟自由基清除能力的测定

桑叶提取物对羟自由基清除能力见图 6。

由图 6 可知, 桑叶提取物浓度在 0~0.1 mg/mL 范

围内, 其羟自由基清除能力随浓度的增加而上升, 具有明显的量效关系。结果显示, 桑叶提取物对羟自由基的 IC_{50} 为 3.13 mg/mL, 在较高浓度时具有一定羟自由基清除能力, 但弱于抗坏血酸。

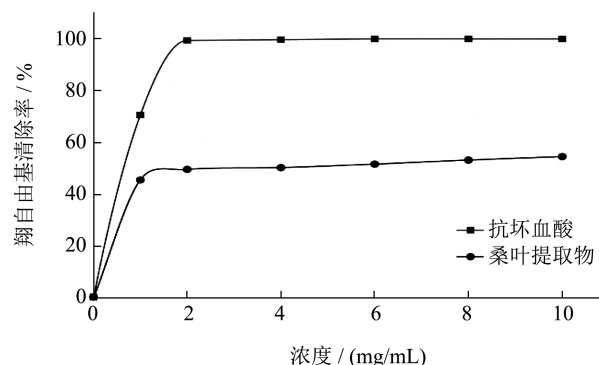


图6 桑叶提取物对羟自由基的清除能力

Fig.6 The ·OH scavenging ability of mulberry leaf extract

2.4.3 桑叶提取物对超氧阴离子清除能力的测定

桑叶提取物对超氧阴离子清除能力见图 7。

由图 7 可知, 桑叶提取物浓度在 0~1.0 mg/mL 范围内, 其超氧阴离子清除能力随浓度的增加而上升, 具有明显的量效关系。当浓度为 1.0 mg/mL 时, 桑叶提取物对超氧阴离子清除率达到 55.56%, 此后其清除能力上升速度减缓。结果显示, 桑叶提取物对超氧阴离子自由基的 IC_{50} 为 1.15 mg/mL, 具有较高的超氧阴离子清除能力。

紫金蜜桑叶提取物对 DPPH 自由基、羟自由基以

及超氧阴离子自由基的半数清除率(IC_{50})分别为 0.06 mg/mL、3.13 mg/mL 和 1.15 mg/mL, 王吉成^[23]等人发现, 桑叶乙醇提取物对 DPPH 自由基清除率的 IC_{50} 为 4.69 mg/mL, 而其对羟自由基的清除能力较低, 在实验浓度为 20 mg/mL 时, 清除能力只有达到 20%左右, 远低于本试验结果。紫金蜜桑叶提取物对 DPPH 自由基和超氧阴离子自由基的清除能力较强, 清除率接近抗坏血酸, 其中多酚、黄酮和多糖对 DPPH 自由基和超氧阴离子自由基都有一定的清除作用; 而桑叶提取物对羟自由基的清除能力相对较弱。杨世园^[24]等人研究发现, 多酚和黄酮类物质具有改变氧化态或烯醇式与酮式官能团互变异构的化学特性, 是桑叶提取物中起到清除羟自由基作用的主要物质, 而多糖类物质清除羟自由基的能力远比多酚和黄酮类物质弱^[25]。这可能是造成本研究中多糖含量较多、多酚和黄酮含量较少的桑叶提取物对羟自由基的清除能力较弱的重要因素。

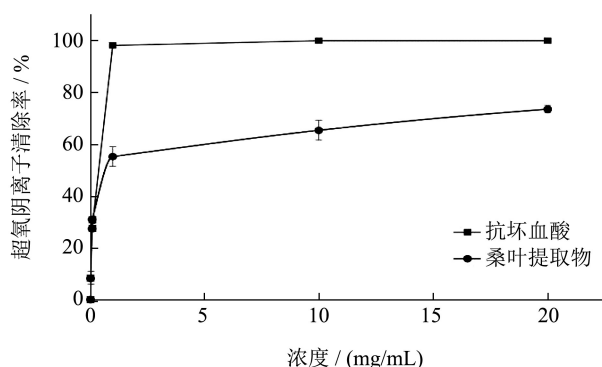


图7 桑叶提取物对超氧阴离子的清除能力

Fig.7 The superoxide anion free radical scavenging ability of mulberry leaf extract

3 结论

本文以紫金蜜桑叶为研究对象, 采用超声波辅助乙醇提取法提取桑叶抗氧化活性成分, 通过单因素和正交试验优化得到最佳提取工艺条件为乙醇浓度 60%、料液比 1:35 g/mL、提取温度 45 °C、提取时间 70 min, 此条件下, 紫金蜜桑叶活性成分提取率高达 20.49%。在最佳提取工艺条件上制得的桑叶提取物对 DPPH 自由基、羟自由基以及超氧阴离子自由基的半数清除率 (IC_{50}) 分别为 0.06 mg/mL、3.13 mg/mL 和 1.15 mg/mL。超声波辅助乙醇提取制得的紫金蜜桑叶提取物含有丰富的多酚、黄酮和多糖类物质, 具有较强的抗氧化能力, 在功能性食品领域有着非常好的应用前景。

参考文献

- [1] 范浩, 庄愉. 桑叶药食同源开发应用研究进展[J]. 现代农业科技, 2017, 14: 78-79, 83
FAN Hao, ZHUANG Yu. Research progress on development and application of mulberry leaf medicine food homology [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2017, 14: 78-79, 83
- [2] Seung-Ok Shin, Hyun-Ju Seo, Hyunyoung Park, et al. Effects of mulberry leaf extract on blood glucose and serum lipid profiles in patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic review [J]. European Journal of Integrative Medicine, 2016, 8(5): 602-608
- [3] Schafranski, Kathlyn P, Matheus P E, et al. Evaluation of bioactive compounds and antioxidant activity of extracts of black mulberry leaves using experimental design [J]. Quimica Nova, 2019, 42(7): 736-44
- [4] SUN Chong-zhen, TANG Xin, REN Yao, et al. Novel antioxidant peptides purified from mulberry leaf protein hydrolysates with hemolysis inhibition ability and cellular antioxidant activity [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(27): 7650-7659
- [5] Wu Qi-guo, Hu Ye-qing. Systematic evaluation of the mechanisms of mulberry leaf acting on diabetes based on network pharmacology and molecular docking [J]. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, 13 September, 2021, 24(5): 668-682
- [6] NIU Sheng-Li, TONG Zhi-Fan, ZHANG Yu, et al. Novel protein tyrosine phosphatase 1B inhibitor-geranylated flavonoid from mulberry leaves ameliorates insulin resistance [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(31): 8223-8231
- [7] Lee Yoonjin, Lee Eunyoung, Lee Mak-Soon, et al. Hypolipidemic effect of mulberry leaf extract in rats fed a high-cholesterol diet [J]. Current Developments in Nutrition, 2019, 3(6): 14-19
- [8] Shahid Iqbal, Umer Younas, Sirajuddin, et al. Proximate composition and antioxidant potential of leaves from three varieties of mulberry (*Morus* sp.): a comparative study [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13(6): 6651-6664
- [9] 张月, 唐钦悦, 代娟, 等. 桑叶黄酮提取物制备及其体外抗氧化作用研究[J]. 中国食品添加剂, 2020, 31(9): 47-52
ZHANG Yue, TANG Qin-yue, DAI Juan, et al. Study on the preparation of flavonoids extracted from mulberry leaves and its anti-oxidative activity *in vitro* [J]. China Food Additives, 2020, 31(9): 47-52

- [10] Dong-Yang Zhang, Yi Wan, Jian-Yi Xu, et al. Ultrasound extraction of polysaccharides from mulberry leaves and their effect on enhancing antioxidant activity [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 137: 473-479
- [11] YU Yan-fang, LI Hong-yan, ZHANG Bing, et al. Nutritional and functional components of mulberry leaves from different varieties: Evaluation of their potential as food materials [J]. International Journal of Food Properties, 2018, 21(1): 1495-1507
- [12] 吴松海,郑家祯,张树河,等.台湾长果桑的扦插繁殖及高产栽培技术[J].福建农业科技,2019,5:33-35
WU Song-hai, ZHENG Jia-zhen, ZHANG Shu-he, et al. Techniques of cutting propagation and high yield cultivation of Taiwan *Morus macroura* [J]. Fujian Academy of Agricultural Sciences, 2019, 5: 33-35
- [13] Özge Algan Cavuldak, Nilüfer Vural, Mehmet Abdulkadir Akay, et al. Optimization of ultrasound-assisted water extraction conditions for the extraction of phenolic compounds from black mulberry leaves [J]. International Journal of Food Properties, 2019, 42(5): e13132.1-e13132.15
- [14] T/AHFIA 005-2018,植物提取物及其制品中总多酚含量的测定 分光光度法[S]
T/AHFIA 005-2018, Determination of Total Polyphenol in Plant Extracts and Its Products Spectrophotometric Method [S].
- [15] DB34/T 2743-2016,槐米及其制品中总黄酮含量的测定 分光光度法[S]
DB34/T 2743-2016, Determination of Flavones in Sophora Japonica and Its Products Spectrophotometric Method [S]
- [16] SN/T 4260-2015,出口植物源食品中粗多糖的测定 苯酚-硫酸法[S]
SN/T 4260-2015, Determination of Crude Polysaccharides in Plant Source Foods for Export Phehol-sulfuric Acid Colorimetry [S]
- [17] Tchabo, Ma, Kwaw, et al. Impact of extraction parameters and their optimization on the nutraceuticals and antioxidant properties of aqueous extract mulberry leaf [J]. International Journal of Food Properties, 2018, 21(1): 717-732
- [18] 韦献雅,殷丽琴,钟成,等.DPPH 法评价抗氧化活性研究进展[J].食品科学,2014,35(9):317-322
WEI Xian-ya, YIN Li-qin, ZHONG Cheng, et al. Advances in the DPPH radical scavenging assay for antioxidant activity evaluation [J]. Food Science, 2014, 35(9): 317-322
- [19] 李冠楠,夏雪娟,赵欢欢等.桑叶提取物泡腾片制备工艺及其抗氧化活性研究[J].西南大学学报(自然科学版),2015, 37(4):132-137
LI Guan-nan, XIA Xue-juan, ZHAO Huan-huan, et al. On preparation of original mulberry essence effervescent tablets [J]. Journal of Southwest Agricultural University, 2015, 37(4): 132-137
- [20] 任尧.鸭蛋清蛋白肽的酶法制备及其抗氧化活性研究[D].广州:华南理工大学,2011
REN Yao. Study on enzymatic preparation and antioxidant activities of duck egg white peptide [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2011
- [21] 王瑞娴,楚渠,嵯苏,等.不同桑品种的桑叶多酚和黄酮含量的测定[J].陕西农业科学,2019,65(1):78-80
WANG Rui-xian, CHU Qu, GAO Su, et al. Determination of polyphenol and flavone in leaves of different mulberry varieties [J]. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences, 2019, 65(1): 78-80
- [22] 于小凤.经霜对桑叶黄酮类成分积累影响的分子机制研究[D].镇江:江苏大学,2018
YU Xiao-feng. Effect of frost and the underlying molecular mechanism on the accumulation of flavonoids in mulberry leaves [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2018
- [23] 王吉成,刘轩,唐劲天,等.桑叶发酵前后总黄酮、总酚酸含量变化及抗氧化活性研究[J].中国民族民间医药,2014,23(23): 15-18
WANG Ji-cheng, LIU Xuan, TANG Jin-tian, et al. Antioxidant activities and determination of total flavonoids and total phenolics in the fermentation and non-fermentation products in mulberry leaf [J]. Chinese Journal of Ethnic and Folk Medicine, 2014, 23(23): 15-18
- [24] 杨世园,汪志平,缪云根,等.桑叶粗提物清除羟自由基能力的比较[J].蚕业科学,2005,3:351-353
YANG Shi-yuan, WANG Zhi-ping, MIAO Yun-gen, et al. Study on hydroxyl radical scavenging activity of mulberry leaf extracts [J]. Acta Sericologica Sinica, 2005, 3: 351-353
- [25] 魏文杰,李浩浩.Box-Behnken 响应面法优化桑叶总多糖提取工艺[J].农业科学研究,2018,39(4):5-11,17
WEI Wen-jie, LI Hao-hao. Optimization of extraction technique for polysaccharide from mulberry leaf by using Box-Behnken design and response surface methodology [J]. Journal of Agricultural Sciences, 2018, 39(4): 5-11, 17