

文章编号:1001-6880(2016)12-1989-07

旱莲草多糖的提取及其抗氧化活性研究

过七根,陈昱,李汉全,张炳火*,查代明

九江学院药学与生命科学学院,九江 332000

摘要:采用水/甲醇混合溶剂浸泡提取旱莲草的多糖组分,利用硅胶柱层析和中压液相色谱,对多糖进行分离纯化,纯化后的多糖组分经薄层层析分析发现,这些多糖主要组成单糖均为葡萄糖和果糖。旱莲草多糖在总还原能力、总抗氧化能力和FRAP抗氧化能力测试中均显示较好的活性,能够有效清除羟自由基和DPPH自由基,在1.5 mg/mL的浓度下,对羟自由基的清除效率为(12.33~56.81)%,粗多糖组分在1 mg/mL的浓度下对DPPH自由基的清除效率为(17.88~84.47)%,精分多糖组分在5 mg/mL的浓度下,对DPPH自由基的清除效率为(18.64~91.35)%;极性小的多糖抗氧化活性显著优于极性大的多糖,抗氧化活性最高可达后者的11倍之多;粗多糖组分的抗氧化活性一般优于纯化后的相应精多糖组分,这说明旱莲草的不同多糖分子之间可能存在协同抗氧化作用。

关键词:旱莲草;多糖;抗氧化活性;薄层层析

中图分类号:Q946.91

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.12.024

Extraction and Antioxidant Activity of Polysaccharides of *Eclipta alba*

GUO Qi-gen, CHEN Yu, LI Han-quan, ZHANG Bing-huo*, ZHA Dai-ming

College of Pharmacy and Life Sciences, Jiujiang University, Jiujiang 332000, China

Abstract: The polysaccharides of *Eclipta alba* were extracted by immersing in the mixture of water and methanol, and were then purified using silica gel column chromatography and medium-pressure liquid chromatography. The main monosaccharides of the polysaccharides were found to be glucose and fructose based on thin layer chromatography (TLC) analysis. The polysaccharides of *E. alba* showed good activities in the assays of total reducing power, total antioxidant power and FRAP antioxidant power. The polysaccharides can scavenge hydroxyl radical and DPPH radical effectively, with (12.33~56.81)% scavenging rates of the hydroxyl radical at the concentration of 1.5 mg/mL, and (17.88~84.47)% scavenging rates of the DPPH radical for the crude polysaccharides at the concentration of 1 mg/mL, and (18.64~91.35)% scavenging rates of the DPPH radical for the refined polysaccharides at the concentration of 5 mg/mL, respectively. Small polarity polysaccharides showed stronger antioxidant activities than large polarity polysaccharides with the antioxidant activities up to 11 times of the latter. The crude polysaccharides showed better antioxidant activities than relevant refined polysaccharides, which indicated that different polysaccharides of *E. alba* probably existed synergistic antioxidant effect.

Key words: *Eclipta alba*; polysaccharides; antioxidant activity; thin layer chromatography

旱莲草,为双子叶植物菊科鲤肠属鲤肠(*E. alba*)的俗称,又称墨旱莲,是一种重要的药用植物^[1],具有促使毛发生长^[2]、降低血脂、防止动脉粥样硬化^[3]、止血和治疗炎症^[4,5]、抗病毒^[6]和抗肿瘤^[7]等多种功能。目前对旱莲草化学成分研究多为一些小分子物质,如香豆草醚类、三萜皂苷类、甾体

类、噻吩类、生物碱和黄酮类等化合物^[6-9],而对旱莲草多糖的研究相对较少。

近年来,旱莲草多糖的研究逐渐引起了人们的兴趣。杨春静等^[10]研究了不同的酶对旱莲草多糖的提取效率,发现纤维素酶提取效率最高,在pH5.0、酶用量3%和50℃的条件下,酶解3 h效果最佳;许小华比较了旱莲草多糖的水提法、碱提法和酶提法,认为碱提法为最佳提取方法^[11,12];王彩云等^[13]采用水提醇沉法,并利用DEAE-52型纤维素柱对提取的多糖进行了分离纯化,得到一个均一多糖,其相对分子质量为8892 Da。于雷等^[14]开展了

收稿日期:2016-05-16 接受日期:2016-07-15

基金项目:国家自然科学基金(31660096);江西省自然科学基金(20122BAB204022);江西省教育厅青年科学基金(GJJ11238);九江学院重点校级课题(09KJ3)

*通讯作者 E-mail:binghuozh@126.com

旱莲草多糖脱色方法的研究发现,在 pH7.0、50 °C 的条件下,加入 20% (v/v) 的过氧化氢(浓度为 30%),旱莲草多糖溶液(10 mg/mL)脱色效果最佳。许小华等^[15]发现旱莲草多糖能够增强小鼠免疫功能。然而,关于旱莲草多糖的其它生理活性的研究很少开展。本文采用溶剂浸泡提取旱莲草化学成分,并利用正相硅胶柱层析、反相硅胶柱层析和反相中压液相色谱法,对提取物中的多糖组分进行分离纯化,并利用薄层层析(TLC)的方法初步分析旱莲草多糖的主要组成成分,测定其还原、抗氧化和清除自由基的能力,为旱莲草多糖的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料采集及预处理

本研究所用旱莲草为 2015 年 9 月采自江西省德安县,由九江学院药学与生命科学学院张炳火老师鉴定。采集后用清水将旱莲草清洗干净,并除去枯枝烂叶,切碎晒干,再将其碎粉,过 40 目筛置于 4 °C 冰箱备用。

1.2 旱莲草多糖的分离与纯化及初步鉴定

取旱莲草干燥粉末,加甲醇/水(v/v,1:1)的混合溶剂,室温浸泡振荡提取 24 h 后过滤,收集滤液,共提取三次,合并提取液,减压浓缩干燥,再用硅胶柱层析进行分离,依次采用氯仿/甲醇混合液(v/v,1:0→9:1→7:1→5:1→3:1→1:1→0:1)、甲醇/水混合液(1:0→9:1→7:1→5:1→3:1→1:1→0:1)洗脱,收集水溶性组分,减压浓缩干燥;再以少量去离子水重新溶解干燥样品,用反相硅胶(YMC,ODS-AQ,50 μm)柱对样品溶液进一步分离,洗脱溶剂为去离子水,对得到的各组分采用中压液相色谱进一步分离,洗脱溶剂为去离子水。

采用莫利许(Molisch)反应和斐林(Fehling)试验分别对多糖和还原糖进行定性鉴定。参考杜敏华等^[16]的方法,利用 TLC 的方法对多糖组成成分进行初步鉴定。分别称取各多糖组分 30 mg,加入 6 mL 盐酸(1 mol/L),于 100 °C 水浴中酸解 10 h,水解液用 Na₂CO₃ 中和静置,取上清在硅胶板 GF₂₅₄(青岛海洋化工厂分厂)上点样,同时用 10 mg/mL 的葡萄糖、果糖、鼠李糖、甘露糖、半乳糖、木糖和乳糖的标准糖溶液点样,样品干燥后用溶剂系统冰乙酸/氯仿/水(20/16/3,v/v/v)展层,结束后晾干,再喷雾苯胺-二苯胺-磷酸显色剂,并置于 80 °C 烘箱中烘烤 10 min,根据斑点颜色和位置确定糖的组成。

1.3 总还原力测定

参考 Gu 等^[17]方法,取样品水溶液 0.5 mL 于试管中,依次加入 1.25 mL 磷酸缓冲溶液(0.2 M, pH6.6)和 1.25 mL 的铁氰化钾溶液(1%),混匀,50 °C 水浴 20 min,快速冷却后,加入 1.25 mL 三氯乙酸溶液(TCA,10%),再依次加入 4.25 mL 蒸馏水、0.85 mL 三氯化铁溶液(0.1%,现配现用),充分混匀,室温静置 10 min,在 700 nm 波长下测吸光光度值,吸光度越大还原能力越强。根据维生素 C(Vc)标准曲线,计算与各样品总还原力相等的 Vc 浓度(μg/mL)。反相硅胶分离得到的 5 个多糖样品(1~5)浓度为 1 mg/mL,中压液相精分得到的 14 个多糖样品(1-1~5-3)浓度为 10 mg/mL。

1.4 总抗氧化能力的测定

参考 Pan^[18]的方法。配制硫酸、磷酸钠和钼酸铵的混合液,使三者终浓度分别为 0.6 mM、28 mM 和 4 mM,取混合液 4 mL,加入浓度为 3 mg/mL 的样品水溶液 0.4 mL,混匀并密封,95 °C 水浴 90 min,取出冷却后于 695 nm 波长下测吸光度,以蒸馏水代替样品溶液作为参比调零。根据 Vc 标准曲线,计算与各样品总抗氧化力相等的 Vc 浓度(μg/mL)。

1.5 羟自由基清除效果的测定

参考 Yang 等^[19]的方法,测样品对羟自由基清除效果。反应体系包括 0.5 mL 的 FeSO₄ 水溶液(2 mmol/L)、1.0 mL 水杨酸甲醇溶液(6 mmol/L)、3 mL 样品水溶液(1.5 mg/mL)和 0.5 mL 的 H₂O₂(质量分数 0.01%),混匀后于 37 °C 水浴 30 min,冷却后于 510 nm 波长下测定吸光度,吸光度越低则自由基清除能力越强,对照组以蒸馏水代替样品溶液。按下列公式计算羟基自由基清除率:

$$Y = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100\%$$

其中,A₀,对照组吸光度;A₁,样品试验组吸光度;A₂,试剂空白吸光度。

1.6 DPPH 自由基清除能力的测定

参考 Ammar 等^[20]方法测定样品清除 DPPH 自由基的能力。反应体系包括 1.0 mL 样品水溶液和 2.0 mL 的 DPPH 乙醇溶液(0.1 mmol/L,现配现用)混合均匀,室温(约 20 °C)避光反应 60 min 后于 517 nm 处测定吸光度,以乙醇作参比调零。对照组以蒸馏水代替样品溶液。反相硅胶分离得到的 5 个多糖样品(1~5)浓度为 1 mg/mL,中压液相分离得到的 14 个多糖样品(1-1~5-3)浓度为 5 mg/mL。采用下

列公式计算 DPPH 自由基清除率:

$$Y = \frac{OD_{517} - OD_{T517}}{OD_{517}}$$

其中, Y: 抑制率(%) ; OD₅₁₇: 对照组在 517 nm 波长下的吸光度; OD_{T517}: 样品溶液在 517 nm 波长下的吸光度。

1.7 FRAP 抗氧化能力的测定

参考 Jeong 等^[21] 的方法。在 3.0 mL 的 FRAP 溶液中加入 200 μL 样品水溶液, 混匀后 37 °C 水浴反应 10 min, 于 593 nm 处测定吸光值。以蒸馏水代替样品溶液, 执行相同操作获得的溶液作参比调零。FRAP 溶液配方: 乙酸钠缓冲液 (0.3 mol/L, pH3.6)、三吡啶三吖嗪溶液 (TPTZ 溶液, 10 mmol/L, 以 40 mmol/L 的盐酸溶液配制) 和三氯化铁溶液 (20 mmol/L), 三者按照 10:1:1 (体积比) 混合均匀即得。反相硅胶分离得到的 5 个多糖样品 (1~5) 浓度为 2 mg/mL, 中压液相分离得到的 14 个多糖样品 (1-1~5-3) 浓度为 6 mg/mL。

1.8 统计学处理

采用 Microsoft Office Excel 2007 对数据进行统计处理。确定 3 次重复实验的平均值 (mean value) 和标准偏差 (standard deviation, SD), 绘图数据取 3 次试验的平均值, 多糖组分的总还原力、总抗氧化力、羟自由基的清除率、DPPH 自由基清除和 FRAP 抗氧化力, 采用单因素方差分析, $P \leq 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

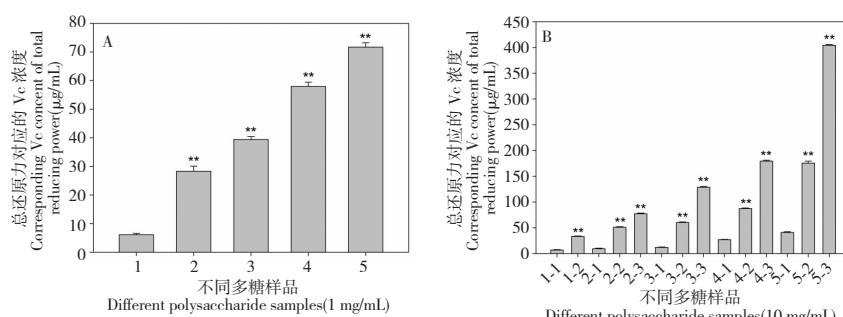


图 1 旱莲草多糖反相硅胶粗分组分(A)及中压液相精分组分(B)的总还原力

Fig. 1 The total reducing power of the crude fractions separated by reverse phase silica gel (A) and the refined fractions separated by middle-pressure liquid chromatography (B) from *E. alba* polysaccharides

注: ** $P < 0.01$, 表示相邻的多糖样品之间比较, 差异极显著

Note: ** $P < 0.01$ indicated extremely significant differences between the neighboring polysaccharides

2.3 总抗氧化能力

与总还原力的试验结果类似, 样品 1~5 在浓度

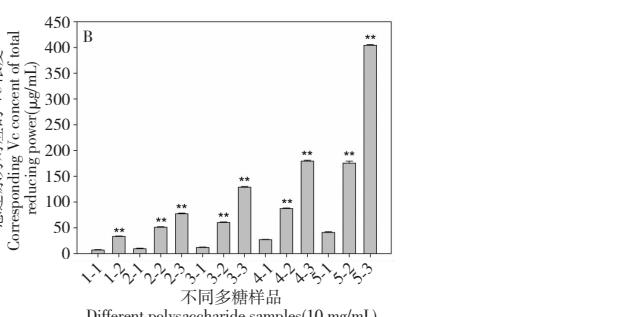
2.1 旱莲草多糖的分离和定性鉴定

经过反相硅胶柱层析得到 5 个无色粘稠组分, 按照洗脱顺序, 分别编号为 1、2、3、4 和 5, 这 5 个样品经过中压液相色谱分离, 共得到 14 个无色粘稠组分, 分别编号为 1-1、1-2、2-1、2-2、2-3、3-1、3-2、3-3、4-1、4-2、4-3、5-1、5-2 和 5-3。

这些样品在莫利许反应和斐林试验中, 均为典型的阳性特征, 说明这些样品均为多糖组分, 且具有还原性。TLC 检测结果显示, 这些多糖水解产物显色后, 主要斑点均为蓝色中略带黄色, 黄色位置稍微靠上, R_f 值与葡萄糖和果糖基本相同, 因此可能是葡萄糖和果糖的混合物, 将葡萄糖和果糖标准液点样在一处后展层显色, 与水解液的特征相同, 因此, 推测旱莲草多糖的主要组成单糖为葡萄糖和果糖。

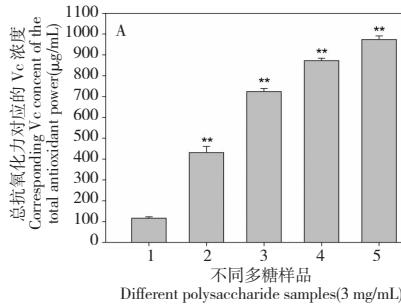
2.2 旱莲草多糖的总还原力

试验结果显示, 利用反相硅胶柱分离的 5 个组分的总还原力差异显著, 在浓度相同的情况下, 先洗脱的极性大的组分总还原力极显著低于后洗脱的极性小的组分 (图 1A; $P < 0.01$), 在 1 mg/mL 的浓度下, 样品 5 的总还原力相当于 $71.72 \pm 1.50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Vc 总还原力, 是样品 1 的 11.74 倍; 中压液相色谱进一步精分得到的 14 个样品也出现类似情况 (图 1B), 同一个样品洗脱后所得到的各个组分, 先洗脱的极性大的组分总还原力极显著低于后洗脱的极性小的组分 ($P < 0.01$); 而且, 经中压液相色谱分离后得到的各个组分的总还原力, 均低于分离前的相应样品。



相同的情况下, 极性小的组分总抗氧化力极显著高于极性大的组分 (图 2A; $P < 0.01$), 在 3 mg/mL 的

浓度下,样品 5 的总抗氧化力相当于 $973.64 \pm 17.56 \mu\text{g/mL}$ 的 Vc 的总抗氧化力,是样品 1 的 8.33 倍;与此类似,在中压液相色谱精分得到的样品,也存在先洗脱的大极性组分总抗氧化力极显著



低于后洗脱的小极性组分(图 2B; $P < 0.01$);而且经中压液相色谱分离后得到的各个组分的总抗氧化力,多数显著低于分离前的相应样品。

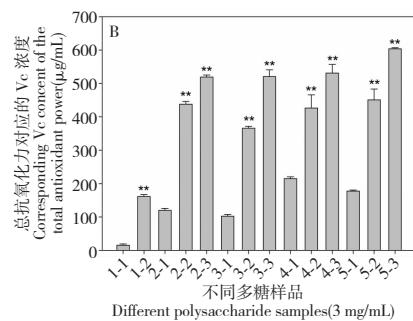


图 2 旱莲草多糖反相硅胶粗分组分(A)及中压液相精分组分(B)的总抗氧化力

Fig. 2 The total antioxidant power of the crude fractions separated by reverse phase silica gel (A) and the refined fractions separated by middle-pressure liquid chromatography (B) from *E. alba* polysaccharides

注: ** $P < 0.01$, 表示相邻的多糖样品之间比较, 差异极显著

Note: ** $P < 0.01$ indicated extremely significant differences between the neighboring polysaccharides

2.4 羟自由基清除效果

试验结果显示,各样品均具有一定的羟自由基清除力,且后洗脱的小极性样品的清除效率高于先洗脱的大极性样品(图 3),在 1.5 mg/mL 的浓度下,样品 5 的羟自由基清除率为($56.81 \pm 2.23\%$),是样品 1 的 4.02 倍;经过中压液相色谱分离后得到的各组分,其羟自由基清除率也是后洗脱

的小极极样品高于先洗脱的大极性样品,但部分精分得到的样品羟自由基清除率显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)高于分离前相应的样品,如样品 1-2、2-2、2-3、3-3 和 4-3,它们的羟自由基清除率分别是($40.17 \pm 2.82\%$)、($31.55 \pm 1.20\%$)、($44.33 \pm 3.55\%$)、($45.81 \pm 2.40\%$)和($49.58 \pm 2.31\%$),分别是分离前相应样品的 2.14、1.68、2.36、2.11 和 1.17 倍。

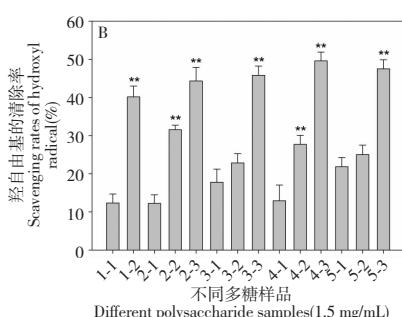
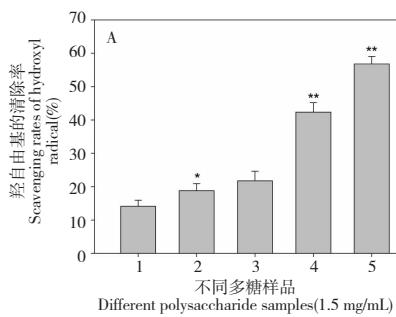


图 3 旱莲草多糖反相硅胶粗分组分(A)及中压液相精分组分(B)对羟自由基的清除率

Fig. 3 The hydroxyl radical scavenging rates of the crude fractions separated by reverse phase silica gel (A) and the refined fractions separated by middle-pressure liquid chromatography (B) from *E. alba* polysaccharides

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 表示相邻的多糖样品之间比较, 差异显著或极显著

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ indicated significant or extremely significant differences between the neighboring polysaccharides

2.5 DPPH 自由基清除能力

试验结果显示,先洗脱的大极性多糖组分对 DPPH 自由基的清除率小于后洗脱的小极性多糖组分(图 4);多糖组分 2~5 对 DPPH 自由基的清除效果较好,在 1 mg/mL 的浓度下,清除率为($64.11 \sim$

84.47%)(图 4A);经过中压液相色谱精分后所得的各多糖组分,只有 5-2 和 5-3 对 DPPH 自由基的清除率较高,在 5 mg/mL 的浓度下,清除效率分别为($89.92 \pm 1.00\%$)和($91.35 \pm 1.20\%$),其余多数组分即使在 5 mg/mL 的浓度下,也比分离前的对

应样品在 1 mg/mL 的浓度下,对 DPPH 自由基的清

除率低(图 4B)。

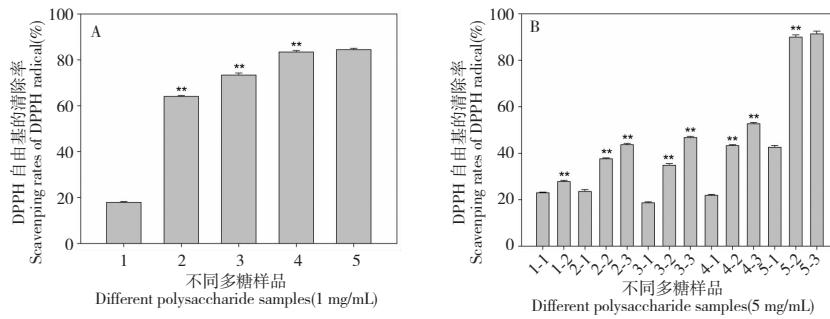


图 4 旱莲草多糖反相硅胶粗分组分(A)及中压液相精分组分(B)对 DPPH 自由基的清除率

Fig. 4 The DPPH radical scavenging rates of the crude fractions separated by reverse phase silica gel (A) and the refined fractions separated by middle-pressure liquid chromatography (B) from *E. alba* polysaccharides

注: ** $P < 0.01$, 表示相邻的多糖样品之间比较, 差异极显著

Note: ** $P < 0.01$, indicated extremely significant differences between the neighboring polysaccharides

2.6 FRAP 抗氧化能力的测定

试验结果显示,先洗脱的大极性多糖组分对 FRAP 的抗氧化能力小于后洗脱的小极性多糖组分(图 5),在 2 mg/mL 的浓度下,多糖组分 5 的 FRAP

抗氧化能力是组分 1 的 4.91 倍(图 5A);经过中压液相色谱精分后,所得到的各多糖组分即使在更高的浓度(6 mg/mL)下,其 FRAP 抗氧化能力也极显著低于分离前的对应样品(图 5B)。

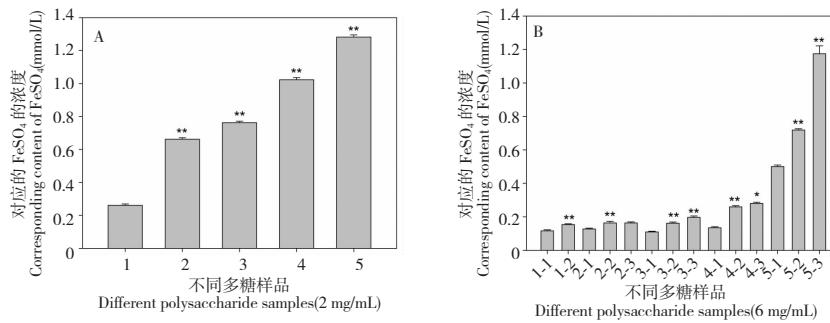


图 5 旱莲草多糖反相硅胶粗分组分(A)及中压液相精分组分(B)的 FRAP 抗氧化力

Fig. 5 FRAP antioxidant power of the crude fractions separated by reverse phase silica gel (A) and the refined fractions separated by middle-pressure liquid chromatography (B) from *E. alba* polysaccharides

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 表示相邻的多糖样品之间比较, 差异显著或极显著

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ indicated significant or extremely significant differences between the neighboring polysaccharides

3 讨论与结论

旱莲草多糖的提取方法有热水浸泡或回流提取^[11,13,15,22]、加入破坏植物细胞壁结构的纤维素酶等,进行酶法提取^[10,12]和碱提法^[12]。本文采用甲醇/w(v/v,1:1)混合溶剂室温下浸泡提取,有机溶剂甲醇的加入有助于消除脂溶性成分对多糖浸出的阻碍作用,提高提取效率。多糖提取后一般采用乙醇沉淀法制备粗多糖^[10-13,15,22],粗多糖则可利用纤维素离子交换剂和葡聚糖凝胶进一步纯化^[13]。本文利用正相硅胶、反相硅胶和中压液相色谱,有效将其它非糖物质和多糖分开,彻底除去了色素,得到无

色、极性大小不同的多个多糖成分,为进一步研究旱莲草不同多糖的抗氧化作用提供了条件,然而由于正相硅胶对大极性物质可能会产生不可逆吸附,因此,会损失部分多糖。旱莲草多糖的单糖组成目前尚未有相关报道,本文利用 TLC 分析,初步确定其主要组成单糖为 D-(+)-葡萄糖和果糖。

施嫣嫣等^[23]研究发现,旱莲草水提物和醇提物均具有较好的抗氧化活性,且水提物乙酸乙酯和丁醇萃取物也具有一定的抗氧化作用,但弱于水提物和醇提物,其中水提物和醇提物在浓度 < 2.5 mg/mL 时,对 DPPH 的清除率超过 50%,醇提物在浓度 < 2.5 mg/mL 时,对超氧阴离子自由基的清除率超

过 50% ,这说明旱莲草含有多种抗氧化物质。旱莲草抗氧化作用的研究目前主要集中在黄酮类化合物^[22,24,25]。许瑞波等^[28]采用水浸泡提取和乙醇沉淀的方法,制备了旱莲草粗多糖,并研究了其抗氧化活性,发现旱莲草粗多糖和旱莲草黄酮类化合物类似,均具有很好的抗氧化作用,能够有效清除超氧阴离子自由基和羟自由基。本文对旱莲草极性大小不同的多糖进行了抗氧化作用研究,发现它们的总还原力,总抗氧化力,清除羟自由基、DPPH 自由基和FRAP 抗氧化能力均有较大差异,且它们的抗氧化活性多数情况下都显著小于分离前的相应多糖组分,这说明旱莲草的不同多糖组分之间可能存在协同抗氧化作用。

参考文献

- 1 Dhaka N, Kothari SL. Microppropagation of *Eclipta alba* (L.) hassk—An important medicinal plant. *In Vitro Cell Dev-Pl*, 2005, 41:658-661.
- 2 Roy RK, Thakur M, Dixit VK. Hair growth promoting activity of *Eclipta alba* in male albino rats. *Arch Dermatol Res*, 2008, 300:357-364.
- 3 Kim DI, Lee SH, Choi JH, et al. The butanol fraction of *Eclipta prostrata* (Linn) effectively reduces serum lipid levels and improves antioxidant activities in CD rats. *Nutr Res*, 2008, 28:550-554.
- 4 Chen JJ (陈建济), Shi DJ (施东捷), Li KH (李克华), et al. Effect of *Eclipta prostrata* on inflammation and hemorrhage induced by the snake venom. *J Snake* (蛇志) 2005, 17(2):65-68.
- 5 Pithayanukul P, Laovachirasawan S, Bavovada R, et al. Antivenom potential of butanolic extract of *Eclipta prostrata* against Malayan pit viper venom. *J Ethnopharmacol*, 2004, 90: 347-352.
- 6 Manvar D, Mishra M, Kumar S, et al. Identification and evaluation of anti-hepatitis C virus phytochemicals from *Eclipta alba*. *J Ethnopharmacol*, 2012, 144:545-554.
- 7 Liu QM, Zhao HY, Zhong XK, et al. *Eclipta prostrata* L. phytochemicals: Isolation, structure elucidation, and their antitumor activity. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50:4016-4022.
- 8 Yuan JC (袁继承), Jiang YH (蒋永和), Shen ZB (沈志滨). Research progress in chemical components of *Eclipta alba*. *Asia-Pacific Tradit Med* (亚太传统医药), 2009, 5: 125-128.
- 9 Tabata A, Taniguchi M, Shibano M. Ecliptamines A-D, four new guanidine alkaloids from *Eclipta prostrata* L. *Phytochem Lett*, 2015, 11:224-228.
- 10 Yang CJ (杨春静), Zhang J (张杰), Zhang HF (张华峰), et al. Optimization of enzymatic extraction technology of polysaccharides from *Eclipta prostrata*. *Chin J Exp Tradit Med Formul* (中国实验方剂学杂志), 2013, 19(12):63-65.
- 11 Xu XH (许小华), Yang Y (杨云), Zhang HJ (张寒娟), et al. Optimal water-extraction of polysaccharide from *Herba ecliptae* by orthogonal design. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学), 2010, 27:319-322.
- 12 Xu XH (许小华). Study on extraction, purification and immunoreactivity of polysaccharide from *Eclipta prostrata* L. Zhengzhou: Henan University of Chinese Medicine (河南中医药大学), MSc. 2010.
- 13 Wang CY (王彩云), Zhang MY (张明月), Zou YK (邹一可), et al. Isolation and purification of water-soluble polysaccharide from *Eclipta prostrate* L. and determination of its molecular weight by HPLC. *Chin J Spectrosc Lab* (光谱实验室), 2012, 29:2398-2401.
- 14 Yu L (于雷), Li XK (李晓坤), Yang Y (杨云), et al. Study on the method of hydrogen peroxide decoloration of the polysaccharide from *Eclipta prostrata* L. *Liaoning J Tradit Chin Med* (辽宁中医杂志), 2012, 39:1832-1834.
- 15 Xu XH (许小华), Hao PF (郝鹏飞), Yang Y (杨云), et al. Effect of the polysaccharide from *Eclipta prostrata* L. on immune function of mice. *Chin J Exp Tradit Med Formul* (中国实验方剂学杂志), 2010, 16:181-182.
- 16 Du MH (杜敏华), Tian L (田龙). Extraction and purification of *Alliumm acrostemon* bunge polysaccharide and its monosaccharide constituents identification. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2007, 28(4):77-80.
- 17 Gu F, Kim JM, Hayat K, et al. Characteristics and antioxidant activity of ultrafiltrated Maillard reaction products from a casein-glucose model system. *Food Chem*, 2009, 117 (1): 48-54.
- 18 Pan Y, He CH, Wang HS, et al. Antioxidant activity of micro-wave-assisted extract of *Buddleia officinalis* and its major active component. *Food Chem*, 2010, 121:497-502.
- 19 Yang GM, Wang D, Wei T, et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of *Oxytropis falcata* fractions and its possible anti-inflammatory mechanism. *Chin J Nat Med*, 2010, 8: 285-292.
- 20 Ammar RB, Bhouri W, Sghaier MB, et al. Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): a structure-activity relationship study. *Food Chem*, 2009, 116: 258-264.