

人工培养蛹虫草 C19 提取液的体外抗氧化活性研究

毛穗芳¹, 巫光宏¹, 古清霞², 陈江磊¹, 张莉¹

(1. 华南农业大学生命科学学院, 广东广州 510642) (2. 深圳市澎源生物科技有限公司, 广东深圳 518000)

摘要: 探讨人工培养的蛹虫草 C19 的生物学活性, 采用化学比色法分别测定蛹虫草提取物的抗氧化活性。实验结果表明, 蛹虫草 C19 提取液具有很强还原能力。提取液为 0.12% 时, 对 DPPH· 的清除率达到(49.74±1.83)%, 对 MDA 生成的抑制率为(88.67±2.59)%; 提取液为 0.6% 时, 对 O₂⁻· 的清除率为(83.22±3.07)%; 提取液为 1% 时, 对·OH 的清除率为(69.59±2.24)%。表明人工培养的蛹虫草子 C19 可作为一种潜在天然抗氧化剂。

关键词: 蛹虫草 C19 子实体; 提取液; 自由基; 抗氧化作用

文章编号: 1673-9078(2011)1-45-49

In vitro Anti-oxidation of the Extraction from C19 Fruiting Bodies of Cultured *Cordyceps militaris*

MAO Sui-fang¹, WU Guang-hong¹, GU Qing-Xia², CHEN Jiang-lei¹, ZHANG Li¹

(1. College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. Peng Yuan Bio-technology Limited Company, Shenzhen 5108000, China)

Abstract: The biological activity of fruiting bodies of cultured *Cordyceps militaris* C19 was examined and the antioxidant activity of the extract from *Cordyceps militaris* was investigated by using the chemical colorimetry. The experimental results showed that the extract from C19 fruiting bodies of cultured *Cordyceps militaris* had potent reducing power. When the concentration of the extract was 0.12%, its scavenging effect on DPPH· reached (49.74±1.83)%, and its inhibitory effect on the generation of MDA was (88.67±2.59)%. When the concentration of the extract was 0.6%, its scavenging effect on O₂⁻· reached (83.22±3.07)%. And its scavenging effect on ·OH reached (69.59±2.24)% with its concentration being of 1%. It was indicated that the C19 fruiting bodies of cultured *Cordyceps militaris* was a potential natural antioxidant.

Key words: C19 fruiting bodies of cultured *Cordyceps militaris*; extract; free radical; antioxidation

活性氧(Reactive oxygen species, ROS)自由基是一些处于激发态的含氧基团, 如超氧阴离子自由基(O₂⁻·)、羟基自由基(·OH)、氧有机自由基(RO·)、有机过氧自由基(ROO·)、脂过氧自由基(LOO·)等^[1], 它们具有强烈的氧化能力, 使体内的多种大分子产生氧化变化、交联或断裂, 使酶的活性丧失, 损伤 DNA 可导致基因突变, 引起细胞结构和功能的破坏, 导致组织损害和机体进行性退化^[2]。当生物体内的自由基产生过多或清除过慢, 就会攻击各种细胞、器官并使之受到损伤, 加速机体的衰老过程并诱发各种疾病^[3]。目前抗氧化、抗自由基活性物质的研究已成为

收稿日期: 2010-09-28

基金项目: 华南农业大学横向课题(4600-H08046); 华南农业大学生命科学学院“博士奥”科技创新项目

作者简介: 毛穗芳(1987-), 女, 在读本科

通讯作者: 巫光宏(1964-), 女, 博士, 副教授, 主要从事多糖等天然产物方面的研究

生命科学研究热门课题^[2,4]。从植物和真菌等天然资源中研究开发天然成分的抗氧化剂以取代化学合成的抗氧化剂已成为必然趋势。

蛹虫草(*Cordyceps militaris* L; Sp, PL)也称北冬虫夏草, 为子囊菌亚门(Ascomycotina)麦角菌科(Clavicipitales)虫草属(*Cordyceps*)真菌^[4]。从蛹虫草中提取的活性物质具有降血压、抗氧化、抗肿瘤、抗流感病毒及调节免疫功能等重要作用^[5]。其中, 多糖是蛹虫草的主要活性成分, 已经被证实可作为自由基的清道夫, 在体内防止氧化损伤中起着重要作用^[5]。近年来, 由于天然蛹虫草产量有限, 药源紧缺, 许多研究人员致力于人工蛹虫草的研究与开发。但由于使用的菌株不同, 栽培工艺不同, 人工蛹虫草的药效也各异。本实验采用华南农业大学食品学院石木标教授培育的蛹虫草 C19 菌株, 提取蛹虫草 C19 子实体有效成分, 采用体外实验方法, 研究蛹虫草 C19 子实体提取液在体外对超氧阴离子自由基(O₂⁻·)、有机自由基

(DPPH·)、羟自由基(OH·)和脂质过氧化的清除作用,进一步探讨蛹虫草C19抗氧化功效及其作用机理,为开发其保健功能食品提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

UV-2000PC-紫外可见分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司)、高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)、DU^R530-核酸蛋白质自动分析仪(美国 BECKMAN)、Eppendorf 移液器。

1.2 材料与试剂

蛹虫草(*Cordyceps militaris*)C19 菌株:华南农业大学食品学院石木标教授提供;蛹虫草(*C. militaris*)C19 子实体由深圳澎源生物科技有限公司提供;DPPH·(1,1-二苯基苦基苯肼, 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl):生化试剂, Sigma; 硫代巴比妥酸(TBA)、氯化硝基四氮唑蓝(NBT)等其它试剂均为进口分装或国产的分析纯。

1.3 蛹虫草 C19 子实体提取液的制备

准确称取 5 g 蛹虫草子实体粉末于三角瓶中,按料水比(*m/V*)为 1:40 加入纯水 200 mL,于 100 °C 沸水浴中回流浸提 1 h,冷却,10000 r/min 离心 10 min,取蛹虫草上清液保存于-18 °C,根据不同测试指标进行不同倍数的稀释,进行体外抗氧化作用的研究。

2 方法

2.1 提取液对 DPPH· 自由基清除作用的研究

精确称量 1.97 mg DPPH· 粉末,以无水乙醇溶解并定容至 50 mL,即为 0.1 mmol/L DPPH 溶液,避光保存。

取试管数支,分别加入 0.1 mmol/L DPPH· 溶液 1.5 mL,分别加入稀释的蛹虫草提取液:0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL、1.2 mL,使各实验组的浓度(*m/V*)为:0.02%、0.04%、0.06%、0.08%、0.10%、0.12%,各组补加纯水至 3.0 mL。调零管为 1.5 mL 无水乙醇加纯水至 3.0 mL。对照管为 1.5 mL 0.1 mmol/L DPPH· 溶液加纯水至 3.0 mL。然后将各管置于 25 °C 水浴反应 30 min,分别测 A_{517nm} 。与对照组的 A_{517nm} 比较,便能测定提取液对 DPPH· 的清除作用^[6]。实验重复三次。DPPH· 自由基清除率($E\%$)= $[(A_{对照}-A_{样品})/A_{对照}] \times 100\%$ 。

2.2 提取液的还原能力测定

实验根据物质具有的还原能力,使 Fe^{3+} /氧化铁络合物还原成 Fe^{2+} 形式,呈现蓝绿色^[7]。取数支试管,

分别加入稀释的蛹虫草提取液:0.1 mL、0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL、1.2 mL,使各实验组的浓度(*m/V*)为:0.05%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%。各组分别加入 2.5 mL pH 6.6 的 PBS,并加纯水至 5.0 mL。再加入 2.5 mL 1% 的铁氰化钾溶液。充分混匀,50 °C 水浴 20 min,迅速冷却。加入 2.5 mL 10% 的三氯乙酸溶液,3000 r/min,离心 10 min 后,取上清液 2.5 mL,补加纯水 2.5 mL,加 0.5 mL 0.1% $FeCl_3$ 溶液。充分混匀,静置 10 min。调零管为不加 $FeCl_3$ 的反应液。测定吸光值 A_{700nm} , A_{700nm} 值越大,测定物的还原力越强。

2.3 提取液对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)清除作用研究

取数支干燥试管,分别加入稀释的蛹虫草提取液:0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL、1.2 mL,使各实验组的浓度(*m/V*)为:0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%。各管再分别加入 65 mmol/L 甲硫氨酸(Met) 1.2 mL,1.273 mmol/L EDTA- Na_2 溶液 0.4 mL,375 μ mol/L 氯化硝基四氮唑蓝(NBT)0.67 mL,120 μ mol/L 核黄素 0.7 mL。最后加 50 mmol/L pH 7.8 的 PBS 至 5.0 mL。各组的调零管为该组同剂量的蛹虫草提取液,补加 50 mmol/L pH 7.8 的 PBS 至 5.0 mL。分别于 4000 lx 日光灯光照 30 min。校正管为不加样品的反应液及不进行光照处理。对照管为不加样品的反应液于 4000 lx 日光灯光照 30 min。各管在 560 nm 处测定吸光值 (A)^[8]。实验重复三次。超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)抑制率($E\%$)= $(A_{对照}-A_{样品}) \times 100\% / (A_{对照}-A_{校正})$ 。

2.4 提取液对羟自由基(OH·)清除作用的研究

参考 Fenton 反应体系模型^[9]。取数支试管,分别加入稀释的蛹虫草提取液:0.25 mL、0.5 mL、1.0 mL、2.0 mL、2.5 mL,使各实验组的浓度(*m/V*)为:0.125%、0.25%、0.50%、1.0%、1.25%。各管分别加入 60 mmol/L H_2O_2 溶液 0.2 mL,9 mmol/L $FeSO_4$ 溶液 0.2 mL,9 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液 0.2 mL,补加纯水至 5.0 mL,混匀。并以 5.0 mL 纯水为调零管,对照组为不加蛹虫草提取液的反应液,各管于 37 °C 水浴反应 30 min,在 510 nm 处测定 A_{510nm} ,实验做三次重复。羟自由基(OH·)清除率($E\%$)= $(A_{对照}-A_{样品}) \times 100\% / A_{对照}$ 。

2.5 提取液抑制鸡肝微粒体脂质过氧化产物 MDA 生成的测定

2.5.1 鸡肝微粒体的制备

迅速去血后的新鲜鸡肝,用生理盐水洗净后称取适量于冰浴中研磨,0.25 mol/L 蔗糖制成 10% (*m/V*) 的匀浆悬浮液,5000 r/min 离心 10 min 取上清液,沉淀再加 0.25 mol/L 蔗糖离心洗涤 1 次,合并上清液,

于 4 ℃、10000 r/min 离心 40 min, 取沉淀, 悬浮于生理盐水中。蛋白含量采用考马斯亮蓝 G250 染色法测定^[10], 使其悬液含微粒体蛋白 0.2~0.4 g/L^[6]。

2.5.2 MDA 的测定

MDA 采用硫代巴比妥酸分光光度法测定^[6]。取数支试管, 分别加入稀释的蛹虫草提取液: 0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL、1.2 mL, 使各实验组的浓度(m/V)为: 0.04%、0.06%、0.08%、0.10%、0.12%。各组分别加入 1 mL 鸡肝微粒体悬液, 6 mmol/L EDTA-Fe(乙二胺四乙酸铁钠盐) 200 μL, 60 mmol/mL H₂O₂ 100 μL, 补加纯水至 2.6 mL。调零管为 2.6 mL 纯水, 对照管为不加蛹虫草提取液的反应液, 校正管为 10% 肝匀浆 1.0 mL 加水至 2.6 mL。各管于 37 ℃ 水浴 1 h, 加 15% TCA (三氯乙酸) 1.0 mL 终止反应。加入 0.5% TBA (硫代巴比妥酸) 1.0 mL, 充分摇匀, 于沸水浴中显色反应 15 min, 取出冷却后, 离心 10000 r/min, 10 min, 分别测吸光值 A_{532nm}, 实验重复三次。MDA 生成的抑制率 (E%)=(A_{对照}-A_{样品})×100%/(A_{对照}-A_{校正})。

2.6 实验数据处理

实验数据均以平均值±标准误($\bar{x} \pm S.E.$)表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件进行邓肯氏新复极差检验, 对各处理组实验数据的统计学分析。

3 结果与分析

3.1 提取液对 DPPH· 自由基清除作用

稳定的 DPPH· 体系是一种广泛用于评价抗氧化剂自由基清除能力的方法。其主要原理为: 溶于甲醇的 DPPH· 呈紫色, 在 517 nm 处有特征性吸收峰。当有抗氧化剂存在时, DPPH· 的孤电子被配对, 使其颜色变浅, A_{517nm} 的吸光值变小, 且这种颜色的变浅程度与配对电子数呈化学计量关系。因此, 可通过 A_{517nm} 值的测定来评价自由基的清除情况^[6]。

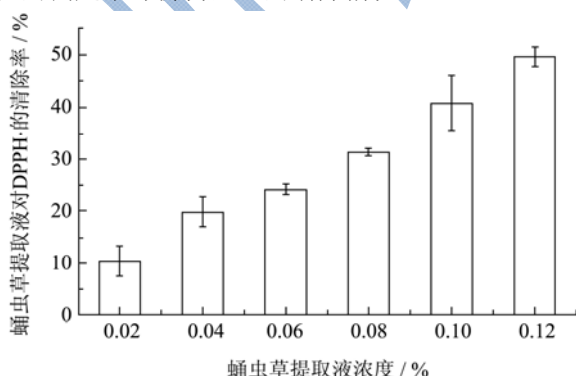


图1 蛹虫草提取液对 DPPH· 的清除作用

Fig.1 DPPH· scavenging effect of extracts from *C. militaris*

从图 1 可知, 蛹虫草提取液对 DPPH· 有一定的清

除作用。在反应体系中, 蛹虫草提取液稀释后, 各组的浓度(m/V)为 0.02%、0.04%、0.06%、0.08%、0.10%、0.12% 时, 对 DPPH· 自由基清除率随提取液浓度的增加而增加。当提取液的剂量为 0.12% 时, 对 DPPH· 的清除率达到(49.74±1.83)%。

3.2 蛹虫草子实体提取液还原能力的测定

在实验中, 通过测定使 Fe³⁺/氧化铁络合物还原成 Fe²⁺, 证实抗氧化剂的还原能力来反映其抗氧化能力。通常样品的还原能力与其抗氧化能力呈正相关^[11]。根据还原能力的测定方法, 在波长 700 nm 处测定的吸光度越大, 则样品的还原能力越强。

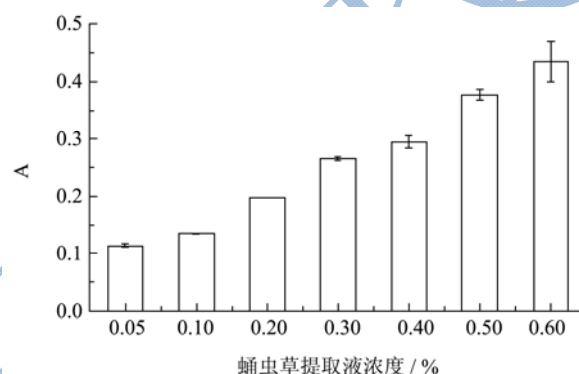


图2 蛹虫草提取液还原能力的测定

Fig.2 Determination of the reducing power of extracts from *C. militaris*

从图 2 可见, 在提取液的剂量为 0.05%、0.10%、0.20%、0.30%、0.40%、0.50%、0.60% 范围内, 反应体系的光吸收值 A_{700nm} 呈线性增大, 表明蛹虫草子实体提取液的还原能力逐渐增强。蛹虫草子实体提取液剂量为 0.60% 时, 光吸收值 A_{700nm} 为 0.435±0.035。这说明了蛹虫草子实体提取液的还原能力很强。

3.3 提取液对超氧阴离子自由基(O₂⁻)的清除作用

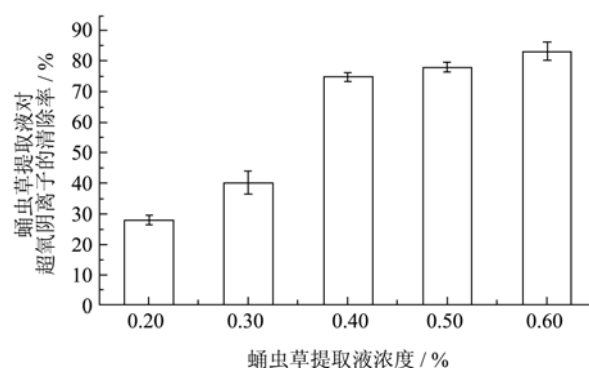


图3 蛹虫草提取液对超氧阴离子(O₂⁻)的清除作用

Fig.3 O₂⁻ scavenging effect of extracts from *C. militaris*

从图 3 可知, 蛹虫草提取液对 O₂⁻ 有清除作用, 在提取液的剂量为 0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6% 范围内, 对 O₂⁻ 清除作用的强度随提取液剂量的增加

而增加,其中,蛹虫草提取液为0.3%时,对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除率为 $(40.19\pm 3.78)\%$;当蛹虫草提取液为0.6%时,对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除率为 $(83.22\pm 3.07)\%$ 。

3.4 提取液对羟自由基($\cdot OH$)清除作用的研究

从图4可知,蛹虫草提取液对 $\cdot OH$ 有清除作用,且清除作用的强度随提取液浓度增加而增加。当提取液的剂量分别在0.25%时,对 $\cdot OH$ 的清除率为 $(35.79\pm 3.63)\%$;当提取液的剂量为1%时,对 $\cdot OH$ 的清除率为 $(69.59\pm 2.24)\%$ 。

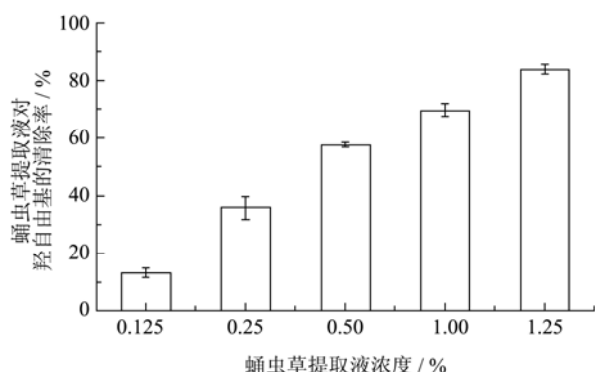


图4 蛹虫草提取液对羟自由基($\cdot OH$)的清除作用

Fig.4 $\cdot OH$ scavenging effect of extracts from *C. militaris*

3.5 提取液对 $FeSO_4$ 和 H_2O_2 诱导的鸡肝微粒体脂质过氧化物MDA生成的影响

脂质过氧化是自由基损伤组织的重要方式,MDA是脂质过氧化反应的主要产物。本实验利用Fenton反应产生 $\cdot OH$ 自由基诱导肝微粒体发生脂质过氧化反应,而其产物MDA可通过硫代巴比妥酸(TBA)法^[1]测定。

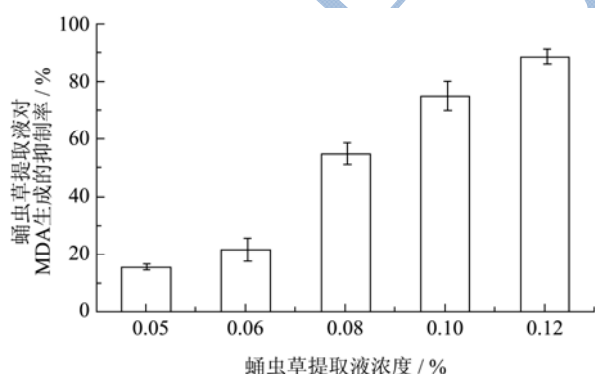


图5 蛹虫草提取液对MDA的抑制作用

Fig.5 Inhibition effect of extracts of *C. militaris* on MDA

由图5可知,加入蛹虫草提取液后,由于Fenton反应体系生成的 $\cdot OH$ 导致脂质过氧化产物MDA的量减少,说明蛹虫草提取液能显著抑制Fenton的 $Fe^{2+}-H_2O_2$ 反应体系产生 $\cdot OH$,从而抑制鸡肝微粒体脂质过氧化反应的进行。当提取液的剂量分别为0.1%、0.12%时,对MDA生成的抑制率分别为

$(75.02\pm 5.23)\%$ 、 $(88.67\pm 2.59)\%$ 。

4 结论

DPPH· (1,1-二苯基苦基苯肼; 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)是一种脂溶性的稳定自由基,DPPH·可以接受自由基清除剂提供的电子或氢,从而形成稳定分子。DPPH·分析法被广泛用于检测自由基清除的研究,评价实验样品的抗氧化能力^[2]。吕国英等^[12]研究表明蛹虫草无性型菌丝体的水提取液对DPPH·清除率为89.20%。顾宇翔等^[13]研究表明天然和发酵蛹虫草水提取物DPPH·自由基清除率分别为82.4%和90.6%,然而它们相应的醇提取物却几乎没有清除DPPH·自由基活性。本实验结果显示蛹虫草C19子实体提取液对DPPH·的清除率为 $(49.74\pm 1.83)\%$ (图1),这说明人工栽培蛹虫草子实体提取物具有一定的清除DPPH·自由基的能力。蛹虫草提取液中的主要成分是多糖,多糖化合物中含有多羟基团,具有氧化还原性质,在反应中可作为氢原子供体,使DPPH·还原为DPPH-H。在吸氧与中和自由基中发挥重要作用,可淬灭单线氧和三线氧,分解过氧化物,从而使多糖等提取物具有抗氧化活性^[14]。

$O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 是体内最活泼的活性氧,可损伤蛋白质、核酸、脂质等多种生物大分子,尤其对脂质过氧化的作用最强。通常以MDA作为脂质过氧化物和氧化应激的指标,检测MDA的生成量就可以衡量脂质过氧化的程度^[2]。据报道,蛹虫草无性型菌丝体水提取物对 $O_2^{\cdot-}$ 清除率为5%^[12-13],表明蛹虫草无性型菌丝体的水和醇提取物清除 $O_2^{\cdot-}$ 能力均较弱。而对 $\cdot OH$ 的清除率有的为89.6%^[12],有的为44.5%^[13];天然冬虫草和天然蛹虫草水提取物的 $\cdot OH$ 清除率分别为70.9%、84.9%^[13]。本实验中,蛹虫草C19子实体提取液对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除率为 $(83.22\pm 3.07)\%$ (图3),对 $\cdot OH$ 的清除率为 $(69.59\pm 2.24)\%$ (图4),同时能够抑制 $\cdot OH$ 所致的MDA生成,其抑制率为 $(88.67\pm 2.59)\%$ (图5)。表明蛹虫草C19子实体提取液具有较高清除自由基 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 的活性,有效抑制脂质过氧化作用。蛹虫草C19子实体提取液具有清除 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 自由基活性与其的抗氧化活性有关。其抗氧化作用的机理:提取液中多糖等的碳氢链上氢原子可与 $\cdot OH$ 快速地结合成水,多糖的碳原子上则留下一个单电子,成为碳自由基,进一步氧化形成过氧自由基,最后分解成对机体无害的产物。同时在Fenton反应体系中,多糖可与金属离子如 Fe^{2+} 络合,降低具有催化活性的中间态金属离子的含量,从而抑制 $\cdot OH$ 产生^[15]。多糖可与 $O_2^{\cdot-}$ 发

生氧化反应,以达到清除的目的。

研究表明具有抗氧化活性的物质如黄酮、黄酮醇类、多糖及聚合酚类等还在还原力试验过程中,通过提供电子可阻断 Fe^{2+} 向 Fe^{3+} 的转变,表现出一定的还原能力;同样也可以通过提供电子或氢原子给自由基,自身成为较稳定的共振自由基又可去结合其他自由基,表现出抗氧化活性^[7]。还原能力是抗氧化剂提供电子能力的重要指标,还原能力与抗氧化活性之间有着密切的关系。本实验结果显示蛹虫草C19子实体提取液具有较强的还原力(图2),同时也具有较强的清除自由基 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 和抑制脂质过氧化的能力(图3、图4、图5)。可见,蛹虫草C19子实体提取液富含多种活性成分如虫草多糖、虫草素、虫草酸等,其抗氧化作用模式主要是通过终止自由基的产生能力,抑制脂质过氧化物的生成,以及提供氢离子从而起到还原作用的能力共同实现的。因此,蛹虫草C19子实体提取物的良好抗氧化性能,是一种天然的抗氧化剂,具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] Halliwell B, Gutteridge, J M C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview [J]. *Methods in Enzymology*, 1990, 186: 1-85
- [2] Ferreira I C F R, Baptista P, Vilas-Boas M, et al. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity [J]. *Food Chemistry*, 2007, 100: 1511-1516
- [3] 刘安军,祝长美,朱振元,等.古尼虫草多糖对衰老模型小鼠的影响[J].*现代食品科技*,2008,24(3):201-203
- [4] 刘小莉,周剑忠,王英,等.虫草属真菌的ITS序列分析和系统发育研究[J].*现代食品科技*,2009,25(50):478-480
- [5] Ohta Y, Lee J, Hayashi K. et al., In vivo anti-influenza virus activity of an immunomodulatory acidic polysaccharide isolated from *Cordyceps militaris* grown on germinated soybeans [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(25): 10194-10199
- [6] Srivastava A, Harish S R, Shivanandappa T. Antioxidant activity of the roots of *Decalepis hamiltonii* (Wight & Arn.) [J]. *LWT*, 2006, 39: 1059-1065
- [7] 姚倩,孙涛,徐铁霞,等.壳聚糖/壳寡糖衍生物的制备及其抗氧化性能研究[J].*食品与生物技术学报*,2009,28(2):188-189
- [8] Giannopolitis C N, Ries S K. Superoxide dismutases: II. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings [J]. *Plant Physiol*, 1977, 59 (2): 315-318
- [9] Halliwell B, Gutteridge, J M C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview [J]. *Methods in Enzymology*, 1990, 186: 1-85
- [10] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254
- [11] 刘骞,孔保华.猪血浆蛋白水解物抗氧化作用模式的研究[J].*食品科学*,2009,30(7):15-19
- [12] 吕国英,潘慧娟,吴永志,等.蛹虫草无性型菌丝体提取液体外抗氧化活性研究[J].*菌物学报*.2009,28(4):597-602
- [13] 顾宇翔,宋幸文,范立强,等.虫草及其发酵制品抗氧化能力研究[J].*中国中药杂志*,2007,32(11):1028-1031
- [14] Yuan H, Zhang W, Li X, et al. Preparation and *in vitro* antioxidant activity of jccarrageenan oligosaccharides and their oversulfated, acetylated, and phosphorylated derivatives [J]. *Carbohydrate Research*, 2005, 340: 385-692
- [15] Duh P D, Tu Y Y, Yen G C. Antioxidant activity of water extract of Harnng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) [J]. *Lebensmittel Wissenschaft and Technologie*, 1999, 32: 269-277