

不同方法提取杜仲中桃叶珊瑚苷等 4 种高活性成分的比较研究

陈玉甫^{1,2}, 张学俊^{1,2*}, 王明力^{1,2}, 贺扬洁^{1,2},张萌萌³, 陶 菡^{1,2}, 胡川渝³¹贵州大学 贵州省发酵工程与生物制药重点实验室;²贵州大学酿酒与食品工程学院, 贵阳 550025; ³贵州艾科米亚生物科技有限公司, 贵阳 550002

摘要:为研究生物化学方法对杜仲中高活性成分的提取率,本文以高效液相色谱法检验样品中提取出活性成分的含量差异,比较了在相同条件下酶解法、水提法、醇提法对杜仲树皮中桃叶珊瑚苷、京尼平苷、京尼平苷酸与绿原酸这 4 种活性成分的提取量,并对 4 种活性成分的不同提取效果进行了比较研究。结果发现三种方法的提取量存在明显差异,其中桃叶珊瑚苷提取量为:酶解法 22.42 $\mu\text{g/g}$,水提法 8.27 $\mu\text{g/g}$,醇提法 9.13 $\mu\text{g/g}$;京尼平苷提取量为:酶解法 77.89 $\mu\text{g/g}$,水提法 33.19 $\mu\text{g/g}$,醇提法 7.76 $\mu\text{g/g}$;京尼平苷酸提取量为:酶解法 110.05 $\mu\text{g/g}$,水提法 36.63 $\mu\text{g/g}$,醇提法 47.40 $\mu\text{g/g}$;绿原酸提取量为:酶解法 345.35 $\mu\text{g/g}$,水提法 118.85 $\mu\text{g/g}$,醇提法 172.04 $\mu\text{g/g}$,即酶解法提取量均比水提法、醇提法高出数倍。实验表明酶解法是 3 种方法中提取效果最好的,且无化学污染。

关键词:杜仲树皮;天然化合物;纯水提取;乙醇溶液提取;酶解生化提取;高效液相色谱

中图分类号:R284.2;Q556

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)1-0010-06

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.1.002

Comparative study on extraction of 4 highly active ingredients such as aucalein from *Eucommia ulmoides* Oliv.

CHEN Yu-fu^{1,2}, ZHANG Xue-jun^{1,2*}, WANG Ming-li^{1,2}, HE Yang-jie^{1,2},
ZHANG Meng-meng³, TAO Han^{1,2}, HU Chuan-yu

¹The Provincial Key Laboratory of Fermentation Engineering and Bio-Pharmaceutical, Guizhou University;

²School of Liquor & Food Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

³Guizhou Eucommia Biological Science & Technology Co. Ltd, Guiyang 550002, China

Abstract: In order to study the extraction rate of high-activity components in *Eucommia ulmoides* by biochemical methods, this paper compared the enzymatic hydrolysis, water extraction and alcohol extraction methods in the eucommia bark of the eucommia bark, genipin, genipin. The extraction of four active components, acacia, genipin, genipin and chlorogenic acid, was carried out by high performance liquid chromatography to determine the difference in the content of active ingredients extracted from the samples. The extraction effects of four active ingredients in the extraction of *Eucommia* bark from different extraction methods were compared and compared. The determination of the extraction quantity of the 4 natural compounds with three solutions respectively by liquid chromatography, which showed that there were significant differences in contents between three extracting solutions. The contents of Aucubin were 22.42 $\mu\text{g/g}$ with aqueous solution containing enzyme, 8.27 $\mu\text{g/g}$ with distilled water, and 9.13 $\mu\text{g/g}$ with 70% ethanol solution. The contents of Geniposide were 77.89 $\mu\text{g/g}$ with aqueous solution containing enzyme, 33.19 $\mu\text{g/g}$ with distilled water and 7.76 $\mu\text{g/g}$ with 70% ethanol solution. The contents of Geniposidic acid were 110.05 $\mu\text{g/g}$ with aqueous solution containing enzyme, 36.63 $\mu\text{g/g}$ with distilled water and 47.40 $\mu\text{g/g}$ with 70% ethanol solution. The contents of Chlorogenic acid were 345.35 $\mu\text{g/g}$ with aqueous solution containing enzyme, 118.85 $\mu\text{g/g}$ with distilled water and 172.04 $\mu\text{g/g}$ with 70% ethanol solution. That is, the amount of extraction by enzymatic hydrolysis is

收稿日期:2018-05-03 接受日期:2018-11-19

基金项目:十三五国家重点研发计划(2017YFD0600702)

* 通信作者 Tel:86-013885019307; E-mail: xzhang203@aliyun.com

several times higher as much as that of water extraction and ethanol extraction. Those determination results showed that the enzymatic hydrolysis was the best among the three methods in natural products extraction, and also enzymatic extraction causes no any chemical pollution.

Key words: barks of *Eucommia ulmoides*; natural compounds; water extraction; ethanol extraction; enzymatic biochemistry extraction; HPLC

杜仲 (*Eucommia ulmoides*) 是我国独有的植物物种, 占全世界杜仲林的 96% 以上。杜仲为一科一属的唯一树种, 有着“先锋植物”、“活化石植物”的称号^[1]。汉《神农本草经》最早有记载杜仲树皮的药效, 将其列为少数的几味上品中药, 无副作用可多服久服^[2]。经国内外众多药理学家的研究证实, 杜仲中多种天然药物成分具有抗肿瘤、保肝护胆、抗菌消炎等药理作用^[3], 这和传统中药古书的记载一致; 并且还发现了其对心血管疾病具有治疗作用。杜仲的药理药效作用使得其在天然药物领域成为了研究热点^[4]。

本文检测分析的桃叶珊瑚苷、京尼平苷、京尼平苷酸与绿原酸即为杜仲中主要的天然药物成分。其中桃叶珊瑚苷具有强筋健骨、治疗肝损伤以及神经保护作用等多种药理作用^[5-7]; 京尼平苷具有防治帕金森病的功效^[8,9]; 京尼平苷酸与京尼平苷的分子结构和药理作用稍有差异, 但都具有利胆、健胃、抗菌、消炎等多种药理功能^[10,11]; 绿原酸是杜仲中含量较高的苯丙素类物质, 是重要的强肝药物, 且具有降血糖血脂的功效^[12,13]。

目前, 对于植物中活性成分的检测最有效广泛的方法是高效液相色谱法, 其中 Zhao 等^[14] 采用高效液相色谱法测定金银花中绿原酸的含量; Zhang 等^[15] 采用高效液相色谱法作为马鞭草中绿原酸的定量测定方法; Luo 等^[16] 通过高效液相色谱法对杜鹃花中熊果苷, 绿原酸和咖啡酰核素这三种主要成分进行分析和定量测定, 并说明该方法可重复且准确; Singh 等^[17] 采用高效液相色谱法, 对 9 种小檗属物种中不同部分所含原小檗碱生物碱, 阿朴吗啡生物碱和绿原酸的含量进行了定量测定。本文作者通过高效液相色谱法对酶解法、水提法与醇提法所提取的 4 种主要天然化合物含量进行了定量检测, 证实了不同提取方法在杜仲树皮中天然化合物提取方面的显著差异。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

杜仲树皮: 采自贵州省铜仁武陵山区, 树龄为 10 ~ 20 年, 经贵州大学酿酒与食品工程学院张学

俊教授依据杜仲生药学特征和产地鉴定为贵州地道杜仲树所产杜仲树皮。

生物酶制剂: ZH · Euco-pro 蛋白酶 (5 万 U/g), 购于张家港金源生物化工有限公司; ZH · Euco-pect 果胶酶 (5 万 U/g), ZH · Euco-cell 纤维素酶 (5 万 U/g), 购于潍坊苏科汉生物工程有限公司, 均为市售饲料级食用酶制剂; 柠檬酸 (食品添加剂, 纯度 99%) 和柠檬酸钠 (食品添加剂, 纯度 99%), 购于潍坊英轩实业有限公司; 无水乙醇 (分析纯 99.7%), 购于天津市富宇精细化工有限公司; 乙腈 (色谱纯 99.9%), 购于美国 Tedia 公司; 异丙醇 (色谱纯 99.9%), 磷酸 (色谱纯 99.9%), 购于天津市科密欧化学试剂有限公司; 超纯水: Millipore Simpax-R 纯水器实验室自制; 蒸馏水: SZ-96A 石英蒸馏器实验室自制。标准品: 桃叶珊瑚苷标准品 (≥98%)、京尼平苷标准品 (≥98%)、京尼平苷酸标准品 (≥99%), 购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 绿原酸标准品 (≥98%), 购于贵州迪大生物科技有限公司。

1.2 仪器

SHA-CA 数显水浴恒温振荡器 (常州普天仪器制造有限公司); Agilent 1260 高效液相色谱仪 (安捷伦科技有限公司, 美国); CP214 电子天平 (上海奥豪斯仪器有限公司); EYELA 旋转蒸发仪 (上海爱朗仪器有限公司); Thermo Heraeus Multifuge X3R 通用台式离心机 (赛默飞世尔科技公司, 美国)。XW-80A 旋涡混合仪 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司); SCAA-103 有机相柱式过滤器 (上海安谱实验科技股份有限公司 0.45 μm)。

1.3 实验方法

1.3.1 测试液的制备

1.3.1.1 酶解提取液

蛋白酶提取液: 配制 pH 为 3.4 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液 500 mL 与 2.5 g ZH · Euco-pro 蛋白酶制剂混合液, 洗脱反复洗脱后收集的酶液与 50.0 g 薄片条杜仲树皮混合后置于 53 °C 恒温水浴振荡 8 h 后取出; 经过滤、抽滤所得清液在真空旋转蒸发仪上浓缩至 10 ~ 15 mL, 至比色管中加入无水乙醇定

容至 50 mL;振荡混合充分后沉淀过夜,离心后及时做高效液相色谱检测。

果胶酶提取液:将 500 mL pH 为 4.0 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液与 2.5 g ZH·Euco-pect 果胶酶制剂混合,反复洗脱收集的酶液与酶解后的杜仲树皮残渣混合后置于 45 °C 中水浴恒温振荡 8.0 h 后取出;余后实验步骤与蛋白酶提取相同。

纤维素酶提取液:将 500 mL pH 为 5.5 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液与 2.5 g ZH·Euco-cell 纤维素酶制剂混合,反复洗脱收集的酶液与两次酶解后的杜仲树皮残渣与酶液混合后置于 55 °C 水浴恒温振荡 8.0 h 后取出;余后实验步骤与蛋白酶提取相同。

1.3.1.2 乙醇提取液

称量 50.0 g 薄片条杜仲树皮;加入浓度为 70% 的乙醇溶液 500 mL 加入三角瓶,在 53 °C 水浴恒温振荡器进行中速振荡 8.0 h 取出;余后实验步骤与蛋白酶提取相同。

1.3.1.3 水提取液

取 50.0 g 薄片条杜仲树皮,将 500 mL 蒸馏水加入三角瓶中,置于 53 °C 水浴恒温振荡器进行中速振荡 8.0 h 取出;余后实验步骤与蛋白酶提取相同。

1.3.2 提取液样品的处理

将杜仲树皮的蛋白酶酶解提取液样品、果胶酶酶解提取液样品、纤维素酶酶解提取液样品、蒸馏水提取液样品与乙醇提取液样品,分别经有机相针式滤器(0.45 μm)过滤注入高液自动进样样品小瓶,冰箱冷藏保存以备进行高效液相色谱检测。

1.3.3 色谱检测方法

4 种主要天然药物成分具有不同的特征吸收波长,为了准确定量采用了不同的检测条件。

桃叶珊瑚苷:色谱柱:TOSOH TSKgeL ODS 100Z-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(10:90)溶液;检测波长:204 nm;流速:0.8 mL/min;进样量:10 μL;柱温:25 °C。

京尼平苷:色谱柱:TOSOH TSKgeL ODS 100Z-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(20:80)溶液;检测波长:238 nm;流速:1.0 mL/min;进样量:10 μL;柱温:35 °C。

京尼平苷酸:色谱柱:TOSOH TSKgeL ODS 100Z-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.2% 磷酸(16:84)溶液;检测波长:233 nm;流速:0.7 mL/min;进样量:10 μL;柱温:35 °C。

绿原酸:色谱柱:TOSOH TSKgeL ODS 100Z-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.2% 磷

酸(18:82)溶液;检测波长:330 nm;流速:0.6 mL/min;进样量:10 μL;柱温:40 °C。

1.3.4 标准曲线的测定

桃叶珊瑚苷:准确称取桃叶珊瑚苷标准品适量,用 75% 乙醇溶液溶解后配置成浓度为 0.001、0.002、0.005、0.01、0.025、0.05、0.10 mg/mL 的系列标准品溶液进行 HPLC 检测,记录色谱峰面积;**京尼平苷:**准确称取京尼平苷标准品适量,用 75% 乙醇溶液溶解后配置成浓度为 0.004、0.008、0.021、0.042、0.084、0.168、0.252 mg/mL 的系列标准品溶液进行 HPLC 检测;京尼平苷酸:准确称取京尼平苷酸标准品适量,用 75% 乙醇溶液溶解后配置成浓度为 0.003、0.007、0.019、0.038、0.076、0.152、0.304 mg/mL 的系列标准品溶液进行 HPLC 检测,记录色谱峰面积;**绿原酸:**准确称取绿原酸标准品适量,用 75% 乙醇溶液溶解后配置成浓度为 0.01、0.025、0.05、0.10、0.20、0.30、0.40 mg/mL 的系列标准品溶液进行 HPLC 检测,记录色谱峰面积。分别以待测成分质量(μg)为横坐标、峰面积(mAu * s)为纵坐标进行线性回归。

2 结果与分析

2.1 标准品与样品高效液相色谱检测

按“1.3.3”项下色谱检测方法对各标准品溶液与提取液样品进行 HPLC 检测,结果如下图。

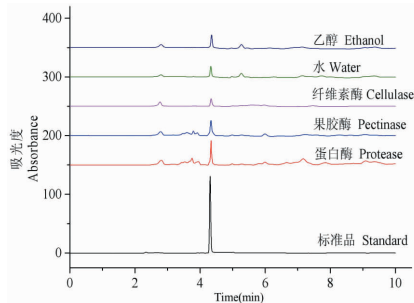


图 1 桃叶珊瑚苷标准品与提取液样品色谱图

Fig. 1 The chromatogram of aucubin standard and extract sample

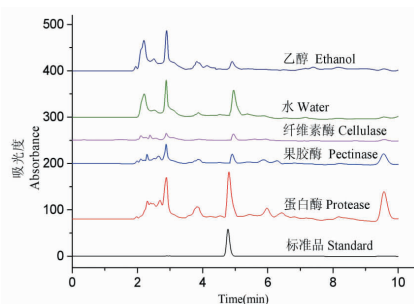


图 2 京尼平苷标准品与提取液样品色谱图

Fig. 2 The chromatogram of geniposide standard and extract sample

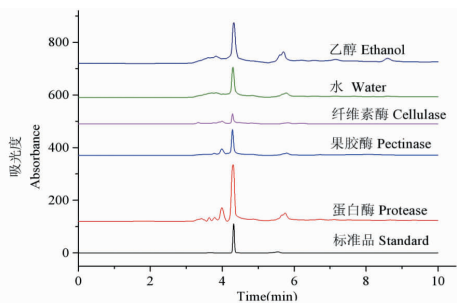


图3 京尼平苷酸标准品与提取液样品色谱图

Fig. 3 The chromatogram of geniposidic acid standard and extract sample

2.2 方法学考察

2.2.1 标准曲线的测定

按“1.3.3”项下色谱检测条件对“1.3.4”项下

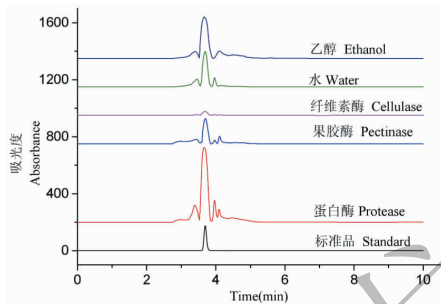


图4 绿原酸标准品与提取液样品色谱图

Fig. 4 The chromatogram of chlorogenic acid standard and extract sample

各标准品的系列溶液进行 HPLC 检测,记录色谱峰面积。以待测成分质量 (μg) 为横坐标、峰面积 ($\text{mAu} \cdot \text{s}$) 为纵坐标进行线性回归,得回归方程。结果如下表。

表1 4种天然化合物的线性关系

Table 1 The linear relationship of 4 natural compounds

天然化合物 Native compound	线性回归方程 Equation of linear regression	线性范围 Linearity range (μg)	r^2
桃叶珊瑚苷 Aucubin	$y = 818.26x - 0.5454$	0.010 ~ 1.00	0.9995
京尼平苷 Geniposide	$y = 861.6x + 27.431$	0.042 ~ 2.52	0.9989
京尼平苷酸 Geniposidic acid	$y = 1299.8x + 19.79$	0.038 ~ 3.040	0.9993
绿原酸 Chlorogenic acid	$y = 3741.9x - 54.353$	0.100 ~ 4.000	0.9991

2.2.2 精密度试验

按“1.3.3”项下色谱检测条件,分别对各标准品溶液连续做6次平行样测定,记录峰面积,计算得桃叶珊瑚苷、京尼平苷、京尼平苷酸与绿原酸峰面积的RSD分别为0.76%、0.81%、0.85%、0.93%。结果表明检测仪器精密度良好。

2.2.3 重复性试验

精密移取“1.3.2”项下蛋白酶提取液样品适量,取样6份,按“1.3.3”项下色谱检测条件进样检测,记录样品中4种天然化合物峰面积,计算得桃叶珊瑚苷、京尼平苷、京尼平苷酸与绿原酸峰面积的RSD分别为1.96%、1.88%、2.13%、2.61%,结果表明检测方法重复性好。

2.2.4 稳定性试验

精密吸取“1.3.2”项下各提取液样品适量,置于室温0、2、4、8、12、24 h,按“1.3.3”项下色谱检测

条件进样检测,记录各样品中4种天然化合物峰面积,计算得蛋白酶提取液样品、果胶酶提取液样品、纤维素酶提取液样品、水提液样品和醇提液样品中桃叶珊瑚苷峰面积的RSD分别为1.16%、1.51%、1.78%、1.83%、1.73%;京尼平苷峰面积的RSD分别为1.54%、1.72%、1.88%、1.68%、1.98%;京尼平苷酸峰面积的RSD分别为1.97%、2.09%、1.52%、1.49%、2.14%;绿原酸峰面积的RSD分别为1.60%、1.82%、2.05%、1.89%、1.87%;结果表明各提取液样品在室温放置24 h内十分稳定。

2.2.5 加样回收率试验

平行制取6份已知4种天然化合物含量的蛋白酶提取液样品1 mL,分别与不同浓度的4种天然化合物标准品溶液1 mL,置10 mL棕色容量瓶中,加75%乙醇稀释定容至刻度,摇匀。按“1.3.3”项下色谱条件进行检测,计算加样回收率。桃叶珊瑚苷

平均回收率为 98.94%, RSD 为 1.58% ($n=6$); 京尼平苷平均回收率为 99.36%, RSD 为 0.85% ($n=6$); 京尼平苷酸平均回收率为 99.61%, RSD 为 0.95% ($n=6$); 绿原酸平均回收率为 99.44%, RSD 为 1.41% ($n=6$); 结果表明该色谱法准确可靠。

2.3 不同方法天然化合物含量测定

分别取“1.3.2”项下不同提取方法的提取液样品,按照“1.3.3”项下色谱条件各平行检测 3 次,记录峰面积,代入线性回归方程计算,测定结果见下表。

表 2 样品中 4 种天然化合物含量测定结果 ($n=3$)

Table 2 Determination results of 4 natural compounds in the samples ($n=3$)

样品 Sample	桃叶珊瑚苷含量 Content of aucubin ($\mu\text{g/g}$)	京尼平苷含量 Content of geniposide ($\mu\text{g/g}$)	京尼平苷酸含量 Content of geniposidic acid ($\mu\text{g/g}$)	绿原酸含量 Content of chlorogenic acid ($\mu\text{g/g}$)
蛋白酶酶解液 Protease extraction	11.89	62.03	68.94	260.85
果胶酶酶解液 Pectinase extraction	6.89	9.96	31.30	74.14
纤维素酶酶解液 Cellulase extraction	3.64	5.90	9.81	10.36
酶解法(蛋+果+纤) Enzymatic hydrolysis (Protease + Pectinase + Cellulase)	22.42	77.89	110.05	345.35
蒸馏水提取液 Distilled water extraction	8.27	33.19	36.63	118.85
乙醇提取液 70% ethanol extraction	9.13	7.76	47.40	172.04

酶解法提取天然化合物量远远高于水提法与醇提法。仅 ZH·Euco-pro 蛋白酶的酶解液中 4 种药物成分的提取量就高于水提和醇提的提取量。因为 ZH·Euco-pro 蛋白酶对于杜仲树皮具有极强的消蚀作用,在 ZH·Euco-pro 酶生化降解杜仲植物组织的过程中,组织结构彻底瓦解,其效果达到了物理的粉碎作用,植物组织结构的瓦解粉化,大大提高了酶解液与植物组织接触的比表面,使得药物溶出面积巨大提高,药物成分的溶出速度、溶出成分种类和溶出量呈倍数地增高。

3 结论

ZH·Euco-pro 蛋白酶可酶解植物组织,具有强烈的泥浆粉碎化作用。酶解提取杜仲树皮中天然产物之前,仅沿树皮中杜仲胶生长的纵向方向处理成 5 公分及以上的长条状,保持了杜仲胶的天然状态和杜仲胶聚合物的高聚合度,而蛋白酶酶解过程中杜仲树皮组织发生销蚀瓦解直至粉末泥浆化,泥浆粉碎化作用提高了蛋白酶生化降解提取杜仲天然药物的溶出量,达到了比其他提取方法高出许多的药物提取量,溶出了几乎所有韧皮部中的天然化合物。ZH·Euco-pro 酶的泥化作用瓦解了植物组织结构使植物组织疏解松散,其他基本结构组织的果胶和细胞等都游离分散暴露在泥浆液中。植物细胞的细胞壁由纤维素组成,彼此由果胶粘连在一起形成长

条形的块状。ZH·Euco-pect 果胶酶可直接与底物果胶作用发生降解,植物组织细胞随之彼此分散疏解开,存在于胞间的杜仲药物成分便溶解于酶解液中。暴露在外疏散的植物细胞,其细胞壁是纤维素组织结构而成的,ZH·Euco-cell 纤维素酶可直接与细胞壁纤维素组织识别结合,进入纤维素酶活性中心的纤维素片段发生水解断裂,活性中心反复地与相适配的纤维素结合水解,连续对纤维素壁进行纤维素酶的降解,生成的单糖和寡聚糖溶解在酶解液中,同时细胞中的杜仲天然药物成分随之扩散溶解于酶解液中。所以,整个酶解过程就是植物组织被瓦解泥化消蚀,酶解液充分与植物组织结合溶解出其中全部的天然药物成分,达到最高效率的提取。

而水提法与醇提法不能瓦解植物组织,仅仅通过溶剂向植物组织内部扩散、润涨植物组织,只有那些与溶剂充分亲和溶剂化的药物成分,靠热运动从植物组织中扩散出来。植物结构组织的润涨只是组织结构的间隙扩大,原来的组织结构依旧存在,通透性极差,溶剂化的药物成分在这样的组织结构中扩散不畅,仅仅溶出少量的天然药物成分。

本研究中,在提取杜仲植物组织中的天然药物过程中,植物组织的泥化、消蚀,和组织结构的瓦解是提高天然药物提取率的最直接有效的方法。具有破坏、粉化杜仲植物组织的生物酶酶解法是最合理、

最有效的提取中草药材中天然药物的方法,且酶解具有专一性、条件温和,能有效的保护天然药物的高活性。

虽然物理粉碎可以增大植物组织被水或醇提取天然药物时与溶剂作用的比表面积,但是经过滤纸超滤后的酶解提取液中,获得了非常细腻的植物组织粉末,说明非常细腻的植物组织粉末与溶剂接触的比表面显著地高于物理粉碎的植物组织粉末,不难理解酶解粉化的植物超细粉末甚至分子级的降解碎片,其中药物成分的溶出率呈倍数的高于物理粉碎方法。此外,酶解对植物组织的降解和粉化,具有对底物的针对性和专一性,对药物成分和杜仲植物组织中的高分子聚合物杜仲胶毫发无损,极好地保护酶解提取的目标物,确保了目标物的原生态天然性。

经对比研究发现,水提法、醇提法和酶解法在提取杜仲中天然化合物方面的各自有自己独特的特点,和各自成因的条件的利弊。试验结果表明,酶解法在提取量方面远远优于其他两种方法,并且酶解条件温和,45 ~ 55 °C 的弱酸性条件保证了天然化合物的生物活性。酶解法提取杜仲树皮中的天然产物显然比通常中药煎煮法具有明显高效、高量、保持药物成分高活性的优势。水提法和醇提法于4种提取物提取量的差异则是因为醇提液的极性低于水提液的极性,促进了绿原酸在醇提液中亲和扩散。酶解法条件温和,完全适合进行杜仲药物成分的工业提取生产,且由于杜仲树皮无需物理破碎便于后续进行原生态长丝杜仲胶的提取,提高原材料的利用率,创造更高价值。

参考文献

- 1 Yang L, Zhang B, Fu ZR, et al. Comprehensive utilization of *Eucommia ulmoides* Oliv. in China[J]. Guangzhou Chem Ind (广州化工), 2011, 39(24):9-10.
- 2 Zhang KJ. Research progress and existing problems of *Eucommia ulmoides*[J]. J NW Fore Col(西北林学院学报), 1994, 4:58-63.
- 3 Chen W. Extraction, separation and purification techniques of chlorogenic acid and flavonoids in Chinese medicine *Eucommia ulmoides* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University(南京农业大学), 2007.
- 4 Zhao BT, Qian Y, Zhang WM. The research and application of *Eucommia ulmoides*[J]. Mod Busi Tra Ind(现代商贸工业), 2001, 10:47-48.
- 5 Mu LQ, Du J, Hu YY, et al. Effect of quercetin, geniposide, and aucubin in *Eucommia ulmoides* on proliferation and differentiation of osteoblast MC3T3-E1 in mice[J]. Drug Eval Res(药物评价研究), 2015, 38:165-169.
- 6 Kim YM, Sim UC, Shin Y, et al. Aucubin promotes neurite outgrowth in neural stem cells and axonal regeneration in sciatic nerves[J]. Exp Neurobiol, 2014, 23:238-245.
- 7 Fu T, Pu Q, Tan J, et al. Protective effect of *Gardenia* geniposide on acute alcoholic liver injury in mice[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Clin Med(中药药理与临床), 2007, 3:25-27.
- 8 Chen YM, Zhang YF, Li L. Neuroprotective effect of geniposide on Parkinson's disease model mice[J]. Chin J Contemp Neurol Neurosurg(中国现代神经疾病杂志), 2015, 6:477-483.
- 9 Chen YM, Zhang YF, Liu WZ, et al. Neuroprotective effects of geniposide to MPTP induced parkinson's disease mice model[J]. Chin J Neuroanat(神经解剖学杂志), 2015, 31:629-634.
- 10 Zhao S, Ding YQ, Wang H, et al. Preparation of geniposidic acid by alkaline hydrolysis of *Gardenia* extract[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2017, 29:1349-1354.
- 11 Jin X, Sun J, Xie WL, et al. Study of neuroprotection of geniposidic acid on ischemic brain injury of rat[J]. J Hubei Univ Sci Tech Med Sci(湖北科技学院学报:医学版), 2017, 31(2):93-96 + 103 + 88.
- 12 Liang XC, Meng W, Zhong YL, et al. Effects of chlorogenic acid on mouse insulin resistance development induced by high fat emulsion[J]. Chin Pharm Bull(中国药理学通报), 2013, 29:654-658.
- 13 Sun J, Lu Y, Xiang WY, et al. Simultaneous determination of six active components in *Eucommia ulmoides* by UPLC[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2016, 28:498-504.
- 14 Zhao Q, Wu XX, Zhou J, et al. RP-HPLC determination of chlorogenic acid in *Lycium barbarum* L. extract and its protective effect on retinal ganglion [J]. Biomed Res India, 2017, 28:4869-4873.
- 15 Zhang ZH, Pan TW. HPLC determination of chlorogenic acid in *Verbena officinalis* L. extract and its *in vitro* antibacterial activity[J]. Biomed Res India, 2017, 28:3996-4001.
- 16 Luo XL, Li N, Xu M, et al. HPLC simultaneous determination of arbutin, chlorogenic acid and 6'-*O*-caffeoylarbutin in different parts of *Vaccinium dunalianum* wight[J]. Biomed Res India, 2015, 29:1963-1965.
- 17 Singh A, Bajpai V, Kumar S, et al. Quantitative determination of isoquinoline alkaloids and chlorogenic acid in *Berberis* species using ultra high performance liquid chromatography with hybrid triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry[J]. J Sep Sci, 2015, 38:2007-2013.