

工业色谱法纯化山银花中绿原酸的工艺研究

陈光宇^{1,2}, 葛发欢², 何群^{3,4}, 谢梦洲^{1*} (1.湖南中医药大学-湖南省药食同源功能性食品工程技术研究中心, 长沙 410208; 2.中山大学生命科学院, 广州 510275; 3.中药成药性与制剂制备湖南省重点实验室, 长沙 410208; 4.湖南省药学“十二五”重点学科, 长沙 410208)

摘要: 目的 探索工业色谱法纯化山银花中绿原酸的最优工艺参数。方法 以绿原酸的转移率为评价指标, 以山银花水提液过大孔树脂后的 20%乙醇洗脱液为原料液, 采用单因素及响应面设计试验, 对采用工业色谱纯化山银花中绿原酸工艺中的原料液浓缩程度、固定相类型、流动相乙醇浓度、乙醇流速、进样量等主要工艺参数进行优化, 确定了最优工业色谱纯化山银花中绿原酸的工艺条件。结果 工业色谱纯化山银花中绿原酸的最优工艺条件: 以 60 °C, -0.1 MPa 为浓缩条件, 将原料液浓缩至原体积的 0.166 7(1/6), 工业色谱 UV 检测波长为 230 nm, 以 PIPO-02 色谱填料为固定相, 以 18.54% 乙醇作为流动相, 流速为 14.57 mL·min⁻¹, 进样量为 13.15 mg。该工艺绿原酸的平均转移率为 95.49%, RSD=1.91%, 绿原酸产品纯度为 97.45%, RSD=3.30%。结论 经过工艺优化与验证, 创立了一条工业色谱纯化山银花中绿原酸工艺路线, 该工艺制备的绿原酸产品纯度>97%, 绿原酸转移率高, 工艺简单、无毒, 溶剂易于回收, 适合于山银花中绿原酸纯化的工业化生产。

关键词: 山银花; 绿原酸; 工业色谱纯化; PIPO-02; CT-25; CT-36

中图分类号: R284.2 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2018)05-0698-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.05.017

引用本文: 陈光宇, 葛发欢, 何群, 等. 工业色谱法纯化山银花中绿原酸的工艺研究[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(5): 698-703.

Study of the New Process of the Purification by Industrial Chromatography of Chlorogenic Acid in *Lonicera Macranthoides*

CHEN Guangyu^{1,2}, GE Fahuan², HE Qun^{3,4}, XIE Mengzhou^{1*} (1.Engineering Center of Medicinal and Edible Functional Food, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2.College of Life Science, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China; 3.Druggability of Traditional Chinese Medicine and Preparations, Key Laboratory of Hunan Province, Changsha 410208, China; 4.Key Disciplinary of "The 12th Five-Year Plan" of Pharmacy in Hunan Province, Changsha 410208, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the optimal process of the purification by industrial chromatography of chlorogenic acid in *Lonicera macranthoides*. **METHODS** The transport rate of chlorogenic acid was used as main assessment index, the eluent of 20% ethanol solution of macroporous resin, which first gained from the water extract solution of *Lonicera macranthoides*, was used as raw material, single factor and response surface test was adopt to design this test, these main factors, which have effect on the process of the purification by industrial chromatography of chlorogenic acid in *Lonicera macranthoides*, such as the type of stationary phase, the concentration of ethanol in mobile phase, the flow rate of mobile phase, the sample amount, were optimized. The optimum condition of the process of the purification by industrial chromatography of chlorogenic acid in *Lonicera macranthoides* was determined. **RESULTS** The optimum conditions of the process of the purification by industrial chromatography of chlorogenic acid in *Lonicera macranthoides* were as follows: the condense condition was 60 °C, -0.1 MPa, the volume of raw material should be concentrated to one-sixth of its original volume, the UV determine wavelength of industrial chromatography was 230 nm, the chromatography packing of PIPO-02 was used as the stationary phase, 18.54% ethanol was used as the mobile phase, the flow rate of mobile phase was 14.5 mL·min⁻¹, the sample amount was 13.15 mg. In this process the average data-transfer rate of chlorogenic acid was 95.49% (RSD=1.91%), the purity of product was 97.45% (RSD=3.30%). **CONCLUSION** A new route of the process of the purification by industrial chromatography of chlorogenic acid from *Lonicera macranthoides* has been established through optimization and verification experiment. The process, with a high transport rate of chlorogenic acid, is simple, healthy, the solvent is easy to recycle, and the process is suitable for industrialize production of the purification by industrial chromatography of chlorogenic acid in *Lonicera macranthoides*.

KEY WORDS: *Lonicera macranthoides*; chlorogenic acid; purification by industrial chromatography; PIPO-02; CT-25; CT-36

作者简介: 陈光宇, 男, 硕士 Tel: (0731)88458231 E-mail: chengguangyu58@126.com *通信作者: 谢梦洲, 女, 博士 Tel: (0731)88458231 E-mail: 1173511369@qq.com

绿原酸是从金银花、山银花等药材中提取分离得到的一种具有生物活性的化合物^[1], 研究发现其具有多种药理作用^[2], 绿原酸提取物广泛应用于生物医药、保健食品等各个领域^[3]。目前, 绿原酸含量高的中药材主要有金银花类、山银花类、杜仲叶等^[4], 而灰毡毛忍冬等山银花类药材因来源广、价廉备受市场青睐^[5]。目前用于植物中绿原酸分离、纯化的方法主要有乙酸乙酯萃取法、常规柱层析法等^[6-9], 但这些传统方法存在转移率低、生产过程复杂、溶剂不适合回收等问题。

工业色谱是一种新型高效分离技术, 它利用各组份在相间滞留时间的不同而进行分离, 与制备色谱法相比, 它采用动态轴向压缩技术来填装色谱填料, 采用连续进料等方式, 是一种可大规模制备中药有效成分的方法^[10]。近年出现的 PIPO-02 新型色谱填料^[11], 是一种以聚苯乙烯结构为骨架, 颗粒度为 5~150 μm 的高分子材料, 理化性质稳定, 与分离的各类目标物质不产生化学反应, 适于亲水性层析, 环保价格低, 寿命长, 能在线活化, 适合工业化生产, 重现性好, 库存量大, 年生产能力达 10 吨。CT-25 型填料为多孔亲水性聚甲基丙烯酸酯骨架的弱酸离子交换填料, CT-36 型填料为多孔亲水性聚甲基丙烯酸酯骨架的弱碱离子交换填料, 这 2 种型号填料平均孔径 1 000 $\text{\AA}$, 平均粒径 40~75 μm , 非特异性吸附少, 产物回收率高, 具有良好的化学稳定性, 耐受水溶性的有机溶剂, pH 值范围 2~13, 使用温度范围 4~60 $^{\circ}\text{C}$, 柱床稳定性和机械性能稳定性较好, 能在高流速下使用, 适用于生物大分子和生化产品(如溶菌酶等)的分离纯化, 特别适合工业大规模的制备纯化过程。CT-25 适用于碱性生物大分子, CT-36 适用于酸性生物大分子。

本研究首次采用工业色谱法纯化山银花中绿原酸, 建立了一条绿原酸产品纯度>97%, 绿原酸转移率高、工艺简单、无毒、溶剂易于回收的工艺路线。

1 仪器与材料

RE-52AA 型旋转蒸发器(上海亚华仪器设备有限公司); SHZ-DIII 型循环水式真空泵(巩义市予华仪器设备有限公司); SH101-1 型鼓风干燥箱(上杭仪器公司); DZF-6020 型真空干燥箱(上海博迅实业有限公司); 2X2-2 型旋片真空泵(浙江台州求精真空泵有限公司); T500 型电子天平(常熟

市双杰测试仪器厂); AL104 型电子分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司); UtiMate-3000 型高效液相分析色谱仪(Thermo Scientific 公司); LS2010 型工业色谱仪(江苏汉邦科技有限公司)。

PIPO-02 填料(广州牌牌生物科技有限公司); CT-25、CT-36 填料(天津南开和成科技有限公司); AR 乙醇(广州化学试剂厂); AR 无水乙醇(天津市科密欧化学试剂有限公司); AR 甲醇(广州新成精细化工有限公司); 绿原酸对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 110753-200413, 供含量测定用); 分离绿原酸的原料为在最优提取工艺条件下得到的山银花水提液(山银花药材经重庆中药研究院李云隆研究员鉴定为忍冬科植物灰毡毛忍冬的花蕾或带初开的花, 符合中国药典 2015 年版一部 30 页相关规定), 再在最优大孔树脂吸附分离工艺条件下所得的洗脱液。

2 单因素试验法优化工业色谱纯化山银花中绿原酸工艺方法及结果

2.1 绿原酸的 HPLC 测定

照中国药典 2015 年版一部山银花项下法测定绿原酸含量^[12-13], 山银花中绿原酸含量为 4.41%。

2.2 工业色谱纯化试验的计算与说明

绿原酸转移率(在原料液浓缩程度实验中)/% = 原料液中绿原酸量(mg)/浓缩液中绿原酸量(mg) $\times$ 100%; 绿原酸转移率(在工业色谱实验中)/% = 工业色谱供试液中绿原酸量(mg)/工业色谱接收馏分中绿原酸量(mg) $\times$ 100%; 绿原酸纯度/% = 工业色谱接收馏分析晶干品中绿原酸量(mg)/工业色谱接收馏分析晶干品重量(mg) $\times$ 100%。

2.3 工业色谱填料的前处理

将色谱填料浸泡于已过滤的蒸馏水中, 除掉色谱填料碎屑及杂物。以湿法匀浆上柱, 上柱压力为 0.2 MPa, 采用动态轴向压缩技术, 静压 2 h 以上至无液体流出, 后用 10 倍柱体积的水淋洗至流出液澄清, 即得。

2.4 原料液浓缩程度对绿原酸转移率的影响

原料液需要浓缩至原体积一定倍数, 并浓缩至无醇味, 过滤, 后才能注入工业色谱对绿原酸进行纯化。以 60 $^{\circ}\text{C}$, -0.1 MPa 为浓缩条件, 将原料液分别浓缩至原体积的 46%, 25%, 16%, 15%, 13%, 11.6%, 10%, 过滤。按“2.1”项下方法测定, 按“2.2”项下方法计算, 平行重复 3 次, 结

果见表 1。

表 1 原料液浓缩程度对绿原酸转移率的影响($n=3$)

Tab. 1 The influence of the degree of concentration of raw material solution on the transport rate of chlorogenic acid ($n=3$)

浓缩至原体积百分数/%	绿原酸转移率/%	95%置信区间
0.460 8	99.93±0.18	99.48~100.4
0.25	98.93±0.21	98.41~99.45
0.16	94.59±0.23	94.02~95.16
0.149 9	93.23±0.26	92.58~93.88
0.13	89.23±0.25	88.61~89.85
0.115 7	85.45±0.28	84.75~86.15
0.1	80.92±0.24	80.32~81.52

由表 1 结果可知, 7 组浓缩程度样品, 21 个数据采用 95%可信区间重叠法统计处理, 表明 95%置信区间皆未重叠, 说明差别有统计意义, 进一步分析发现, 自变量与因变量可建立函数关系, 以浓缩至原体积倍数平均值为自变量 X , 转移率(%)平均值为因变量 Y , 采用计算机对表 1 结果进行拟合, 结果见表 2。

表 2 原料液浓缩程度对绿原酸转移率影响的数学模型拟合

Tab. 2 The mathematical model fitting of the influence of the degree of concentration of raw material solution on the transport rate of chlorogenic acid

数学模型	判断指标	拟合结果
逻辑斯蒂模型	R^2	0.998 9
	F	1 816
	P	0.000 1
Gompertz 模型	R^2	0.998 5
	F	1 361
	P	0.000 1
负指数函数模型	R^2	0.908 2
	F	49.46
	P	0.000 9

由表 2 可知, 浓缩至原体积倍数(X)与转移率(Y)的函数关系与逻辑斯蒂模型拟合度最高, 故建立的数学模型方程为 $Y = \frac{99.85}{1 + e^{0.9109-23.50(X-0.05)}}$, 将 $Y=100\%$ 代入方程求解, 得 $X=0.165 4$ 倍, 即浓缩至原体积的 0.165 4 倍, 实际调整为浓缩至原体积的 0.166 7(即浓缩至原体积的 1/6), 以此作为最优浓缩至原体积倍数。

2.5 工业色谱绿原酸供试品溶液的制备

取原料液, 浓缩至原体积的 0.166 7(即浓缩至原体积的 1/6), 过滤, 即得。

2.6 色谱填料类型对纯化绿原酸效果的影响

分别取 PIPO-02 型、CT-25 型、CT-36 型色谱填料各取 600 g, 按“2.2”项下方法进行预处理, 以此作为工业色谱固定相; 以乙醇-水(20:80)为流动相, 以 $15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 为流速, 每种类型固定相注入 15 mL 工业色谱绿原酸供试品溶液, 根据检测信号收集出峰馏分。平行重复 3 次, 按“2.1”项下方法测定, 按“2.2”项下方法计算。结果见图 1~3、表 3。

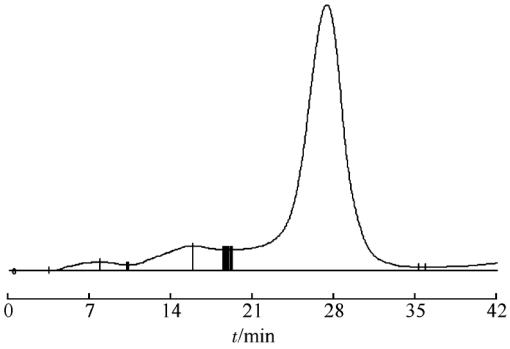


图 1 PIPO-02 型色谱填料纯化绿原酸的工业色谱图谱
Fig. 1 The industrial chromatogram of the purification by the chromatography packing of PIPO-02 of chlorogenic acid

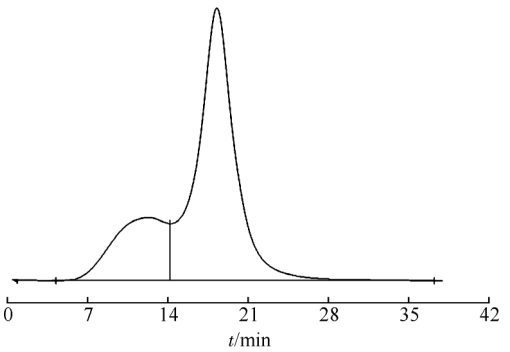


图 2 CT-25 型色谱填料纯化绿原酸的工业色谱图谱
Fig. 2 The industrial chromatogram of the purification by the chromatography packing of CT-25 of chlorogenic acid

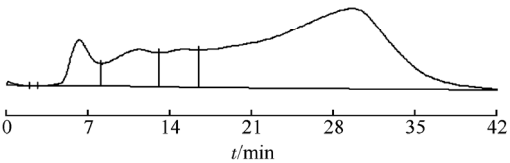


图 3 CT-36 型色谱填料纯化绿原酸的工业色谱图谱
Fig. 3 The industrial chromatogram of the purification by the chromatography packing of CT-36 of chlorogenic acid

表3 色谱填料类型对绿原酸转移率影响结果表(n=3)

Tab. 3 The influence of the type of chromatography packing on the transport rate of chlorogenic acid (n=3)

色谱填料类型	绿原酸平均转移率/%	95%置信区间
PIPO-02	95.58±0.37	94.66~96.50
CT-25	79.93±0.39	78.96~80.90
CT-36	86.14±0.36	85.25~87.03

表3结果显示,3种类型色谱填料95%置信区间未重叠,差别有统计意义,PIPO-02型色谱填料纯化绿原酸平均转移率比其他2种型号色谱填料高。由图1~3可知,色谱填料PIPO-02型的分离度比CT-25型和CT-36型的好,PIPO-02型的分离时间比CT-36型的短。当流动相乙醇-水比例逐渐提升后,PIPO-02型色谱填料的柱压比其他2种型号的低。而笔者未见国内外文献报道有关PIPO-02色谱填料纯化绿原酸的报道。综上考虑,选择PIPO-02型色谱填料作为工业色谱纯化山银花中绿原酸的最佳色谱填料。

3 响应曲面法优化工业色谱纯化山银花中绿原酸工艺方法及结果

每次实验取600 g色谱填料,按“2.3”项下方法进行预处理,测定1倍柱体积为600 mL,按响应面试验设定的参数进行试验。

3.1 响应曲面工艺优化设计

采用Box-Behnken试验设计,以流动相乙醇浓度、流动相流速及进样量3个影响因素为自变量,每个因素取3个水平,以-1、0、+1编码,以绿原酸转移率为响应值,考察以上3种因素对工业色谱纯化山银花中绿原酸工艺的影响。试验因素水平及编码设计见表4。

表4 Box-Behnken 设计试验因素水平及编码表

Tab. 4 The factors and level and coding schedule of Box-Behnken design

自变量	代码	编码水平		
		-1	0	+1
乙醇浓度/%	A	10.00	20.00	30.00
流速/mL·min ⁻¹	B	10.00	15.00	20.00
进样量/mg	C	5.50	11.00	16.50

3.2 响应曲面优化工业色谱纯化山银花中绿原酸工艺过程

分别按响应曲面试验设计,将“2.5”项下工业色谱绿原酸供试品溶液注入工业色谱仪分离,根据检测信号收集出峰馏分,按“2.1”项下方法

测定,按“2.2”项下方法计算。

3.3 响应曲面试验结果

响应曲面试验结果见表5。表5共15个试验点,其中12个为析因点,3个为零点,析因点为自变量取值乙醇浓度(A)、乙醇流速(B)和进样量(C)所构成的顶点,零点为区域的中心点,其中零点试验重复3次,用以估算试验误差。

表5 响应曲面试验结果

Tab. 5 The result of response surface experiment

序号	A 乙醇浓度/%	B 乙醇流速/mL·min ⁻¹	C 进样量/mg	R 绿原酸转移率/%
1	30	15	5.5	87.63
2	10	20	11	92.08
3	20	20	16.5	93.27
4	20	20	5.5	85.85
5	20	10	5.5	88.57
6	10	10	11	93.43
7	20	15	11	94.01
8	20	15	11	93.77
9	30	15	16.5	92.35
10	30	20	11	91.75
11	20	10	16.5	91.76
12	10	15	5.5	87.22
13	20	15	11	93.57
14	10	15	16.5	92.89
15	30	10	11	93.46

3.4 模型的建立及显著性分析

利用Design Expert 8.0软件对表5试验数据进行二次回归拟合,得绿原酸转移率(R)对流动相乙醇浓度(A)、流动相乙醇流速(B)和进样量(C)二次多项回归模型方程: $R=93.783-0.054A-0.534B+2.625C-0.09AB-0.238AC+1.06BC-0.472A^2-0.632B^2-3.289C^2$ 。对该模型进行显著性检验,结果见表6。

表6 回归模型方差分析表

Tab. 6 The analysis of variance table of regression model

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	102.77	9.00	11.42	106.81	<0.000 1
A-A	0.02	1.00	0.02	0.22	0.661 5
B-B	2.28	1.00	2.28	21.32	0.005 8
C-C	55.13	1.00	55.13	515.63	<0.000 1
AB	0.03	1.00	0.03	0.30	0.605 7
AC	0.23	1.00	0.23	2.11	0.206 0
BC	4.47	1.00	4.47	41.84	0.001 3
A ²	0.82	1.00	0.82	7.68	0.039 3
B ²	1.47	1.00	1.47	13.78	0.013 8
C ²	39.95	1.00	39.95	373.64	<0.000 1
残差	210.13	3.00	70.04		
失拟	0.44	3.00	0.15	3.00	0.259 6
误差	0.10	2.00	0.05		
综合	103.31	14.00			
校正系数	$R^2=0.994 8$		$R^2_{adj}=0.985 5$		

实验选用的模型 P 值 <0.01 具有显著性, 失拟项不显著($P=0.259$ $6>0.05$), 说明该模型是有统计意义的; 复相关系数 $R^2_{\text{adj}}=0.985$ 5, 说明该模型能解释 98.55%响应值的变化, 因而该模型的拟合程度比较好, 可以用此模型来分析和预测工业色谱纯化山银花中绿原酸工艺参数。

3.5 工业色谱纯化山银花中绿原酸工艺各因素对加强指数影响的曲面分析结果

利用 Design Expert 8.0 软件对工业色谱纯化山银花中绿原酸工艺数据进行处理得到曲面分析结果见图 4~6, 从回归方程各项方差的进一步检验也可看出, 一次项中影响显著因素为 C、B, 在所选的各因素水平范围内, 按照对结果的影响排序: $A>B>C$, 即乙醇浓度 $>$ 乙醇流速 $>$ 进样量, 3 个因素中, 进样量与流速之间具显著的交互作用, 而进样量与乙醇浓度和流速与乙醇浓度之间交互作用并不明显。

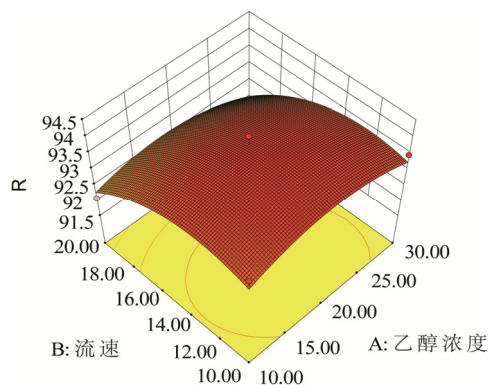


图 4 乙醇浓度(A)和乙醇流速(B)对绿原酸转移率影响的曲面图

Fig. 4 The surface diagram of the effect of the concentration of ethanol (A) and the flow rate (B) on the transport rate of chlorogenic acid

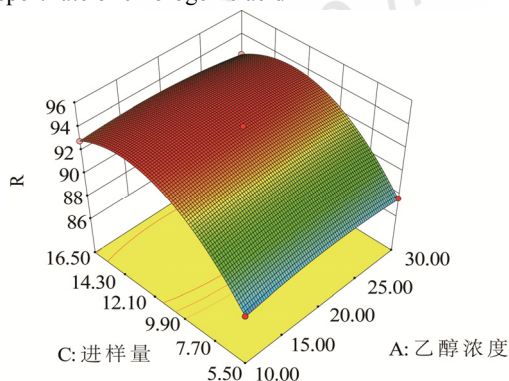


图 5 乙醇浓度(A)和进样量(C)对绿原酸转移率影响的曲面图

Fig. 5 The surface diagram of the effect of the concentration of ethanol (A) and the sample amount (C) on the transport rate of chlorogenic acid

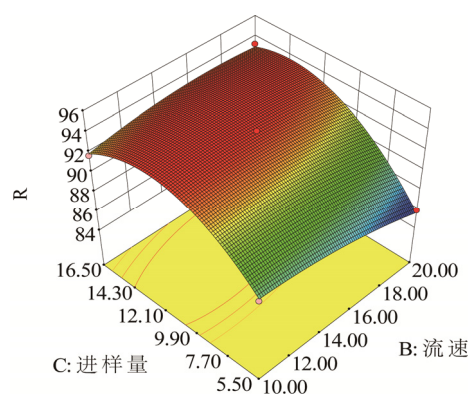


图 6 乙醇流速(B)和进样量(C)对绿原酸转移率影响的曲面图

Fig. 6 The surface diagram of the effect of the flow rate (B) and sample amount (C) on the transport rate of chlorogenic acid

3.6 工业色谱纯化工艺条件优化结果

采用程序 Design-Expert 8.0 软件对方程 R 求解, 得到工业色谱纯化山银花中绿原酸的最优工艺: 乙醇浓度为 18.54%, 乙醇流速为 $14.57 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量为 13.15 mg, 理论工业色谱绿原酸转移率 R 为 94.322 7%。

3.7 验证试验结果

采用最佳优化条件对绿原酸进行纯化, 结果得绿原酸平均转移率为 95.49%, RSD 为 1.91%, 与理论值很接近, 所以基于响应曲面法优化的绿原酸纯化工艺参数科学、合理、可行。

3.8 最优工业色谱纯化工艺中绿原酸产品纯度的测定

按最优工业色谱纯化绿原酸工艺条件进行 6 批实验, 每批实验进行 10 次, 将每批实验收集的馏分接收液合并, 减压浓缩, 趁热加入 95%乙醇至溶液呈浑浊状, 将其置于低温下冷却, 待其静置析出晶体, 过滤, 得高纯度的绿原酸提取物(含水量为 2.1%), 按“2.1”项下方法测定, 按“2.2”项下方法计算, 其平均纯度为 97.45%, RSD=3.30%。

4 小结与讨论

本研究首次采用工业色谱法从山银花中纯化绿原酸, 该工艺绿原酸转移率高达 95.49%, RSD=1.91%, 所得绿原酸产品纯度为 97.45%, RSD=3.30%。通过单因素及响应曲面试验, 确定了最优工业色谱纯化山银花中绿原酸工艺参数。利用 PIPO-02 型色谱填料能有效富集绿原酸, 除去杂质, 消耗溶剂仅为水和乙醇, 过程无毒, 溶

剂易于回收。

关于聚苯乙烯型和聚甲基丙烯酸酯型色谱填料对绿原酸的吸附与解析作用可从以下几点探讨。①吸附机制：质粒在色谱填料表面上受到的作用力未被完全抵消，因而会产生吸附力场，这种力场可以降低界面张力而吸引绿原酸；相对于硅胶色谱填料的力场主要来源于氢键间作用力来说，聚苯乙烯型色谱填料主要来源于范德华力、静电引力；由于聚苯乙烯型色谱填料主要依靠物理吸附力来吸附绿原酸，所以不易产生不可逆的非特异性吸附作用，因此绿原酸转移率高。②吸附过程：当有供试品溶液注入工业色谱仪后，色谱填料会从流动相中吸附绿原酸分子；开始吸附速度大于脱吸附速度，绿原酸分子会在带孔的色谱填料质粒周围形成一道液膜再扩散至色谱填料表面，即产生膜扩散作用，此阶段一般也是控速阶段，然后再从色谱填料表面往孔穴中扩散，即在产生粒内扩散作用。③脱附机制：含有有机溶剂的流动相对聚苯乙烯型和聚甲基丙烯酸酯型色谱填料解析绿原酸的影响主要表现在 2 个方面，一是有机溶剂分子能将聚苯乙烯和聚甲基丙烯酸酯型色谱填料吸附结构改变，甚至破坏，使色谱填料对绿原酸的吸附作用减弱，甚至消失。二是流动相溶液对绿原酸也存在吸附力，这类力可以将被色谱填料吸附的绿原酸拉回流动相；当溶剂产生浓度差时，这类作用力效果会得到增强。④脱附过程：当流动相以一定流速流经色谱填料时，流动相有机溶剂分子能冲击聚苯乙烯和聚甲基丙烯酸酯型色谱填料吸附活性中心，使绿原酸分子被挤出；被挤出绿原酸分子再从孔穴内逸出色谱填料质粒表面，回到溶剂分子中。

乙醇分子能够冲击聚苯乙烯型和聚甲基丙烯酸酯型色谱填料活性结构，增加色谱填料碎屑。实验时，笔者发现 PIPO-02 型色谱填料可用乙醇-水流动相以梯度淋洗方式即可再生，但工业色谱

柱压会不断上升，再生的色谱填料的分离纯化效果也会下降。当流动相乙醇-水的比例超过 20：80 后，CT-36 型色谱填料的柱压会猛增，而再降低乙醇-水的比例后，CT-36 型色谱填料的柱压不再降低，说明 CT-36 型色谱填料在高浓度乙醇液中结构会发生较大变化，且该变化不可逆。

REFERENCES

- [1] ZHANG Y F, ZHANG L Y, MA Z C, et al. Progress of research of chlorogenic acid [J]. Chin J Chem Edu(化学教育), 2011(4): 1-2, 6.
- [2] GAO J M, ZHANG A L, ZHANG K J, et al. Advances in the researches of distribution, extraction and bioactivities of chlorogenic acids [J]. J North Forest Univ(西北林学院学报), 1999(2): 73-82.
- [3] 徐晓伟. 金银花绿原酸的提取纯化研究[D]. 合肥工业大学, 2010.
- [4] 周舟, 彭淼, 钟晓红. 绿原酸提取分离及检测研究进展[J]. 长江大学学报(自然科学版), 2011(2): 243-246.
- [5] XU X F, LI H J, LI P, et al. Chemical constituents in bud of *Lonicera macranthoides* [J]. Chin J Nat Med(中国天然药物), 2006 (1): 45-48.
- [6] 张彤, 谢景田, 陶建生, 等. 一种从金银花中提取分离绿原酸的方法[P]. 上海: CN101838200A, 2010-09-22.
- [7] 张洁, 张亮, 李鑫泉. 高纯度绿原酸工业化生产工艺. 四川: CN16874352005-10-26.
- [8] 卢定强, 洪声, 王俊, 梁铭鑫, 张淑敏, 凌岫泉. 一种吸附分离高纯度绿原酸的新方法. 江苏: CN101314568 [P]. 2008-12-03.
- [9] ZHANG B, YANG R Y, ZHAO Y, et al. Separation of chlorogenic acid from honeysuckle crude extracts by macroporous resins [J]. J Chromatogr B, 2008(867): 253-258.
- [10] YAN H Q, LI C Y. Application of industrial preparative chromatograph in separation of traditional Chinese medicine [J]. Guangdong Trace Elem Sci(广东微量元素科学), 2009(2): 14-18.
- [11] QIAO H M. Progress of polymeric chromatographic packing [J]. J Mater Sci Engin(材料科学与工程学报), 2016, 34(2): 333-337.
- [12] 中国药典. 一部[S]. 2015: 30-31.
- [13] HUANG W, WANG Y. Simultaneous determination of three indicators in Chrysanthemi Flos by quantitative analysis of multi-components by single marker [M]. Her Med(医药导报), 2016, 35(6): 646-650.

收稿日期: 2017-09-02

(本文责编: 曹粤锋)