

豚草中绿原酸的测定及提取剩余物的生物转化

刘 虎¹, 陈育如¹, 唐 刚¹, 刘军利²

(1 南京师范大学 生命科学学院, 江苏 南京 210046)

2 中国林业科学研究院林产化学工业研究所 国家林业局林产化学工程重点实验室, 江苏 南京 210042)

[摘要] 采用超声波法辅助提取、HPLC 测定的方法, 研究了豚草不同部位绿原酸的含量. 并与烟草、金银花和几种南京郊区常见杂草的绿原酸含量进行了比较. 将提取剩余物用间型脉孢菌进行了生物转化. 实验结果表明, 豚草各部位的绿原酸含量以叶最多, 为 1.160 mg/g. 花和茎次之, 分别为 0.559 和 0.494 mg/g. 豚草叶绿原酸以 7 月份含量最高. 在 50℃ 时用超声波辅助提取, 作用时间以 20 min 为宜. 用间型脉孢菌转化提取剩余物, 物料经生物转化后, 富含纤维素酶、蛋白酶和类胡萝卜素, 其中纤维素酶中 CMC 酶活性为 5503.9 U/g. 蛋白酶活性为 7926.4 U/g. 类胡萝卜素含量为 126.6 μg/g. 提取酶和类胡萝卜素后的物料可作为生产有机肥的原料, 使物料得到全部利用.

[关键词] 豚草, 绿原酸, 超声波, 提取, 生物转化

[中图分类号] S 765.1 [文献标识码] A [文章编号] 1672-1292(2009)04-0087-06

Determination of the Content of Chlorogenic Acid in *Ambrosia artemisiifolia* L. and Bioconversion of Extraction Residue

Liu Hu¹, Chen Yuru¹, Tang Gang¹, Liu Junli²

(1 School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

2 Key Laboratory on Forest Chemical Engineering of SFA, Institute of Chemical Industry of Forest Products of CAF, Nanjing 210042, China)

Abstract The content of chlorogenic acid in different parts of *Ambrosia artemisiifolia* L. was studied by HPLC analysis method and ultrasonic-assisted extraction. Chlorogenic acid contents of *Ambrosia artemisiifolia* L., *Nicotiana tabacum*, *Lonicera japonica* Thunb. and several common weed of Nanjing were compared. The extraction residues were treated by *Neurospora intermedia*. The results showed that the contents of chlorogenic acid in different parts of *Ambrosia artemisiifolia* L. were different. Leaves were 1.160 mg/g, flowers and stems were 0.559 mg/g and 0.494 mg/g respectively. The chlorogenic acid content of *Ambrosia artemisiifolia* L. leaf is the highest in July. When extracted by ultrasound-assisted method at 50℃, the proper extraction time was 20 min. After bioconversion by *Neurospora intermedia*, the extraction residues contain carotenoid and abundance of enzymes such as cellulase and protease. The yields of carotenoid as high as 126.6 μg/g. Enzyme activity of CMCase and Protease were 5503.9 U/g and 7926.4 U/g respectively. After the enzyme and carotenoid were extracted from fermentation products, the residue was entirely utilized as organism fertilizer totally.

Key words *Ambrosia artemisiifolia* L., chlorogenic acid, ultrasonic wave, extraction, bioconversion

豚草 (*Ambrosia artemisiifolia* L.) 又名艾叶破布草, 属双子叶植物纲菊科豚草属, 原产北美, 一年生草本植物, 是一种危害人体健康和农牧业生产的恶性杂草, 尤以其花粉引发人的过敏反应而成为世界性的公害, 被国家环保总局列为第一批公布的 16 种外来入侵物种之一^[1]. 在我国的豚草发生地, 每年都要花费巨大的人力物力加以清理, 如能将清理的豚草加以利用, 则有望降低处理成本, 化害为利.

豚草中含有绿原酸^[2]. 而绿原酸是一种具有良好开发前景的精细化学品, 在国际上有“植物黄金”之称, 一些中成药制剂如银翘伤风胶囊等将其作为质量控制的指标之一^[3], 国内外的研究认为它是很有希

收稿日期: 2008-12-28

基金项目: 江苏省高新技术研究计划 (BG2007049) 资助项目.

通讯联系人: 陈育如, 博士, 副教授, 研究方向: 生物化工. E-mail: chenyrn@njnu.edu.cn

望抗艾滋病病毒(HIV)的先导化合物^[4,5]. 豚草、小蓬草等杂草每年都需投入大量的人力和物力进行清除,因此很有必要了解这些杂草中绿原酸含量,以便有针对性地资源化利用. 绿原酸的生产主要是以金银花为原料,本课题组已经开展以烟草为原料提取绿原酸的研究^[6],因此本工作也将这些物料与金银花和烟草中绿原酸的含量进行了比较.

除绿原酸外,豚草中还含有丰富的纤维素与半纤维素等可供转化利用的生物质. 本课题组在利用烟草废料提取绿原酸研究的基础上^[6],对豚草等植物提取绿原酸进行了探讨,并对提取剩余物进行了微生物转化研究.

1 材料、菌种与试剂

1.1 材料

豚草(*Ambrosia artemisiifolia* L.),小蓬草(*Conyza canadensis*),空心莲子菜(*Alternanthera philoxeroides*),蔓陀罗(*Datura Stramonium*),苍耳(*Xanthium sibiricum*),龙葵(*Solanum americanum* Miller),苣荬菜(*Sonchus brachyotus*),金银花(*Lonicera japonica* Thunb.),一枝黄花(*Solidago virgaurea* L.),均采于南京市郊或市区,采后风干,粉碎至 40 目备用. 木绣球(*Viburnum macrocephalum* Fort.)采自南京市区;烟草(*Nicotiana tabacum*)安徽产;粉碎至 40 目备用.

1.2 菌种与培养基

间型脉孢菌(*N eurospora intermedia*),本实验室分离、鉴定和保藏.

生物转化培养基:豚草提取剩余物 22 g 加入 KH_2PO_4 0.2 g MgSO_4 0.03 g CaCl_2 0.03 g 加水使物料含水量 65% (湿基),pH 值自然. 装于 250 mL 三角瓶中,121℃湿热灭菌后备用.

1.3 试剂

绿原酸标准品(98%),购于中国生化药品试剂检定所.

甲醇(HPLC级)、磷酸氢二钠缓冲溶液(10 mmol/L,用 1 mol/L 的磷酸溶液调 pH 至 4.0)、 H_2SO_4 等均为国产分析纯试剂.

2 仪器与方法

2.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪(Agilent 公司);HH-4 数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司);G-560E 振荡器(Scientific Industries INC);KQ-100E 超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司);PYX-DHS-50X65-S 型隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂);FA 1004 型电子分析天平(上海天平仪器厂).

2.2 实验方法

2.2.1 样品的制备与分析

杀青处理方法:将约 10 g 新鲜豚草在 120℃ 烘箱高温短时间处理 5 min,每隔 10 s 搅拌使之受热均匀,处理结束后自然风干,粉碎至 40 目,备用.

样品处理:准确称取豚草(包括风干与经过杀青的叶、花、茎、根等)、蔓陀罗、苍耳、龙葵、苣荬菜、空心莲子菜、小蓬草、木绣球、烟草叶及金银花、一枝黄花的花粉状样品(40 目)各 1.00 g 转移至 50 mL 离心管中,加入 9 mL 含量 40% 的甲醇溶液(调节 pH 至 4.0),振荡混匀后在超声清洗机中 50℃ 超声提取 20 min,过滤,40% 的甲醇溶液 9 mL 重复超声提取 1 次,合并滤液转移至 20 mL 容量瓶并定容至刻度,混匀,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后 HPLC 进行绿原酸测定.

色谱条件:Thermo 公司 Hypersil ODS C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱;流动相 A 为磷酸氢二钠缓冲溶液(10 mmol/L),流动相 B 为甲醇;A 与 B 配比为 75% : 25%;流速:1 mL/min;柱温:25℃;进样体积:20 μL;检测波长 326 nm.

2.2.2 绿原酸提取率的计算

将超声法提取并定容后的样品在上述色谱条件下分析,根据峰面积与绿原酸浓度成线性关系计算绿原酸的平均提取率. 计算公式为:绿原酸提取率 = 绿原酸浓度 × 提取液体积 / 干样品质量.

2.2.3 CMC 酶活性测定

酶活力定义^[7]: 在 50℃、pH 4.6 条件下, 1 min 水解产生 1 μg 的葡萄糖所需的酶量为一个酶活性力单位, 以 U/g(或 U/mL)表示。

测定: 以羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 为底物, 用 DNS 法测定, 取酶液 0.5 mL, 再加入 1% CMC-Na 1 mL, 50℃准确反应 30 min 取出加入 1 mL DNS 溶液, 沸水浴中保持 5 min 流水冷却, 水定容至 10 mL, 混匀, 在 540 nm 处比色。

2.2.4 蛋白酶活性测定

酶活力定义^[8]: 在 40℃、pH 7.0 条件下, 1 min 水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸所需的酶量为一个酶活力单位, 以 U/g(或 U/mL)表示。

测定: 取粗酶液 0.2 mL, 加入 pH 7.0 的磷酸盐缓冲液 1 mL 及 2% 酪蛋白溶液 0.4 mL, 立即放入 40℃ 水浴中准确反应 10 min 然后加 1 mL 0.4 mol/L 的三氯乙酸溶液, 于 60℃ 水浴中 10 min 以终止酶反应, 再加入 9 mL 水后混匀, 10 000 r/min 离心 3 min, 取上清液在 275 nm 处测定吸光度。

3 结果与讨论

3.1 豚草及其它样品的绿原酸含量

经 HPLC 检测, 豚草及其它材料中的绿原酸含量如表 1 所示。

由表 1 可见, 豚草、蔓陀罗、苍耳、苣荬菜、空心莲子菜、小蓬草中均含有绿原酸成份, 这些植物中有的是恶性入侵种 (如豚草、空心莲子菜等), 严重影响人们健康 (豚草) 或农业生产 (空心莲子菜)。若能高效、低成本地从这些植物中提取绿原酸, 可变废为宝, 得到有效利用。其中豚草叶中绿原酸含量达 1.160 mg/g 茎中含量达 0.494 mg/g 为文献 [2] 所报道的豚草茎中绿原酸含量 (0.040 7 mg/g) 的 12 倍。此外季节变化对豚草中绿原酸也有影响, 豚草叶在 9 月份绿原胶含量为 0.345 3 mg/g 为 7 月份的 29.8%。

金银花中绿原酸含量较豚草高, 为 29.98 mg/g 以金银花为原料提取绿原酸已有很多文献, 且金银花仅为植株的一小部分, 来源有限, 成本较高。烟草中的绿原酸含量也达 26.75 mg/g 烟草中烟碱的存在对绿原酸的分离提出了更高的要求, 本课题组另有专文进行研究, 本工作主要对豚草的绿原酸进行分析研究。

绿原酸标品和部分抽提液样品的绿原酸 HPLC 分析如图 1 至图 4 所示。

表 1 豚草和几种植物中的绿原酸含量
Table 1 Content of chlorogenic acid in *Ambrosia artemisiifolia* L. and several plants

| 种类 | 绿原酸含量 (mg/g 干重) |
|-------|-----------------|
| 豚草 | 1.160 |
| 蔓陀罗 | 0.451 |
| 苍耳 | 1.104 |
| 苣荬菜 | 1.767 |
| 空心莲子菜 | 0.520 |
| 小蓬草 | 6.460 |
| 金银花 | 29.98 |
| 木秀球 | 4.136 |
| 一枝黄花 | 8.50 |
| 烟草 | 26.75 |
| 龙葵 | - |

注: “-”为未检出

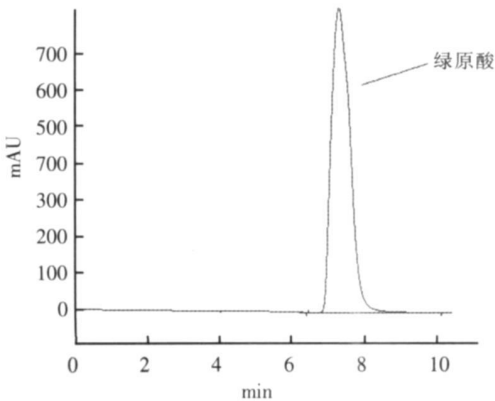


图 1 绿原酸标准品的 HPLC 图

Fig.1 HPLC graph of the the standard sample of chlorogenic acid

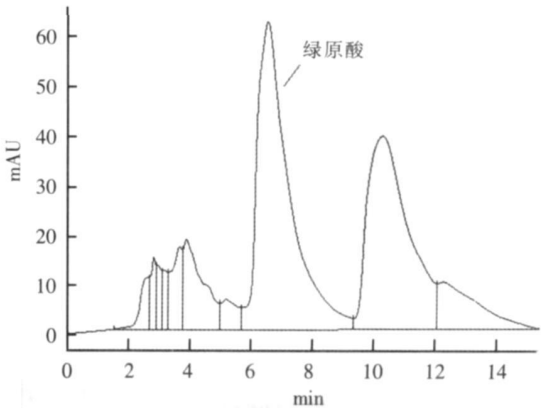


图 2 豚草提取液的 HPLC 分析图

Fig.2 HPLC graph of *Ambrosia artemisiifolia* L. extraction

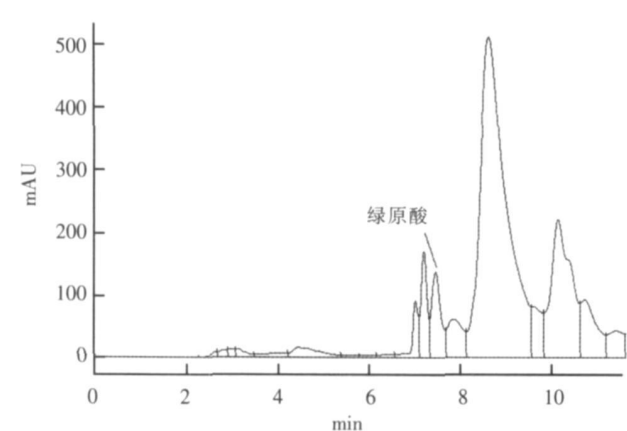


图 3 小蓬草提取液的 HPLC 分析

Fig.3 HPLC graph of *Conyza Canadensis* extraction

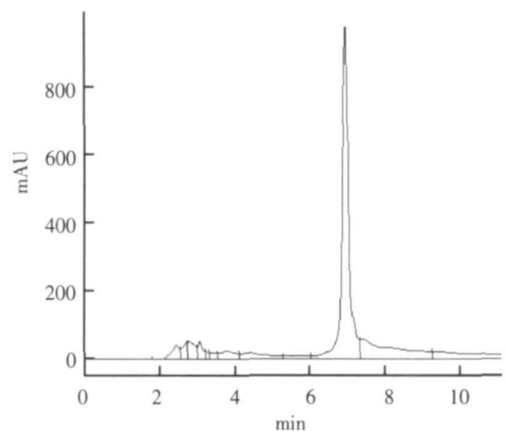


图 4 龙葵提取液的 HPLC 分析

Fig.4 HPLC graph of *Solanum americanum* Miller extraction

根据绿原酸提取率的计算公式计算, 豚草叶中绿原酸含量为 0.927mg/g(图 2 中的 7.503 min 峰为绿原酸). 此外还有一含量较高的未知成分物质(主峰).

图 3 小蓬草中的绿原酸含量为 6.460mg/g 比豚草中绿原酸的含量还高, 检测中也发现有一未知主峰, 含量较大. 由图 4 可见, 在龙葵提取液中没有检测出绿原酸, 但在 6.9min 左右检测出一个含量极高的未知峰, 这些含量较高的未知物是否为多酚类有机酸(如咖啡酸)值得进一步研究.

3.2 不同季节月份对豚草叶中的绿原酸含量的影响

豚草是一种典型的短日照喜光植物, 当夏至过后, 随着日照时间的缩短而迅速进入花期. 所以 5~6 月为营养生长期, 7~8 月为现蕾开花期, 9~10 月为种子成熟期^[9]. 本工作测定了 5-10 月份豚草叶中绿原酸含量, 结果如图 5 所示.

由图 5 可见, 5~7 月份豚草叶中绿原酸含量逐渐增加并在 7 月份达到最高值 (1.160mg/g), 8 月份也较高 (0.947mg/g), 此两月为开花期, 豚草次级代谢旺盛, 积累的绿原酸含量较高, 之后 9~10 月份含量大为减少, 仅为 7 月份含量的 30% 左右. 所以无论从提取绿原酸还是从阻断豚草传播的角度考虑, 开花期阶段是收获的最有利时期.

3.3 豚草不同部位绿原酸的含量

在我国入侵杂草中, 豚草列于首位清除对象, 每年人们要花费大量的人力与物力对其进行清除, 而清除下来的豚草气味浓烈难闻, 干后呈毛刺状, 适当的无害化处理与利用是现实中摆在人们面前的问题.

本工作对豚草中不同部位的绿原酸量作进一步的探讨, 以期将清除豚草得到的物料有效地利用, 化害为利, 测定结果见表 2 所示.

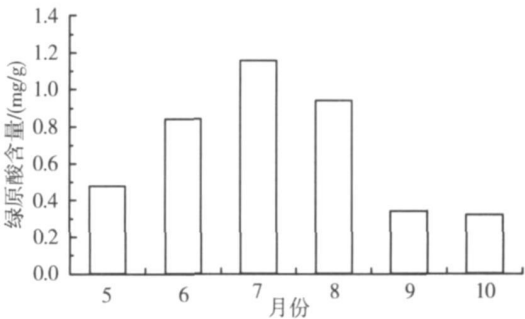


图 5 不同月份对豚草叶中的绿原酸含量的影响

Fig.5 The effect of different months to content of chlorogenic acid in leaves of *Ambrosia artemisiifolia* L.

表 2 豚草不同部位绿原酸的含量

| Table 2 Content of chlogrenic acid in different parts of <i>Ambrosia artemisiifolia</i> L. | | | | | |
|--|----|-------|-------|-------|-------|
| 豚草部位 | | 叶 | 茎 | 花 | 根 |
| 绿源酸含量 (mg/g 干重) | 7月 | 1.160 | 0.494 | 0.559 | 0.232 |
| | 9月 | 0.345 | 0.142 | 0.158 | - |

注: “-”为未检出

由表 2 可见, 豚草各部位绿原酸的含量有所不同, 其中以叶中最多, 花和茎中含量相对较少. 绿原酸是植物的次级代谢产物, 叶与花是代谢较为旺盛的器官, 因此含量较高, 忍冬属植物也有类似现象^[10].

在 9 月份的开花期叶和茎中绿原酸含量降低为 0.345 和 0.142mg/g 与 7 月份相比大为减少, 而豚草的清除一般是在花期前, 因此利用此时的豚草提取绿原酸可得较高的产率.

3.4 不同处理方法的比较

绿原酸为典型的多酚类物质, 易被多酚氧化酶类分解, 从而使提取的绿原酸得率降低, 类似的情况如制红茶与绿茶的两种工艺中, 制绿茶时因有杀青工序使茶多酚总量保存较多, 而发酵工序使红茶中茶多酚类总量下降了 43.8%^[11]. 因此, 实验设计对豚草鲜叶做了两种不同的处理: 一种自然风干处理, 另外一种为杀青处理, 杀青的目的是迅速破坏多酚氧化酶等的活性. 结果表明: 经杀青处理的豚草叶提取的绿原酸 (1.16 mg/g) 含量比自然风干的豚草叶含量 (0.927 mg/g) 高 25.1%. 因此在以分离绿原酸为目的时, 及时的杀青处理可保存更多的绿原酸.

3.5 提取时间对提取量的影响

传统的绿原酸提取方法有水提醇沉, 醇提铅沉, 超声波或微波辅助提取等方法^[12]. 本工作采用超声波辅助提取方法. 绿原酸的提取一般采用温度 50℃、pH 4.0 的条件^[13], 但提取时间在文献报道中不尽相同, 如以杜仲原料提取绿原酸处理为 30 min^[13], 以金银花原料提取绿原酸处理为 30 min^[14], 豚草茎中提取绿原酸为 70 min^[2]. 本实验设计了处理时间分别为 10 20 30 40 50 60 min 的实验, 以探讨超声波处理时间对提取量的影响, 结果如图 6 所示.

从图 6 可见, 10~20 min 内绿原酸提取率是呈上升的趋势, 20 min 以后到 60 min 之间变化不大, 说明在实验条件下, 绿原酸在 20 min 内已基本提取出来. 超声波是一种均匀的球面机械波, 以独特的作用形式——空化作用在液体内部产生强烈的冲击波和微射流, 使细胞内组分渗透到溶液中, 从而达到分离的目的^[12]. 本样品粉碎度较高 (40 目), 绿原酸溶出速度较快, 过长的提取时间有可能增加绿原酸的分解量, 因此选取 20 min 的提取时间能提高设备利用率.

3.6 提取剩余物的生物转化

提取剩余物仍需进一步利用. 本课题组在利用烟草提取绿原酸后, 对剩余物料用微生物发酵剂转化^[6], 使之成为可用于无公害绿色食品生产用的优质有机肥^[15]. 从这一思路出发, 在提取剩余物中加上适量的无机盐等配成培养基, 接入间型脉孢菌, 在 28℃ 培养. 结果表明脉孢菌在其上生长迅速, 2 d 后即可见到白色菌丝, 3 d 后物料基本被菌丝包裹, 并开始有桔黄色孢子产生, 培养 4 d 后, 脉孢菌金黄色的孢子铺满了整个物料, 培养基内部颜色由浅绿色变为棕黑色, 豚草原有浓烈的气味大为减弱甚至消失.

发酵 2 d 后物料中 CMC 酶 (pH 4.6) 和蛋白酶 (pH 7.0) 分别达到 5 503.9 7 926.4 U/g 为相同培养条件下用蔗渣、麸皮培养基发酵产生相应酶活力的 1.87 倍和 1.12 倍. 此外 4 d 后发酵物料中类胡萝卜素的含量也达 126.6 μg/g. 由于脉孢菌酶系丰富^[16], 能有效地降解转化植物纤维素原料并增加转化物料中的酶含量. 因此用脉孢菌转化豚草提取剩余物, 有作为生产酶或提取类胡萝卜素原料的潜力, 提取后的残渣还可作为有机肥, 物料可得到充分的利用.

4 结论

(1) 本工作所测定的南京所产豚草叶、花、茎中绿原酸含量在 7 月份开花前分别为 1.160 0.559 和 0.494 mg/g 9 月份开花期降低为 0.345 0.158 和 0.142 mg/g 与 7 月份的含量相比有所减少.

(2) 测定不同月份豚草叶中绿原酸含量, 以 7 月份的花前期最高, 8 月份次之, 含量分别为 1.160 和 0.947 mg/g

(3) 经杀青处理的豚草叶, 绿原酸提取量比自然风干的豚草叶提取量高 25.1%, 分别为 1.16 和 0.927 mg/g 因此杀青处理有利于绿原酸的保存.

(4) 实验条件下, 超声波辅助提取的作用时间以 20 min 较为适宜, 而延长时间并不能提高绿原酸提取率.

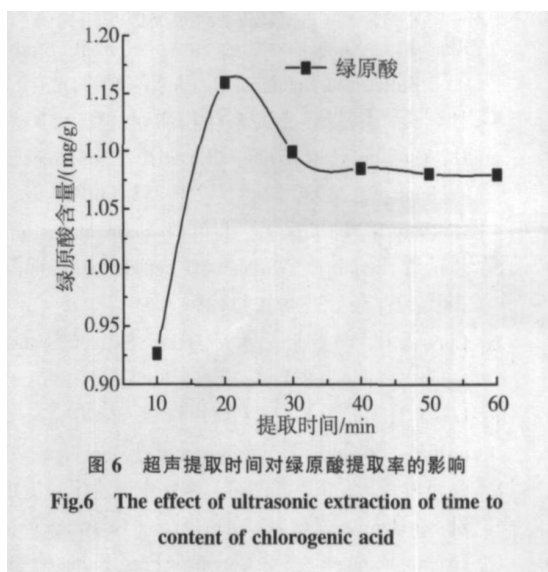


图 6 超声提取时间对绿原酸提取率的影响

Fig.6 The effect of ultrasonic extraction of time to content of chlorogenic acid

(5) 间型脉孢菌能够对豚草提取剩余物快速转化, 转化 2 d 后物料中的 CMC 酶 (pH 4.6) 活力达到 5 503.9 U/g 蛋白酶 (pH 7.0) 活力达到 7 926.4 U/g 转化 4 d 后类胡萝卜素含量可达到 126.6 μg/g 有作为产酶原料的潜力, 同时降解后的物料也可作为有机肥。

[参考文献] (References)

- [1] 陈永亭, 吴降星, 陆军良. 豚草的生物学特性及防除 [J]. 安徽农学通报, 2006, 12(4): 136
Chen Yongting Wu Jiangxing Lu Junliang Biological characteristics and prevention of *Ambrosia artemisiifolia* L [J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2006, 12(4): 136 (in Chinese)
- [2] 赵昕, 袁晓颖, 付玉杰, 等. 高效液相色谱法测定豚草茎中绿原酸含量的研究 [J]. 植物研究, 2003, 23(2): 185-188
Zhao Xin Yuan Xiaoying Fu Yujie et al Study on the content of chlorogenic acid from *Ambrosia artemisiifolia* L. by HPLC [J]. Bulletin of Botanical Research, 2003, 23(2): 185-188 (in Chinese)
- [3] 杜延兵, 裴爱泳. 绿原酸生物活性、资源及其提取纯化 [J]. 现代食品科技, 2006, 22(2): 250-252
Du Yanbing Qiu Aiyong Bioactivity resources extraction and purification of chlorogenic acid [J]. Modern Food Science and Technology, 2006, 22(2): 250-252 (in Chinese)
- [4] Holliday R, Phillips K. Health benefits of the sunflower kernel [J]. Cereal Foods World, 2001, 46(5): 205-208
- [5] Jiang Y, Satoh K, Watanabe S et al Inhibition of chlorogenic acid-induced cytotoxicity by CoCl₂ [J]. Anticancer Research, 2001, 21(5): 3349-3353
- [6] Chen YR, Yu QJ, Li XM, et al Extraction and HPLC characterisation of chlorogenic acid from tobacco residues [J]. Separation Science and Technology, 2007, 42(15): 3481-3492
- [7] Lee YJ, Kim BK, Lee BH, et al Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(2): 378-386
- [8] 张寒俊, 刘大川, 杨国燕. 紫外光谱法定量测定不同种蛋白酶活力的研究 [J]. 粮食与饲料工业, 2004(9): 44-45
Zhang Hanjun Liu Dachuan Yang Guoyan Exploring the way of determining the activity of the different proteases by UV spectrophotometry [J]. Cereal & Feed Industry, 2004(9): 44-45 (in Chinese)
- [9] 王建军, 赵宝玉, 李明涛, 等. 生态入侵植物豚草及其综合防治 [J]. 草业科学, 2006, 23(4): 71-75
Wang Jianjun Zhao Baoyu Li Mingtao et al Ecological invasion plant Bitterweed (*Ambrosia artemisiifolia*) and integrated control strategy [J]. Pratacultural Science, 2006, 23(4): 71-75 (in Chinese).
- [10] 于华忠, 李国章, 李贵, 等. 不同品种忍冬及不同部位中绿原酸的含量测定 [J]. 食品研究与开发, 2004, 25(6): 108-109
Yu Huazhong Li Guozhang Li Gui et al Determination of the content of chlorogenic acid in different species and parts of *onicera japonica* thunb [J]. Food Research and Development, 2004, 25(6): 108-109 (in Chinese)
- [11] 李大祥, 方世辉, 杨荣俊, 等. 绿茶、红茶加工工艺对茶鲜叶中多酚类物质的影响 [J]. 中国茶叶加工, 2005(4): 23-29
Li Daxiang Fang Shihui Yang Rongjun et al The effect of processing craft to tea polyphenols in fresh leaf of green tea and black tea [J]. China Tea Processing, 2005(4): 23-29 (in Chinese)
- [12] 邓良, 袁华, 喻宗沅. 绿原酸的研究进展 [J]. 化学与生物工程, 2005(7): 4-6
Deng Liang Yuan Hua Yu Zongyuan Research progress of chlorogenic acid [J]. Chemistry & Bioengineering, 2005(7): 4-6 (in Chinese)
- [13] 陈晓娟, 周春山, 魏巍. 杜仲叶中绿原酸和黄酮不同提取方法的比较 [J]. 中国生化药物杂志, 2006, 27(1): 38-40
Chen Xiaojuan Zhou Chunshan Wei Wei The comparison between different extractions of chlorogenic acid and flavonoid in *Eucommia ulmoides* olive [J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2006, 27(1): 38-40 (in Chinese)
- [14] 尹波, 王科军. 超声波法提取金银花中的绿原酸 [J]. 林产化工通讯, 2005, 39(1): 14-16
Yin Bo Wang Kejun Study on ultrasonic extraction of chlorogenic acid from *onicera japonica* thunb [J]. Journal of Chemical Industry of Forest Products, 2005, 39(1): 14-16 (in Chinese)
- [15] 陈育如, 骆跃军, 李雪梅. 烟草作为制备绿原酸原料的应用及制备绿原酸方法: 中国, ZL 200410065240.6 [P]. 2004-11-04
Chen Yun Luo Yuejun Li Xuemei The application and method preparation of chlorogenic acid using tobacco waste as material China ZL 200410065240.6 [P]. 2004-11-04 (in Chinese)
- [16] Xios C, Topakas E, Katapodis P, et al Hydrolysis and fermentation of brewers spent grain by *Neurospora crassa* [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(3): 5427-5435

[责任编辑: 严海琳]