

## • 专论与综述 •

## 高速逆流色谱在中药现代化研究中的应用

韩利文<sup>1,2</sup>, 陈锡强<sup>1</sup>, 袁延强<sup>1</sup>, 何秋霞<sup>1</sup>, 楚杰<sup>1</sup>, 王祖林<sup>1</sup>, 王思锋<sup>1</sup>, 刘可春<sup>1\*</sup>

(1. 山东省科学院生物研究所, 山东 济南 250014; 2. 天津中医药大学中药学院, 天津 300193)

**摘要:** 中药复杂成分体系的科学阐述是中药现代化研究中的重中之重和难点所在。高速逆流色谱是最近 20 多年发展起来的新型液-液分配技术, 是解决中药及天然产物中化学成分方面的一项新兴的关键技术。简要介绍高速逆流色谱在中药现代化研究中如成分分离(单体分离、系统成分分离、标准品或对照品制备等)、质量控制、药物筛选以及中药复方的研究进展。

**关键词:** 高速逆流色谱; 中药现代化; 分离精制; 质量控制; 药物筛选

**中图分类号:** R284.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1674-5515(2010)04-0241-06

### Application of high speed countercurrent chromatography to research of modern Chinese medicine

HAN Li-wen<sup>1,2</sup>, CHEN Xi-qiang<sup>1</sup>, YUAN Yan-qiang<sup>1</sup>, HE Qiu-xia<sup>1</sup>, CHU Jie<sup>1</sup>,  
WANG Zu-lin<sup>1</sup>, WANG Si-feng<sup>1</sup>, LIU Ke-chun<sup>1</sup>

(1. Institute of Biology, Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China;

2. Tianjin university of Traditional Chinese Medicine, Tianjin, 300193, China)

**Abstract:** Scientific explanation of complex compounds of Chinese medicine is the first priority and a major difficult problem in modernization of traditional Chinese medicine. As a new liquid-liquid distributing technology developed within the past two decades, high speed countercurrent chromatography (HSCCC) has been proved a key technology to study complex compounds in traditional Chinese medicine and natural products. This paper reviews the application of HSCCC in some fields of traditional Chinese medicine such as compound separation (separation of single compound, systematic separation, and preparation of standard samples), quality control, drug screening and study on Chinese compound prescriptions.

**Key words:** high speed countercurrent chromatography; traditional Chinese medicine modernization; separation and purification; quality control; drug screening

中药现代化就是在继承和发扬中医药优势和特色的基础上, 充分利用现代科学技术的方法和手段, 借鉴国际通行的医药标准和规范, 研究、开发能够合法进入国际医药主流市场的现代化中药产品, 以提高中药在国际市场的竞争力。中药现代化是一个系统工程, 是需要逐步发展、逐步完善和充实的长期工程。从化学的角度看, 每一味中药都是数以百计, 甚至数以千计的化学成分集合体, 大量的有

效成分以及辅助成分构成了复杂的成分体系。而阐明这种大成分体系的组成和功效, 也成为中药现代化研究的重中之重和难点所在。高速逆流色谱(High Speed Countercurrent Chromatography, HSCCC)就是解决中药及天然产物中化学成分方面的一项新兴的关键技术。

HSCCC 是由美国国立卫生院 Ito 博士研制开发的新型色谱技术, 由于该技术不需要固体辅料, 因

作者简介 韩利文(1980—), 男, 在读博士, 研究方向为药物代谢动力学及代谢组学。E-mail: hanliwen08@yahoo.com.cn

\* 通讯作者 刘可春, 博士, 研究员。E-mail: hliukch@keylab.net

而避免了因不可逆吸附引起的样品损失、失活、变性等,特别适合于天然生物活性成分的分

离。在过去的二三十年中 HSCCC 发展十分迅速,产生了一系列新型的分离技术,积累了大量的科研成果。笔者主要就 HSCCC 在中药成分分离、中药质量控制、药物筛选、中药复方研究等方面的应用以及在中药现代化进程中的作用进行综述。

## 1 HSCCC 应用于中药成分分离

### 1.1 应用于单体成分的分

从中药中分离得到一种或几种单体成分 HSCCC 应用于中药领域最早、最重要的方面。中药里成分复杂,传统的分离精制手段面临许多困难和问题。因为人们感兴趣的活性物质通常仅以很低的量存在于极其复杂的基质当中,因此色谱方法一直是天然产物分离精制中的主要手段,尤其是高效液相色谱法,在复杂混合物的分离中可以达到很高的分辨率。但是,目标物质在固体填料表面上的不可逆吸附和变性是固相载体色谱所遇到的共同问题。Peng 等<sup>[1]</sup>采用 HSCCC 与制备液相 (RPLC) 2 种方法对绶草属植物 *Spiranthes australis* (R. Brown) Lindl 中 3 个成分 5-hydroxyl-7,4'-dimethoxyflavone、5-hydroxyl-7,3',4'-dimethoxyflavone 和 5- $\gamma$ , $\gamma$ -dimethylallyl-8-[2-(2,6-dihydroxyphenyl)-3-dimethylbut-2-enyl]-umbelliferon 进行分离,通过对分离时间、溶剂消耗、上样量、产率、回收率、纯度等方面进行二者分离性能的比较,结果显示 HSCCC 能够一步分离获得的 3 个成分,一次试验时间 240 min,化合物质量分数达到 97% 以上,回收率超过 91%; 而用 RPLC 法多次上柱,化合物质量分数为 98.5% 以上,回收率低于 75%,所用时间为 HSCCC 的 7~13 倍,充分体现了 HSCCC 在中药成分分离中的技术优势。目前国内外的研究人员已经从延胡索<sup>[2]</sup>、乌头<sup>[3]</sup>、淫羊藿<sup>[4]</sup>、黄芪<sup>[5]</sup>、芦荟<sup>[6]</sup>、银杏叶<sup>[7]</sup>、白芍<sup>[8]</sup>、钩藤<sup>[9]</sup>、曼地亚红豆杉<sup>[10]</sup>、广陈皮<sup>[11]</sup>等 50 多种传统中药中利用 HSCCC 技术分离到四氢掌叶防己碱、关附甲素、淫羊藿苷、毛蕊异黄酮等数百种成分。

随着研究的深入,越来越多的研究者已经将 HSCCC 成功地应用于用常规分离技术难于分离的大极性分子,如皂苷类、多酚类化合物。多酚类化合物在天然产物中广泛存在,具有诸多的生物活性。葡萄籽中的二聚体或四聚体原花青素对于常规柱色谱以及常规的色谱填料来说,都是一个极大的挑战。

原花青素中的酚羟基暴露后极不稳定,而且会与硅胶柱填料发生死吸附。Kohler 等<sup>[12]</sup>使用醋酸乙酯-异丙醇-水 (40:1:40)、(20:1:20),醋酸乙酯-正丁醇-水 (14:1:15) 体系成功分离到二聚体原花青素表儿茶素-(4 $\beta$ →8)-儿茶素、表儿茶素-(4 $\beta$ →8)-表儿茶素、儿茶素-(4 $\alpha$ →8)-儿茶素、儿茶素-(4 $\alpha$ →8)-表儿茶素、表儿茶素-(4 $\beta$ →6)-表儿茶素、表儿茶素-(4 $\beta$ →8)-儿茶素、表儿茶素没食子酸酯-(4 $\beta$ →8)-儿茶素、三聚体原花青素表儿茶素-(4 $\beta$ →8)-表儿茶素-(4 $\beta$ →8)-表儿茶素,四聚体原花青素 cinnamtannin A2, 为这类不稳定的多羟基化合物的分离提供了新的思路。酚酸类化合物被认为是重要的活性成分, Yang 等<sup>[13]</sup>采用正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水 (1:2:1:2) 作为溶剂体系,从 250 mg 菝葜提取物中得到没食子酸 26.7 mg、原儿茶酸 16.5 mg、咖啡酸 21.8 mg、龙胆酸 31.3 mg、反式-2-羟基肉桂酸 24.1 mg,所有单体质量分数均在 98% 以上。此外,三七中的皂苷类通过 HSCCC 分离后,仅一步就从三七粗提取物中分离得到人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 共 4 个单体<sup>[14]</sup>。

HSCCC 不仅适用于已知的化学成分的定向获得,在新化合物的发现方面也有独特的优势。Liu 等<sup>[15-16]</sup>在白花前胡和紫花前胡的研究中,从石油醚部位中分离到包括 qianhucoumarin D、decursidin 等在内的 10 个单体,其中 Pd-D-V 是首次以纯化合物形式分离得到,欧芹素 (ostruthin) 首次从紫花前胡中分离得到,且提取量不低。笔者认为这可能是由于该化合物在常规分离过程中易发生变化或易形成死吸附,这也说明了 HSCCC 方法的优越性。

一些基于 HSCCC 的新技术的不断开发,拓宽了 HSCCC 在植物药活性成分分离中的应用范围,如两相梯度洗脱<sup>[17]</sup>、pH 梯度洗脱<sup>[18]</sup>、pH 区带逆流色谱<sup>[19-21]</sup>、离子对逆流色谱法、二元模式逆流色谱法等。Tong 等<sup>[19]</sup>报道了利用 pH 区带逆流色谱法从金银花中分离绿原酸以及另外两个同分异构体 3,5-二咖啡酰奎宁酸与 3,4-二咖啡酰奎宁酸,采用甲基叔丁基醚-乙腈-水 (2:2:3) 作为溶剂系统, TFA 加入上相中作为保留剂 (终浓度为 10 mmol/L, pH 2.6), 氨水加入到下相中作为洗脱剂 (终浓度为 8 mmol/L, pH 10.1), 3 种成分由于 pKa 值不同,在 TFA 的尖峰后形成 3 个明显的“平台”区段,绿原酸的 pKa 值最小 (3.58~3.11), 所以最先被洗脱出来,然后依次是 3,4-二咖啡酰奎宁酸和 3,5-二咖啡酰

奎宁酸, 进样量从 323 mg 增加到 2.136 g, 3 种化合物质量分数不降低, 显示了极大的技术优势。离子对逆流色谱需在固定相中加入配位体, 提高固定相的保留值。可用于中药或天然产物中的多肽、儿茶酚胺以及花青素的分离<sup>[22]</sup>。二元模式逆流色谱法是以同一两相分配溶剂系统洗脱, 既可用于正相洗脱也可用于反相洗脱。此特征大大增加了 HSCCC 对化合物极性范围的适应性, 普遍地用于天然产物的分离精制<sup>[23]</sup>。

常规的溶剂体系大都含有有机相, 不适合用于强极性化合物的分离, 特别是蛋白质等生物大分子的分离。近年来, Ito 等<sup>[24]</sup>提出一种螺线型圆盘柱的柱体设计, 通过螺距的快速增长实现径向离心力的快速梯度增长。以此代替 HSCCC 的螺旋管柱, 可以使含有机相的极性溶剂体系和双水相聚合物体系都能达到良好的固定相保留, 尤其是对双水相聚合物体系的保留有了显著的提高, 可以从原来的 10% 提高到 70% 以上, 有望发展成为一种既适用于天然小分子物质又适用于大分子物质分离的新型逆流色谱仪器, 解决极性小分子成分以及水溶性大分子成分的分离精制问题。另外, 胡光辉等<sup>[25]</sup>报道利用实验室自行设计研制的 J 型螺旋槽圆盘柱逆流色谱系统对正丁醇-醋酸-水体系和聚乙二醇 (PEG1000) - 磷酸盐-水双水相体系的保留能力进行考察, 发现其保留能力较传统的螺旋管逆流色谱柱有显著提高。采用正丁醇-醋酸-水 (4:1:5) 和 PEG1000-磷酸钾盐-水 (12.5:12.5:75, 质量比) (pH9.0) 体系可以在较高的流动相体流量和较高的固定相保留下分别实现对亮氨酸-酪氨酸 (Leu-Tyr) 和缬氨酸-酪氨酸 (Val-Tyr) 二肽混合物、细胞色素 C 与肌红蛋白混合物、肌红蛋白与溶菌酶混合物及鸡蛋清样品中蛋白成分的成功分离。

### 1.2 应用于中药成分的系统分离

天然药物的总提取物往往含有从脂溶性到水溶性的具有广泛极性的一系列化学成分, 若仅仅对其中主要成分进行 HSCCC 分离, 不仅无法全面反映与活性相关的物质基础, 而且以一种溶剂系统也难以一次性实现彻底的分离。若采用传统的系统溶剂分离法, 将总提取物用不同的溶剂逐步划分为极性从小到大的不同部位, 再针对不同部位, 使用不同 HSCCC 溶剂系统进一步分离, 不仅可以加快整体分离速度, 而且有利于追踪主要活性部位, 加大有效先导化合物的发现几率,

从而使得全部分离工作的系统性、针对性和完整性得到增强, 最终将促进 HSCCC 技术成为天然产物化学研究中的常规分离手段, 加快天然药物化学研究现代化步伐。Yao 等<sup>[23]</sup>采用系统分离的策略, 对何首乌的 95%乙醇提取物分别用乙醚、正丁醇萃取, 得到乙醚部位、正丁醇部位和水 3 个部分, 将化合物按照极性分成 3 部分, 其中乙醚部位正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水 (3:7:5:5) → (9:1:5:5) 分步洗脱分离到大黄素 (rhein, 3.2 mg)、6-羟基-大黄素 (6-OH-emodin, 5.4 mg)、大黄素 (48.5 mg)、大黄酚 (chrysophanol, 15.7 mg) 4 个成分; 正丁醇部位用醋酸乙酯-甲醇-水 (50:1:50) 的正反向洗脱结合的方法, 得到 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-β-D-葡萄糖苷 (2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-β-D-glucoside, 56.4 mg)、大黄素-8-β-D-葡萄糖苷 (emodin-8-β-D-glucoside, 11.9 mg)、没食子酸 (gallic acid, 3.7 mg)、何首乌乙素 (poly-gonimitin B, 7.2 g) 和一个未知成分; 水层用醋酸乙酯-正丁醇-水 (20:1:20) 系统也分离得到何首乌乙素 (7.2 g)。Chu 等<sup>[17]</sup>采用另外一种方法对虎杖中蒽醌类成分进行系统分离, 即使用石油醚-醋酸乙酯-甲醇-水 (2:5:4:6) 对虎杖粗提物进行分配, 将粗提物划分为极性部分 (下相, 样品 1) 和低极性部分 (上相, 样品 2), 样品 1 采用石油醚-醋酸乙酯-水 (1:5:5) 分离到白藜芦醇葡萄糖苷 (piceid) 和蒽苷 B (anthrax-glycoside B) 2 种成分, 样品 2 采用石油醚-醋酸乙酯-甲醇-水 (3:5:4:6) → (3:5:7:3) 梯度洗脱分离到白藜芦醇 (resveratrol)、大黄素和大黄素甲醚 (physcion) 3 种成分, 这 5 种成分的质量分数均在 95% 以上。

### 1.3 应用于中药标准品及对照品研究

随着中药现代化和标准化进程的推进, 化学对照品的需求量急剧增长。目前国际市场上可用于质量控制的植物活性成分对照品及标准品仍然非常缺乏, 且价格昂贵。传统的标准对照品制备方法费时、费力、产率低、纯度低、成本高且工艺复杂。从具备的优点和目前仪器的制备规模来看, HSCCC 非常适合于高纯度活性成分单体的制备。北京工商大学曹学丽教授曾参与了我国最早的十余种经国家质量技术监督检验检疫局审定的天然有效成分国家标准样品的研制工作, 其中几乎全都用到了 HSCCC。这些标准品包括山柰酚、

异鼠李素、槲皮素、淫羊藿苷、表儿茶素鞣酸酯(EGCG)、表儿茶素鞣酸酯(ECG)、儿茶素鞣酸酯(GCG)、白藜芦醇、白藜芦醇苷、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯苷、葛根素、3'-甲氧基葛根素等。北京天宝物华生物技术有限公司和上海同田生化有限公司是国内拥有自主知识产权能够生产逆流色谱仪的企业,并且依托 HSCCC 的技术优势,目前已经能够提供 600 余种中药对照品。北京天宝物华公司还作为国家标准样品技术委员会天然产物标样专业工作组的技术依托单位,承担“天然产物国家标准样品库”和“天然产物标准样品专业工作组秘书处”的组织管理工作,并被授权为首家国家天然产物标准样品经销单位。在此基础上山东省科学院分析测试中心王晓课题组利用 HSCCC 技术在天然产物对照品及标准品方面进行了大量工作,其中补骨脂素、异补骨脂素、厚朴酚、和厚朴酚、牛蒡子苷、白鲜碱、鞣酮、黄柏酮、松果菊苷、芒柄花素、鹰嘴豆芽素 A、异槲皮苷、京尼平苷等 13 种成分获得了国家标准样品证书<sup>[26-27]</sup>。

#### 1.4 应用于中药成分的工业放大生产

石杉碱甲是从中国特有植物千层塔(蛇足石杉)中提取的一种生物碱,是中国独创的一种世界级新药,属于可逆性胆碱酯酶抑制剂,是目前治疗良性记忆障碍和早老性痴呆症最为安全有效的药物之一。石杉碱甲单体在千层塔干燥全草中的质量分数约为 0.02%,且常伴有成分复杂、结构相似的共生生物碱,应用常规的分离方法难以大量获得。目前采用的生产方法为溶剂法,产品得率低,生产周期长;有机合成石杉碱甲由于技术问题尚未获得突破。以千层塔提取物为原料,利用 HSCCC 对石杉碱甲单体的制备进行研究获得重大突破。陈建华等<sup>[28]</sup>对 HSCCC 溶剂体系的选择、分离样品的预处理、高速逆流色谱主要工艺参数(温度、转速及体积流量)的优化及工艺的产业化拓展进行研究,取得一种分离周期短、产品质量分数高、分离量大且稳定的工艺路线。上海同田公司也利用 HSCCC 建成产量达千克级以上的生产线并已投入使用,年产量达 20 kg 以上,为天然产物单体的大规模生产奠定了基础。

## 2 HSCCC 应用于中药质量控制

中药材的主要活性成分是次生代谢物,对后

天的生长环境依赖性很强,使得活性成分的种类和产量因地域、气候及采收期而有较大的差异。中药指纹图谱已经成为国际公认的一种针对复杂成分体系的质量控制手段。各种色谱及其联用技术是指纹图谱最重要的技术手段。近年来随着逆流色谱技术的迅猛发展,分析型 HSCCC 已经应用到中药指纹图谱研究中,以此控制中药(材)的品质。分析型 HSCCC 与制备型 HSCCC 之间应该说没有严格的界定,但是通常将螺旋管柱的内径 $\leq 1\text{ mm}$ ,柱体积 $\leq 50\text{ mL}$ 的多层螺旋管行星式管离心分离仪称为分析型高速逆流色谱仪。分析型 HSCCC 继承了 HSCCC 的诸多与生俱来的优点,对于一些天然活性成分的分离可以达到很高的分离度,且重现性良好,将其用于中药指纹图谱研究更能全面地反映其中活性成分的本来面目,这些对于中药化学指纹图谱分析非常重要,已有用何首乌、沙棘、雪莲、丹参等中药或提取物的指纹图谱研究。Gu 等<sup>[29]</sup>比较了 HSCCC 和非水毛细管电泳(NACE)2种色谱技术建立的中药丹参的指纹图谱优劣。在实验条件下,NACE 出现了 7 个特征峰;而 HSCCC 出现了 12 个特征峰,组分(未经任何后处理)质量最大达到 92%,与标准品比较,证明 12 个组分中包含丹参酮 I、丹参酮 II<sub>A</sub>和隐丹参酮,显示了良好的分离度和更多的化学成分信息。

## 3 HSCCC 应用于药物筛选

在天然新药的发现和筛选中,为了最大限度地保留粗提取物中可能存在的活性成分,必须采用温和而高效的分离技术,以保证低质量浓度的活性成分最大程度地保留。因此,HSCCC 在很多以天然产物为来源的药物研究中被作为对粗提取物进行初步分离的首选方法,在活性试验的指导下进行活性成分的跟踪和筛选。如从天然植物、微生物培养液以及海洋天然产物等复杂来源的基质中进行新的药物活性成分的筛选时,都有 HSCCC 的应用。Si 等<sup>[30]</sup>发现中国绿茶提取物能够强烈地抑制食物源性的病原体如出血性大肠杆菌 O157:H7、鼠伤寒沙门菌 DT104、单核增生性李斯特菌、金黄色葡萄球菌、蜡状芽孢杆菌,进而采用基于 HSCCC 的生物活性指导的分离追踪模式,获得 4 个活性成分 ECG、EGCG、表儿茶素和咖啡因,其中 ECG 和 EGCG 活性最

强,特别是 EGCG 对金黄色葡萄球菌的  $MIC_{90}$  值为 58 mg/L,对耐甲氧西林金葡菌的  $MIC_{90}$  值为 37 mg/L。Peng 等<sup>[31]</sup>利用 HSCCC 技术从白花败酱中分离得到 6 个黄酮类化合物,其中(2S)-5,7,2',6'-tetrahydroxy-6-lavandulylated flavanone (2)、(2S)-5,7,2',6'-tetrahydroxy-4'-lavandulylated flavanone (3)、(2S)-5,2',6'-trihydroxy-2'',2''-dimethylpyrano[5'',6'':6,7]flavanone、(2S, 3''S)-5,2',6'-trihydroxy-3''- $\gamma,\gamma$ -dimethylallyl-2'',2''-dimethyl-3'',4''-dihydropyrano[5'',6'':6,7]flavanone 等 4 个为新成分。其中(2S)-5,7,2',6'-tetrahydroxy-6,8-di( $\gamma,\gamma$ -dimethylallyl)flavanone、化合物 2 和 3 显示了明显的抗肿瘤活性,特别是对 K562 肿瘤细胞株具有显著抑制作用( $IC_{50} < 3.1 \mu\text{g/mL}$ )。宋航娜等<sup>[32]</sup>发现散斑竹根兰的 60%乙醇提取物有抑制癌细胞 SW620 的作用,由于活性部位样品量少,常规分离手段受到限制,故采用 HSCCC 进行追踪分离,以正己烷-醋酸乙酯-乙醇-水组成二相系统作为固定相与流动相,分离出其中的抗癌活性成分 3-(4'-hydroxy-benzyl)-5,7-dihydroxy-6-methyl-8-methoxylchroman-4-one,质量分数可达 95%以上,体外抑制 SW620 细胞的  $IC_{50}$  为 32  $\mu\text{g/mL}$ 。

#### 4 HSCCC 应用于中药复方研究

复方是中医药精髓的集中体现。中药现代化的重中之重的任务就是利用现代科学技术揭示中药复方的药效成分、药理药效和作用机制。利用 HSCCC 按照极性段分离中药复方,分离制备每一部分,进一步利用 HPLC 或硅胶柱色谱分离分析,再用半制备或制备 HPLC 制备较纯的组分,利用 LC-MS(MS) 或 NMR 分析鉴定。这种思路从根本上克服了中药复方直接利用 HPLC 分离分析、HPLC-MS 检测的困难。这是研究中药复方物质基础的一种新方法。戴德舜等<sup>[33]</sup>利用化工热力学溶液理论,结合溶剂体系模型函数,设计了溶液体系软件,利用该软件使用 HSCCC 对经典方剂“桂枝汤”的具有双相调节的 A 部分进行了分离,得到 7 个部位,除部位 No.1、No.2 分离效率比较低之外,其余部位都达到比较理想的效果。

#### 5 小结

HSCCC 是一种独特的不用固态载体的连续液-液分配色谱制备分离技术,是一种能实现连续

有效分离的实用分离制备技术。自从 20 世纪 90 年代 HSCCC 技术创立以来,取得了迅猛发展,国内外每年都不断有新的 HSCCC 技术和应用涌现。传统中药若实现现代化、国际化,必须广泛吸纳先进的现代科学技术,建立适合于中药复杂成分体系的关键技术。HSCCC 由于其独特的优势,已经逐渐应用在中药新药研发、标准品制备、天然产物化学成分研究、质量控制、复方药效物质基础等各个领域。而且随着研究的进一步深入,HSCCC 也将会在中药现代化进程中发挥更大的作用。

#### 参考文献

- [1] Peng J Y, Zhan L B, Dong F Q, *et al.* A comparative study of chromatographic methods for separating chemical compounds from *Spiranthes australis* (R. Brown) Lindl roots [J]. Sep Sci Technol, 2008, 59 (3): 262-269.
- [2] Liu Z L, Yu Y, Shen P N, *et al.* Separation and purification of dl-tetrahydropalmatine from *Corydalis yanhusuo* by high-speed counter-current chromatography [J]. Sep Sci Technol, 2008, 58 (3): 343-346.
- [3] Tang Q F, Yang C H, Ye W C, *et al.* Preparative isolation and purification of bioactive constituents from *Aconitum coreanum* by high-speed counter-current chromatography coupled with evaporative light scattering detection [J]. J Chromatogr A, 2007, 1144 (2): 203-207.
- [4] Liu R M, Li A F, Sun A L, *et al.* Preparative isolation and purification of three flavonoids from the Chinese medicinal plant *Epimedium koreanum* Nakai by high-speed counter-current chromatography [J]. J Chromatogr A, 2005, 1064 (1): 53-57.
- [5] 马晓丰, 屠鹏飞, 陈英杰, 等. 高速逆流色谱法分离纯化黄芪中的芒柄花素和毛蕊异黄酮[J]. 色谱, 2005, 23 (3): 299-301.
- [6] Wan J Z, Chen X X, Qiu C M, *et al.* Isolation and purification of isoaloeresin D and aloin from *Aloe vera* by high-speed counter-current chromatography [J]. Chin Herb Med, 2010, 2 (2): 148-152.
- [7] 苏静, 谈锋, 李连强, 等. 高速逆流色谱法分离纯化银杏叶中白果内酯和银杏内酯 A、B、C[J]. 中草药, 2008, 39 (11): 1644-1648.
- [8] 黄天辉, 周俊. 高速逆流色谱分离纯化白芍中芍药苷的研究[J]. 中草药, 2009, 40 (1): 67-68.
- [9] 沈洁, 苏燕评, 许盈, 等. 高速逆流色谱分离纯化钩吻中钩吻素己和 1-甲氧基钩吻碱[J]. 中草药, 2009, 40 (9):

- 1392-1395.
- [10] 苏静, 谈锋, 谢峻, 等. 循环高速逆流色谱从曼地亚红豆杉枝叶提取物中分离紫杉醇和三尖杉宁碱[J]. 中草药, 2009, 40(10): 1569-1572.
- [11] 郑国栋, 周芳, 蒋林, 等. 高速逆流色谱分离制备广陈皮中多甲氧基黄酮类成分的研究[J]. 中草药, 2010, 41(1): 52-55.
- [12] Kohler N, Wray V, Winterhalter P. Preparative isolation of procyanidins from grape seed extracts by high-speed counter-current chromatography [J]. J Chromatogr A, 2008, 1177(1): 114-125.
- [13] Yang C H, Tang Q F, Liu J H, et al. Preparative isolation and purification of phenolic acids from *Smilax china* by high-speed counter-current chromatography [J]. Sep Sci Technol, 2008, 61(3): 474-478.
- [14] Du Q Z, Gerold J, Reiner W, et al. Isolation of dammarane saponins from *Panax notoginseng* by high-speed counter-current chromatography [J]. J Chromatogr A, 2003, 1008(2): 173-180.
- [15] Liu R M, Feng L, Sun A L, et al. Preparative isolation and purification of coumarins from *Peucedanum praeruptorum* Dunn by high-speed counter-current chromatography [J]. J Chromatogr A, 2004, 1057(1/2): 89-94.
- [16] Liu R M, Sun Q H, Shi Y R, et al. Isolation and purification of coumarin compounds from the root of *Peucedanum decursivum* (Miq.) Maxim by high-speed counter-current chromatography [J]. J Chromatogr A, 2005, 1076(1/2): 127-132.
- [17] Chu X, Sun A L, Liu R M. Preparative isolation and purification of five compounds from the Chinese medicinal herb *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc by high-speed counter-current chromatography [J]. J Chromatogr A, 2005, 1097(1/2): 33-39.
- [18] Liu Z, Du Q, Wang K, et al. Completed preparative separation of alkaloids from *Cephalotaxus fortunei* by step-pH-gradient high-speed counter-current chromatography [J]. J Chromatogr A, 2009, 1216(22): 4663-4667.
- [19] Tong S Q, Yan J Z, Guan Y X. Preparative separation of isomeric caffeoylquinic acids from *Flos Lonicerae* by pH-zone-refining counter-current chromatography [J]. J Chromatogr A, 2008, 1212(1/2): 48-53.
- [20] 童胜强, 盛柳青, 颜继忠, 等. pH梯度洗脱高速逆流色谱制备性分离决明子中的橙黄决明素和大黄酸[J]. 中国现代应用药学杂志, 2009, 26(5): 391-394.
- [21] Wang T T, Jiang X H, Yang L, et al. pH-gradient counter-current chromatography isolation of natural antioxidant chlorogenic acid from *Lonicera japonica* Thumb. using an upright coil planet centrifuge with three multi-layer coils connected in series [J]. J Chromatogr A, 2008, 1180(1/2): 53-58.
- [22] Wybraniec S, Stalica P, Jerz G, et al. Separation of polar betalain pigments from cacti fruits of *Hylocereus polyrhizus* by ion-pair high-speed counter-current chromatography [J]. J Chromatogr A, 2009, 16(41): 6890-6899.
- [23] Yao S, Li Y, Kong LY. Preparative isolation and purification of chemical constituents from the root of *Polygonum multiflorum* by high-speed counter-current chromatography [J]. J Chromatogr A, 2006, 1115(1/2): 64-71.
- [24] Ito Y, Qi L, Powell J, et al. Mixer-settler counter-current chromatography with a barricaded spiral disk assembly with glass beads [J]. J Chromatogr A, 2007, 1151(1/2): 108-114.
- [25] 胡光辉, 曹学丽. 螺旋槽圆盘柱高速逆流色谱及其在多肽和蛋白分离中的应用[J]. 生物工程学报, 2009, 25(4): 618-625.
- [26] Wang X, Lin Y L, Geng Y L. Preparative separation and purification of sesamin and sesamol from sesame seeds by high-speed counter-current chromatography [J]. Cereal Chem, 2009, 86(1): 23-25.
- [27] Wang X, Shi X G, Li F W. Application of analytical and preparative high-speed counter-current chromatography for the separation of Z-ligustilide from a crude extract of *Angelica sinensis* [J]. Phytochem Anal, 2008, 19(3): 193-197.
- [28] 陈建华, 黄少烈, 李忠. 高速逆流色谱技术制备石杉碱甲单体[J]. 中国现代应用药学杂志, 2006, 23(4): 295-297.
- [29] Gu M, Zhang S F, Su Z Q, et al. Fingerprinting of *Salvia miltiorrhiza* Bunge by non-aqueous capillary electrophoresis compared with high-speed counter-current chromatography [J]. J Chromatogr A, 2004, 1057(1/2): 133-140.
- [30] Si W, Gong J, Tsao R, et al. Bioassay-guided purification and identification of antimicrobial components in Chinese green tea extract [J]. J Chromatogr A, 2006, 1125(2): 204-210.
- [31] Peng J Y, Fan G R, Wu Y T. Preparative isolation of four new and two known flavonoids from the leaf of *Patrinia villosa* Juss. by counter-current chromatography and evaluation of their anticancer activities *in vitro* [J]. J Chromatogr A, 2006, 1115(1/2): 103-111.
- [32] 宋航娜, 陈书红. 高速逆流色谱法分离纯化散斑竹根兰中的抗癌活性成分[J]. 河北化工, 2009, 32(8): 45-46.
- [33] 戴德舜, 王义明, 罗国安. 高速逆流色谱溶剂体系软件在桂枝汤A部分研究中的应用[J]. 中成药, 2001, 23(9): 625-628.

(收稿日期 2010-05-10)