

高速逆流色谱法分离制备益母草中益母草碱

江敏红¹, 黄松涛¹, 胡 玥¹, 朱龙平^{1,2}, 尹 胜^{1,2}, 赵志敏^{1,2}, 王冬梅^{1,2*}

1. 中山大学药学院, 广东 广州 510006

2. 广东省现代中药工程技术研究开发中心, 广东 广州 510006

摘要: 目的 建立高速逆流色谱(HSCCC)技术高效快速地分离制备益母草中益母草碱的方法。方法 单因素实验优化益母草碱的提取工艺,而后考察不同的HSCCC溶剂体系,根据分配系数(K),确定溶剂体系为醋酸乙酯-正丁醇-水(3:2:5),以其上相为固定相,下相为流动相,转速850 r/min,体积流量2.2 mL/min,检测波长为277 nm,对益母草样品进行HSCCC分离。结果 益母草正丁醇萃取部位通过HSCCC可分离得到益母草碱,该方法成功应用于益母草粗提物中益母草碱的分离:1次HSCCC运行可从2.48 g益母草70%乙醇粗提物(益母草碱质量分数为3.01%)中分离得到68 mg益母草碱,质量分数为96.2%,得率为2.74%。结论 建立的方法可高效分离纯化益母草中的益母草碱,为得到高纯度的益母草碱提供了制备技术。

关键词: 高速逆流色谱技术; 益母草; 益母草碱; 分配系数; 制备技术

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)09-1778-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.09.013

Isolation and preparation of leonurine from *Leonurus japonicus* by high speed countercurrent chromatography

JIANG Min-hong¹, HUANG Song-tao¹, HU Yue¹, ZHU Long-ping^{1,2}, YIN Sheng^{1,2}, ZHAO Zhi-min^{1,2}, WANG Dong-mei^{1,2}

1. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-set University, Guangzhou 510006, China

2. Guangdong Technology Research Center for Advanced Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To establish a simple and effective method for the isolation of leonurine from *Leonurus japonicus* by high speed countercurrent chromatography (HSCCC). **Methods** The extraction conditions of leonurine were optimized by one-factor experimental design. After comparing several different solvent systems, the two phase system of ethyl acetate-*n*-butanol-water (3:2:5) was finally chosen as operating solvent of HSCCC for the separation of leonurine, in which the lower phase was determined as the mobile phase and the upper phase as stationary. The detection of eluates was performed with an ultraviolet detector at 277 nm. The rotation speed was adjusted at 850 r/min, and the flow rate was 2.2 mL/min. **Results** Leonurine was successively isolated from *n*-butanol fraction by HSCCC, and the above established method was also successively applied to the crude extract of *L. japonicus*. Finally, 68 mg of leonurine with purity about 96.2% could be obtained from 2.48 g crude extract of *L. japonicus* in a single injection. **Conclusion** The described approaches actively promote efficient preparation strategy to obtain high purity of leonurine.

Key words: high speed countercurrent chromatography; *Leonurus japonicus* Houtt.; leonurine; distribution coefficient; preparative technique

益母草 *Leonuri Herba* 为唇形科益母草属植物益母草 *Leonurus japonicus* Houtt. 的新鲜或干燥地上部分, 味苦、辛, 性微寒, 具有调经活血、利尿消肿、清热解毒的功效, 被称为“血家圣药、经产

良药”^[1]。该属植物主要含有生物碱类、黄酮类、二萜类等成分^[2-4]。生物碱一直被认为是益母草的有效成分^[5], 其中益母草碱、水苏碱为其主要活性成分^[6-7]。益母草碱能够抑制血小板的聚集、防止血栓

收稿日期: 2017-02-16

基金项目: 广东省省部产学研合作专项资金项目(2013B090500100)

作者简介: 江敏红(1991—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药质量控制。E-mail: min338_haoi@163.com

*通信作者 王冬梅(1968—), 女, 副教授, 研究方向为中草药有效成分与质量标准化。Tel: (020)39943042 E-mail: lsswdm@mail.sysu.edu.cn

形成；扩张外周血管、降低血管阻力；具有一定抗高血压、降低冠脉阻力、增加冠脉血流量、保护心脏等药理作用^[8-11]。《中国药典》2015 年版规定益母草的质量控制标准包括益母草碱和水苏碱的定量测定^[12]，其化学对照品的制备对于益母草药材及相关制剂的质量标准评价和后续的药理研究具有重要意义。目前，仅有对益母草碱化学合成方法的报道^[13]，从中药材中分离纯化益母草碱的研究^[14]大多涉及传统柱色谱手段，存在步骤繁复、溶剂消耗大、耗时长、得率低等缺点。

逆流色谱法是利用溶质在两种互不相溶的溶剂体系中分配系数的不同而达到物质分离的液-液色谱分离技术^[15-18]。与传统的分离方法相比，不会造成样品的不可逆吸附、分解；粗样可以直接上样而不会对柱子造成任何损害；上样量大，每毫升柱体积的载样量可达 10 mg；有广泛的溶剂体系可供不同极性物质的分离等特点，被广泛应用于天然活性成分的制备分离^[19-22]。本实验首次通过高速逆流色谱^[23-24] (high speed countercurrent chromatography, HSCCC) 技术分离纯化益母草中的益母草碱，该法操作简单、耗时较短、溶剂消耗少、产物纯度高，可为快速大量制备高纯度的益母草碱对照品提供重要参考。

1 仪器与材料

Optichrome-300PLUS 高速逆流色谱仪，线圈体积 300 mL，CF-80 恒流泵，LC3000 型紫外检测器，BS-100A 自动收集器，江阴逆流公司；LC-20A 高效液相色谱仪，LC-20AB 二元高压泵，SIL-20A 自动进样器，SPD-M20A 二极管阵列检测器，Shimadzu LC-Solution 色谱工作站，日本岛津公司；Mettler Toledo AG285 分析天平，瑞士 Mettler Toledo 公司；SB25-12DTD 超声波清洗仪，宁波新芝生物科技股份有限公司；AvanceIII 核磁共振谱仪，瑞士 Bruker 公司；LC-MS-IT-TOF 液相色谱-飞行时间质谱联用仪，日本岛津公司。

HPLC 分析用乙腈为色谱纯，Merck KGaA；纯水，德国 Millipore；其他试剂均为市售分析纯试剂。对照品盐酸益母草碱，批号 160527，质量分数 > 95%，上海融禾医药科技发展有限公司。

益母草药材购于云南中药材市场，经中山大学药学院杨得坡教授鉴定为唇形科植物益母草 *Leonurus japonicus* Houtt. 的干燥地上部分。药材干燥粉碎过 60 目筛后，干燥器中保存备用。

2 方法与结果

2.1 益母草碱的 HPLC 测定

2.1.1 色谱条件 采用 Ultimate AQ-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm, Welch, 美国)。流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液，体积流量为 1.0 mL/min，梯度洗脱程序：0~22 min，15%~18%乙腈；22~52 min，18%~52%乙腈；52~70 min，52%~95%乙腈。检测波长为 277 nm，柱温为室温。进样量 10 μL。理论板数以益母草碱计算不低于 7 000，色谱图见图 1。

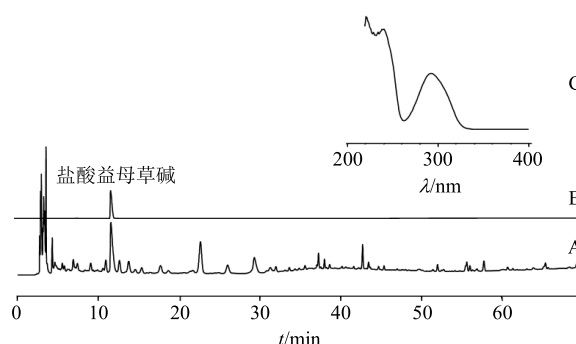


图 1 益母草药材粗提取物 (A) 和盐酸益母草碱 (B) 的 HPLC 图及益母草碱紫外全波长扫描图 (C)

Fig. 1 HPLC of *L. japonicus* crude extract (A), hydrochloric acid leonurine (B), and ultraviolet (UV) spectrum of hydrochloric acid leonurine (C)

2.1.2 对照品溶液的制备 精确称取真空干燥至恒定质量的盐酸益母草碱对照品 5.0 mg 于 10 mL 量瓶中，用 70%乙醇完全溶解，稀释并定容至刻度，摇匀，得 500 μg/mL 盐酸益母草碱对照品溶液。4 ℃ 下保存备用。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称定药材粉末 1 g 至 50 mL 锥形瓶中，加入 70%乙醇 10 mL 超声（频率 40 kHz，功率 500 W）提取 30 min。放至室温后用提取溶剂补足质量，微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.1.4 线性关系考察 取益母草碱对照品溶液适量，用 70%乙醇配制质量浓度分别为 500、400、300、200、100、50 μg/mL 的系列对照品溶液，按“2.1.1”项色谱条件测定盐酸益母草碱色谱峰面积。以质量浓度为横坐标，峰面积为纵坐标绘制标准曲线。得到盐酸益母草碱的回归方程为 $Y = 3\,906.2 X + 137\,936$ ， r 为 0.999 8，线性范围为 50~500 μg/mL。

2.1.5 精密度试验 取益母草碱对照品溶液，按“2.1.1”项色谱条件重复进样 6 次，记录盐酸益母草

碱峰面积, RSD 值为 0.40%, 结果表明仪器精密度高。

2.1.6 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别放置 0、2、4、8、12、24 h 后, 按“2.1.1”项色谱条件测定益母草碱峰面积, RSD 值为 0.63%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.7 重复性试验 精密称取 1 g 益母草粉末 6 份, 按“2.1.3”项方法平行制备供试品溶液, 按“2.1.1”项色谱条件测定益母草碱峰面积, RSD 值为 0.45%, 结果表明方法重复性好。

2.1.8 加样回收率试验 精密取已知益母草碱量的益母草粉末 9 份, 分别按低、中、高 3 个梯度加入一定量的对照品溶液(另配, 大致按样品中益母草碱量的 50%、100%、150%)制备供试品溶液, 按“2.1.1”项色谱条件测定益母草碱峰面积, 盐酸益母草碱的加样回收率为 98.2%, RSD 值为 1.54%。

2.2 提取工艺研究

选取提取溶剂、料液比、提取次数、提取时间 4 个可能影响提取效果的因素进行单因素实验。

2.2.1 提取溶剂考察 精密称取 9 份药材粉末各 1 g, 料液比为 1:10, 提取溶剂分别为 50%、70%、90%甲醇, 50%、70%、90%乙醇和 50%、70%、90%丙酮, 常温超声提取 30 min, 按“2.1.1”项色谱条件测定提取液中益母草碱量, 计算益母草碱提取率, 重复操作 3 次。结果不同提取溶剂的提取率分别为 1.900、1.732、1.949、2.017、2.088、1.931、2.051、1.882、1.363 mg/g ($n=3$)。

提取率 = 益母草碱提取得量/药材质量

2.2.2 料液比考察 精密称取 5 份药材粉末各 1 g, 70%乙醇为提取溶剂, 料液比分别为 1:8、1:10、1:15、1:20、1:25, 常温超声提取 30 min, 按“2.1.1”项色谱条件测定提取液中益母草碱量, 计算益母草碱提取率, 重复操作 3 次。结果不同料液比的提取率分别为 1.897、2.088、2.432、2.493、2.508 mg/g ($n=3$)。

2.2.3 提取次数考察 精密称取 1 份 1 g 的药材粉末, 70%乙醇为提取溶剂, 料液比为 1:15, 常温超声提取 4 次, 每次 30 min, 每次所得滤液分别按“2.1.1”项色谱条件测定提取液中益母草碱量, 计算益母草碱累积提取率, 重复操作 3 次。结果不同提取次数的累积提取率分别为 2.472、2.911、3.056、3.148 mg/g ($n=3$)。

2.2.4 超声时间考察 精密称取 5 份药材粉末,

70%乙醇为提取溶剂, 料液比为 1:15, 超声时间分别为 20、25、30、35、40 min, 常温超声提取 2 次, 按“2.1.1”项色谱条件测定益母草碱量, 计算益母草碱累积提取率, 重复操作 3 次。结果不同超声时间的累积提取率分别为 2.859、2.959、2.980、2.986、2.990 mg/g ($n=3$)。

以益母草碱提取率为考察指标, 选取最佳的条件组合: 结果显示 70%乙醇作为提取溶剂益母草碱的提取率最高; 料液比为 1:15 益母草碱的提取率不再明显上升; 提取 2 次后益母草碱累积提取率基本不变; 超声提取 30 min 后益母草碱累积提取率随超声时间延长增长不显著。结合工业生产条件, 最后确定益母草碱的提取工艺为 70%乙醇作为提取溶剂, 料液比为 1:15, 超声提取 2 次, 每次 30 min, 益母草碱的累积提取率为 2.98 mg/g。

2.3 益母草粗提物的制备

称取益母草干燥药材粉末 100 g, 加入 1.5 L 的 70%乙醇常温超声提取 30 min, 提取 2 次, 滤过后合并滤液。将滤液减压浓缩、干燥, 4 °C 下保存备用。70%乙醇粗提物中益母草碱质量分数为 3.01%, 得率(得率 = 70%乙醇粗提物的质量/药材质量)为 103.1 mg/g。

2.4 HSCCC 分离条件的选择

在 HSCCC 中溶剂体系的选择至关重要, 合适的溶剂体系是其分离的关键。HSCCC 两相溶剂体系的选择需要满足以下几个要求^[25]: (1) 分层时间要 < 30 s, 这样可以使固定相有较高的保留值; (2) 不会造成样品的分解与变性; (3) 足够高的样品溶解度; (4) 有合适的分配系数(K , 一般在 0.5~2 最佳), 但是由于现在 HSCCC 技术和方法上的改进, K 值已经扩展至 0.25~16。

本实验依据所分离化合物的特性及 HSCCC 分离生物碱的相关报道, 通过对不同配比的醋酸乙酯-乙酸-水(4:1:4)、正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水(6:4:5:5 及 5:2:5:2)、醋酸乙酯-正丁醇-水(2:3:5 及 3:2:5)、正丁醇-丙酮-水(8:1:10) 6 种不同溶剂体系进行试管实验, 初步筛选溶剂体系。采用 HPLC 法分析, 检测上、下相的目标化合物相应的峰面积(A_{upper} 和 A_{lower}), 以计算各目标化合物的 K ($K=A_{upper}/A_{lower}$) 值。根据不同溶剂体系中目标化合物的 K 值(表 1), 选择 K 值为 1.14 的醋酸乙酯-正丁醇-水(3:2:5) 溶剂体系进行 HSCCC 分离。在分液漏斗中配制醋酸乙酯-正丁醇-水(3:

表 1 益母草粗提物中益母草碱在不同溶剂体系中的 K 值
Table 1 K values of leonurine in *L. japonicus* crude extract with different solvent systems of HSCCC

溶剂体系	K 值
醋酸乙酯-乙酸-水 (4:1:4)	0.85
正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水 (6:4:5:5)	<0.10
正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水 (5:2:5:2)	<0.10
醋酸乙酯-正丁醇-水 (3:2:5)	1.14
醋酸乙酯-正丁醇-水 (2:3:5)	1.30
正丁醇-丙酮-水 (8:1:10)	1.87

2:5) 两相溶剂体系, 充分振摇后在室温静置过夜。使用前分别取上相和下相抽滤, 超声脱气 15 min。

2.5 益母草碱的富集

益母草 70%乙醇粗提物含有较多脂溶性成分, 而且由于益母草碱的极性较大, 参考文献方法^[26]采用醋酸乙酯萃取去脂, 而后用正丁醇萃取富集益母草碱。取 5 g 粗提物悬浮于 100 mL 纯水中, 先用等体积醋酸乙酯萃取, 然后用正丁醇萃取, 各萃取物与剩余水层减压浓缩、干燥, 4 °C 下保存备用。粗提物及各萃取物按“2.1.1”项色谱条件分析 (图 2), 可知益母草碱集中分布在正丁醇萃取物中, 因此, 选用正丁醇萃取物作为 HSCCC 分离制备益母草碱的原料。正丁醇萃取物中益母草碱质量分数为 34.47%, 得率 (得率=正丁醇萃取物的质量/药材质量) 为 8.76 mg/g。

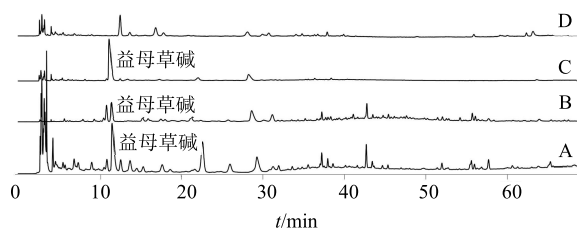


图 2 益母草药材粗提物 (A)、醋酸乙酯萃取物 (B)、正丁醇萃取物 (C) 和水层留余物 (D) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of *L. japonicus* crude extract (A), ethyl acetate extract (B), *n*-butanol extract (C), and residue remained in water phase (D)

2.6 HSCCC 分离制备益母草碱

取 80 mg 益母草正丁醇萃取物 (益母草碱质量分数 34.47%), 加入上述的上相和下相各 10 mL 超声溶解, 滤过, 备用。以上相为固定相, 下相为流动相, 头进尾出洗脱模式。以 20 mL/min 的体积流量将溶剂体系的上相注入 HSCCC 分离管中, 待上相充满整个管路后调整主机转速为 800 r/min, 再以

2 mL/min 的体积流量注入流动相, 两相在分离管中达到动态平衡后, 溶剂体系的固定相的保留率为 60.0%。由进样口注入 20 mL 样品液, 分离温度 25 °C, 检测波长 277 nm, 得到 HSCCC 分离图 (图 3-A)。分离结束后, 停止线圈转动, 用甲醇将线圈内的固定相置换出来。经 HPLC 检测分析合并含相同化合物流分, 流分 A-I 为单一化合物, 旋干称定质量得到 25 mg 样品, 得率 (得率=益母草碱得量/正丁醇萃取物质量) 为 31.25%。

为简化益母草碱的制备工艺, 采用相同的 HSCCC 分离条件, 将供分离样品改为益母草粗提物, 亦得到了良好的分离效果。将 HSCCC 操作参数微调整后 (主机转速为 850 r/min, 体积流量 2.2 mL/min), 固定相的保留率为 53.3%, 增加进样量, 最后 70%乙醇粗提物 (益母草碱质量分数为 3.01%) 进样量增大至 2.48 g 进行 HSCCC 分离 (图 3-B), 收集流分 B-I, 浓缩至干得到 68 mg 样品, 得率 (益母草碱得量/70%乙醇粗提物质量) 为 2.74%。

2.7 收集流分的 HPLC 分析与结构鉴定

按“2.1.1”项色谱条件对制备得到的流分 A-I 和 B-I 样品进行分析, 得知二者为同一化合物。对

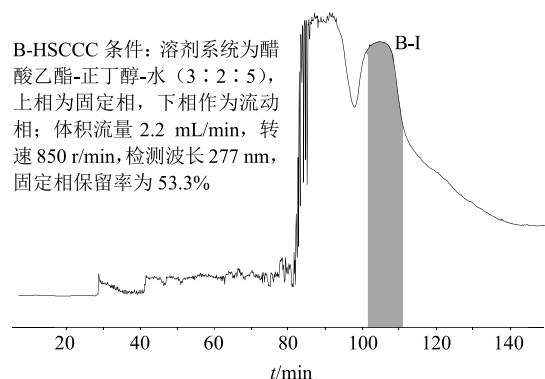
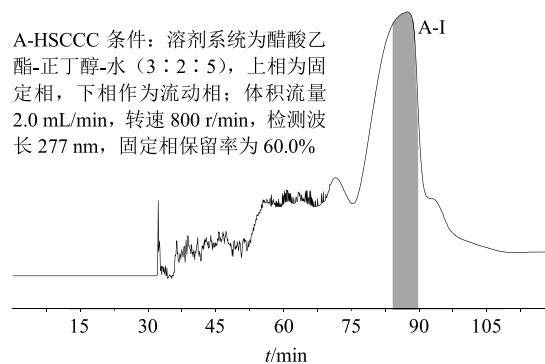


图 3 益母草药材的正丁醇萃取物 (A) 和粗提物 (B) 的 HSCCC 图

Fig. 3 HSCCC of *n*-butanol extract (A) and crude extract of *L. japonicus* (B)

流分 A-I 进行结构鉴定: 白色粉末, LC-MS-IT-TOF 质谱分析, $[M+H]^+$ m/z 312.153 9 (计算值 312.155 4), 分子式为 $C_{14}H_{22}N_3O_5$, 碎片离子 m/z 181.049 1、114.103 0, 初步判断其为益母草碱^[27]。¹H-NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 2.25 (2H, t, J = 6.9 Hz, H-3), 1.75 (2H, m, H-4), 1.85 (1H, m, H-5), 4.33 (2H, t, J = 6.8 Hz, H-6), 7.31 (2H, s, 2', 6'), 3.90 (6H, s, 3', 5'-OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 158.5 (C-1), 42.0 (C-3), 26.4 (C-4), 27.0 (C-5), 65.7 (C-6), 119.6 (C-1'), 108.0 (C-2', 6'), 149.1 (C-3', 5'), 144.5 (C-4'), 168.4 (C-7'), 56.7 (3', 5'-OCH₃)。与参考文献中报道的益母草碱的波谱数据一致, 故鉴定流分 A-I 为益母草碱^[28] (leonurine)。采用对照品进行外标法定量测定, 得知流分 A-I 中益母草碱的质量分数为 97.2%, 流分 B-I 中益母草碱的质量分数为 96.2% (图 4)。

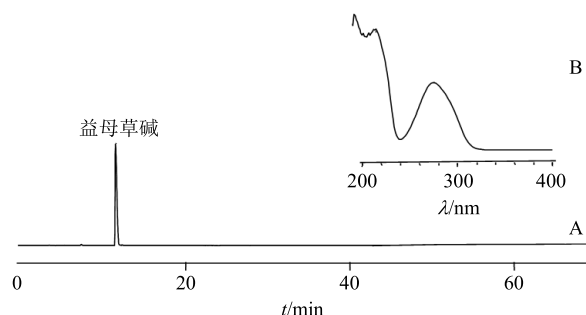


图 4 益母草粗提物 HSCCC 流分 B-I 的 HPLC 图 (A) 和紫外全波长扫描图 (B)

Fig. 4 HPLC (A) and UV spectrum (B) of fraction B-I isolated from *L. japonicus* crude extract by HSCCC

3 讨论

本研究在单因素实验确定了益母草碱的最优提取工艺的基础上, 建立了采用 HSCCC 技术从益母草药材中分离制备益母草碱的方法, 益母草粗提物 2.48 g 经 1 次 HSCCC 分离制备即可得到 68 mg 质量分数为 96.2% 的益母草碱。该方法简捷、高效, 所得产物纯度高, 为益母草碱对照品的快速制备提供了新方法。

参考文献

- [1] 中药大辞典 (上册) [M]. 上海: 上海人民出版社, 1997.
- [2] 熊亮, 彭成. 基于中药质量标志物 (Q-Marker) 的基本条件研究益母草和赶黄草的 Q-Marker [J]. 中草药, 2016, 47(13): 2212-2220.
- [3] Shang X F, Pan H, Wang X Z, et al. *Leonurus japonicus* Houtt.: Ethnopharmacology, phytochemistry and

pharmacology of an important traditional Chinese medicine [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 152(1): 14-32.

- [4] 张雪, 宋玉琴, 杨雨婷, 等. 益母草活血化癥化学成分与药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(2): 214-217.
- [5] 苗明三, 肖开, 高渐联, 等. 益母草总碱对老龄大鼠前列腺增生模型的影响 [J]. 中草药, 2015, 46(13): 1937-1943.
- [6] Lin H C, Pan S M, Ding H Y, et al. Antiplatelet effect of leonurine from *Leonurus sibiricus* [J]. *Taiwan Pharmaceut J*, 2006, 59(3): 149-152.
- [7] Xin H, Gu M, Wang W W, et al. Effects of leonurine on L-type calcium channel in rat ventricular myocytes [J]. *Biol Pharm Bul*, 2012, 35(8): 1249-1256.
- [8] 张雪, 宋玉琴, 杨雨婷, 等. 益母草活血化癥化学成分与药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(2): 214-217.
- [9] Kong Y C, Yeung H W, Cheung Y M, et al. Isolation of the uterotonic principle from *Leonurus Artemisia*, the Chinese Motherwort [J]. *Am J Chin Med*, 1976, 4(4): 373-382.
- [10] Hayashi Y. Studies on the ingredients of *Leonurus sibiricus* L. II. Structure of leonurine. (2) [J]. *Yakugaku Zasshi*, 1962, 82: 1025-1027.
- [11] 贺春晖, 赵懿清, 李霞, 等. 益母草碱药理作用的分子机制研究进展 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2013, 18(12): 1419-1422.
- [12] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [13] 王蓉, 何黎琴, 王效山. 益母草碱合成工艺改进 [J]. 科技创新导报, 2010(4): 102.
- [14] Yeung H W, Kong Y C, Lay W P, et al. The structure and biological effect of leonurine [J]. *Planta Med*, 1977, 31(1): 51-56.
- [15] Ito Y. Countercurrent chromatography [J]. *J Biochem Bioph Meth*, 1981, 5(2): 105-129.
- [16] 张晓峰, 张宏, 李小云, 等. 高速逆流色谱-UPLC-Q-TOF-MS/MS 法分离制备延胡索中脱氢紫堇碱和海罂粟碱 [J]. 中草药, 2016, 47(24): 4351-4356.
- [17] 王高红, 黄新异, 段文达, 等. 逆流色谱技术分离蛋白质和多肽的研究进展 优先出版 [J]. 分析化学, 2016, 44(10): 1600-1608.
- [18] Ito Y. Countercurrent chromatography: principle and application [J]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 1981, 26(8): 1020-1046.
- [19] Liu Q, Zhou J D, Yu J G, et al. Systematic and efficient separation of 11 compounds from *Rhizoma Chuanxiong* via counter-current chromatography-solid phase extraction-counter-current chromatography hyphenation

- [J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1364(17): 204-213.
- [20] Cao X L, Wang C, Pei H R, *et al.* Separation of proanthocyanidins isolated from tea leaves using high-speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(19): 4268-4274.
- [21] 楼招欢, 杨波, 沈炜, 等. 丹参二萜醌部位高速逆流色谱制备工艺及体外抗肿瘤活性研究 [J]. 中草药, 2015, 46(5): 679-682.
- [22] Alvarenga R R, Friesen J B, Nikolic D, *et al.* K-targeted metabolomic analysis extends chemical subtraction to DESIGNER extract: selective depletion of extracts of Hops (*Humulus lupulus*) [J]. *J Nat Prod*, 2014, 77: 2595-2604.
- [23] 赵东梅, 王威, 刘坤, 等. 柱色谱-高速逆流色谱法分离纯化虎杖中大黄素-8-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2118-2122.
- [24] 李熹. 高速逆流色谱法分离纯化艾叶化学成分、提取条件优化及结构鉴定 [D]. 长沙: 湖南师范大学, 2016.
- [25] Oka F, Oka H, Ito Y. Systematic search for suitable two-phase solvent systems for high-speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 1991, 538(1): 99-108.
- [26] 钟宁远, 张文婷, 唐登峰. 益母草流浸膏的指纹图谱和多指标成分含量测定方法研究 [J]. 中国现代应用医药, 2015, 32(12): 1467-1471.
- [27] Li B H, Wu J D, Li X L. Simultaneous determination and pharmacokinetic study of stachydrine and leonurine in rat plasma after oral administration of herba Leonuri extract by LC-MS/MS [J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2013, 76: 192-199.
- [28] 邓岫, 刘丽丽, 陈玥, 等. 益母草化学成分研究 III [J]. 天津中医药大学学报, 2014, 33(6): 362-364.