

高速逆流色谱分离提取天然产物技术研究进展

高荫榆^{1,2}, 魏 强¹, 范青生¹, 陈秀霞¹

(1. 南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047;

2. 生物质转化教育部工程研究中心, 江西 南昌 330047)

摘 要: 高速逆流色谱是最近 20 多年发展起来的一项液-液分配技术, 由于其具有不需任何固态支撑的特点, 在分离提取天然产物方面具有很多优势, 因此被广泛应用。本文介绍了高速逆流色谱的原理和特点, 对其分离提取天然产物有效成分的应用及其进展进行了综述。

关键词: 高速逆流色谱; 天然产物; 分离提取

Advances of High-speed Countercurrent Chromatography on Separation of Natural Products

GAO Yin-yu^{1,2}, WEI Qiang¹, FAN Qing-sheng¹, CHEN Xiu-xia¹

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

2. Engineering Research Center of Biomass Conversion, Ministry of Education, Nanchang 330047, China)

Abstract: High-speed countercurrent chromatography (HSCCC) is a liquid-liquid separation chromatographic technique, which has been developed in recent twenty years. Having many advantages in isolation of natural products and no any solid support, it has been widely applied. The principle and characteristics of HSCCC were introduced in this article, and also the progresses and applications of HSCCC in extracting bioactive ingredients from natural products was summarized in detail.

Key words high-speed countercurrent chromatography; natural products; extraction

中图分类号: TS201.21

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)02-0461-05

自从上世纪 80 年代初, 美国 Ito 教授研制出了高速逆流色谱(high-speed counter-current chromatography, HSCCC), 很快地 HSCCC 在生物化学、医药学、食品、地质、农业、环境、材料、化工、海洋生物等众多领域被广泛应用。因 HSCCC 可采用不同物化特性的溶剂体系和多样性的操作条件, 具有较强的适应性, 为从复杂的天然产物粗制品中提取不同特性(如不同极性)的有效成分提供了有利条件^[1], 因此在 80 年代后期, HSCCC 被大量用于天然产物化学成分的分析 and 制备分离。所涉及天然产物包括黄酮类、糖类、皂苷类、生物碱类、萜醌类、多酚类、香豆素类、多肽, 以及蛋白质、多糖、细胞、抗生素、紫胶染料等生物大分子物质和稀有元素、重金属元素等无机物^[2]。

通过广泛查阅近年来的相关资料, 本文对 HSCCC 分离提取天然产物有效成分的应用及其进展进行了综述。

1 HSCCC 原理和特点

HSCCC 是一种基于液-液多级逆流萃取建立的色谱体系, 它利用溶质在两种互不相溶的溶剂系统中分配系数的不同, 从而实现分离。具体地说, 就是 HSCCC。

互不相溶的两相溶剂组成溶剂系统, 依靠轻巧的聚四氟乙烯蛇形管的方向性及特定的高速行星式旋转所产生的离心场作用, 将两相溶剂固定于管中, 分别充当固定相和流动相, 由于样品中各溶质组分在两相中的分配能力不同, 故其在蛇形管中的移动速度也不同, 因而使样品组分得到分离^[3], 而且其分离效果较好。所以 HSCCC 是属于分离比较完全的液液分配色谱。

HSCCC 技术不用任何固态支撑体, 从而具有诸多优点:

排除了对样品的沾染、失活、变性等影响, 能实现对复杂混合物中各组分的高纯度制备量分离。避免了有效成分被固相载体的不可逆吸附和峰形拖尾等缺点。样品粗提物可进样分离, 分离纯化与制备可同步完成, 有机溶剂消耗少, 无损失、无污染, 能高效、快速和大制备量分离。柱子可以用合适的溶剂很容易地洗

收稿日期: 2007-10-31

基金项目: 教育部长江学者和创新团队发展计划资助项目(IRT0540)

作者简介: 高荫榆(1940-), 女, 教授, 主要从事食物(含生物质)资源开发与利用研究。E-mail: yygaoncu@163.com

清,可重复使用。滞留在柱中的样品可以通过多种洗脱方式予以完全回收。

另外,与高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)相比, HSCCC 具有重现性好、分离度高、操作简便等优点,而且 HSCCC 进样量较大,最多可达几克,是 HPLC 的 $10^4 \sim 10^5$ 倍;而与常压和低压色谱相比, HSCCC 的分离能力强,有的样品经过一次分离就可以得到 1 个甚至多个单体,并且分离时间也较短,一般几个小时就可以完成一次分离^[4]。

2 HSCCC 分离提取天然产物的应用

2.1 黄酮类化合物的分离提取

黄酮类化合物多存在于高等植物和羊齿类植物中,常以游离或与糖结合成苷的形式存在,在花、叶、果实等组织中多为苷类,而在木质部组织中多为游离苷元。主要包括黄酮、异黄酮、二氢黄酮、儿茶精、花色苷等及各种衍生物。利用 HSCCC 技术能够很有效的分离提取黄酮类化合物。

Cao 等^[5]以乙酸乙酯-正丁醇-水(2:1:3)为溶剂系统从葛根中分离得到异黄酮苷、葛根素、3-甲氧基葛根素、葛根素木糖苷 3'-羟基葛根素。Du Q 等^[6]以正己烷-乙酸乙酯-正丁醇-甲醇-乙酸-水(1:2:1:1:5:1)为溶剂系统,从大豆中提取出 4 个异黄酮,分别为异黄酮苷、染料木苷、6-O-丙二酰异黄酮苷、6-O-丙二酰染料木苷。Peng J Y 等^[7]以己烷-醋酸乙酯-甲醇-水(10:11:11:8)为溶剂系统从败酱草中分离得到 bolusanthol B、5,7,2',6'-四羟基-6,8-二(γ, γ-二甲代烯丙基)黄烷酮和 tetrap-terol I。马晓丰等^[8]采用 HSCCC 法,以正己烷-氯仿-甲醇-水(1.5:3:3:2)组成的二相系统对黄芪的醋酸乙酯粗提物进行了分离纯化,分离出的毛蕊异黄酮纯度可达 95% 以上,并可以初步纯化芒柄花素;然后用正己烷-氯仿-甲醇-水(4:4:5:4)组成的系统进一步纯化芒柄花素,其纯度达 95% 以上。Ma X F 等^[9]利用 HSCCC,以乙酸乙酯-甲醇-乙酸-水(4:1:0.25:5)为溶剂系统,从黄芪粗提物中分离出两种异黄酮,纯度均大于 95%。Chen L J 等^[10]以氯仿-甲醇-水(8:10:5)为溶剂系统,从木蝴蝶中一次分离出了白杨素、黄芩素、黄芩素-7-O-葡萄糖苷、千层纸素 B 等四种高纯度化合物。

2.2 生物碱类化合物的分离提取

生物碱是重要的天然含氮化合物,对疾病治疗和药物发展等具有重要作用。生物碱结构比较复杂,分 59 种类型,种类在 2000 多种以上。在植物中,生物碱分布非常广泛,有 50 多科 120 属植物中含有生物碱。近年,用 HSCCC 已成功分离了多种生物碱。

用 HSCCC 提取生物碱较常用的溶剂系统是氯仿-甲醇-酸性改性剂体系。洪波等^[11]采用 HSCCC 对附子中的

化学成分进行研究,分离得到了 15-α-羟基新乌碱单体,溶剂系统为氯仿-甲醇-0.3mol/L 盐酸(4:3:2)。颜继忠等^[12]以氯仿-甲醇-0.2mol/L 盐酸(2:1:1)为溶剂体系,用 HSCCC 成功分离出金果榄中的巴马亭成分,经测定组分纯度大于 99.6%。Yang F 等^[13]以氯仿-甲醇-0.2mol/L 盐酸(4:1.5:20)为两相溶剂,利用 HSCCC 分离得到巴马亭、小檗碱、表小檗碱和黄连碱 4 种生物碱。袁黎明等^[14]应用氯仿-甲醇-磷酸二氢钠缓冲液(23mmol/L pH5.6)(4:3:2)溶剂系统,以上相为固定相,下相为流动相,分离绿茶的总生物碱提取物,较好地分离纯化了茶叶中的咖啡碱、可可碱和茶叶碱三种生物碱。

另外, HSCCC 其他溶剂体系的运用,也有较多报导。Wu S H 等^[15]用石油醚-乙酸乙酯-四氯化碳-氯仿-甲醇-水(1:1:4:4:6:2)与乙酸乙酯-四氯化碳-甲醇-水(1:6:4:1)体系,从莲子心中分离出莲心碱、异莲心碱和甲基莲心碱。Liu R M 等^[16]以正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(5:5:7:5)溶剂系统从吴茱萸中分离得到吴茱萸碱、吴茱萸次碱和吴茱萸新碱。俞雁等^[17]以石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(16:31:19:21)溶剂体系,从延胡索粗提物中分离出延胡索乙素。

2.3 蒽醌类化合物的分离提取

蒽醌类化合物是广泛存在的重要天然色素,在高等植物和真菌、地衣等低等植物中尤为普遍,中药中则以蒽醌及其衍生物最为重要,具有泻下、抗菌、抗癌等生理活性。

Tian G L 等^[18]以石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(2:3:2:1.7)为溶剂系统从丹参中分离得到丹参醌 IIA、二羟基丹参醌 IA、丹参醌 IA 和隐丹参醌。Yang F Q 等^[19]利用乙醚-水的两相溶剂系统,通过调整流动相 pH 值,采用梯度洗脱,从大黄中分离了大黄酚、大黄素、大黄素甲醚等羟基蒽醌类化合物,纯度均大于 98%。Lu 等^[20]用 HSCCC,以正己烷-乙酸乙酯-乙醇-水(16:14:14:5)为溶剂体系,从 52mg 紫草粗提物(含 38.9% 紫草素)中分离纯化得到紫草素 19.6mg(纯度为 98.9%),回收率为 96.9%,完成一次分离用时 200min。黄丹凤等^[21]则以正丁醇-乙酸乙酯-水(1:3:4)作溶剂体系,采用高速逆流色谱与硅胶柱色谱结合的方法,从芦荟中分离制备高纯度芦荟素异构体。袁黎明^[22]等利用氯仿-甲醇-水(4:3.8:2)体系,对传统中药大黄中的蒽醌类活性成分进行了制备性分离研究,并对制备物进行了薄层色谱分析,检验了其中的大黄素,证实了其中的蒽醌类成分。

2.4 皂苷类化合物的分离提取

皂苷由皂苷配基与糖、糖醛酸或其他有机酸组成,在中草药中广泛存在。由于其分子量大,结构复杂,极性较高,因而分离难度较大。近年来,通过应用 HSCCC 技术,对皂苷类成分的分离研究取得了较大进展。

Du Q Z等^[23]以正丁烷-正丁醇-水(3:4:7)体系从三七粗提物中分离得人参皂苷RbI、三七皂苷RI、人参皂苷Re和人参皂苷Rg1。王春燕等^[24]以氯仿-甲醇-水(9:10.5:8)溶剂体系,一次性分离得到芦荟苷(纯度99.99%)和芦荟大黄素(纯度95.83%),分别达到定量和鉴别用化学对照品要求。Peng等^[25]利用制备型HSCCC从仙茅中成功分离纯化了仙茅苷和仙茅苷乙,纯度分别为96.5%和99.4%,并研究了一些参数,包括溶剂体系为乙酸乙酯-乙醇-水(5:1:5),分离温度、流动相流速和仪器的转速等。Zhou等^[26]用制备型HSCCC对栀子的果实京尼平苷进行了大规模的分离纯化,一次分离粗提物1g,溶剂体系为乙酸乙酯-正丁醇-水(2:1.5:3),得到京尼平苷的纯度大于98%。彭金咏等^[27]以乙酸乙酯-乙醇-水(4:1:5)为溶剂系统,从白花败酱草中分离纯化了异荛草苷和异牡荛苷。Li等^[28]用HSCCC对连翘的果实50.0%乙醇粗提物进行了分离纯化,以正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(1:9:1:9)为溶剂体系,得到连翘苷的纯度大于98.6%。

2.5 多酚类化合物的分离提取

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。国人最常饮用的茶叶中,所含茶多酚(主要功效成分儿茶素)就具有抗氧化、抗溶血、抗口臭、抑制致癌物的形成等众多生物活性和保健功能。

王凤美等^[29]以正己烷-醋酸乙酯-水-甲醇(1.5:5:5:1.5)为溶剂系统,分离纯化丹参水溶性成分丹酚酸类物质,结果一次分离可制备63.4mg丹酚酸B,其纯度为98.6%。Tian G L等^[30]从山茱萸的正丁醇提取物中,以乙酸乙酯-正丁醇-水(5:1.8:6)与乙酸乙酯-乙醇-水(5:0.5:6)两步分离得到没食子酸,纯度大于97%。黄健光等^[31]以正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水(7:3:6:4)为溶剂系统,成功分离了邻苯二酚和对苯二酚这一对同分异构体。Lu等^[32]应用正丁醇-冰乙酸-水(4:1:5)系统从金银花中分离得到绿原酸。孙爱玲等^[33]使用石油醚-醋酸乙酯-甲醇-1%醋酸(5:5:7:3)溶剂系统,建立了HSCCC分离制备厚朴的有效成分厚朴酚与和厚朴酚的新方法。从100mg厚朴粗提物制得和厚朴酚33.3mg,厚朴酚19.5mg,经HPLC分析,纯度均大于99.5%。江和源等^[34]选择溶剂系统乙酸乙酯-正己烷-甲醇-水(3:1:1:6),成功地将红茶茶黄素提取物中的四种主要茶黄素单体分离纯化成三个部分,分别是茶黄素、茶黄素双没食子酸酯、两种茶黄素单没食子酸酯的混合物。

2.6 香豆素类化合物的分离提取

香豆素及其衍生物是一类重要的香料,大多具有重要的经济和药用价值。在植物界中,香豆素及其衍生物分布较为广泛。

Wei Y等^[35]以正丁烷-乙酸乙酯-甲醇-水(1:1:1:1)和(5:5:6:4)溶剂系统梯度分离,从蛇床子中分离出欧芹酚甲

醚和花椒毒酚。Liu R M等^[36]以石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(5:5:5:5)与石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(5:5:6:4)梯度洗脱一次性分离得到蛇床子素、花椒毒素、欧前胡素、异虎耳草素、佛手苷内酯5种高纯化合物。他们^[37]还以正己烷-甲醇-水(5:5:5)与正己烷-甲醇-水(5:7:3)梯度洗脱,从白芷中分离纯化了欧前胡素、异欧前胡素和氧化前胡素;他们^[38]用石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(5:5:5:5)与石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(5:5:6.5:3.5)梯度洗脱,从白花前胡中得到前胡香豆素D、白花前胡乙素及白花前胡甲素。他们^[39]还以正丁醇-甲醇-0.5%乙酸(5:1.5:5)从秦皮中分离得到秦皮素、七叶甙、秦皮甙和七叶素。

2.7 其他类化合物的分离提取

对于HSCCC技术,除了上面这些方面的应用外,对其他天然产物成分的分离提取也是被广泛使用的。

余佳红等^[40]以氯仿-甲醇-水(4:3:2)为溶剂系统,从银杏叶中分离制备得到白果内酯。Du Q Z等^[41]以正己烷-乙酸乙酯-乙醇-水(1:4:2.5:2.5)为溶剂系统从穿心莲中分离得到穿心莲内酯和新穿心莲内酯。Degenhardt等^[42]以甲基叔丁基醚-正丁醇-乙腈-水(1:3:1:5)体系从胡麻中分离得到木质素双糖苷,即司可异落叶松树脂醇二糖苷。虾青素是类胡萝卜素中抗氧化活性最强的物质,Li H B等^[43]以正己烷-乙酸乙酯-乙醇-水(5:5:6.5:3)体系从海绵粗提物中分离出纯度超过97%的虾青素。红曲色素是以微生物法生产的天然食用色素,是红曲菌属真菌发酵粮食所得的代谢产物,夏明等^[44]利用HSCCC,采用石油醚-甲醇-乙酸乙酯-水(3:6:5:4)为两相溶剂,成功分离了红色素类、紫红色素类和黄色素类3种结构已知的色素。抗生素的分离制备也可采用HSCCC,Okamoto等^[45]采用正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(3:6:5:5)溶剂体系,分离得到纯度分别为98.2%、92.3%、97.4%的螺旋霉素I、II、III。Shibusawa等^[46]以16%聚乙二醇-12.5%磷酸钾缓冲液-15%硫酸铵溶剂体系从牛的心脏分离出乳酸脱氢酶。

3 HSCCC 最新研究进展简介

3.1 应用方面的研究进展

HSCCC不仅仅运用在天然产物和中药有效成分的分离提取,而且在食品、蛋白质和多肽、抗生素的分离纯化等方面都有应用。比如Okamoto等^[47]以叔丁基甲基醚-正丁醇-乙腈-水(2:2:1:5)溶剂体系对虫胶进行分离,得到4种乳酸A、B、C和E,其纯度经HPLC鉴定分别达到97.2%、98.1%、98.2%和95.0%;Harada^[48]等采用正丁醇/乙酸乙酯/0.005mol/L三氟乙酸(1.25:3.75/5)的溶剂体系,从溶解杆菌(*Lysobacter*)发酵液分离的WAP-8294A混合物中分离得到了对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌有较强抗性的WAP-8294A。

3.2 技术方面的研究进展

基于常规的 HSCCC 技术,随着人们研究运用的深入,人们又发展了多种 HSCCC 技术。如双向逆流色谱(dual countercurrent chromatography, DuCCC),正交轴逆流色谱(cross-axis coil planet centrifuge, X-axis CPC), pH-区带精制逆流色谱(pH-zone-refining CCC), HSCCC 与质谱(MS)联用等。

DuCCC 的两相都是流动相,没有固定相存在,适合于分离极性范围分布较宽的多组分天然粗提物。X-axis CPC 的螺旋管支持件的自转轴和公转轴相互垂直,产生三维的不对称离心力场,适用于生物大分子样品的分离制备。pH-zone-refining CCC 是依据物质的解离常数和疏水性的不同而实现分离的,适合于有机酸、有机碱的分离^[49]。HSCCC 和 MS 联用技术则把逆流色谱分离的多样性与质谱的高灵敏度和结构分析特性良好地结合在一起,广泛地应用于天然产物、药物和其他生化物质的分离分析。

4 结 论

总而言之, HSCCC 技术在国内外的研究中已经被广泛采用。从 1982 年发明至今,虽然仅短短 20 余年时间,但作为一种有独特优势的液相分配色谱技术, HSCCC 发展可谓迅猛,技术也日臻全面和完善。

近年来,国内外每年都不断有新的 HSCCC 技术和应用得以涌现。常规的 HSCCC 技术是与紫外检测器连用,但随着研究的深入, HSCCC 日益与质谱(MS)、傅立叶红外光谱(FTIR)、蒸发光散射(ELSD)以及其他新型检测器连用,为 HSCCC 技术的应用提供了新型多维分离分析方法,为制备标准品、建立指纹图谱、研究天然药物化学成分以及开发新药等提供了强大的技术支持。HSCCC 尤其适用于天然产物和药物的提取分离,而我国是一个动植物等自然资源极其丰富的资源大国,因而 HSCCC 这项技术的运用和发展,就更具有特别的意义。作为一种方兴未艾的优势技术,随着越来越多的研究者的加入, HSCCC 必将更多的用于生命科学、生物医药、食品、化工、材料、环境、地质等工农业生产领域。

参考文献:

- [1] 顾铭, 苏志国. 高速逆流色谱用于天然产物分离和指纹图谱构建[J]. 生物加工, 2003, 1(2): 59-62.
- [2] HOSTETTLMANN K, MARSTON A. Counter-current chromatography in the preparation separation of plant-derived natural products[J]. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 2001, 24(11/12): 1711-1721.
- [3] OKA H, OKA H, HO Y. Systematic search for suitable two-phase solvent system for high-speed counter-current chromatography[J]. Chromatography, 1991, 538(1): 99-108.
- [4] 田桂莲, 张天佑, 杨福全. 应用高速逆流色谱(HSCCC)分离纯化山茱萸中的没食子酸[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 12(6): 52-55.
- [5] CAO X L, TIAN Y, ZHANG T Y. Separation and purification of isoflavones from *Pueraria lobata* by high speed counter-current chromatography[J]. J Chromatography A, 1999, 55(8): 709-713.
- [6] DU Q, LAB H, ITO Y, et al. Preparative separation of isoflavone components in soybeans using high-speed counter-current chromatography[J]. J Chromatography A, 2002, 923(1): 271-274.
- [7] JIN Y P, GUO R F, YU T W, et al. Preparative isolation and separation of a novel and two known flavonoids from *Patrinia villosa* by high-speed counter-current chromatography[J]. J Chromatography A, 2005, 1092: 235-240.
- [8] 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毛蕊素和毛蕊异黄酮[J]. 色谱, 2005, 23(3): 299-301.
- [9] MA X F, TU P F, CHEN Y J, et al. Preparative isolation and purification of two isoflavones from *Astragalus membranaceus* Bge. var. *Mongholicus* (Bge) Hisao by high-speed counter-current chromatography[J]. J Chromatogr A, 2003, 992(1-2): 193-197.
- [10] CHEN L J, GAMES D E. Isolation and identification of four flavonoid constituents from the seeds of *Oroxylum indicum* by high-speed counter-current chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2003, 988(1): 95-98.
- [11] 洪波, 司云珊, 赵宏峰, 等. 高速逆流色谱法分离附子中的 15- α -羟基新乌碱[J]. 吉林农业大学学报, 2004, 26(1): 57-58.
- [12] 颜继忠, 褚建军, 徐聪, 等. 高速逆流色谱分离金果榄中巴马亭[J]. 理化检验: 化学分册, 2004, 40(8): 450-451.
- [13] YANG F, ZHANG T, ZHANG R, et al. Application of analytical and preparative high-speed counter-current chromatography for separation of alkaloids from *Coptis chinensis* Franch[J]. Chromatogr A, 1998, 829(1-2): 137-141.
- [14] 袁黎明, 傅若农, 张天佑, 等. 高速逆流色谱法分离茶叶中的生物碱[J]. 色谱, 1998, 16(4): 361-362.
- [15] WU S H, SUN C R, CAO X J, et al. Preparative counter-current chromatography isolation of liensinine and its analogues from embryo of the seed of *Nelumbo nucifera* GAERTN. using upright coil planet centrifuge with four multilayer coils connected in series[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1041(1/2): 153-156.
- [16] LIU R M, CHU X, SUN A L, et al. Preparative isolation and purification of alkaloids from the Chinese medicinal herb *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth by high-speed counter-current chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1074(1/2): 139-142.
- [17] 俞雁, 金艳, 徐超, 等. 应用高速逆流色谱技术从延胡索中分离制备延胡索乙素[J]. 世界科学技术: 中医现代化, 2006, 8(2): 17-19.
- [18] TIAN G L, ZHANG T Y, ZHANG Y B, et al. Separation of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* Bunge by multidimensional counter-current chromatography[J]. J Chromatography A, 2002, 945: 281-285.
- [19] YANG F Q, ZHANG T Y, TIAN G L, et al. Preparative isolation and purification of hydroxyanthraquinones from *Rheum Officinale* Bailly by high-speed counter-current chromatography using pH-modulated stepwise elution[J]. J Chromatography A, 1999, 858(1): 103-107.
- [20] LU H T, JIANG Y, CHEN F. Preparative high-speed counter-current chromatography for purification of shikonin from the Chinese medicinal plant *Lithospermum erythrorhizon*[J]. J Chromatogr A, 2004, 1023(1): 159-163.
- [21] 黄丹凤, 曹学丽, 赵华, 等. 高速逆流色谱与硅胶柱色谱结合分离制备高纯度芦荟素异构体[J]. 色谱, 2006, 24(1): 42-45.
- [22] 袁黎明, 夏滔, 吴平, 等. 高速逆流色谱对大黄有效成分的制备性分离研究[J]. 化学世界, 2002, 43(4): 185-186.

- [23] DU Q Z, GEROLD J, REINER W, et al. Isolation of dammarane saponins from *Panax notoginseng* by high-speed counter-current chromatography[J]. J Chromatography A, 2003, 1008: 173-180.
- [24] 王春燕, 蔡定国, 柳正良, 等. 芦荟甙和芦荟大黄素的高速逆流色谱法分离纯化[J]. 中国医药工业杂志, 2001, 32(4): 145-147.
- [25] PENG J Y, JIANG Y Y, FAN G R, et al. Optimization suitable conditions for preparative isolation and separation of curculigoside and curculigoside B from *Curculigo orchoides* by high-speed counter-current chromatography[J]. Sep Purif Technol, 2006, 52(1): 22-28.
- [26] ZHOU T T, FAN G R, HONG Z Y, et al. Large-scale isolation and purification of geniposide from the fruit of *Gardenia jasminoides* Ellis by high-speed counter-current chromatography[J]. J Chromatogr A, 2005, 1100(1): 76-80.
- [27] 彭金咏, 范国荣, 吴玉田, 等. 白花败酱草中异牡荆苷和异荜茇苷的高速逆流色谱分离和制备[J]. 分析化学, 2005, 33(10): 1389-1392.
- [28] LI H B, CHEN F. Preparative isolation and purification of phillyrin from the medicinal plant *Forsythia suspensa* by high-speed counter-current chromatography[J]. J Chromatogr A, 2005, 1083(1/2): 102-105.
- [29] 王风美, 陈军辉, 李磊, 等. 高速逆流色谱法分离制备丹酚酸B[J]. 天然产物的研究与应用, 2006, 18(1): 100-104.
- [30] TIAN G L, ZHANG T Y, YANG F Q, et al. Separation of gallic acid from *Cornus officinalis* Seib. et Zucc by high-speed counter-current chromatography[J]. J Chromatography A, 2000, 886(1/2): 309-312.
- [31] 黄健光, 李总成. 利用高速逆流色谱分离邻苯二酚和对苯二酚[J]. 化学工业与工程, 2005, 22(3): 249-251.
- [32] LU H T, JIANG Y, CHEN F. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for separation of chlorogenic acid from *Flos Lonicerae*[J]. J Chromatography A, 2004, 1026: 185-190.
- [33] 孙爱玲, 冯蕾, 柳仁民. 高速逆流色谱分离制备厚朴的有效成分厚朴酚与和厚朴酚[J]. 分析化学研究简报, 2005, 33(7): 1016-1018.
- [34] 江和源, 程启坤, 杜琪珍. 高速逆流色谱法分离纯化茶黄素[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 12(4): 30-35.
- [35] WEI Y, ZHANG T Y, ITO Y. Preparative isolation of osthol and xanthoxol from common *Cnidium* fruit (Chinese traditional herb) using stepwise elution by high-speed counter-current chromatography[J]. J Chromatography A, 2004, 1033(2): 373-377.
- [36] LIU R M, FENG L, SUN A L, et al. Preparative isolation and purification of coumarins from *Cnidium monnieri* (L.) Cusson by high-speed counter-current chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1055(1/2): 71-76.
- [37] LIU R M, LI A F, SUN A L. Preparative isolation and purification of coumarins from *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm) Benth, et Hook. f (Chinese traditional medicinal herb) by high-speed counter-current chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1052(1/2): 223-227.
- [38] LIU R M, FENG L, SUN A L, et al. Preparative isolation and purification of coumarins from *Peucedanump-raeruptorum* Dunn by high-speed counter-current chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1057(1/2): 89-94.
- [39] LIU R M, SUN Q H, SUN A L, et al. Isolation and purification of coumarin compounds from *Cortex fraxinus* by high-speed counter-current chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1072(2): 195-199.
- [40] 余佳红, 柳正良, 蔡定国. 高速逆流色谱分离制备白果内酯[J]. 中国新药杂志, 2000, 9(6): 392-394.
- [41] DU Q Z, JERZ G. Winterhater P separation of andrographolide and neoandrographolide from the leaves of *andropholis paniculata*[J]. J Chromatogr A, 2003, 984(1): 147-149.
- [42] DEGENHARDT A, HABBEN S, WINTERHAHER P. Isolation of the lignan secoisolariciresinol diglucoside from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) by high-speed counter-current chromatography[J]. J Chromatography A, 2002, 943: 299-302.
- [43] LI H B, CHEN F. Preparative isolation and purification of astaxanthin from the microalga *Chlorococcum* sp. by high-speed counter-current chromatography[J]. J Chromatography A, 2001, 925: 133-137.
- [44] 夏明, 杜琪珍. 高速逆流色谱提取分离红曲色素的研究[J]. 广州食品工业科技, 2003, 18(4): 5-7.
- [45] OKA H, HARADA K, SUZUKI M, et al. Separation of spiramycin components using high-speed counter-current chromatography[J]. J Chromatogr A, 2000, 903(1/2): 93-98.
- [46] YOICHI S, NAOMI M, HEISABURO S, et al. Purification of lactic acid dehydrogenase from crude bovine heart extract by pH-peak focusing counter-current chromatography[J]. J Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2002, 776: 183-189.
- [47] OKA H, ITO Y. Separation of lac dye components using high-speed counter-current chromatography[J]. Counter-current Chromatography, 2000(4): 24-29.
- [48] HARADA K I, SUZUKI M. Separation of WAP8294A components, a novel anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* antibiotic, using high-speed counter-current chromatography[J]. J Chromatogr A, 2001, 932(1): 75-81.
- [49] 李艳, 肖凯军. 高速逆流色谱研究进展——在天然产物有效成分分离方面的应用[J]. 现代食品与药品杂志, 2006, 16(4): 78-80.