

· 综述 ·

## 真空柱色谱在中药有效成分富集和制备中的应用

姚丽<sup>1,2</sup>, 刘晓谦<sup>2,3\*</sup>, 高慧敏<sup>2,3</sup>, 王智民<sup>2,3</sup>

(1. 广东药科大学 中药学院, 广州 510006; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;  
3. 中药质量控制技术国家工程实验室, 北京 100700)

**[摘要]** 中药化学研究日趋关注微量成分、新成分的分离和鉴定, 而其生物活性如何、是否具有开发价值等问题, 往往止步于其量微难得。现有的制备型 HPLC, 工业色谱等设备经济性差, 难以胜任实验室规模的制备, 如何突破该瓶颈的制约, 是中药研究能否深入的关键之一。结合本实验室的经验, 本文介绍一种高效、便捷、廉价的传统分离技术——真空柱色谱法, 尽管它已广泛应用于制药、食品、化妆品等行业, 但缘于该技术诀窍缺乏系统披露, 对于初涉中药研究领域的学生或科研工作者来说, 大量制备目标化合物仍是一种挑战。本文结合实例, 在简述真空柱色谱特点、原理、操作要点的基础上, 着重介绍了该技术在新化合物发现、已知化合物快速制备中的应用, 并介绍应用该技术进行制备过程中的实验室分离策略。

**[关键词]** 真空柱色谱; 分离; 中药有效成分

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)21-0197-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016210197

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160906.0935.068.html>

**[网络出版时间]** 2016-09-06 9:35

## Application of Vacuum Liquid Chromatography in Enrichment and Preparation of Active Ingredients of Traditional Chinese Medicines

YAO Li<sup>1,2</sup>, LIU Xiao-qian<sup>2,3\*</sup>, GAO Hui-min<sup>2,3</sup>, WANG Zhi-min<sup>2,3</sup>

(1. School of Traditional Chinese Medicine (TCM), Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 3. National Engineering Laboratory for TCM Quality Control Technology, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** With the development of traditional Chinese medicine (TCM) chemistry, more and more studies have focused on the separation and identification of micro-components and new components. However, their biological activity and development value have been hard to be studied due to the difficulties in enrichment and purification. Although, great progresses had been achieved in chromatography technology, such as HPLC and preparative HPLC, it is still hard to prepare in a large scale in laboratory. In order to find a suitable technique, vacuum liquid chromatography (VLC), which is an effective, convenient and cheap traditional separation technique, was recommended according to our experiences in reference examples during the preparation of these target compounds. Although VLC has been widely used in pharmaceutical, food and somatic industries, it was still a great challenge for new researchers in the field of separation and purification of TCM due to the lack of systematic disclosure of the technique. The characteristics, principle and key operating points of VLC and the separation strategy in laboratory were introduced in this paper to help study the separation and purification of TCM.

**[Key words]** vacuum liquid chromatography; separation; traditional Chinese medicine effective component

**[收稿日期]** 20151130(011)

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09103201-009, 2012ZX09103201-027); 中药饮片质量保障体系研究(一)(201507002); 中国中医科学院客座研究员联合创新研究项目(ZZ070837)

**[第一作者]** 姚丽, 在读硕士, 从事中药质量控制研究, Tel: 18810336043, E-mail: rita\_liyao@163.com

**[通讯作者]** \* 刘晓谦, 副研究员, 从事中药制剂与质量控制研究, Tel/Fax: 010-84017310, E-mail: lianyu1127@126.com

发现新化合物、活性成分和揭示中药药效物质基础仍是中药研究的长期主要任务,常见中药的化学成分及其活性研究已较深入,为此,学术界多把目光聚焦于微量成分和痕量成分的研究与发现上;得到这些成分已属不易,结构鉴定后往往剩余极少,很难再开展深入研究,如质量标准制定、新成分的活性筛选与评价等;积累一定量的纯品对于多数课题组来说都是一项艰巨的任务。柱色谱法(CC)是常规分离纯化的首选方法,传统 CC 因操作时间长、分离效果差、耗费溶剂多等缺点而不适宜于大样本、特定目标的快速分离;制备型 HPLC 能实现微量成分的良好分离和制备,但在进行克级样品的制备时,其高昂的成本和漫长的工时是其短板;工业色谱尽管能实现大量制备,但多不适宜于实验室级需求量(1~5 g)的样品制备,且多数实验室缺少该设备。为寻找高效、廉价、快速、操作简单的技术,国内外众多学者做了大量研究,其中真空柱色谱(Vacuum Liquid Chromatography, VLC)就是一个成功范例。尤其是在目前中药化学研究聚焦在微量或极微量成分新化合物或新骨架成分的研究潮流中,VLC 技术如果在“变微量成分分离为常量成分制备”、“有目标的制备代替传统的盲目分离”的制备策略指导下,仍是效率高、快捷、低成本的实用技术<sup>[1-2]</sup>,特别是在“高大上”仪器堆积研究模式的当下,“低头看”接地气的传统技术仍有其一席之地。目前,VLC 作为分离纯化技术已被广泛应用到中药复杂成分的研究中,可针对不同对象、层次、目的和要求的化学成分制备实现目标分离,特别是适宜于中药对照品和微量成分的制备。为大量分离制备目标产物,样品在进行分离前常采取简单前处理(如萃取,VLC 富集),分离时常采用 VLC-TLC 联用技术<sup>[3]</sup>等。该技术虽然在化学合成、中药化学等方面有所应用,但源于该技术诀窍缺乏系统披露,对于中药研究领域的科研人员来说,大量制备目标成分仍是一个挑战,为此,本文就 VLC 的操作要点、方法和应用,并结合我国国家工程实验室对照品分离制备的经验进行阐述,为从事中药化学对照品、微量成分等的制备分离提供借鉴。

## 1 VLC 简介

**1.1 原理** VLC 是根据抽真空的方法进行分离的柱色谱。采用砂芯板作为色谱柱隔板,填料可选择硅胶 H,氧化铝及各种反相填料等,采用干法填充的方式进行装柱,且边抽真空边装填可使之填充更均匀。烧结砂芯板(一般为 G4)可以防止硅胶微粒的

透过,可在样品以有机溶剂溶解后进行湿法上样或样品与分散剂混合干燥后的干法上样。根据待分离的成分的不同性质,采用不同的洗脱剂系统进行抽真空分离,分段收集。将收集到的样品同时用 TLC 或 HPLC 或 LC-MS 进行跟踪观察<sup>[4]</sup>,重点收集拟富集流分。值得注意的是,仪器规格的选择应根据样品量的大小来定<sup>[5]</sup>。

**1.2 特点和优势** 为了比较优势,默克公司<sup>[6]</sup>从含有维生素和生物碱的混合物中分离出多种结构极为相似的化合物,并得到了价格昂贵、不易获得的乌头碱;为获得 1 g 乌头碱,分别运用制备柱色谱和 VLC 2 种方法,并对 2 种方法进行比较,各项参数见表 1。由表 1 可明显发现:VLC 具有高效、价廉、简单的特点,可在很大程度上节约填料和溶剂,并大幅缩短制备时间和成本。

表 1 VLC 与制备薄层法分离乌头碱的结果比较

Table 1 Compare of VLC and PTLC technology on separating of aconitine

参数	PTLC	VLC
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 的用量/g	760	90
装柱时间/h	48	1
溶剂量/L	4.25	1.5
分离所需时间/h	54	7
压力	常压	真空
可重复利用性	不可以	可以
操作	较为复杂	较简单
使用范围	适合简单、少量的样品	适合复杂、大量的样品

**1.3 操作要点** ①柱高的选择:应根据分离目的来决定,由于中药提取物的黏性往往较大,因此柱床的高度不宜过高,以 5~10 cm 之内最宜。②填料的选择:针对粗提物粗分时,一般选用粗硅胶;针对弱极性-中等极性成分富集流分的分离时,宜选择硅胶 H。③洗脱溶剂的选择:为了快速制备待分离成分,需要“锁定目标,分步实施”。粗分时,尽可能选择单一溶剂,以实现待分离成分与“杂质”的“分群”;粗分后流分再富集或进一步分离纯化时,则可以考虑采用复合溶剂体系,以 2 种溶剂为宜,以最大可能的实现待分离目标成分与“杂质”的分离。对于低沸点溶剂易倒吸问题,在样品瓶外连接一个缓冲瓶也是一个恰当的做法,但应严格控制真空度。为防止试剂污染,建议在通风橱中操作。

在白花前胡香豆素的分离纯化中,采用 VLC-PTLC 相结合的方法进行二次分离(不同比例的己

烷,己烷-乙酸乙酯,乙酸乙酯),经鉴定,最终得到 2 种新的呋喃型香豆素<sup>[7]</sup> Agasyllin (左) 和 Aegelinol (右),见图 1。

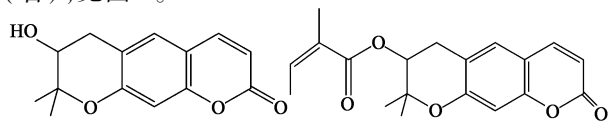


图 1 2 种香豆素成分结构

Fig.1 Two structures of pyranocoumarin

## 2 应用实例

**2.1 新化合物的发现与制备** 在化合物的分离时,一般都要对提取液进行富集或者划段,要经过粗分、目标物流分再富集等。值得注意的是,无论是直接上样或是拌样上样,最好用未吸附样品的硅胶将样品与柱内壁隔开,这样可以避免洗脱时产生边缘效应<sup>[8]</sup>。对于纯粹分离鉴定新化合物来说,为提高新化合物的发现概率,可先采用 UPLC-MS 对拟制备中药特定流分的各个峰进行结构推测,并结合其 UV

给出的结构类型信息,以推测是否为新化合物,然后再锁定制备目标,开展定向制备。

如在采用 VLC 对心叶淫羊藿乙酸乙酯部位进行化学分离的研究中,先以不同比例的石油醚-乙酸乙酯洗脱,再以三氯甲烷-甲醇不同比例洗脱,分离得到了 8 种化合物,其中有 1 个化合物为该属首分,6 个为该植物首分<sup>[9]</sup>,大大提高了分离效率,且能够快速发现新化合物。相似的研究还有墨角藻<sup>[10]</sup>,之前其化学成分的研究仅仅停留在墨角藻聚糖,而采用 VLC 得到了海藻多酚,为该属首分。采用 VLC 对小蓼提取物进行活性筛选,发现了一种新的抗恶性肿瘤细胞的物质<sup>[10-11]</sup>。在番荔枝根<sup>[12]</sup>里找到了能抑制血小板激活因子的成分,填补了此种药物在生物活性方面的空白。同样的,VLC 在宽苞棘豆<sup>[13]</sup>的化学成分研究中发现了 3 种新黄酮类成分。因此,VLC“卡段”结合 LC-MS 结构推测的思路是发现新化合物较为便捷的实用方法,相似的研究较多,见表 2。

表 2 VLC 在新化合物发现分离中的应用

Table 2 Application of VLC on discovery and separation of new compounds

分离部位	化合物归属	来源	分离技术	文献出处
70% 乙醇提取物	黄酮	毛樱桃叶	VLC	[14]
95% 乙醇提取物	黄酮	芫花	VLC 和 Pre-HPLC	[15]
乙醇部位	五环三萜	白马骨	VLC	[16]
石油醚提取液	甾醇	半叶马尾藻	VLC	[17]
甲醇提取液	黄酮	丹参	VLC	[18]
甲醇提取液	芳杂环化合物	葛枣猕猴桃	VLC	[19]
乙醇提取液	八硫环醚	核桃叶	VLC	[20]
正己烷提取液	脂肪酸	海洋放线菌代谢物	VLC	[21]
95% 乙醇提取物	甾体类化合物	杯叶海棉	VLC	[22]
	萜类化合物	棕色扁海绵		
	环肽类化合物	隋氏蒂壳海绵		

**2.2 已知目标物的快速分离** 对于已知目标物的分离应根据化合物的性质,选择适宜的提取方法,最大限度地提高目标成分提取率,降低非目标物的浸出量,以得到足量、高纯度的对照品。如黑胡椒通过 VLC 分离(Rf = 0.76,己烷-乙酸乙酯 1:3),得到了纯净、足量的油酸<sup>[23]</sup>,该物质具有杀虫效果好、毒性小的特点。在多年生山靛的 VLC 分离中,采用反相 VLC(TLC 级别)进行纯化,得到了较为纯净的酚酸类物质<sup>[24]</sup>;本课题组采用 VLC 技术从苦参中分离异戊烯基黄酮对照品,在很短时间内可实现 8 个异戊烯基黄酮成分达克级量的制备,相似研究见表 3。该技术的应用,可实现目标成分的快速制备、富集,可为后期药效筛选,节约时间成本,尤为适宜于新功效成分的发现与制备。

对于成分复杂、难分离的物质,可采用 2 次或多次 VLC 分离。大豆异黄酮除在大豆中提取外,亦可在豆制品及其发酵产品中得到,特别是发酵产品中大豆异黄酮的含量较高,但其成分较为复杂。如韩国豆瓣酱是一种由真菌和杆菌发酵的特殊食品,分离中先用 2 种不同规格的 VLC 柱子(90 mm × 50 mm,65 mm × 40 mm)进行粗分,然后采用 Sephadex LH-20 色谱柱,Pre-HPLC 进一步纯化,最终得到 HMG-CoA 还原酶抑制剂成分染料木黄酮、异黄酮苷及黄豆黄素<sup>[42]</sup>。在进行 N-磷酸化氨基酸的仿生化反应机制的研究中<sup>[43]</sup>,利用梯度洗脱,成功地利用 VLC 柱从保温后的混合物中分离了二肽,为其反应机制的探讨打下了基础。

**2.3 对照品的大量制备** VLC 可看作是柱色谱形

表 3 VLC 在目标成分快速富集中的应用

Table 3 Application of VLC on rapid separations of bio-active substances

制备物质	化合物归属	来源	分离技术	文献出处
环氧酮	黄酮	毛姜黄	VLC	[25]
黄酮	黄酮	桃叶蓼	VLC	[26]
胡萝卜素	四萜	棕榈油	VLC	[27]
阿魏酮 C	香豆素	花贝母根茎	VLC-PTLC	[28]
6-姜酚脞	姜酚脞	姜油树脂	VLC	[29]
苦参碱	生物碱	苦参	VLC	[30]
黑僵菌素 A/B	六元环缩肽	肉汤	UWV-VLC	[4]
阿魏酸	肉桂酸	<i>Kelussia odoratissima</i>	NP-VLC 和 RP-VLC	[31]
三萜类	三萜	木瓜	VLC	[32]
甾体皂苷	皂苷	沙漠枣	VLC	[33]
吉马酮	黄酮	蓝心姜	VLC	[34]
儿茶素	黄烷醇	<i>Acacia hydasypica</i> R	VLC 和 FC	[35]
高良姜醇	黄酮	高良姜	VLC 和 LC-MS	[36]
橙黄决明素	黄酮	决明子	VLC	[37]
香草酸	肉桂酸类生物	老鼠筋	VLC	[38]
姜酚	姜油树脂	生姜	VLC	[39]
$\beta$ -谷甾醇	甾醇	向日葵	VLC	[40]
甾体、萜类物质	甾体、萜类物质	山槐	VLC 和 Pre-HPLC	[41]

式的制备薄层,其与制备型 LC 都可对中药目标提取物分离、制备,制备 HPLC 虽然分离效果较好,但成本较高<sup>[44]</sup>、制备量少,传统上有时会用制备薄层色谱(PTLC)来代替。VLC 与 PTLC 在对照品制备方面的优势与特点见表 4。在北五味子五味子甲素的分离中<sup>[45]</sup>,采用 VLC 方法进行梯度洗脱,将木质素类成分合并,进行第 2 次 VLC 分离,并重结晶,最后在 1 kg 北五味子中分离到 5 g 五味子甲素。

表 4 常用制备薄层色谱与 VLC 的比较

Table 4 Comparison between PTLC and VLC

参数	VLC	PTLC
压力	减压	常压
固定相	硅胶 H、氧化铝、反相填料	常规正相、反相填料皆可
分离时间	短	长
操作	简单	简单
优缺点	制备量大(g 级)、快速、便捷、成本低	制备量少(mg 级)、溶剂消耗少、溶剂污染大、样品损失多
适用范围	易分离物质的低成本制备、复杂物质的快速富集、难分离物质的制备	少量难分离物质的制备

VLC 和 PTLC 共同的缺点在于,  $R_f$  之差  $< 0.2$  的物质很难分开,需要借助其他制备色谱手段,如细长的加压柱(低压)、中压制备(样品量 100 ~ 500 mg),HPLC 制备(样品量  $< 50$  mg)等。因此色谱联用技术可很好地实现优势互补,如在海洋生物盾叶蕨藻的 VLC 分离过程中,仅采用 VLC 分离纯度较低,与制备型 HPLC 相结合达到纯化、制备的效果,

最终得到一种新的目标成分蕨藻红素<sup>[46]</sup>,见图 2。相似方法的研究还有海洋无脊椎生物<sup>[47]</sup>(次生代谢产物)、异叶茴芹<sup>[48]</sup>(挥发油)、长春花<sup>[49]</sup>(长春碱和长春新碱)及海绵<sup>[50]</sup>(双萜甲酰胺)。将 VLC 灵活的与 HPLC,PTLC 等结合,可快速、准确的得到足量的目标产物。

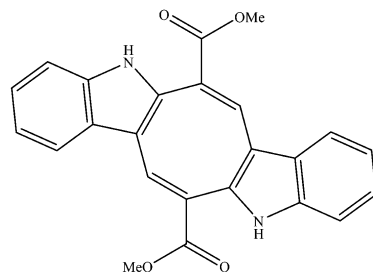


图 2 蕨藻红素

Fig.2 Structure of caulerpin

### 3 小结与展望

起初 VLC 最先用在有机合成实验室的快速纯化中,但随着该技术的发展,已经慢慢的融入到中药及天然产物的分离纯化中去,VLC 的梯度洗脱,能灵活切换洗脱系统极性,更有利于实现“变微量、半微量成分分离为常量分离的策略”。除以上列出的成分外,VLC 还被广泛用到甾醇类、三萜皂苷类、二苯乙烯三聚体或四聚体<sup>[51]</sup>、萜类<sup>[52]</sup>等成分的分离研究中。相较而言,对于酚酸类物质、结构复杂的醚萜类物质以及生物碱的研究比较多,对于苷类物质的研究相对较少。

VLC 仍有不足方面:① VLC 对难分开的物质

( $R_f < 0.2$ ), 单次分离得到物质纯度较低, 需借助其他制备色谱共同完成或增加柱长和增大吸附剂的量; ②没有连接 UV 或者其他检测器, 不能及时的在线分析物质的结构及其纯度, 目前的 FLASH 快速制备色谱就克服了 VLC 的该缺陷; ③在运用 VLC 时, 要对样品进行较为复杂的前处理, 如果处理不当或没有掌握其中的诀窍, 则分离效果较差。这三方面都制约 VLC 的发展。在实验中应综合考虑各方面因素, 灵活运用实验设备和分离策略, 在达到高效、迅速制备对照品的同时, 尽可能降低成本。自动真空液相色谱(AUTO-VLC)也是在 VLC 基础上的提升, 是一个较好的实例<sup>[53]</sup>。在未来的研究中, 应依据实际需要, 把握好各种仪器设备的特点, 恰当利用多种技术的联用, 以实现优势互补。

总之, 在实验目标成分分离、富集过程中, 如何降低成本, 灵活旧法新用、高效获取对照品, 是值得众多中药研究者考虑的问题。相信今后会有更多的学者灵活的运用 VLC, 发挥其在中药研究中的作用。

#### [参考文献]

[1] 陈业高, 张燕, 冯丽萍. 真空液相层析及其在生物活性天然产物分离中的应用[J]. 云南化工, 2000, 27(5): 19-21.

[2] Targett N M, Kilcoyne J P, Green B. Vacuum liquid chromatography an alternative to common chromatographic methods[J]. J Org Chem, 1979, 44(26): 4962-4964.

[3] Pieters L A C, Vlietinck A J, Garbarino J, et al. Vacuum liquid chromatography and quantitative <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy of tumor-promoting diterpene esters[J]. J Nat Prod, 1989, 52(1): 186-190.

[4] Hu Q, Ren S X, Xu D, et al. The Optimization of ultrasonic wave extraction and vacuum liquid chromatography for isolation of destruxins[J]. Res J Biol, 2007, 2(4): 462-467.

[5] Coll J C, Bowden B F. The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures[J]. J Nat Prod, 1986, 49(5): 934-936.

[6] Pelletier S W, Chokshi H P, Desai H K. Separation of diterpenoid alkaloid mixtures using vacuum liquid chromatography[J]. J Nat Prod, 2004, 49(5): 892-900.

[7] Razavi S M, Imanzadeh G, Jahed F S, et al. Pyranocoumarins from *Zosima absinthifolia* (Vent) linkroots[J]. Bioorganicheskaja Khimiia, 2013, 39(2): 215-217.

[8] 张红宇, 柳恒, 苏天铎. 减压液相色谱法制备季戊四

醇三乙酸酯[J]. 应用化工, 2008, 37(5): 541-543.

[9] 杨云, 张寒娟, 贺海花, 等. 心叶淫羊藿化学成分研究[J]. 中草药, 2009, 32(7): 1026-1030.

[10] Pinteus S, Rodrigues D, Horta A, et al. Vacuum liquid chromatography (VLC)-an efficient method to enrich phlorotannins extracts from *Fucus Spiralis* [J]. Curr Opin Biotechnol, 2013, 24(4): S116.

[11] Mohd Ghazali M A, Al-Naqeb G, Krishnan S K, et al. Apoptosis induction by polygonum minus related to antioxidant capacity, alterations in expression of apoptotic-related genes, and S-phase cell cycle arrest in HepG2 cell line [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 539607.

[12] Noraziah N, Juriyati J, Ibrahim J, et al. Platelet-activating factor (PAF) receptor binding activity of the roots of *Enicosanthellum Pulchrum* [J]. Pharm Biol, 2012, 50(3): 284-290.

[13] 马彦梅, 周文明, 李炳奇. 宽苞棘豆黄酮类化学成分的研究[J]. 西北林学院学报, 2009, 24(1): 140-141.

[14] 于丽红, 赵伟, 黄肖霄, 等. 毛樱桃叶化学成分的分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报, 2015, 32(4): 256-260.

[15] 孙倩, 武洁, 李菲菲, 等. 芫花化学成分分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报, 2014, 31(2): 94-98.

[16] 冯顺卿. 白马骨的化学成分及生物活性研究[D]. 广州: 暨南大学, 2004.

[17] 刘红兵, 崔征, 李玉山, 等. 半叶马尾藻化学成分的研究[J]. 中国药学杂志, 1998, 33(8): 464-466.

[18] 岑颖洲, 许少玉, 王穗, 等. 丹参化学成分的研究[J]. 暨南大学学报, 1993, 14(3): 55-60.

[19] 王昌钊. 葛枣猕猴桃果实化学成分及生物活性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2005.

[20] 刘彬彬. 核桃叶生物活性成分的研究[D]. 杨凌: 西北林业科技大学, 2005.

[21] 谢修超. 红树植物内生放线菌的分离鉴定和 2 株海洋链霉菌活性代谢产物的分离鉴定[D]. 海口: 华南热带农业大学, 2007.

[22] 张红军. 三种西沙海绵化学成分和生物活性研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2009.

[23] Santiago V S, Rita Grace A, Villaseo I M. *Aedes aegypti* larvicide from the ethanolic extract of *piper nigrum* black peppercorns[J]. Nat Prod Res, 2015, 29(5): 441-443.

[24] Lorenz P, Conrad J, Bertrams J, et al. Investigations into the phenolic constituents of dog's mercury (*Mercurialis perennis* L.) by LC-MS/MS and GC-MS analyses[J]. Phytochem Anal, 2012, 23(1): 60-71.

[25] Faiz H C, Al-Amin M, Rahman K M, et al. Analgesic

- principle from *Curcuma amada* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 163(2015):273-277.
- [26] Ildikó L, Andrea V, Péter O, et al. Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K channels by extracts of *Polygonum persicaria* and isolation of new flavonoids from the chloroform extract of the herb [J]. *Planta Med*, 2013, 79(18): 1736-12741.
- [27] Tay Y P. Palm carotene concentrates from crude palm oil using vacuum liquid chromatography on silica gel [J]. *J Oil Palm Res*, 2007, 19(4): 421-427.
- [28] Seyed Mehdi R, Mehrnoush J. A new ester coumarin from *ferula persica wild*, indigenousto Iran [J]. *Nat Prod Res*, 2015, 29(8):717-21.
- [29] 曲翔, 吴建中, 黄雪松. 测定 6-姜酚标样物质——6-姜酚的制取与鉴定 [J]. *天然产物研究与开发*, 2009, 21(3): 445-448.
- [30] 刘冰. 减压液相层析分离提纯苦参生物碱 [D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2012.
- [31] Sajjadi S E, Shokoohinia Y, Moayedi N S. Isolation and identification of ferulic acid from aerial parts of *Kelussia odoratissima mozaff* [J]. *J J Nat Pharmaceut Prod*, 2012, 7(3): 159-162.
- [32] 宋亚玲. 中药木瓜化学成分及生物活性研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007.
- [33] Motaal A A, El-Askary H, Crockett S, et al. Aldose reductase inhibition of a saponin-rich fraction and new furostanol saponin derivatives from *Balanites aegyptiaca* [J]. *Phytomedicine*, 2015, 22(9): 829-836.
- [34] Hossain C F, Al-Amin M, Sayem A S M, et al. Antinociceptive principle from *Curcuma aeruginosa* [J]. *BMC Complem Altern M*, 2015, 15(1):191-197.
- [35] Afsar T, Khan M R, Razak S, et al. Antipyretic, anti-inflammatory and analgesic activity of *Acacia hydasypica* R. Parker and its phytochemical analysis [J]. *BMC Complem Altern M*, 2015, 15(1): 136-147.
- [36] 媛婷, 张俊爱, 程远, 等. 高良姜不同成分对人肝癌 HepG2 细胞的抗氧化损伤活性 [J]. *广东医学院学报*, 2014, 32(4): 439-441.
- [37] 寇自农, 徐龙权. 橙黄决明素的制备及其与牛血清白蛋白的相互作用 [J]. *大连工业大学学报*, 2013, 32(1): 18-22.
- [38] 彭兴. 老鼠簕(茎)化学成分和抗氧化活性研究 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2005.
- [39] 柳乃奎. 生姜中抗氧化成分提取分离的研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2004.
- [40] 宋晚平. 向日葵根中活性成分的提取分离研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2004.
- [41] Solmaz A, Fariba H A, Atefeh E, et al. *In vitro* antimalarial activity of different extracts of *Eremostachys* [J]. *Bio Impacts*, 2015, 5(3): 135-140.
- [42] Sung J H, Choi S J, Lee S W, et al. Isoflavones found in Korean soybean paste as 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors [J]. *Biosci Biotech Bioch(BBB)*, 2004, 68(5): 1051-1058.
- [43] 林天舒, 罗施中, 李艳梅, 等. 真空液相色谱柱及其应用 [J]. *理化检验-化学分册 (PTCA)*, 2002, 38(7): 359-360.
- [44] 袁黎明. 制备色谱技术与应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [45] 孙文基, 门瑛璇, 张利, 等. 真空液相色谱法用于北五味子及虎杖中几种成分的分离 [J]. *药物分析杂志*, 1997, 17(4): 276-277.
- [46] Movahhedin N, Barar J, Fathi A F, et al. Phytochemistry and biologic activities of *caulerpa peltata* native to oman sea [J]. *Iran J Pharm Res*, 2014, 13(2): 515-521.
- [47] Ebada S S, Ru A E, Lin W, et al. Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates [J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(12): 1820-1831.
- [48] Delazar A, Biglari F, Esnaashari S, et al. GC-MS analysis of the essential oils, and the isolation of phenylpropanoid derivatives from the aerial parts of *Pimpinella aurea* [J]. *Phytochemistry*, 2006, 67(19): 2176-2181.
- [49] Shams K A, Nazif N M, Azim N S A, et al. Isolation and characterization of antineoplastic alkaloids from *Catharanthus roseus* L. Don. cultivated in Egypt [J]. *Afr J Tradit Complem*, 2009, 6(2): 118-122.
- [50] Wright A D, Lang-Unnasch N. Diterpene formamides from the tropical marine sponge *cymbastela hooperi* and their antimalarial activity *in vitro* [J]. *J Nat Prod*, 2009, 72(3): 492-495.
- [51] Franz B, Abraham W, Martin S. Natural product isolation-how to get from biological material to pure compounds [J]. *Nat Prod Rep*, 2013, 30(4): 525-545.
- [52] Todorova G, Lazarova I, Mikhova B, et al. Anthraquinone, naphthalene, and naphthoquinone components of *Asphodeline lutea* [J]. *Chem Nat Compd*, 2010, 46(2): 322-323.
- [53] 朱靖博. 自动真空液相色谱装置的研制及其在五味子成分分离中的应用 [J]. *色谱*, 2015, 33(8): 864-868.

[责任编辑 顾雪竹]