

色谱技术在黄酮类化合物分离纯化中的应用研究进展

Application progress of chromatographic technology in the separation and purification of flavonoids

杨发容¹ 景联鹏¹ 顾丽莉¹ 尚关兰² 李瑞东²

YANG Fa-rong¹ JING Lian-peng¹ GU Li-li¹ SHANG Guan-lan² LI Rui-dong²

(1. 昆明理工大学化学工程学院, 云南 昆明 650500; 2. 云南烟叶复烤有限责任公司, 云南 昆明 650021)

(1. Faculty of Chemical Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650500, China; 2. Yunnan Leaf Tobacco Redrying Co., Ltd., Kunming, Yunnan 650021, China)

摘要:综述了色谱技术在黄酮类化合物分离纯化中的应用情况, 主要包含柱色谱法、制备型高效液相色谱法、薄层色谱法、超临界流体色谱法、高速逆流色谱法以及多种色谱法的联用, 并对制备型液相色谱柱的发展方向、高速逆流色谱溶剂体系的优化、多维色谱系统的耦合使用作了展望。

关键词: 黄酮; 色谱; 分离纯化

Abstract: In this review, the application of chromatographic techniques in the separation and purification of flavonoids was summarized. The usage of column chromatography, pre-high-performance liquid chromatography, thin-layer chromatography, supercritical fluid chromatography, high-speed countercurrent chromatography and a combination of multiple chromatography methods were also reviewed. The development direction of preparative liquid chromatography columns, the optimization of solvent system for high-speed countercurrent chromatography, and the use of multi-dimensional chromatography systems were prospected.

Keywords: flavonoids; chromatographic; separation and purification

黄酮类化合物是一种广泛存在于天然植物中的多酚类化合物, 具有抗肿瘤、抗氧化性、清除自由基和抗辐射等生理活性, 常被用作食品添加剂用于功能食品的生产^[1-3]。目前对黄酮类化合物的研究多为提取、分离纯

化、含量测定和制剂研究等方面, 而如何高效快速得到高纯黄酮物质是当前亟待解决的问题。针对黄酮类化合物的分离与纯化, 主要有色谱分离法、金属离子络合法^[4]、膜分离法、梯度 pH 萃取法、重结晶法^[5]、高速离心分离法^[6]、分子印迹技术^[7]以及多种技术的耦合^[8]等。相较于其他分离技术, 色谱分离技术分离效率高, 处理量大, 能分离各种性质极其类似的物质, 在用于化学物质分析鉴定的同时, 在天然产物活性成分的分离和纯化中起着重要作用。文章拟对色谱技术在黄酮类化合物的分离纯化中的应用情况进行综述, 主要包括柱色谱法、制备型高效液相色谱法、薄层色谱法、超临界流体色谱法和高速逆流色谱法等, 以期对黄酮类化合物的色谱分离研究提供参考。

1 黄酮类化合物的色谱分离

1.1 柱色谱法

经典的柱色谱技术分离通量大且效率高、适用范围广、操作简单, 是从植物粗提液中分离大量黄酮类化合物的有效方法之一, 常用的吸附剂或载体主要有硅胶、聚酰胺、葡聚糖凝胶、环糊精键合凝胶、氧化铝、大孔树脂、纤维素粉和离子交换树脂等。

硅胶柱色谱主要用于分离极性较小的黄酮类化合物(如异黄酮、黄烷酮、二氢黄酮醇和高度甲基化或乙酰化的黄酮及黄酮醇), 当硅胶降活后也可分离极性较大的黄酮类化合物(如苷类、多羟基黄酮); 聚酰胺应用范围较广, 适用于分离苷类、苷元、查耳酮和二氢黄酮等多种类型的黄酮类化合物; 葡聚糖凝胶既可分离苷元也可分离苷类物质, 分离黄酮苷元时, 主要靠吸附作用, 苷元中游离酚羟基数目越多, 吸附力就越强, 也就越难洗脱, 在分离黄酮苷类时, 分子筛的属性起主导作用, 苷类物质按相

基金项目: 云南省烟草公司科技计划项目(编号: 2018530000242025)

作者简介: 杨发容, 女, 昆明理工大学在读硕士研究生。

通信作者: 顾丽莉(1963—), 女, 昆明理工大学教授, 博士。

E-mail: liligu001@163.com

收稿日期: 2021-06-18

对分子质量由大到小依次流出柱体; β -环糊精是一种具有“内疏水,外亲水”功能的环状空腔化合物,主体分子通过“内识别”和“外识别”作用对客体分子进行识别,基于此特性,多种 β -环糊精键合不同类型的固定相用于黄酮类化合物的分离^[9];氧化铝柱色谱仅适用于分离分子中无3-羟基、5-羟基或者邻二酚羟基结构的黄酮类化合物,具有较多局限性;大孔树脂集吸附性与分子筛分离于一体,待分离目标分子的体积及其与树脂形成氢键或范德华力的作用大小直接影响分离效果;纤维素柱吸附能力有限且结果不稳定,已很少使用;离子交换树脂通常只用作黄酮粗提液的预处理,洗脱水溶性杂质,降低后续分离难度。在众多载体中,以硅胶、聚酰胺、葡聚糖凝胶和大孔树脂最为常用,其优缺点如表1所示。

Zhang等^[10]比较了D101、D201、AB-8、HPD400、D301和D311 6种大孔树脂对银杏黄酮苷(槲皮素、山柰酚、异鼠李素)的富集效果。结果显示,AB-8树脂吸附效果最佳,3种黄酮苷的纯度从提取物中的8.93%,9.88%,6.11%分别增加到30.12%,35.21%,14.14%,回收率分别为88.76%,93.78%,60.90%。Hou等^[11]研究了D101、DM301、NKA-II、NKA-9、X-5、AB-8、HPD-100、HPD-400、HPD-600和HPD-750 10种大孔树脂对越南槐总黄酮的吸附和解吸特性,结果表明,AB-8型树脂吸附性能最佳,吸附量高达18.30 mg/g,在此基础上,以AB-8型树脂为填料,通过柱层析对总黄酮进一步纯化,最终提取物中总黄酮含量从12.14%上升到57.82%,提高了约4.76倍。为使分离效果更佳,多种柱色谱串联使用成为

一种趋势。刘晓艳等^[12]采用硅胶、大孔树脂和Sephadex LH-20凝胶等柱色谱从鸡血藤水提物的乙酸乙酯和正丁醇萃取部位分离并鉴定了异豆素、柚皮素和毛蕊异黄酮等23个黄酮类化合物。郑丹丹等^[13]综合应用硅胶、大孔树脂和Sephadex LH-20凝胶柱色谱对蛇床子乙醇提取物进行分离,经结构鉴定,共分离出13种黄酮物质,其中D-葡萄糖苷、山柰酚-3-O- β -D-半乳糖苷和山柰酚-3-O-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 6)-O-葡萄糖苷等7种物质均是首次从蛇床属植物中得到。利用柱色谱法从天然植物中分离纯化黄酮类化合物已经十分普遍。单一柱色谱法通常用于从黄酮粗提液中获得总黄酮物质,实现黄酮物质与非黄酮物质的初步分离,而多种柱色谱法的串联分离度更高,分离效率也更高,在单一柱色谱法的基础上使总黄酮物质含量达到更高,或进一步获得黄酮单体。

1.2 制备型高效液相色谱法

制备型高效液相色谱(Preparative high performance liquid chromatography, PHPLC)通过高负载、高分离度的制备柱来实现组分分离,其处理量大,效率高,重现性好,能根据被分离物质的性质配备不同的检测器^[14],其制备规模与适用范围如表2所示。

Fan等^[16]建立了制备型二维正相液相色谱(NPLC)和反相液相色谱(RPLC)结合固相萃取技术从甘草中分离纯化黄酮类化合物的方法。黄酮粗提液经固相萃取处理后可去除大多数非黄酮物质,在此基础上,一维中使用NPLC成功从甘草粗提物中获得了16种黄酮组分,二维中使用RPLC分离在NPLC模式下洗脱的组分。经

表1 柱色谱技术优缺点

Table 1 Advantages and disadvantages of column chromatography technology

吸附剂	优点	缺点
硅胶	应用范围广、操作简单、柱寿命长;分离量大、效果好	洗脱繁琐耗时、易受金属离子干扰、成本高、分离能力低
聚酰胺	选择性好、样品容量大、可重复利用;应用范围广、成本低,适合工业化	洗脱速度慢且洗脱溶剂污染环境;死吸附较大、样品损失大
葡聚糖凝胶	应用范围广、有色谱选择性;淋洗速度快、可重复使用	对游离酚羟基较多且分子量小的物质效果不理想
大孔树脂	比表面积大、吸附能力强且速度快,物化性质稳定;使用周期长、解吸条件温和、适应性强、成本低,适合工业化	分离易受洗脱剂种类、温度影响;产物纯度不高,且仅限于水溶性物质的纯化

表2 制备型高效液相色谱柱规格参数^[15]

Table 2 Specifications of preparative high performance liquid chromatography columns

级别	柱内径/cm	柱长/cm	填料粒度/ μ m	处理量/g	应用范围
半制备级	1~2	15~50	10~30	0.01~0.05	实验室
克级	5	20~70	40~60	0.1~1.0	实验室、企业
工业级	10~50	50~100	40~60	20	企业

NPLC 和 RPLC 分离后,共纯化出 24 种黄酮单体,纯度均在 90% 以上,最高可达 99.25%。Li 等^[17]建立的离线二维 PHPLC 从积雪草中分离黄酮类化合物,先后以苯基反相柱和 C₁₈反相柱作为固定相,成功获得了纯度超过 98% 的类黄酮苷。Zhuang 等^[18]依托在线型制备型液相色谱,以 C₁₈柱为固定相,乙腈—水为流动相,梯度洗脱,从朝鲜淫羊藿粗提液中成功分离出山奈酚-3,7-di-O- α -l-鼠李糖苷、二叶淫羊藿苷 A 和二叶淫羊藿苷等 18 种高纯度黄酮类化合物,而该系统整个分离时间仅为 20 h,周期较短,可为从其他天然产物中分离复杂组分提供有效借鉴。制备型高效液相色谱由分析型高效液相色谱发展而来,以目标产物的纯度、产量、生产周期和运行成本等为主要考虑因素。近年来,制备型高效液相色谱已成为当代高效分离纯化的研究前沿。

1.3 薄层色谱法

薄层色谱法(Thin-layer chromatography, TLC)是将厚度约为 0.10~0.25 mm 的吸附剂(硅胶或化学键合硅胶、纤维素、氧化铝和聚酰胺等)铺在一定尺寸的表面平整的玻璃、铝板或塑料板上作为固定相,用展开剂将样品展开,从而实现色谱分离的一种技术。常用类型有高效薄层色谱^[19]、制备薄层色谱^[20]、反相薄层色谱^[21]、微乳薄层色谱^[22]和离心薄层色谱^[23]等。高颖等^[24]以微乳薄层色谱从舒筋定痛胶囊和苏氏接骨胶囊中分离出柚皮苷和金丝桃苷,为研究含黄酮类成分的药物提供了一种简便、准确、高效的分析方法。赵惠茹等^[25]以聚酰胺为固定相,十二烷基硫酸钠—正丁醇—正己烷—水组成的微乳体系为展开剂,对槐米中黄酮类成分进行分离,最终得到的斑点数目多,且斑点圆整不拖尾、荧光强度高,表明该法适合槐米中黄酮类组分的分离。

1.4 超临界流体色谱法

超临界流体色谱(Supercritical fluid chromatography, SFC)是以超临界流体为流动相,固体吸附剂或键合到载体上的高聚物为固定相的色谱。因 CO₂兼具化学惰性、无毒无害和容易制备等优点,且临界温度和压力容易达到,故在 SFC 中最为常用,但 CO₂极性较小,因此常添加甲醇等改性剂用于分离极性较大的物质^[26]。刘士敏等^[27]采用 SFC 成功分离了 3-羟基黄酮、6-羟基黄酮和 7-羟基黄酮,试验表明流动相组成对分离影响最为显著,单纯的 CO₂不能将 3 种组分彻底洗脱,加入少量的磷酸则可显著改变 3 种组分的色谱行为,从而成功将 3 种组分高效分离。吴晓闻等^[28]在温度 40 °C,压力 20~40 MPa 下,以添加了 10% H₂O 的 CO₂作为流动相, C₁₈为色谱柱,成功分离了山奈素、杨梅素和槲皮素 3 种单体。杨杰等^[29]通过优化色谱柱、改性剂、添加剂和柱温等色谱条件,确定了 SFC 分离黄酮的一般色谱条件,并探究

了黄酮物质在 SFC 上的色谱行为规律,结果发现结构相近的黄酮类化合物通过 SFC 能实现很好的分离。相比其他分离纯化技术,超临界分离技术克服了废弃有机溶剂多、污染大、耗时长、具有快速、高效和环保的优势。

1.5 高速逆流色谱法

高速逆流色谱(High-speed counter-current chromatography, HSCCC)是一种利用混合物中各组分在两液相间分配系数的差异,由移动相形成液滴通过作为固定相的液柱来实现混合物分离的技术^[30]。该法不仅分离过程仅取决于目标物的溶解性能,不存在样品损失或变性,具有持续高效、回收率高和分离量大等优点,而且不需要固体担体,避免了柱色谱法分离时因酚羟基与固体担体产生不可逆吸附而难以洗脱的缺点。对于 HSCCC 分离,其溶剂系统和洗脱方式的选择是保证分离效果的前提,故对溶剂系统和洗脱方式的研究十分重要。

1.5.1 高速逆流色谱溶剂体系的选择 当前对于溶剂体系的优化常用 Ito、Oka 和 Arizona 等方法^[31-32],该法提供了 16 种或 23 种可选溶剂体系,但需要依次试验,耗时繁琐。随后 Chen 等^[33]提出的 NRTL-SAC(非随机双液段活度系数)模型将溶剂与溶质之间的相互作用描述为 4 个分段:疏水性分段、给电子分段、吸电子分段和亲水性分段,该模型简单实用,预测精度高,只需少量试验数据即可筛选出最佳溶剂体系。梁君玲等^[34]又以 HEMWat(正己烷—乙酸乙酯—甲醇—水)体系为基础,借助 9×9 排列表得到的溶剂体系选择方案(如图 1、图 2 所示)。在该体系中,其分配系数的对数(lgK)与对应溶剂比例呈线性关系,实际过程中在表中随机选取两个溶剂体系,只需分别获得这两个体系中化合物的分配系数,即可通过回归方程 $y(\text{体系系数}) = a \lg K + b$ (a, b 为拟合系数),最终确定分配系数最佳的溶剂体系。

1.5.2 高速逆流色谱洗脱方式的选择 通常情况,同一流动相仅能洗脱一定极性范围内的组分,而对于复杂组分,当其极性和浓度差异大以及分配系数相近时,则需变

MW	19	28	37	46	55	64	73	82	91
HE	A	B	C	D	E	F	G	H	I
19	A			*	*	x	x	x	x
28	B				*	*	x	x	x
37	C					*	*	x	x
46	D						*	*	x
55	E							*	x
64	F								*
73	G								
82	H								
91	I								

x The unsable system The favorable system
 The usable system * The infrequent system
 The start system The second system

图 1 溶剂体系 9×9 表

Figure 1 Solvent system 9×9 table

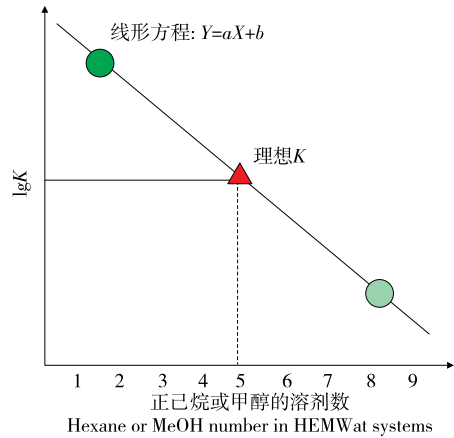


图 2 K 值估算模型
Figure 2 Estimation model of K

换洗脱方式,常用洗脱方式主要有梯度洗脱、双向洗脱、闭路循环洗脱和推挤洗脱等^[35-37],各洗脱方式优缺点如表 3 所示。

高速逆流色谱多与其他分离技术联合使用,常作为最终纯化技术分离黄酮单体,相关实例如表 4 所示。

1.6 多种色谱技术耦合分离纯化黄酮类化合物

熊朝栋等^[46]以氯仿—甲醇—水($V_{\text{氯仿}}:V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=13:6:2$)为展开剂,初步从玳玳果黄酮提取物分离得到新橙皮苷和柚皮苷,其纯度分别为 69.24%和 75.45%,再经高压液相色谱分离,其纯度分别达到 98.84%和 98.81%。Wang 等^[47]依次使用大孔树脂柱色谱,中压液相色谱和高速逆流色谱纯化大麦苗粗提液中 6"-芥子酰皂草苷、异金雀花素 7-O-(6"-阿魏酰基)葡萄糖苷、6"-阿魏酰基皂草苷和(芹菜素 7-木糖基(1"-2")葡萄糖苷)

表 3 各洗脱方式优缺点比较

Table 3 Comparison of advantages and disadvantages of each elution method

洗脱方式	操作方法及洗脱过程	类别	优点	缺点
梯度洗脱	改变流动相组成,pH 值,流速	线性、步进、pH 梯度洗脱	分离范围大、溶剂消耗小、分离时间短	若溶剂体系变化大,则固定相易损失
双向洗脱	借助切换阀改变相角和洗脱方向	正、反向洗脱	分离时间短、色谱峰峰型尖锐	不能连续不间断出峰,且可能出现回声峰
闭路循环洗脱	检测器出口与色谱入口相连,使目标组分实现再次分离	—	适用于 K 值相近的物质	随着循环次数的增加,色谱峰会变宽,分离时间变长
洗脱—推挤	常规洗脱、扫除洗脱、推挤洗脱	—	分离范围大、可连续不间断按 K 值顺序分离	操作过程需停泵
洗脱—反推挤	常规洗脱、改变流动相方向	—	能分离极性范围大的物质、无需停泵	不能连续不间断出峰,且可能出现回声峰

表 4 高速逆流色谱在黄酮单体分离中的应用

Table 4 Application of high-speed countercurrent chromatography technology in the separation of flavonoid monomers

植物源	溶剂系统(V/V)	黄酮单体及纯度	参考文献
黄芪	正己烷:乙酸乙酯:甲醇:水(1:10:2:10) 乙酸乙酯:乙醇:正丁醇:水(30:10:6:50)	毛蕊异黄酮苷(96.50%)、芒柄花苷(97.30%)	[38]
蓝玉簪龙胆	乙酸乙酯:正丁醇:水(4:0.5:5)	龙胆苦苷(98.2%)、异荭草素(94.5%)、异牡荆苷(96.0%)	[39]
澳洲薄荷	乙酸乙酯:正丁醇:水:乙酸(3:1:3:0.005)	香叶木苷(95.2%)	[40]
新疆圆柏枝叶	氯仿:甲醇:正丁醇:水(4:3:0.5:2)	异槲皮苷(91.89%)、槲皮苷(98.45%)、槲皮素-3-O-(6"-O-乙酰基)- β -D-吡喃葡萄糖苷(95.35%)	[41]
胡芦巴	正己烷:乙酸乙酯:甲醇:水(1:4:2:6)	鼠李糖苷(98.6%)、鼠李糖苷元(99.1%)	[42]
丹参	正己烷:氯仿:甲醇:水(0.5:4:3:2) 氯仿:甲醇:水(4:3:2)	高车前素(98%)、泽兰黄酮(98%)、高车前苷(97%)、泽兰黄酮-7-葡萄糖苷(95%)	[43]
绞股蓝	正己烷:乙酸乙酯:甲醇:水(4:5:4:5)	槲皮素(99.23%)	[44]
玫瑰花瓣	正己烷:乙酸乙酯:甲醇:水(2:5:1:5)	紫云英苷(98.88%)、扁蓄苷(98.06%)、胡桃苷(95.03%)	[45]

4 种黄酮类化合物。结果显示,总黄酮含量从粗提取物中的 2.2% 增加到中压液相色谱中的 95.3%,再经高速逆流色谱纯化后,4 种黄酮物质的纯度均高于 98%,而且其中 6"-阿魏酰基皂苷和(芹菜素 7-木糖基(1"→2") 葡萄糖苷)的保留时间几乎相同,表明高速逆流色谱对极性相似物质的分离有巨大潜力。Wu 等^[48]通过使用大孔树脂柱色谱结合制备高效液相色谱纯化鸢尾根乙醇提取物中的 6 种异黄酮,通过 AB-8 树脂分离后,总黄酮含量从粗提取物中的 10.60% 增加至 54.20%,回收率为 75.12%。再经 PREP-HPLC 纯化后,6 种异黄酮(鸢尾苷、鸢尾甲苷 B、鸢尾甲苷 A、鸢尾黄素、鸢尾甲黄素 A 和鸢尾甲黄素 B)的纯度分别达到 99.8%,98.2%,82.2%,99.6%,92.5%,95.8%。Panida 等^[49]使用 Sephadex LH-20 凝胶柱和半制备型反相高效液相色谱(RP-HPLC)对香蕉叶芦丁提取液进行纯化,经 Sephadex LH-20 凝胶柱纯化后,其纯度最高可达 74%~84%,再经 RP-HPLC 进一步纯化,纯度可达 98.4%。多种色谱技术的有机结合将各种色谱技术的优势集于一体,在降低分离成本,提高分离效率和产品纯度等方面具有显著优势,现今将多种色谱技术耦合分离纯化黄酮类化合物已成为研究者们关注的热点。

2 总结与展望

天然植物中黄酮类化合物种类繁多,功效广泛,但由于结构复杂,含量低,从天然植物中对其进行分离纯化是一项极具挑战的工作。传统柱色谱法、制备型高效液相色谱法存在分离周期长、溶剂耗费大、操作步骤繁琐以及难以工业化的缺点。薄层色谱溶剂用量少,分离速度快,结果准确,兼具分离分析功能,但当前在黄酮物质的分离纯化过程中应用较少;超临界流体色谱常以 CO₂ 作为流动相,不使用有机溶剂,成本低,对环境友好,而且分离效率高,是一种绿色的分离纯化技术;高速逆流色谱作为一种新兴的现代色谱分离技术,已被广泛用于黄酮类化合物的分离纯化研究中,未来应用前景广阔。

色谱分离在黄酮类化合物的分离纯化中取得了卓越进步,但仍然存在一些问题,需重点关注以下几个方面:① 制备型液相色谱理论基础较为成熟,但色谱柱作为其核心部件,仍旧存在价格高昂和填充技术不成熟等缺点。另外如何将分析型和制备型液相色谱有机结合,实现一体化操作以提高其定性能力还需进一步探究。② 高速逆流色谱在溶剂体系的优化方面虽取得了长足的进步,但当前仍停留在经验层面,在溶剂体系的理论指导和机理探究以及检测限和灵敏度等方面也需进一步研究。③ 在分离复杂样品时,常规的单柱色谱技术可能难以满足分离要求,将多根色谱柱串联或并联起来用于天然产物的分离纯化将是未来的发展趋势。④ 相较于一维色谱系统,二维色谱系统具有更好的峰容量和分离度,特别是针

对较为复杂的体系。二维色谱系统分析策略包含在线分离和离线分离两种,其中二维溶剂选择范围广,峰容量大,成本低,不受流动相兼容性的限制,而在线二维在不同分离浓度间的流动相与流速的兼容性仍需进一步优化。⑤ 固相萃取、加速溶剂萃取和超临界萃取等作为一种前处理技术,可用于黄酮与非黄酮物质的分离,能有效降低后续黄酮物质的分离难度。

参考文献

- [1] FU Jin-feng, WU Song-yan, WANG Min, et al. Intestinal metabolism of polygonum cuspidatum in vitro and in vivo[J]. Bio-medical Chromatography, 2018, 32(6): e4190.
- [2] JIANG Jian-shuang, LI Fu-shuang, FENG Zi-ming, et al. New phenolic glycosides from polygonum cuspidatum[J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2020, 22(1): 17-23.
- [3] ZHENG Liu-feng, CHEN Li, LI Jing, et al. Two kaempferol glycosides separated from camellia oleifera meal by high-speed counter-current chromatography and their possible application for antioxidant[J]. Journal of Food Science, 2019, 84(10): 2 805-2 811.
- [4] 王子剑. 甘草黄酮的提取纯化与水溶性纳米粒子的制备及评价[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2020: 63-66.
WANG Zi-jian. Extraction and purification of licorice flavonoids and preparation and evaluation of water-soluble nanoparticles[D]. Haerbin: Northeast Forestry University, 2020: 63-66.
- [5] 付胜男, 李欣坪, 王蒙蒙, 等. 滇黄芩根化学成分的研究[J]. 中成药, 2021, 43(6): 1 493-1 499.
FU Sheng-nan, LI Xin-ping, WANG Meng-meng, et al. Chemical constituents from the roots of scutellaria amoena[J]. Chinese Patent Medicine, 2021, 43(6): 1 493-1 499.
- [6] 史雨, 张子钰, 王中彦. 相分离理论在栀子豉汤提取物制备中的应用[J]. 沈阳药科大学学报, 2021, 38(2): 203-210.
SHI Yu, ZHANG Zi-yu, WANG Zhong-yan. Application of phase separation theory in the extraction preparation of zhizi-chi decoction[J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2021, 38(2): 203-210.
- [7] LIANG Cui-ling, ZHANG Zhi-yuan, ZHANG Hui-dan, et al. Ordered macroporous molecularly imprinted polymers prepared by a surface imprinting method and their applications to the direct extraction of flavonoids from ginkgo leaves[J]. Food Chemistry, 2020, 309: 125680.
- [8] SUN Yan-jun, HAN Rui-jie, ZHAO Chen, et al. Four new prenylated flavonoids from the fruits of sinopodophyllum hexandrum[J]. Chemistry of Natural Compounds, 2020, 56(5): 827-831.
- [9] LIU Li-xue, YU Ling, BAOLEERHU Borjigin, et al. Fabrication of thin-film composite nanofiltration membranes with improved performance using β -cyclodextrin as monomer for efficient separation of dye/salt mixtures[J]. Applied Surface Science, 2021, 539: 148284.
- [10] ZHANG Li-hu, WU Ting-ting, XIAO Wei, et al. Enrichment and purification of total ginkgo flavonoid O-glycosides from ginkgo biloba extract with macroporous resin and evaluation of anti-in-

- flammation activities in vitro[J]. *Molecules*, 2018, 23(5): 1 167.
- [11] HOU Meng-yang, HU Wen-zhong, XIU Zhi-long, et al. Preparative purification of total flavonoids from *sophora tonkinensis* gagnep. by macroporous resin column chromatography and comparative analysis of flavonoid profiles by HPLC-PAD[J]. *Molecules*, 2019, 24(17): 3 200.
- [12] 刘晓艳, 徐崑, 杨秀伟, 等. 鸡血藤黄酮类化学成分的分离与鉴定[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(6): 1 384-1 392.
LIU Xiao-yan, XU Wei, YANG Xiu-wei, et al. Isolation and identification of flavonoids from *spatolobi caulis*[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2020, 45(6): 1 384-1 392.
- [13] 郑丹丹, 阮静雅, 张颖, 等. 蛇床子中黄酮类化学成分的分离与结构鉴定[J]. *中国药物化学杂志*, 2020, 30(9): 542-548.
ZHENG Dan-dan, RUAN Jing-ya, ZHANG Ying, et al. Isolation and structural identification of flavonoids in *cnidium*[J]. *Chinese Journal of Medicinal Chemistry*, 2020, 30(9): 542-548.
- [14] LI Zhi-dong, DAI Zhuo-shun, JIANG Da-sen, et al. Bioactivity-guided separation of antifungal compounds by preparative high-performance liquid chromatography[J]. *Journal of Separation Science*, 2021, 44(12): 2 382-2 390.
- [15] 吴希, 邓勤, 徐志勇, 等. 制备型高效液相色谱在天然产物分离中的应用[J]. *化学分析计量*, 2017, 26(1): 113-117.
WU Xi, DENG Qin, XU Zhi-yong, et al. Application of preparative high performance liquid chromatography in separation of natural product [J]. *Chemical Analysis and Meterage*, 2017, 26(1): 113-117.
- [16] FAN Yun-peng, FU Yan-hui, FU Qing, et al. Purification of flavonoids from licorice using an off-line preparative two-dimensional normal-phase liquid chromatography/reversed-phase liquid chromatography method[J]. *Journal of Separation Science*, 2016, 39(14): 2 710-2 719.
- [17] LI Yan, SUN Shi-wei, ZHANG Xiao-yi, et al. Separation of new coumarin glycosides from *toddalia asiatica* using offline two-dimensional high-performance liquid chromatography [J]. *Plants*, 2020, 9(428): 428.
- [18] ZHUANG Lin-wu, DING Yan, MA Feng-lian, et al. A novel online preparative high-performance liquid chromatography system with the multiple trap columns-valve switch technique for the rapid and efficient isolation of main flavonoids from *Epimedium koreanum* Nakai[J]. *Journal of Separation Science*, 2021, 44(2): 656-665.
- [19] VESNA Glavnik, IRENA Vovk. Extraction of anthraquinones from japanese knotweed rhizomes and their analyses by high performance thin-layer chromatography and mass spectrometry[J]. *Plants (Basel)*, 2020, 9(12): 1 753.
- [20] KASSIM N K, LIM P C. Isolation of antioxidative compounds from *micromelum minutum* guided by preparative thin layer chromatography-2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (PTLC-DPPH) bioautography method[J]. *Food Chemistry*, 2019, 272: 185-191.
- [21] BHATT Nejal M, CHAVADA Vijay D Chavada, SANYAL Mallika, et al. Influence of pH and organic modifiers on the dissociation constants of selected drugs using reversed-phase thin-layer chromatography: Comparison with other techniques and computational tools[J]. *Biomedical Chromatography*, 2019, 33(11): e4666.
- [22] NOURA H A, DINA T E, NAHED M E, et al. Multiobjective optimization of microemulsion- thin layer chromatography with image processing as analytical platform for determination of drugs in plasma using desirability functions[J]. *Journal of Chromatography A*, 2020, 1619: 460945.
- [23] 刘洋洋, 孙文, 李春娜, 等. 离心薄层色谱及其在药物分离纯化中的应用[J]. *中草药*, 2014, 45(12): 1 785-1 790.
LIU Yang-yang, SUN Wen, LI Chun-na, et al. Centrifugal thin-layer chromatography and its application in separation and purification of medicine[J]. *Chinese and Herbal Medicine*, 2014, 45(12): 1 785-1 790.
- [24] 高颖, 房德敏, 周波, 等. 基于微乳薄层色谱技术分离鉴定 2 种医院制剂中的黄酮类成分[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(12): 58-61.
GAO Ying, FANG De-min, ZHOU Bo, et al. Separation and identification of flavonoids from two kinds of hospital preparations by micro-emulsion thin layer chromatography[J]. *Chinese Journal of Experimental Formulas*, 2015, 21(12): 58-61.
- [25] 赵惠茹, 郭德喜, 李娜, 等. 槐米中黄酮类成分的微乳薄层色谱分离鉴定[J]. *化工科技*, 2016, 24(4): 27-30.
ZHAO Hui-ru, GUO De-xi, LI Na, et al. Isolation and identification of flavonoids in flos *sophorae immaturus* by microemulsion thin-layer chromatography[J]. *Chemical Technology*, 2016, 24(4): 27-30.
- [26] RAZGONOVA M P, ZAKHARENKO A M, KALENIK T K, NOSYREV A E. Supercritical fluid technology and supercritical fluid chromatography for application in ginseng extracts [J]. *Farmacia*, 2019, 67(2): 202-212.
- [27] 刘志敏, 赵锁奇, 王仁安, 等. 黄酮醇异构体的超临界流体色谱法分离[J]. *色谱*, 1997(4): 18-21.
LIU Zhi-min, ZHAO Suo-qi, WANG Ren-an, et al. Separation of flavonol isomers by packed column supercritical fluids chromatography[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 1997(4): 18-21.
- [28] 吴晓闻, 陈玥. 超临界流体色谱分离纯化单一高纯度黄酮类化合物的方法: 201310568685.5[P]. 2014-02-19.
WU Xiao-wen, CHEN Yue. Method for separating and purifying single high-purity flavonoids by supercritical fluid chromatography: 201310568685.5[P]. 2014-02-19.
- [29] 杨杰, 朱玲玲, 徐永威, 等. 超临界流体色谱在中药分析及分离中的应用[C]// 第 21 届全国色谱学术报告会及仪器展览会会议论文集. 兰州: 中国化学会, 2017: 97-99.
YANG Jie, ZHU Ling-ling, XU Yong-wei, et al. Application of supercritical fluid chromatography in the Analysis and separation of traditional Chinese medicine[C]// Proceedings of the 21st national chromatography academic conference and instrument exhibition conference. Lanzhou: Chinese Chemical Society, 2017: 97-99.
- [30] XIE Guo-yong, YANG Jie, WEI Xiao-nan, et al. Separation of ac-teoside and linarin from *buddlejae flos* by high-speed countercurrent chromatography and their anti-inflammatory activities [J].

- Journal of Separation Science, 2020, 43(8): 1 450-1 457.
- [31] BERTHOD A, HASSOUN M, RUIZ-ANGEL M J. Alkane effect in the Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2005, 383(2): 327-340.
- [32] ITO Yoichiro. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1 065(2): 145-168.
- [33] CHEN Chau-chyun, CRAFTS Peter A. Correlation and prediction of drug molecule solubility in mixed solvent systems with the non-random two-liquid segment activity coefficient (NRTL-SAC) model[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2006, 45(13): 4 816-4 824.
- [34] 梁君玲, 孟杰, 吴定芳, 等. 一种九九表式定向逆流色谱溶剂选择新策略[C]//中国化学会第十八届全国有机分析及生物分析学术研讨会论文集. 上海: 中国化学会, 2015: 97-99.
- LIANG Jun-ling, MENG Jie, WU Ding-fang, et al. A new strategy for solvent selection in directional countercurrent chromatography with a nine-nine table[C]// Proceedings of the 18th National Symposium on Organic Analysis and Biological Analysis of the Chinese Chemical Society. Shanghai: Chinese Chemical Society, 2015: 97-99.
- [35] HUANG Xin-yi, IGNATOVA Svetlana, HEWITSON Peter, et al. An overview of recent progress in elution mode of counter current chromatography [J]. Trends in Analytical Chemistry, 2016, 77: 214-225.
- [36] HU Rui-lin, PAN Yuan-jiang. Recent trends in counter-current chromatography [J]. Trends in Analytical Chemistry, 2012, 40: 15-27.
- [37] HUANG Xin-yi, DI Duo-long. Chiral separation by counter-current chromatography[J]. Trends in Analytical Chemistry, 2015, 67: 128-133.
- [38] 赵竞业, 容蓉, 巩丽丽, 等. 高速逆流色谱法分离纯化黄芪中毛蕊异黄酮苷和芒柄花苷[J]. 山东中医药大学学报, 2017, 41(2): 178-181.
- ZHAO Jing-ye, RONG Rong, GONG Li-li, et al. Separation and purification of calycosin-7-glucoside and ononin from astragalus membranaceus by high-speed counter-current chromatography [J]. Journal of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2017, 41(2): 178-181.
- [39] 李娜, 赵野, 刘圆, 等. 高速逆流色谱法一次性分离制备藏药蓝玉簪龙胆中的三个化合物[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2016, 42(6): 660-664.
- LI Shan, ZHAO Ye, LIU Yuan, et al. Separation and preparation of three compounds from gentiana veitchiorum by high-speed counter-current chromatography (HSCCC) [J]. Journal of Southwest University for Nationalities (Natural Science Edition), 2016, 42(6): 660-664.
- [40] 刘雪辉, 谢红旗, 张思, 等. 高速逆流色谱法分离澳洲薄荷中香叶木苷[J]. 中国农学通报, 2016, 32(27): 109-113.
- LIU Xue-hui, XIE Hong-qi, ZHANG Si, et al. Separation and preparation of diosmin from mentha gracilis by high speed counter-current chromatograph [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2016, 32(27): 109-113.
- [41] 李倩, 李晨阳, 买吾拉江·阿不都热衣木, 等. 高速逆流色谱法分离纯化新疆圆柏枝叶中的黄酮类成分[J]. 食品工业科技, 2016, 37(22): 59-61.
- LI Qian, LI Chen-yang, MAIWULAJIANG Abudureyimu, et al. Separation and purification of flavonoids from Juniperus sabina L. by high-speed counter-current chromatography [J]. Food Industry Science and Technology, 2016, 37(22): 59-61.
- [42] HE Yan-feng, WANG Xiao-yan, SUO You-rui, et al. Efficient protocol for isolation of rhaponticin and rhapontigenin with consecutive sample injection from fenugreek (Trigonella foenum-graecum L.) by HSCCC [J]. Journal of Chromatographic Science, 2016, 54(3): 479-485.
- [43] LI Jia, ZHANG Xiao-yong, YU Qi, et al. One-step separation of four flavonoids from herba salviae plbeiae by HSCCC [J]. Journal of Chromatographic Science, 2014, 52(10): 1 288-1 293.
- [44] PAN Cong-lei, LU Hai-tao. Preparative separation of quercetin, ombuin and kaempferide from gynostemma pentaphyllum by high-speed countercurrent chromatography [J]. Journal of Chromatographic Science, 2019, 57(3): 265-271.
- [45] ZHONG Jie, YANG Yi, XIAO Zhong-ping, et al. Separation and purification of three flavonoids from the petal of rosa rugosa thunb by HSCCC [J]. Asian Journal of Traditional Medicines, 2009, 4(6): 220-227.
- [46] 熊朝栋, 陈丹, 洪丽婷, 等. 玳玳果黄酮提取物效应组分新橙皮苷及柚皮苷敲出分离制备 [J]. 福建中医药, 2020, 51(4): 32-35.
- XIONG Chao-dong, CHEN Dan, HONG Li-ting, et al. Preparation and knockout separation of effective components including neo-hesperidin and naringin in daidai flavonoid extracts [J]. Fujian Journal of Traditional Chinese Medicine, 2020, 51(4): 32-35.
- [47] WANG Na-na, CHEN Tao, YANG Xue, et al. A practicable strategy for enrichment and separation of four minor flavonoids including two isomers from barley seedlings by macroporous resin column chromatography, medium-pressure LC, and high-speed countercurrent chromatography [J]. Journal of Separation Science, 2019, 42(9): 1 717-1 724.
- [48] WU Ze-yu, REN Shao-wei, CHEN Tian-yun, et al. Separation and purification of six isoflavones from iris tectorum Maxim by macroporous resin-based column chromatography coupled with preparative high-performance liquid chromatography [J]. Separation Science and Technology, 2020, 55(9): 1 686-1 694.
- [49] PANIDA Yingyuen, SUCHADA Sukrong, MUENDUEN Phisala-phong. Isolation, separation and purification of rutin from banana leaves (Musa balbisiana) [J]. Industrial Crops & Products, 2020, 149: 112307.