

文章编号:1004-1656(2017)11-1628-07

高速逆流色谱溶剂体系及洗脱模式研究进展

陈 山¹, 赵永杰², 刘 杨^{1*}

(1. 汕头大学理学院生物系, 广东省海洋生物技术重点实验室, 广东 汕头 515063;

2. 汕头大学工学院机械电子工程系, 广东 汕头 515063)

摘要: 高速逆流色谱所具有的诸多优点, 使其在过去的几十年间从理论研究到实际应用均获得了长足的发展。溶剂体系的筛选和洗脱模式的设置对于高速逆流色谱的分离是最为关键和重要的环节。本文根据高速逆流色谱溶剂体系的要求、筛选方法及梯度洗脱、双向洗脱、循环洗脱、推挤洗脱四种洗脱模式的原理、应用范围等进行了综述, 以为高速逆流色谱研究者提供相关参考。

关键词: 高速逆流色谱; 溶剂体系; 洗脱模式

中图分类号: O657.7 **文献标志码:** A

Research progress of solvent system and elution mode for high speed counter current chromatography

CHEN Shan¹, ZHAO Yong-jie², LIU Yang^{1*}

(1. Department of Biology & Guangdong Provincial Key Laboratory of Marine Biotechnology, College of Science, Shantou University, Shantou 515063, China)

(2. Department of Mechanical Engineering, College of Engineering, Shantou University, Shantou 515063, China)

Abstract: Due to many merits of the HSCCC, in the past few decades, HSCCC have dramatic development both in the theory and application. The most critical steps for the separation of HSCCC are the screening of the solvent system and the application of the elution mode. In this paper, we review the requirements of HSCCC, the screening method and the principle, the scope of application of gradient elution, dual-mode elution, recycling elution, extrusion elution in detail. Providing valued information for HSCCC researchers is the aim of this review.

Key words: high speed countercurrent chromatography; solvent system; elution mode

色谱作为一种分离与分析手段, 被广泛应用于天然产物中有效活性成分的分离纯化中。高速逆流色谱(HSCCC)是一项新兴的色谱分离技术, 它以轻巧的聚四氟乙烯螺旋管作分离柱, 在行星式运动中连续地完成整个分配、传递、分离过程^[1-2]。与高效液相色谱(HPLC)不同的是, HSCCC的流动相和固定相均为液体, 因此不存在样品

的吸附、损失、污染等问题^[3]。最初高速逆流色谱主要用于制备分离, 但是由于其本身所具有的诸多优点, 如溶剂消耗少、无需昂贵的固态固定相等使其在过去的几十年中, 在实际应用和理论研究两方面均获得了长足的发展, 从而使其应用范围从制备量级扩展到微量分析^[4]。应用 HSCCC 进行天然活性物质的分离纯化已经成为科研工作者

收稿日期: 2017-03-23; 修回日期: 2017-05-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(21476135)资助; 汕头科技计划项目(2015-46)资助; 广东省高等学校省级重大科研项目(2016KZDXM014)资助

联系人简介: 刘杨(1978-), 女, 教授, 博士, 主要从事生物分离技术。E-mail: liuyanglft@stu.edu.cn

们日渐重视的研究内容,如 Ha 等人^[5]用 HSCCC 对人参中主要皂苷进行分离纯化,李培根等人^[6]通过 HSCCC 纯化获得更高纯度的苏丹红单体,Shan He 等人^[7]利用 HSCCC 技术从东南葡萄中分离纯化出抗氧化二苯乙烯低聚物以及龚德强等^[8]、张敏等^[9]、李昂等^[10]将 HSCCC 技术应用到皂苷类化合物的分离上。

两相溶剂体系的筛选是逆流色谱分离法中最为关键的一步,合适的溶剂体系可以确保目标化合物从混合物中尽可能分离完全。利用高速逆流色谱对物质组分进行分离的必要条件是合适的分配系数。目前对溶剂体系的筛选一般都是参考已知的溶剂体系或根据实验积累的经验,并不能通过理论计算依据筛选到适宜的溶剂体系;而洗脱模式作为逆流色谱分离法中的另一个重要操作指标,通过设置不同的洗脱模式可以有效弥补高速逆流色谱分离效率不高、理论塔板数较低等缺点^[11]。本文主要对近十年来色谱研究者所使用的溶剂体系筛选法和洗脱模式的基本原理、应用进展等进行综述。

1 HSCCC 的溶剂体系筛选

溶剂体系是 HSCCC 分离的心脏,它在 HSCCC 分离中既作固定相,又作流动相。适宜溶剂体系的筛选占整个分离工作的绝大部分时间,通常是 HSCCC 分离中最为复杂和困难的一步。一个合适溶剂体系的判断标准是:物质在该体系中的分配系数(K)是否在合适的范围内,通常认为 HSCCC 最合适的 K 值范围是 0.5~2.0。不同溶剂体系及同一溶剂体系的不同上、下相体积比,其物理参数(黏度、极性、密度差等)存在差别,这对于相同的物质成分会造成分配系数的差异,进而影响待分离组分的分离效果。本小节将对溶剂体系的筛选要求、筛选方法等进行阐述。

1.1 溶剂体系筛选要求及思路

筛选溶剂体系时应注意以下几点^[12~13]:不造成样品的分解或变性;足够高的样品溶解度;溶剂易挥发以方便后续处理;样品在溶剂体系中合适的分配系数值;固定相能够实现足够高的保留。前两点适用于所有的逆流色谱仪,后两点对 HSCCC 特别重要,需要通过实验测定。

筛选一个合适溶剂体系的大致思路如下:①根据被分离物质的极性、溶解度,结合文献选取相

似物质的溶剂体系进行预实验;②应用薄层色谱、高效液相色谱了解和测定目标化合物在上下两相的分配情况及各目标化合物在备选溶剂体系中的分配系数;③采用通过前两点获得的溶剂体系,进行高速逆流色谱分离,结合实验结果,再对体系进行调整以获得理想的溶剂体系。

1.2 溶剂体系筛选方法

参照已知溶剂体系 利用文献是寻找高逆流色谱溶剂体系的有效方法。目前已有大量的相关文献可为我们在溶剂体系的筛选上提供参考,整理并总结这些文献是寻找所需溶剂体系最简单快捷的方法。首先根据待分离物质的类别去寻找同类物质实例,然后结合具体情况对文献的溶剂体系进行调整,并进行实验。再根据分离的效果,在决定是否对体系做进一步调整,直至达到理想的效果。表 1 整理了近年来分离不同类别活性成分所使用的溶剂体系。

Ito 法^[23] Ito 法是最常用的溶剂体系筛选法。Ito 通过实验研究,总结出了正己烷-乙酸乙酯-甲醇/乙醇-水溶剂体系筛选表。他认为在不知目标组分极性的情况下,溶剂体系的筛选可以从正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(3:5:3:5)体系开始,如果目标组分的分配系数略偏离适当范围时,可以通过调整各组成溶剂的体积比来调节。如果目标组分主要集中于某一相时,可以根据目标组分的分配系数调整溶剂的组成。如果需要疏水性更强的体系可以用乙醇替代甲醇,如果需要亲水性更强的体系可以加入盐或酸。与此相似的还有 ARIZONA 溶剂体系^[24]筛选表,它用 A~Z 的 23 个字母(除 E、I、O 外)定义了整个极性范围内的溶剂体系。

实验筛选法 对于生物活性大分子如蛋白质、多糖、核酸等的逆流色谱分离纯化,不能够选择上述的有机溶剂体系,而通常会选择双水相体系来确保逆流色谱分离过程中生物大分子结构和生物活性的稳定性。本实验室对各类双水相体系的相平衡与分配平衡进行了系统的研究^[25-27],生物大分子在双水相体系中的分配影响因素复杂,需通过大量的分配实验来确定适宜的双水相体系类型、细线长度、组分浓度等溶剂体系的操作参数^[28],用于作为生物大分子进行逆流色谱分离纯化过程的操作参数。

NRTL-SAC 法^[29-31] 预测方法出现前,研究者主要通过实验测定分配系数来筛选溶剂体系,这是一个耗时长、操作繁琐的过程。而预测方法

的出现为溶剂体系的快速筛选提供了新思路,它的特点是通过预测溶质的分配系数来筛选溶剂体系。NRTL-SAC 全称为非随机双液分段活度系数(nonrandom two-liquid segment activity coefficient),是预测方法的一种,由 Chen 等人提出,它采用四种概念性的分段来描述溶剂和溶质分子的有效表面相互作用。四种分段分别为:疏水性分段、给电子分段、吸电子分段、亲水性分段。NRTL-SAC 法主要通过计算一系列两相溶剂体系中溶质的分配系数来筛选适于 HSCCC 分离的溶剂体系。分配系数可表示为 LLE(两相体系平衡数据,可通过 UNIFAC 模型计算得到)和溶剂、

溶质 NRTL-SAC 分子参数(包括疏水性分子参数 X ,给电子分子参数 Y^- ,吸电子分子参数 Y^+ ,亲水性分子参数 Z)的函数,它们的关系可表达为:

$$K = f(X, Y^-, Y^+, Z, LLE) \quad (1)$$

将 NRTL-SAC 法应用于 HSCCC 溶剂体系的筛选,需进行如下三个步骤:首先,需测定至少三个预先选定的溶剂体系中溶质的 k 值。其次,将测得的溶质 K 值拟合 NRTL-SAC 模型得到溶质分子参数(X, Y^-, Y^+, Z)。最后通过 NRTL-SAC 法,可预测溶质在大量溶剂体系中的 K 值。根据计算的 K 值,既可快速筛选到适宜高速逆流色谱分离的溶剂体系。

表 1 HSCCC 分离不同类别活性成分所用溶剂体系

Table 1 HSCCC solvent system for separating different active components

样品	溶剂体系	有效成分	类别
老鼠筋 ^[14]	正己烷/乙腈/二氯甲烷/水/乙酸乙酯 (5:5:1:5:1.5, v/v/v/v/v)	吐叶醇、丁香酸、苯并噁唑 等	倍半萜类、羟基芳香 类、苯并噁唑类
马钱子 ^[15]	氯仿/甲醇/0.3M 盐酸(4:3:2, v/v/v)	土的宁氯钾氯化物、马钱 子碱氯甲氯化物	生物碱衍生物类
玫瑰茄 ^[16]	水/正丁醇/甲基叔丁基醚/乙腈/三氟乙 酸(6:3:1:1:0.001, v/v/v/v/v)	花色苷	类黄酮
红葡萄皮 ^[17]	乙腈/正丁醇/甲基叔丁基醚/水/三氟乙 酸(1:40:1:50:0.01, v/v/v/v/v)	花色苷单体	类黄酮
斑唇马先蒿 ^[18]	乙酸乙酯/正丁醇/水(10:6:15, v/v/v)	异麦角甾苷、毛蕊花苷	苯丙素苷类
哈士蟆油提取物 ^[19]	石油醚/乙酸乙酯/丁醇/甲醇/水(3.5: 0.3:0.5:2.5:0.4, v/v/v/v/v)	7-羟基胆固醇、7-酮胆固醇	甾体类
马蔺子皮提取物 ^[20]	正己烷/乙酸乙酯/甲醇/水 (0.75:12.5:1:12.5, v/v/v/v)	原花青素 B ₁ /B ₃ /B ₇ 、儿茶 酚	黄烷-3-醇类
薇甘菊 ^[21]	正丁醇/乙酸/水(4:1:5, v/v/v)	槲皮素-3-O-芸香糖苷、木 犀草苷等	黄酮类
浙江大青 ^[22]	正己烷/乙酸乙酯/甲醇/水(4:5:4:5, v/v/v/v)	teuvincenone E、 kaichianone B、taxusabiet- ane A	松香烷二萜类

1.3 分配系数测定方法

在溶剂体系的筛选过程中,最为关键的就是溶质分配系数的测定。分配系数测定主要有以下几种方法。

(1)高效液相色谱法 高效液相色谱法能精确测定复杂样品中各组分的分配系数,是测定样品组分分配系数最为常用的方法。具体操作如下^[12]:将样品加入到体积为 V_U 的上相中,然后上相用 HPLC 测定,得到色谱峰面积 A_{U1} ;随后加入体积为 V_L 的下相并充分振荡,当两相达到平衡后

取该溶液的上相进行 HPLC 测定,得到色谱峰面积 A_{U2} 。根据公式计算出分配系数:

$$K = (A_{U2}/A_{U1} - A_{U2}) \times (V_L/V_U) \quad (2)$$

(2)紫外吸收法 如果目标组分具有标准品,可以采用紫外吸收法测定其分配系数。具体方法如下:按照设定的比例,配制少量溶液,分别吸取等量的上相和下相置于试管中,然后将标准样品加入试管中,充分振荡,当两相溶液达到平衡后,分别测定上、下相溶液的吸光度(A),

$$K = A_{\text{上}}/A_{\text{下}} \quad (3)$$

(3)薄层色谱法(TLC)^[32] 根据薄层硅胶板上的斑点色度可以判断样品中各组分的含量差别以及在两相溶剂中分配系数间的差异。具体操作如下:将样品溶于平衡的溶剂体系中,充分振荡、静置分层后。取等量上下相点样于薄层硅胶板上,选择合适的展开剂展开,根据硅胶板上目标组分的斑点大小、色度,即可估算 K 值的范围。

指标,设置不同的洗脱模式既可弥补 HSCCC 的缺陷又可有效解决复杂样品的分离。HSCCC 在复杂样品的分离纯化中起着至关重要的作用。研究开发应用不同的洗脱模式可有效解决复杂样品中各组分之间浓度差异大及各样品极性区间分布广等问题。本小节将介绍梯度洗脱、双向洗脱、循环洗脱、推挤洗脱这四种洗脱模式,并对它们的应用实例进行了总结,详见表 2 所示。

2 洗脱模式

洗脱模式是逆流色谱分离中的另一重要操作

表 2 应用各种洗脱模式分离产物的实例

Table 2 Examples of separation products using various elution modes

样品	溶剂体系	洗脱方式	分离产物	参考文献
东南葡萄	正己烷/乙酸乙酯/甲醇/水	梯度洗脱	二苯乙烯低聚物	[7]
甜叶菊制剂	乙酸乙酯/正丁醇/水	梯度洗脱	甜菊糖苷	[39]
丹参	己烷/乙酸乙酯/乙醇/水	梯度洗脱	丹参酮	[40]
南瓜	二氯甲烷/石油醚/乙醇/水,(6:2:2:4, v/v/v/v)	双向洗脱	甘油糖脂粗品	[41]
淫羊藿根	正丁醇/乙酸乙酯/水,(3:7:10, v/v/v)	双向洗脱	朝藿定 A;朝藿定 B;朝藿定 C;淫羊藿苷	[42]
酮康唑对映体	正己烷/乙酸异丁酯/含手性选择剂的磷酸盐缓冲液,(2:3:5, v/v/v)	循环洗脱	酮康唑左旋体;酮康唑右旋体	[43]
草本象牙红	正丁醇/水,(1:1, v/v)	循环洗脱	松果菊苷	[44]
石斛粗提物	正庚烷/乙酸乙酯/甲醇/0.1%甲酸溶液,(2:3:2:3)	洗脱-推挤洗脱	羟基菲;联苕	[45]
人参	乙酸乙酯/正丁醇/0.1%甲酸溶液,(2:1:3, v/v/v)	洗脱-推挤洗脱	人参皂苷 R _{g1} ;R _f ;R _d	[46]
卡萨蒙纳姜 (Zingiber cassumunar)	正己烷/乙酸乙酯/甲醇/水,(1/1/1/1)	洗脱-推挤洗脱	Phenylbutenoids; phenylbutenoid dimers	[47]
独蒜兰	正丁醇/乙醇/水,(20:1:20)	洗脱-推挤洗脱	2种新的苜基酯葡萄糖苷;gastrodin;dactylorhinA;militarine	[48]

2.1 梯度洗脱模式

梯度洗脱起初被广泛应用于高效液相色谱中(HPLC),后来随着逆流色谱技术的发展被逐渐应用于 HSCCC 中。在逆流色谱的分离中,梯度洗脱主要包括线性梯度、步进梯度、pH 梯度等模式。梯度洗脱主要是通过改变流动相的组成、PH 值以及流速来实现的^[33-35]。高速逆流色谱的梯度洗脱模式非常适宜分离组分极性范围宽的样品,对于这种样品使用恒定比例的溶剂体系通常难以达到理想的分离效果。梯度洗脱可以扩大高速逆流色

谱的分离范围,减少溶剂的消耗及分离时间。但梯度洗脱应用于高速逆流色谱中并不像应用于 HPLC 中那样简单,主要原因是任何操作条件(流速、pH 值、流动相组成)的改变都会引起固定相组成的改变及固定相的损失,而梯度洗脱之所以在 HPLC 中较易实现主要是其固定相为固态。因此,在进行梯度洗脱时溶剂体系变化不能太大,否则会造成固定相的损失,影响分离效率。

近年来梯度洗脱被广泛应用于天然产物有效活性成分的分离制备中,它弥补了单一溶剂体系

在天然产物分离中因极性窗口狭小难以达到理想分离效果的缺陷。

2.2 双向洗脱模式

双向洗脱是一种特殊的洗脱模式,包括正向洗脱和反向洗脱两个阶段。双向洗脱的实质是高速逆流色谱在分离期间既进行正向洗脱又进行反向洗脱。高速逆流色谱的双向洗脱模式可以借助切换阀来实现。双向洗脱依据的原理是高保留组分(分配系数大的物质)容易被固定相洗脱而难以被流动相洗脱出分离柱。它在分离过程中通过相角(固定相和流动相两相角色互换)和洗脱方向的转变来提高物质的分离效率与分离度^[36]。

双向洗脱可分为两步,第一步进行常规洗脱,第二步则调换两相溶剂体系的相角并改变洗脱方向。这种洗脱模式的好处在于第一步中高保留组分(分配系数大的组分)在第二步中变为低保留组分被洗脱出来,如果组分在第一步中的分配系数为 K ,在第二步中则为 $1/K$ 。

双向洗脱适于分配系数差异大的物质,其主要优点是减少分离时间和溶剂的消耗,缺点是分离过程不连续。

2.3 循环洗脱

循环洗脱多用于对映体的分离或分配系数相近组分的分离。循环洗脱是通过阀门将检测器的出口连接回高速逆流色谱的入口以将目标组分重新泵入高速逆流色谱中进行再次分离,提高目标组分分辨率与分离效果的方法^[33,37]。循环洗脱的实质是延长分离柱的长度,使组分在分离柱中充分的混合平衡、再混合平衡,从而达到提高分离效率的目的。

循环洗脱适于分离分配系数相近的物质,它能提高 K 值相近物质的分离度。特别在手性分离上,它能显著提高目标对映异构体的分辨率,而不会对手性选择剂和溶剂造成额外的消耗。其缺点是不适于同时分离几种溶质且在循环期间,随着循环次数的增加,色谱峰会逐渐变宽且分离时间越长。在进行循环洗脱时,若发现色谱峰出现重叠,必须立即停止循环。

2.4 推挤洗脱

逆流色谱的推挤洗脱模式是分离复杂混合物的有效方法之一,它与常规的洗脱模式相比不仅扩展了分离的极性窗口,还提高了溶剂体系的分离能力。这种洗脱模式主要包括洗脱-推挤洗脱和反推挤洗脱^[33]。

一个完整的洗脱-推挤洗脱过程可分为三个阶段^[36,38]:常规洗脱、扫除洗脱、推挤洗脱。第一步的常规洗脱与普通洗脱并没有本质区别,在这步中分配系数较小的组分可优先被洗脱出来。第二步的扫除洗脱,在洗脱一定体积的流动相后,将洗脱液换成固定相,在这一阶段固定相会把分离柱中残留的流动相推挤出分离柱,并且此阶段组分的洗脱仍在继续。当继续向分离柱中泵入一定体积的固定相后,柱中残留的组分(K 值大的组分)会依次被推挤出分离柱,这一阶段称为推挤洗脱,此阶段也是整个分离期间较为重要的一步,因为它直接影响样品的分辨率,分离时间等。洗脱-推挤洗脱非常适于分离极性范围大的物质,因为它能扩展分离的极性窗口。

反推挤洗脱是另一种推挤洗脱模式,它与洗脱-推挤洗脱相似。反推挤洗脱的第一步也是常规洗脱,下一步则只改变流动相的洗脱方向。因此在这一步中固定相及其所含组分将从分离柱的另一端被推挤出。

洗脱-推挤洗脱与前文谈到的双向洗脱相比其优点在于可以连续不间断的分离,其不足之处就是操作分离过程中需要停泵,更改流动相。反推挤洗脱的优点在于不需要停泵,仅需要改变流动相的洗脱方向,缺点与双向洗脱相同都不能连续不间断分离,且其可能存在“echo”峰^[33]。

3 总结

高速逆流色谱是一种快速有效的分离方法,在天然产物的分离纯化方面得到广泛的应用。溶剂体系的筛选和洗脱模式的设置是整个分离工作中的关键环节。本文通过借鉴相关文献,总结了 4 种溶剂体系筛选方法,并对近年来分离不同类别的活性成分所使用的溶剂体系进行了整理(详见表 1),旨在为相关研究者分离同类物质时,在溶剂体系的筛选上提供参考。参照已知溶剂体系和 Ito 法是最常用的溶剂体系筛选法;本实验室所研究的双水相体系的操作参数可为研究者在分离生物大分子时,在溶剂体系的筛选上提供一定的理论指导;而 NRTL-SAC 模型预测法是近年来较为新颖的溶剂体系筛选方法,它提升了溶剂体系的筛选效率。通过设置不同的洗脱模式可以有效弥补高速逆流色谱分离效率不高、理论塔板数较低等缺点。洗脱模式在 HSCCC 分离中起着重

要的作用,适当的洗脱模式可以提高样品的分离效率、减少分离时间及溶剂消耗等并在一定程度上弥补单一溶剂体系极性窗口狭小的缺陷。本文主要介绍了梯度洗脱、双向洗脱、循环洗脱、推挤

参考文献:

- [1]张霞,崔海燕,贾晓艳,等.高速逆流色谱法分离纯化金银花中的绿原酸[J].*药物分析杂志*,2010,(1):106-109.
- [2]戴德舜,王义明,罗国安.高速逆流色谱研究进展[J].*分析化学*,2001,29(5):586-591.
- [3]张天佑.逆流色谱技术[M].北京:教育出版社,1991.
- [4]Kong Z, Rinehart K L, Milberg R M, et al. Application of high-speed countercurrent chromatography/electrospray ionization mass spectrometry(HSCCC/ESIMS) in natural products chemistry[J].*J Liq Chromatogr R T*, 1998,21(1-2):65-82.
- [5]Ha Y W, Lim S S, Ha I J, et al. Preparative isolation of four ginsenosides from Korean red ginseng (steam-treated *Panax ginseng* C.A.Meyer), by high-speed countercurrent chromatography coupled with evaporative light scattering detection[J].*J Chromatogr A*, 2007,1151(1-2):37.
- [6]李培根,王钊,曹学丽.高纯度苏丹红单体的高效逆流色谱纯化研究[J].*食品科学技术学报*,2016,34(3):67-73.
- [7]He S, Lu Y, Jiang L, et al. Preparative isolation and purification of antioxidative stilbene oligomers from *Vitis chunganensis* using high-speed counter-current chromatography in stepwise elution mode[J].*J Sep Sci*, 2009, 32(14):2339-2345.
- [8]窦德强,陶佳颐,付文卫,等. HSCCC 法从人参总皂苷中分离制备人参皂苷 Re 与 Rg₁[J].*中药研究与信息*, 2005,7(2):15-16.
- [9]张敏,陈瑞战,窦建鹏,等.人参中的人参皂苷高速逆流色谱法分离[J].*时珍国医国药*,2012,23(2):403-405.
- [10]李昂,魏芸.高速逆流色谱法对独角莲中有效成分皂苷的分离纯化[J].*分析科学学报*,2009,25(2):223-225.
- [11]Berthod A. Chapter 1 Fundamentals of countercurrent chromatography[J].*Comprehensive Analytical Chemistry*, 2002,38:1-20.
- [12]张天佑.高速逆流色谱技术[M].北京:化学工业出版社,2011.
- [13]曹学丽.高速逆流色谱分离技术及应用[M].北京:化学工业出版社,2005.
- [14]Fazuo Wang, Ru Li, Lijuan Long 1, et. A Three phase solvent system in high speed counter current chromatographic for the separation and purification of bioactive constituents from *acanthus ilicifolius*[J].*Chromatographia*, 2015,78:1401-1407.
- [15]Fengsen Ma, Xiaojuan Wu, Yan Yu, et. Preparative separation and purification of two highly polar alkaloids derived from *Semen Strychni* extracted with dichloromethane by high-speed countercurrent chromatography[J].*J Sep Sci*, 2016,39:3709-3715.
- [16]刘雪辉,王振,吴琪,等.高速逆流色谱法分离玫瑰茄中的花色苷[J].*现代食品科技*,2014,30(1):190-194.
- [17]李媛媛,李灵犀,崔艳,等.高速逆流色谱法分离红葡萄皮中的花色苷[J].*中国酿造*,2017,36(2):157-161.
- [18]Chen Chen, Xiao-Hui Zhao, Hui-Lan Yue, et al. Separation of phenylpropanoid glycosides from a Chinese herb by HSCCC[J].*J Chromatogr Sci*, 2014;52:395-399
- [19]Yang Xu, Shi-Han Wang, Yang Luo, et al. Separation of steroidal constituents of oviductus ranae by one-step method high-speed counter-current chromatography[J].*J Liq Chromatogr R T*, 2015,38:1494-1498,
- [20]Huanhuan LV, Jian Ouyang, XiaoYan Wang, et al. Separation and purification of four flavan-3-ols from *Iris lactea pall. var. Chinensis* (Fisch.) Koidz by high-speed counter-current chromatography with flow-rate gradient[J].*J Liq Chromatogr R T*, 2015, 38:1486-1493,
- [21]耿姗,王娟强,席兴军,等.大孔树脂-高速逆流色谱分离纯化薇甘菊中的黄酮类化合物[J].*色谱*, 2017, 35(3):302-307
- [22]Mingfeng Xu, Qin Zhu, Huizhong Wang, et al. Separation of abietane-type diterpenoids from *Clerodendrum kaichianum* Hsu by high-speed counter-current chromatography using stepwise elution[J].*J Liq Chromatogr R T*, 2016,39(3):139-144
- [23]Ito Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography[J].*J Chromatogr A*, 2005,1065(2):145-168.
- [24]Berthod A, Hassoun M, Ruizangel M J. Alkane effect in the Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography[J].*Anal Bioanal Chem*, 2005, 383(2):327-340.
- [25]Yang L, Feng Y, Zhao Y. Liquid - liquid equilibrium of various aqueous two-phase systems: Experiment and correlation[J].*J Chem Eng Data*, 2013, 58(10): 2775-2784.

- [26] Liu Y, Wu Z, Zhao Y. Liquid - liquid equilibrium correlation of aqueous two-phase systems composed of polyethylene glycol and nonionic surfactant[J]. *Thermochim Acta*, 2015, 602(4): 78-86.
- [27] Liu L, Liu Y, Du L, et al. (Liquid+liquid) phase equilibrium of aqueous two-phase system containing (surfactant+sodium sulfate+water) at different temperatures[J]. *Fluid Phase Equilib*, 2016, 415: 25-33.
- [28] Yuan H, Liu Y, Wei W, et al. Phase separation behavior and system properties of aqueous two-phase systems with polyethylene glycol and different salts: Experiment and correlation[J]. *J Fluids*, 2015, 2015: 1-10.
- [29] Ren D B, Yi L Z, Qin Y H, et al. Systematic and practical solvent system selection strategy based on the non-random two-liquid segment activity coefficient model for real-life counter-current chromatography separation[J]. *J Chromatogr A*, 2015, 1393: 47.
- [30] Ren D B, Yang Z H, Liang Y Z, et al. Correlation and prediction of partition coefficient using nonrandom two-liquid segment activity coefficient model for solvent system selection in counter-current chromatography separation[J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1301(15): 10-18.
- [31] And C C C, Song Y. Solubility modeling with a non-random two-liquid segment activity coefficient model [J]. *Ind Eng Chem Res*, 2004, 43(26): 8354-8362.
- [32] 谭龙泉, 张所明. 薄层色谱在高速逆流色谱溶剂系统选择过程中的应用[J]. *分析化学*, 1996, (12): 1448-1451.
- [33] Huang X, Ignatova S, Hewitson P, et al. An overview of recent progress in elution mode of counter current chromatography [J]. *Trac-Trend Anal Chem*, 2016, 77: 214-225.
- [34] Leitao G G, Costa F D. Gradient elution in countercurrent chromatography. [J]. *Planta Med*, 2015, 81(17): 1592-1596.
- [35] Hu R, Pan Y. Recent trends in counter-current chromatography[J]. *Trac-Trend Anal Chem*, 2012, 40: 15-27.
- [36] 张虎, 沈芒芒, 颜继忠, 等. 逆流色谱中多种洗脱模式的应用研究进展[J]. *中国现代应用药学*, 2014, 31(5): 628-634.
- [37] Huang X, Di D. Chiral separation by counter-current chromatography [J]. *Trac-Trend Anal Chem*, 2015, 67: 128-133.
- [38] Berthod A, Friesen J B, Inui T, et al. Elution-extrusion countercurrent chromatography: Theory and concepts in metabolic analysis [J]. *Anal Chem*, 2007, 79(9): 3371-3382.
- [39] Englert M, Kaiser C, Schwack W, et al. Isolation of (five) steviol glycosides from a stevia rebaudiana formulation by gradient elution countercurrent chromatography [J]. *Chromatographia*, 2016, 79(5-6): 275-284.
- [40] Wu S, Wu D, Liang J, et al. Modeling gradient elution in countercurrent chromatography: Efficient separation of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. *J Sep Sci*, 2012, 35(8): 964-976.
- [41] 蒋志国, 王燕华, 钟秋平, 等. 南瓜中甘油糖脂分离制备及体外抗肿瘤活性研究[J]. *中国粮油学报*, 2013, 28(7): 88-92.
- [42] Li H B, Chen F. Separation and purification of epimedin A, B, C, and icariin from the medicinal herb *Epimedium brevicornum maxim* by dual-mode HSCCC. [J]. *J Chromatogr Sci*, 2009, 47(5): 337-340.
- [43] Zhang P, Xie N, Tang K, et al. Modeling and optimization of two phase system for recycling high-speed counter-current chromatographic separation of ketoconazole enantiomers [J]. *Sep Purif Technol*, 2016, 164: 41-48.
- [44] Xie J, Deng J, Tan F, et al. Separation and purification of echinacoside from *Penstemon barbatus* (Can.) Roth by recycling high-speed counter-current chromatography. [J]. *J Chromatogr B*, 2010, 878(28): 2665-2668.
- [45] Li S, He S, Zhong S, et al. Elution-extrusion countercurrent chromatography separation of five bioactive compounds from *Dendrobium chrysotoxum* Lindl [J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(20): 3124-3128.
- [46] 程屹俊, 梁琼麟, 王义明, 等. 应用洗脱-推挤逆流色谱法高效分离制备人参皂苷 Rg₁、Rf 及 Rd [J]. *中成药*, 2012, 34(1): 89-93.
- [47] Lu Y, Liu R, Berthod A, et al. Rapid screening of bioactive components from *Zingiber cassumunar* using elution-extrusion counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1181(1-2): 33-44.
- [48] Wang Y, Guan S H, Feng R H, et al. Elution-extrusion counter-current chromatography separation of two new benzyl ester glucosides and three other high-polarity compounds from the tubers of *Pleione bulbocoides* [J]. *Phytochem Analysis*, 2013, 24(6): 671-676.