

## 高速逆流色谱结合半制备液相色谱制备甘青青兰中3种活性成分

周加本<sup>1</sup> 热增才旦<sup>2</sup> 热毛先<sup>1</sup> 利毛才让<sup>1,3\*</sup>

(1. 青海师范大学生命科学院, 西宁 810008; 2. 青海民族大学药学院, 西宁 810007; 3. 青海师范大学民族师范学院, 西宁 810008)

**摘要** 采用高速逆流色谱(HSCCC)结合液相色谱法制备甘青青兰(*Dracocephalum tanguticum* Maxim.)中绿原酸、胡麻甙-6''-乙酯、迷迭香酸,建立快速分离制备甘青青兰中活性成分的方法。采用半制备型高效液相色谱(SP-HPLC)富集甘青青兰乙酸乙酯萃取物中绿原酸、胡麻甙-6''-乙酯、迷迭香酸,再用制备液相(Pre-HPLC)和HSCCC对富集物进行分离纯化,获得54 mg化合物Ⅰ、130 mg化合物Ⅱ和200 mg化合物Ⅲ,纯度分别为96.9%、97.9%和95.1%,经核磁共振碳谱(<sup>13</sup>CNMR)和氢谱(<sup>1</sup>HNMR)分别鉴定为绿原酸、胡麻甙-6''-乙酯和迷迭香酸。本实验方法适用于甘青青兰乙酸乙酯萃取物中绿原酸、胡麻甙-6''-乙酯和迷迭香酸的分离制备,并避免了传统分离方法操作繁多、试剂消耗量大、不可回收等弊端,为分离甘青青兰活性成分、制备对照品等研究提供了参考依据。

**关键词** 高速逆流色谱;半制备型液相色谱;甘青青兰;绿原酸;胡麻甙-6''-乙酯;迷迭香酸

中图分类号:S132 文献标志码:A doi:10.7525/j.issn.1673-5102.2022.02.010

## Separation and Purification of Three Active Components from *Dracocephalum tanguticum* Maxim. by High-Speed Counter-current Chromatography Combined with Semi-Preparative High Performance Liquid Chromatography

Zhou Jiaben<sup>1</sup> Rezeng Caidan<sup>2</sup> Re Maoxian<sup>1</sup> Limao Cairang<sup>1,3\*</sup>

(1. College of Life Sciences, Qinghai Normal University, Xining 810008; 2. College of Pharmacy, Qinghai University for Nationalities, Xining 810007; 3. College of Nationalities, Qinghai Normal University, Xining 810008)

**Abstract** An efficient method was established for the separation and preparation of chlorogenic acid, pedaliin-6''-acetate and rosmarinic acid from *Dracocephalum tanguticum* Maxim.. The chlorogenic acid, pedaliin-6''-acetate and rosmarinic acid was enriched by semi-preparative high performance liquid chromatography (SP-HPLC) from ethyl acetate extract, and then separated and purification by high-speed counter-current chromatography (HSCCC) and preparative high performance liquid chromatography (Pre-HPLC). A total of 54 mg of chlorogenic acid, 150 mg of pedaliin-6''-acetate and 200 mg of rosmarinic acid were obtained from ethyl acetate extract with purities of 96.9%, 97.9% and 95.1% by HPLC analysis, respectively. Their structures were identified by nuclear magnetic resonance spectrum. The result show that this method is suitable for the isolation and purification of chlorogenic acid, pedaliin-6''-acetate and rosmarinic acid from *D. tanguticum*. It also avoids the disadvantages of traditional separation methods such as many operations, large reagent consumption and non-recyclability, provides a reference basis for the study of separating of active components and preparation reference substance from *D. tanguticum*.

**Key words** high-speed counter-current chromatography; preparative high-performance liquid chromatography; *Dracocephalum tanguticum* Maxim.; chlorogenic acid; Pedaliin-6''-acetate; rosmarinic acid

基金项目:国家自然科学基金(31660086);青海省青藏高原药用动植物资源重点实验室(2017-ZJ-Y13)

第一作者简介:周加本(1996—),男,硕士研究生,主要从事药用植物化学方面的研究。

\* 通信作者:E-mail:1224863256@qq.com

收稿日期:2021-03-18

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31660086); Key Laboratory of Medicinal Animal and Plant Resources in Qinghai-Tibet Plateau of Qinghai Province (2017-ZJ-Y13)

First author introduction: Zhou Jiaben (1996—), male, postgraduate, research direction for Medicinal Phytochemistry.

\* Corresponding author: E-mail: 1224863256@qq.com

Received date: 2021-03-18

高速逆流色谱(HSCCC)是一种高效分离天然药物活性成分的新型技术,具有制备量多、操作简便、分离快速、纯度高、无需载体支撑以及两相溶剂的选择和组合多样灵活等特点,因此,该技术被广泛应用天然活性物质的分离制备领域<sup>[1-2]</sup>。高速逆流色谱与制备液相色谱(Pre-HPLC)技术相结合进行分离纯化,可快速高效地分离制备单体化合物,对藏药对照品的制备方法研究具有重要意义<sup>[3-4]</sup>。

甘青青兰(*Dracocephalum tanguticum* Maxim.),又名唐古特青兰,为唇形科(Lamiaceae)青兰属(*Dracocephalum* Linn.)植物,是藏医药临床常用药材,具有止咳化痰、和胃舒肝、清热解毒的功效<sup>[5]</sup>。甘青青兰中有酚酸类、黄酮及黄酮苷类等成分<sup>[6-7]</sup>,并具有良好的抗氧化、抗病毒、抗心脑血管缺氧、

抗炎、抑菌等药理活性<sup>[8-11]</sup>,其中绿原酸、胡麻甙-6''-乙酯和迷迭香酸是甘青青兰主要活性成分,且具有抗氧化、保肝和治疗心脑血管缺氧的药理作用<sup>[12-13]</sup>。目前,从甘青青兰中分离制备绿原酸、胡麻甙-6''-乙酯和迷迭香酸方法仅限于传统技术,如硅胶柱色谱、凝胶柱色谱、高效液相色谱等,这些方法存在实验周期长、成本高、制备量小等缺点。本研究建立了高速逆流色谱和制备液相色谱相结合,快速、高效分离制备甘青青兰中绿原酸、胡麻甙-6''-乙酯和迷迭香酸(见图1)的方法。该方法分离时间短,产物纯度高,制备量大,对进一步研究甘青青兰及其复方的质量控制提供了参考,为甘青青兰中绿原酸、胡麻甙-6''-乙酯和迷迭香酸的药理及其作用机制研究提供了基础。

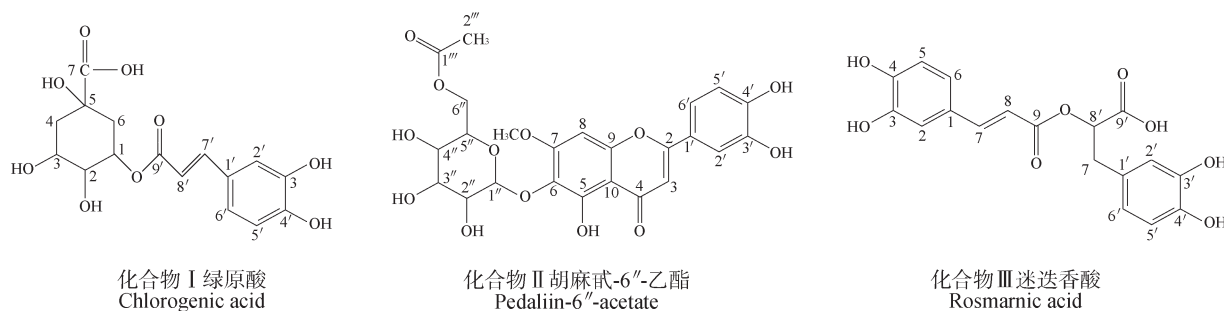


图1 目标化合物结构式

Fig.1 Chemical structure of target compound

## 1 仪器与材料

TBE-1000 高速逆流色谱仪(上海同田生化技术有限公司),TBP-2H02 泵(上海同田生化技术有限公司),UV-300N 全波长紫外检测器(上海三为科学仪器有限公司),N2010 记录仪(浙江大学智达信息工程有限公司);DAC-50 制备型液相色谱仪(江苏汉邦科技有限公司,配有 NP-7000 泵和 NU-3000 UV/VIS 检测器),V220B 色谱记录仪(北京晨悦浩祥公司);LC-3100 皖仪高效液相色谱仪(安徽皖仪科技股份有限公司,配有 P3200Q 四元泵和 DAD-3100 检测器);Varian INOVA-600 核磁共振波谱仪(美国 Varian 公司)。

高速逆流色谱和制备液相用试剂均为分析纯(济南化学试剂厂),乙腈为色谱纯(山东禹王公司),水为超纯水。

甘青青兰采购于青海省八一路药材市场,由青海大学杨仕兵教授鉴定为青兰属植物甘青青兰的干燥地上部分。

## 2 试验方法

### 2.1 甘青青兰粗提物的制备

将干燥甘青青兰(DTM)药材 5 kg 制成粉末后,加 15 倍量 75% 乙醇,在 75 ℃ 下回流提取 3 次,每次 2 h,合并提取液,减压浓缩,将浓缩液移入分液漏斗中,依次用石油醚(A)、乙酸乙酯(B)、正丁醇(C)反复萃取,收集各部位萃取液,减压回收溶剂,得乙酸乙酯部位浸膏 172.9 g,冷藏供分离。

### 2.2 高效液相色谱(HPLC)条件

色谱柱: Welch Ultimate MB-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250.0 mm, 5 μm);流动相: 乙腈(A)-0.1% 醋酸溶液(B);梯度洗脱(0~30 min, 10%~48% A; 30.0~30.1 min, 48%~10% A; 30.1~35.0 min, 10% A);流速为 1 mL·min<sup>-1</sup>;柱温为 30 ℃;多波长检测(200~400 nm);进样量为 15 μL。

### 2.3 半制备型高效液相(SP-HPLC)分离富集

称取 1.00 g 甘青青兰乙酸乙酯萃取物,加入 10 mL 50% 甲醇溶解,离心取 5 mL 上清液,上样于

DAC-50半制备型高效液相,进行梯度洗脱,根据色谱峰分别收集 13.12~15.05 min (DTM-B-1) 和 17.54~25.00 min (DTM-B-2) 时的流出液,减压浓缩至干。取少量干粉按“2.2”项下方法进行 HPLC 检测。

色谱条件: Megres C<sub>18</sub> (20 mm×250 mm, 10 μm) 柱; 流动相为甲醇(A)-0.4% 冰醋酸溶液(B); 洗脱程序为 (0~6 min, 10% A; 7~30 min, 10%~50% A; 31~45 min, 50%~95% A); 流速为 15 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温为 30 ℃; 检测波长为 340、360 nm。

## 2.4 HSCCC 分离

### 2.4.1 分配系数的测定

称取 10 mg “2.3”项分离得 DTM-B-2 加入两相溶剂体系中, 涡旋振荡使样品充分溶解于两相中, 静置分层, 分别取上、下相按“2.2”项下方法进行检测, 目标物在上、下相中的峰面积比值为分配系数 (*K* 值)。

### 2.4.2 HSCCC 分离条件

将两相溶剂体系中的下相以 50 mL·min<sup>-1</sup> 的流速泵入逆流色谱仪的螺旋管中, 待充满螺旋管后, 开启仪器, 调节主机至 FWD 模式进行旋转, 转速稳定在 850 r·min<sup>-1</sup> 后, 以 5 mL·min<sup>-1</sup> 流速泵入上相, 当有流动相从出口稳定流出, 即螺旋管中的两相已达到平衡后, 将样品溶液由进样阀注入逆流色谱仪, 流速调至 2.5 mL·min<sup>-1</sup>, 开启检测器和记录仪, 检测波长为 340 nm。

### 2.5 Pre-HPLC 纯化条件

色谱条件: Megres C<sub>18</sub> (20 mm×250 mm, 10 μm) 柱; 流动相为甲醇(A)-0.4% 冰醋酸(B); 柱温为 25 ℃; 检测波长为 340、360 nm; 流速为 15 mL·min<sup>-1</sup>; 进样量为 1.5 mL。

## 3 结果与分析

### 3.1 SP-HPLC 分离富集

HPLC 检测结果显示, DTM-B-1 和 DTM-B-2 中目标化合物含量较高 (见图 2), 故重复进行“2.3”项中对 DTM-B-1 和 DTM-B-2 的收集, 减压浓缩, 冷冻干燥, 获得 1.50 g DTM-B-1 和 7.44 g DTM-B-2, 待分离。

### 3.2 化合物 I 的纯化

经“3.1”项分离可得化合物 I 的主要单体 (DTM-B-1), 纯度 ≥80%, 因样品量少, 适宜用 Pre-HPLC 进一步纯化。按照“2.5”项条件用 20% 甲醇等度洗脱, 收集 24.00~27.50 min 时的流出液 (见

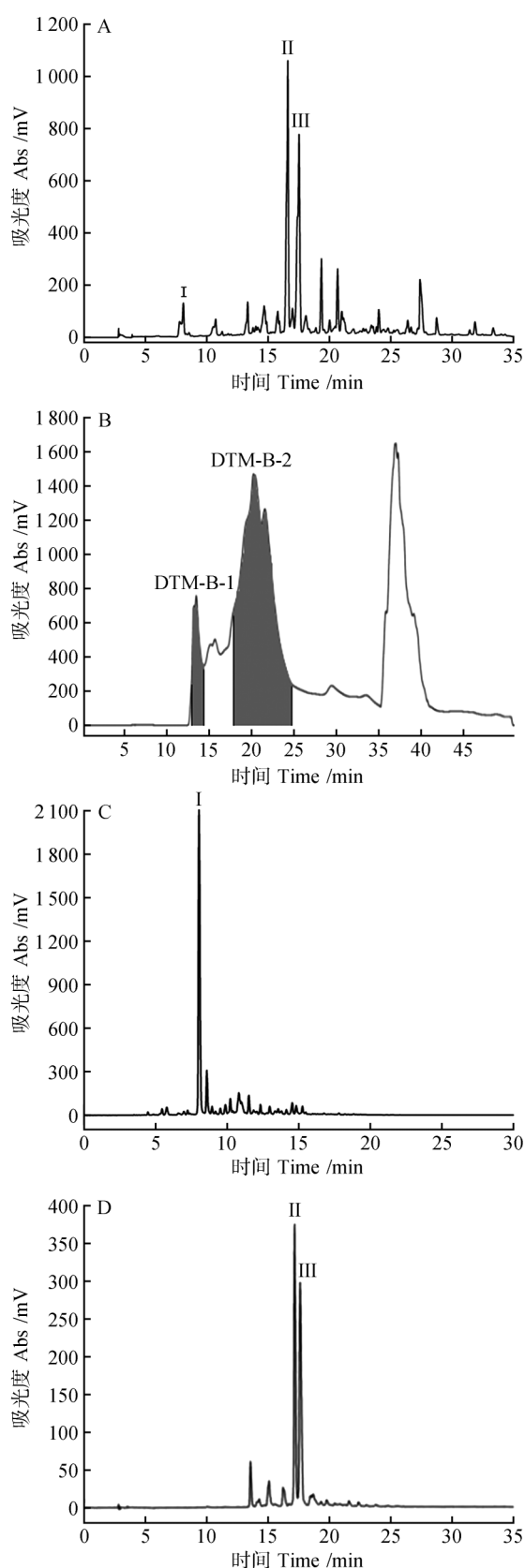


图2 乙酸乙酯部位(A)及其半制备型液相分离(B), DTM-B-1(C), DTM-B-2(D)的色谱图

Fig.2 Chromatograms of ethyl acetate(A) and Semi-preparative separation(B), DTM-B-1(C), DTM-B-2(D)

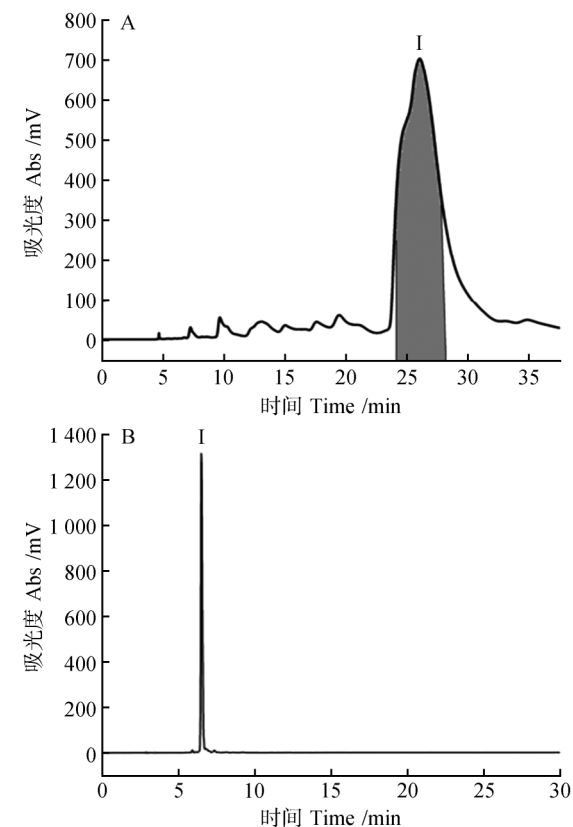


图3 化合物 I 制备液相纯化(A)及纯化后(B)的色谱图  
Fig.3 Chromatograms of compound I Pre-HPLC (A) and HPLC(B)

图 3A),采用“2.2”项方法检测纯度。根据峰面积归一化计算纯度(见图 3B),可得化合物 I (纯度 96.9%),重复进行以上化合物 I 的收集(54 mg)。

3.3 HSCCC 溶剂系统的选择

根据 HSCCC 理论,选择一个合适的溶剂体系是能否有效分离目标化合物的关键。用于 HSCCC 分离的溶剂体系除能够很好的溶解样品外,还需具备目标化合物在两相中能适当分配( $0.5 < K < 2$ )、两相能快速分层( $< 30\text{ s}$ )及固定相能较好的保留( $60\% >$ )等条件<sup>[14]</sup>。分配系数( $K$ 值)过小,样品随流动性迅速流出,不能有效分离组分;而 $K$ 值过大则延长出峰时间,峰形变异。根据待分离组分的极性,本实验选择 4 种不同极性的溶剂体系,分别测定了 DTM-B-2 中 2 种目标化合物在其不同体积配比中的 $K$ 值(见表 1)。从表 1 可知,目标化合物在 $V(\text{正己烷}):V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{甲醇}):V(\text{水})=1:12:1:12$ 和 $V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{甲醇}):V(\text{水})=1:12:1:12$ 体系中的 $K$ 值在 0.69~2.70,且分离度( $R$ )均大于 1.5。考虑到石油醚极易挥发,不易控制溶剂系统的体积配比,因此选择 $V(\text{正己烷}):V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{甲醇}):V(\text{水})=1:12:1:12$ 为两相溶剂体系。

3.4 HSCCC 分离条件的优化

逆流分离时,温度对目标物在溶剂体系中的溶解和分配度,以及固定相的保留率均有较大影响。但当温度过高时,会使低沸点组分溶剂气化而产生气泡,影响出峰及仪器寿命。同时,主机转速对分离效果也具有较大影响,加快主机速度可提高固定相在管内的保留率,但转速过快会缩短设备寿命。此外,本实验考察了进样量(50、100、150、200 mg)对分离效果的影响,当上样量大于 150

表 1 目标物在不同溶剂体系中的分配系数

Table 1 Partition coefficient of target compound in different two-phase solvent systems

| 溶剂体系<br>Solvent system                                            | 体积配比<br>Volume ratio | 分配系数 $K$ |      | 分离度<br>$R$ |
|-------------------------------------------------------------------|----------------------|----------|------|------------|
|                                                                   |                      | II       | III  |            |
| 乙酸乙酯—正丁醇—水<br>Ethyl acetate— <i>n</i> -butanol—water              | 4:1:5                | 4.92     | 3.20 | 0.65       |
|                                                                   | 1:3:1:3              | 0.10     | 0.57 | 5.61       |
|                                                                   | 1:5:1:5              | 0.22     | 0.96 | 4.30       |
|                                                                   | 1:7:1:7              | 0.38     | 1.43 | 3.82       |
| 正己烷—乙酸乙酯—甲醇—水<br>N-hexane—ethyl acetate—methanol—water            | 1:9:1:9              | 0.40     | 1.48 | 3.74       |
|                                                                   | 2:3:2:3              | 0.02     | 0.06 | 2.75       |
|                                                                   | 2:5:2:5              | 0.09     | 0.42 | 4.43       |
|                                                                   | 1:10:1:10            | 0.60     | 2.32 | 3.86       |
|                                                                   | 1:12:1:12            | 0.69     | 2.10 | 4.67       |
| 正己烷—乙酸乙酯—正丁醇—水<br>N-hexane—ethyl acetate— <i>n</i> -butanol—water | 1:14:1:1:14          | 0.81     | 2.97 | 3.68       |
|                                                                   | 1:9:1:1:9            | 1.72     | 5.19 | 3.00       |
|                                                                   | 1:12:1:12            | 1.27     | 2.70 | 2.13       |

mg时,因样品不能充分溶解于两相溶剂中而使分离效果下降。综合考虑上述因素对逆流分离效果的影响,本实验将HSCCC分离条件确定为:恒温装置温度25℃,主机转速850 r·min<sup>-1</sup>,单次进样量150 mg。

### 3.5 HSCCC 分离

称取150 mg DTM-B-2,按照“2.4.2”项方法进行分离,收集组分1(DTM-B-2-1)和组分2(DTM-B-2-2)的流出液(见图4A)。采用“2.2”项HPLC方法对两个组分进行纯度检测(见图4B~C)。可得:化合物II(DTM-B-2-2)和化合物III(DTM-B-2-1)的主要单体,纯度分别为87.2%和88.2%。重复进行以上组分1和组分2的收集,分别获得0.5 g DTM-B-3-1和0.3 g DTM-B-3-2,供进一步纯化。

### 3.6 Pre-HPLC 进一步纯化

#### 3.6.1 化合物II的纯化

经“3.5”项分离可得到化合物II的主要单体,纯度高于85%,采用Pre-HPLC进一步纯化。按照“2.5”项条件用25%甲醇等度洗脱,收集22.00~25.00 min时的流出液(见图5A),采用“2.2”项方法检测纯度。根据峰面积归一化计算纯度(见图5B),可得化合物II(纯度97.9%),重复进行以上化合物II的收集(130 mg)。

#### 3.6.2 化合物III的纯化

经“3.5”项分离可得到化合物III的主要单体,纯度高于85%,采用Pre-HPLC进一步纯化。按照“2.5”项条件用30%甲醇等度洗脱,收集24.00~27.50 min时的流出液(见图6A),采用“2.2”项方法检测纯度。根据峰面积归一化计算纯度(见图6B),可得化合物III(纯度95.1%),重复进行以上化合物III的收集(200 mg)。

### 3.7 结构鉴定

**化合物 I** 棕褐色粉末,分子式为C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>; UV (MeOH) λ<sub>max</sub>: 217, 232, 324 nm; <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, MeOD): δ7.07 (1H, d, J=1.5 Hz, 2'-H), 6.80 (1H, d, J=8.2 Hz, 5'-H), 6.97 (1H, dd, J=8.2, 1.5 Hz, 6'-H), 7.58 (1H, d, J=15.9 Hz, 7'-H), 6.29 (1H, d, J=15.9 Hz, 8'-H), 2.18~2.25 (2H, m, 2-H), 5.36 (1H, td, J=9.0, 4.3 Hz, 3-H), 3.75 (1H, dd, J=8.5, 2.8 Hz, 4-H), 4.19 (1H, td, J=6.0, 3.2 Hz, 3-H), 2.13~1.96 (m, 2H, 6-H); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, MeOD) δ74.96 (C-1), 37.54 (C-2), 72.20 (C-3), 70.62 (C-4), 70.05 (C-5), 36.86 (C-6), 175.97 (7-C), 126.41 (C-1'), 115.09 (C-2'), 145.40 (C-3'),

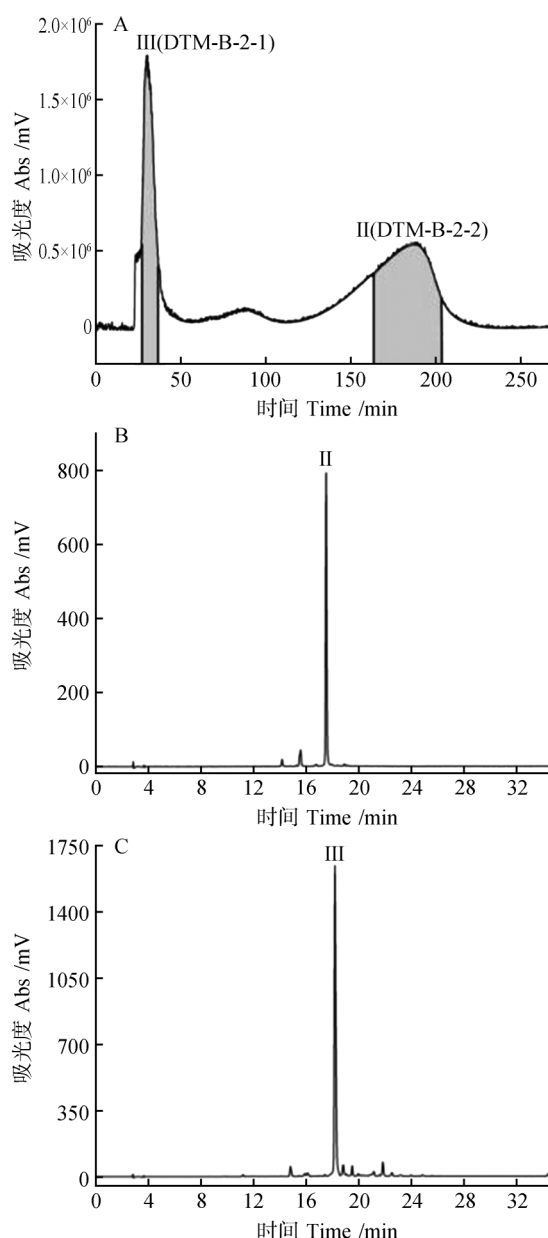


图4 DTM-B-3高速逆流分离(A)和逆流分离得化合物II(B)、III(C)的色谱图

Fig.4 Chromatograms of HSCCC separation DTM-B-3 (A) and compound II (B), III (C)

148.17(C-4'), 113.84(C-5'), 121.59(C-6'), 145.69(C-7'), 115.09(C-8'), 167.33(C-9')。以上<sup>1</sup>H-NMR和<sup>13</sup>C-NMR数据与文献<sup>[15]</sup>报道的绿原酸一致。

**化合物 II** 淡黄色粉末,分子式为; UV (MeOH) λ<sub>max</sub>: 272, 347 nm; <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO): δ13.03 (1H, s, 5-OH), 9.95 (1H, s, 4'-OH), 9.34 (1H, s, 3'-OH), 7.41 (2H, m, 2', 6'-H), 6.86 (1H, d, J=8.2 Hz, 5'-H), 6.83 (1H, s, 8-H), 6.70 (1H, s, 3-H), 4.93 (1H, d, J=7.1 Hz, 1''-H), 4.08~4.02 (6H, m, 糖基质子), 3.85 (3H, s, 7-OCH<sub>3</sub>), 1.81 (3H, s, 2'''-

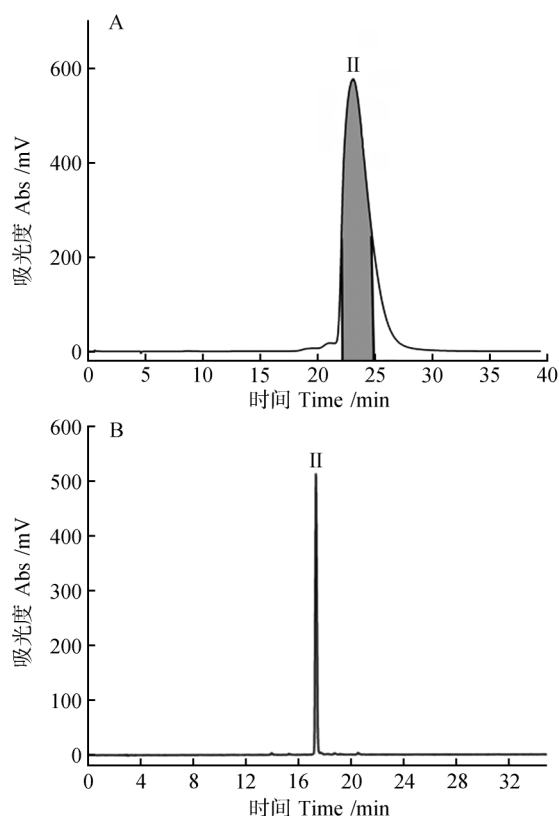


图5 化合物Ⅱ制备液相纯化(A)及纯化后(B)的色谱图  
Fig.5 Chromatograms of compound II Pre-HPLC (A) and HPLC(B)

CH<sub>3</sub>) ; <sup>13</sup>C-NMR (151MHz, DMSO) δ164.71 (C-2) , 103.18(C-3),182.59(C-4),152.30(C-5),128.37(C-6), 159.18(C-7),91.84(C-8),153.22(C-9),105.27(C-10), 56.94(7-OCH<sub>3</sub>) ,121.93(C-1') ,114.01(C-2') ,146.26 (C-3') ,150.30(C-4') ,116.43(C-5') ,119.54(C-6') , 102.54 (C-1'') , 74.27 (C-2'') , 76.78 (C-3'') , 70.52 (C-4'') ,74.48(C-5'') ,63.69(C-6'') ,170.45(C-1''') , 20.92(C-2''')。以上<sup>1</sup>H-NMR和<sup>13</sup>C-NMR数据与文献<sup>[16]</sup>报道的胡麻甙-6''-乙酯一致。

**化合物Ⅲ** 白色无定形粉末,分子式为C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>; UV (MeOH) λ<sub>max</sub>: 270, 354 nm; <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, MeOD) : δ7.01 (1H, d, J=1.8 Hz, 2-H) , 6.74 (1H, d, J=8.2 Hz, 5-H) , 6.91 (1H, dd, J=8.2, 1.6 Hz, 6-H) , 7.51 (1H, d, J=15.9 Hz, 7-H) , 6.23 (1H, d, J=15.9 Hz, 8-H) , 6.72 (1H, d, J=1.6 Hz, 2'-H) , 6.66 (1H, d, J=8.0 Hz, 5'-H) , 6.58 (1H, dd, J=8.1, 1.7 Hz, 6'-H) , 5.15 (1H, dd, J=8.4, 4.2 Hz, 8'-H) , 3.06 (1H, dd, J=14.3, 4.2 Hz, 7'-H) , 2.97 (1H, dd, J=14.3, 8.5 Hz, 7'-H) ; <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, MeOD) δ129.89(C-1) , 115.80(C-2) , 146.72(C-3) , 150.30 (C-4) , 118.16 (C-5) , 123.75 (C-6) , 148.29

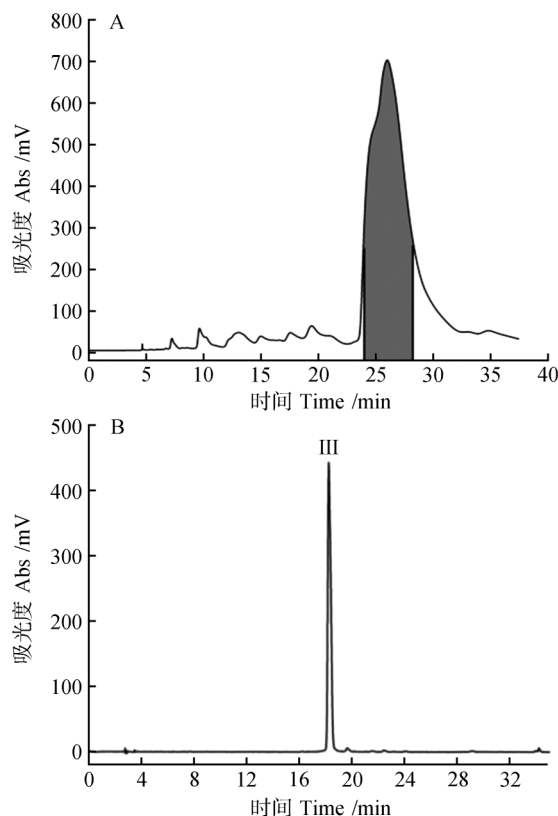


图6 化合物Ⅲ制备液相纯化(A)及纯化后(B)的色谱图  
Fig.6 Chromatograms of compound III Pre-HPLC (A) and HPLC(B)

(C-7) , 115.02 (C-8) , 169.07 (C-9) , 128.25 (C-1') , 122.39 (C-2') , 145.84 (C-3') , 147.38 (C-4') , 117.09 (C-5') , 116.88 (C-6') , 38.51 (C-7') , 75.28 (C-8') , 174.22 (C-9')。以上<sup>1</sup>H-NMR和<sup>13</sup>C-NMR数据与文献<sup>[17]</sup>报道的迷迭香酸一致。

#### 4 结论

本文通过高速逆流色谱和制备高效液相色谱优化了从甘青青兰中同时分离制备绿原酸、胡麻甙-6''-乙酯和迷迭香酸的条件,并成功结合两种技术,从甘青青兰乙酸乙酯萃取物中制备得54 mg绿原酸、130 mg胡麻甙-6''-乙酯和200 mg迷迭香酸,纯度分别为96.9%、97.9%和95.1%,3种化合物的<sup>13</sup>C-NMR、<sup>1</sup>H-NMR数据与文献报道一致。所建立的方法可得较高纯度、高产率的绿原酸、胡麻甙-6''-乙酯和迷迭香酸,操作简便,更省时间,为绿原酸、胡麻甙-6''-乙酯和迷迭香酸对照品的制备及工业生产提供参考,也为其药理活性的深入研究提供基础。

#### 参 考 文 献

[1] Yang Y A, Wang Y B, Zeng W A, et al. A strategy based on

- liquid-liquid-refining extraction and high-speed counter-current chromatography for the bioassay-guided separation of active compound from *Taraxacum mongolicum* [J]. Journal of Chromatography A, 2020, 22(14): 1614-1618.
- [2] Tian R, Suo H, Zhang S, *et al.* Separation of a family of antioxidants flavan-3-ol thio-conjugates from procyanidins by high-speed counter-current chromatography [J]. European Food Research and Technology, 2020, 246(5): 1017-1029.
- [3] Yang X, Wang N N, Shen C, *et al.* An effective method based on medium-pressure liquid chromatography and recycling high-speed counter-current chromatography for enrichment and separation of three minor components with similar polarity from *Dracocephalum tanguticum* [J]. Journal of Separation Science, 2019, 42(3): 637-778.
- [4] 陈涛, 李玉林, 杨雪. 一种甘青青兰药材中三种化学对照品的制备方法: 中国, CN107903176A [P]. 2018-04-13.
- Cheng T, Li Y L, Yang X. A preparation method of three chemical reference substances in *Dracocephalum tanguticum* Maxim.: China, 107903176A [P]. 2018-04-13.
- [5] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 卫生部药品标准·藏药分册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995.
- Pharmacopoeia Committee of the Ministry of Health of China. Drug Standards of the ministry of health of the people's republic of China (Tibetan Medicines) [M]. Beijing. People's Medical Publishing House, 1995.
- [6] 左马怡, 杨超, 田倩, 等. 青兰属植物甘青青兰化学成分研究 [J]. 云南民族大学学报: 自然科学版, 2015, 24(2): 101-103.
- Zuo M Y, Yang C, Tian Q, *et al.* Chemical constituents of *Dracocephalum tanguticum* Maxim. of genus *Dracocephalum* [J]. Journal of Yunnan Minzhu University, 2015, 24(2): 101-103.
- [7] Li Q, Liu Y Q, Han L F, *et al.* Chemical constituents and quality control of two *Dracocephalum* species based on high-performance liquid chromatographic fingerprints coupled with tandem mass spectrometry and chemometrics [J]. Journal of Separation Science, 2016, 39(21): 4075-4081.
- [8] 谢建锋, 朱林燕, 孔子铭, 等. 唐古特青兰总黄酮的提取及其体外抗氧化活性的研究 [J]. 华西药学杂志, 2015, 30(4): 422-424.
- Xie J F, Zhu L Y, Kong Z M, *et al.* Study on the extraction of total flavonoids from *Dracocephalum tanguticum* and its activity *in vitro* [J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015, 30(4): 422-424.
- [9] Yao H, Zhou L C, Tang L L, *et al.* Protective effects of luteolin-7-O-glucoside against starvation-induced injury through upregulation of autophagy in H9c2 Cells [J]. Bio-science Trends, 2017, 11(5): 557-564.
- [10] 李永芳, 李延斌, 杨梅, 等. 唐古特青兰对低氧性肺动脉高压大鼠 ET-1 和 NO 的影响 [J]. 中成药, 2016, 38(10): 2260-2262.
- LI Y F, LI Y B, YANG M, *et al.* Effects of *Dracocephalum tanguticum* Maxim. on ET-1 and NO in rats with hypoxic pulmonary hypertension [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2016, 38(10): 2260-2262.
- [11] 胡君茹, 姜华, 李喜香. 对藏药甘青青兰 4 种提取物抑菌作用的研究 [J]. 西部中医药, 2014, 27(06): 10-12.
- Hu J R, Jiang H, Li X X. Study on antibacterial activity of four kinds of extracts from tibetan medicine *Dracocephalum tanguticum* [J]. Western Journal of Traditional Chinese Medicine, 2014, 27(06): 10-12.
- [12] 赵沙沙, 程彬彬. 迷迭香酸对人肝癌 Huh7 细胞增殖凋亡的影响及其分子机制 [J]. 中医肿瘤学杂志, 2020, 2(1): 58-61.
- Zhao S S, Cheng B B. Effect of rosmarinic acid on proliferation and apoptosis of liver cancer Huh7 cells and Its Molecular mechanism [J]. Journal of Oncology in Chinese Medicine, 2020, 2(1): 58-61.
- [13] Ma E G, Wu H Y, Hu L J, *et al.* Three new phenylacetamide glycosides from *Dracocephalum tanguticum* Maxim. and their anti-hyperglycemic activity [J]. Natural Product Research, 2020, 34(13): 1827-1835.
- [14] Yu J Q, Zhang J Q, Sun X W, *et al.* Comprehensive separation of iridoid glycosides and triterpenoid saponins from *Dipsacus asper* with salt-containing solvent by high-speed counter current chromatography coupled with recycling mode [J]. Journal of Separation Science, 2020, 43(7): 1203-1392.
- [15] 张谦华. 玉叶金花化学成分及抗炎活性研究 [D]. 广西中医药大学, 2019.
- Zhang Q H. Chemical constituents from *Mussaenda pubescens* and anti-inflammatory activity [D]. Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, 2019.
- [16] 牛宝静, 马柱坤, 廖志新, 等. 异叶青兰的化学成分研究 [J]. 中草药, 2013, 44(2): 147-152.
- Niu B J, Ma Z K, Liao Z X, *et al.* Chemical constituents from *Dracocephalum heterophyllum* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2013, 44(2): 147-152.
- [17] 李怀志, 宫成玉, 李云, 等. pH 区带逆流色谱法分离纯化丹参中的丹酚酸 B 和迷迭香酸 [J]. 山东科学, 2016, 29(03): 13-17+123.
- Li H Z, Gong C Y, Li Y, *et al.* Separation and purification of salvianolic acid B and rosmarinic acid from *Salvia miltiorrhiza* Bge. by pH-zone-refining counter-current chromatography [J]. Shandong Science, 2016, 29(03): 13-17+123.