

梯度洗脱法同时快速分离测定不同品种不同部位淫羊藿中 7种异戊烯基黄酮类成分的研究

谢娟平^{1*}, 孙文基²

¹安康学院化学化工系, 安康 725000; ²西北大学陕西省生物医药重点实验室, 西安 710069

摘要: 建立一种同时快速分离测定不同品种、不同部位淫羊藿中双黄酮 A、淫羊藿属苷 A、朝藿定 C、淫羊藿苷、淫羊藿属苷 C、意卡瑞苷 A 和去多甲基羟基淫羊藿素 7 种异戊烯基黄酮类成分的梯度洗脱方法, 其中双黄酮 A、意卡瑞苷 A 和去多甲基羟基淫羊藿素为首次报道其含量测定。实验比较了三种不同的梯度洗脱条件和三种不同的提取分离条件, 选出了实验的最佳条件: 采用 RP-HPLC 法, 以美国 WATERS SUNFRET™-C₁₈ 为色谱柱, 乙腈-水为流动相, 梯度洗脱 (乙腈: 0 min 20%; 10 min 40%; 15 min 45%; 20 min 60%), 流速为 1 mL/min, 检测波长 270 nm, 在此条件下, 30 min 内所有组分均得到了良好的分离。实验同时考察比较了巫山淫羊藿植株不同药材部位和其它十种不同品种淫羊藿中 7 种异戊烯基黄酮类成分的分布。结果表明: 不同品种淫羊藿中黄酮类成分的含量差异很大, 但大部分品种以朝藿定 C 为主; 同一品种巫山淫羊藿不同部位中则双黄酮 A 和朝藿定 C 的含量较大 (在巫山淫羊藿根中, 两者的含量分别为现行质量控制指标淫羊藿苷的 20 倍和 30 倍), 可见巫山淫羊藿显著不同于其它品种的淫羊藿, 朝藿定 C 在其药用效果中可能比淫羊藿苷扮演着更重要的角色尤其是在根部作为药用时, 这也为民间将巫山淫羊藿根作为小黄连使用提供了一定的实验支持。结论: 对于品种较多, 分布资源较广的淫羊藿药材, 作为药用时, 应注意品种和药用部位, 考察药材的内在质量, 不能一概而论。实验所得到的方法能被用作淫羊藿植株中二次代谢产物分布的快速考察、筛选符合要求的淫羊藿原药材和淫羊藿制备药物中的质量考察。

关键词: 淫羊藿; 异戊烯基黄酮; 分离; 定量测定; RP-HPLC

中图分类号: R284. Q946. 91

文献标识码: A

Separation and Simultaneous Quantification of Seven Prenylflavones from Organs of different *Epimedium* Using Gradient Reverse-phase HPLC

XIE Juan-ping^{1*}, SUN Wen-ji²

¹Department of Chemistry, Ankang University, Ankang 725000, China;

²Biology and Medicine Key Laboratory of Shaanxi Province, Northwest University, Xi'an 710069, China

Abstract A simple and rapid gradient reverse-phase HPLC method for separation and simultaneous determination of the seven prenylflavones, diphyllaside A, epimedinoside A, Epimedinin C, icariin, epimedinoside C, icarisoside A, and desmethylanhydroicaritin in different organs (roots, stems, leaves) of *Epimedium wushanense* for the first time has been developed. Especially, diphyllaside A, icarisoside A and desmethylanhydroicaritin (never found any reports of the detection by HPLC) were determined in *Epimedium* for quality control in the first time. Comparison of three RP-HPLC methods and three extraction methods, quantification and comparison of each prenylflavone in leaves of *Epimedium wushanense* with other nine *Epimedium* species. With this method, we obtained good retention times and resolution of seven compounds. Concentration of all seven components varied between plant organs. Epimedinin C was higher than icariin (the compound typically used to evaluate *Epimedium* quality) in leaves of *Epimedium*; diphyllaside A and Epimedinin C were 20 and 30x higher, respectively than icariin in the roots of *E. wushanense*. T. S. Ying and the quantification of Epimedinin C was higher far away from other *Epimedium* species. Thus *Epimedium wushanense* is a special species of *Epimedium*, Epimedinin C is likely to

play a more important role than icariin in *Epimedium wushanense*, especially roots of *Epimedium wushanense* should be exploit (it has been used to therapy disease as well as *Coptis chinensis* in china in civilian). The method could be applied to

收稿日期: 2009-01-07

接受日期: 2009-07-06

基金项目: 安康学院高层次人才启动经费资助项目 (AYQDZR200801)

* 通讯作者 Tel: 86-915-3261415; E-mail: xjp_731205@163.com

seek regularity in secondary metabolites distribution, screen raw materials in search for highly quality plants and its medicinal preparations

Key words *Epimedium*; prenylflavones; separation; quantitative determination; RP-HPLC

淫羊藿为小檗科常用中草药, 具有补肾阳、强筋骨、祛风湿的功能^[1-3], 在中国药用已超过 2000 年的历史, 广泛用于治疗心血管疾病和其他慢性疾病。中国淫羊藿资源相当丰富, 常用品种为朝鲜淫羊藿、箭叶淫羊藿、巫山淫羊藿、柔毛淫羊藿、淫羊藿等, 常用其植株的干燥地上部分, 尤其是巫山淫羊藿根在民间作为“小黄连”来使用, 具有较高的临床价值。该属其它植物在个别地区也作淫羊藿用, 称习用淫羊藿药材。现代药理研究表明淫羊藿对骨质疏松症有强烈活性^[4]。

淫羊藿药材含有多种黄酮类成分^[1,5], 主要是异戊烯基黄酮, 形成了该属独特的黄酮类成分。提取分离实验表明, 淫羊藿中主要含有七种黄酮类成分, 包括双藿苷 A、淫羊藿属苷 A、朝藿定 C、淫羊藿苷、淫羊藿属苷 C、意卡瑞苷 A 和去多甲基羟基淫羊藿素。其中以淫羊藿苷为代表的 HPLC 法含量测定已有许多报道^[5,6], 中国药典也以淫羊藿苷作为特征性成分规定了含量测定, 限度不低于 0.5%^[7], 但对于淫羊藿药材中七种异戊烯基黄酮成分含量的同时分离与快速测定则未见报道, 尤其是双藿苷 A、意卡瑞苷 A 和去多甲基羟基淫羊藿素的含量测定未见报道。特别是巫山淫羊藿根中的化学成分, 在以前的报道中, 淫羊藿苷是提取物中的主要有效部分。我们从巫山淫羊藿根中分离到上述七种异戊烯基黄酮, 其中巫山淫羊藿根中以双藿苷 A 和朝藿定 C 为主, 叶中以朝藿定 C 和淫羊藿苷为主; 不同品种淫羊藿叶中黄酮类成分的含量差异很大, 但大部分品种以朝藿定 C 为主。此外上述七种异戊烯基黄酮均显示了一定的抗氧化活性和抗菌活性, 其中淫羊藿属苷 C 和多甲基羟基淫羊藿素的抗氧化活性强于其它黄酮^[8], 这也为民间将巫山淫羊藿根作为“小黄连”使用提供了一定的理论支持。因此, 测定淫羊藿中黄酮类成分的含量对评价其质量和控制临床研究剂量是必须的。

本研究建立了一种简单有效的 RP-HPLC 方法。可用于同时分离分析淫羊藿中七种黄酮类成分, 用此方法对采集的不同品种的淫羊藿和同一品种淫羊藿药材不同部位中的七种黄酮类成分进行了快速分离分析考察, 结果良好。

1 仪器与试剂

WATERS 高效液相色谱仪, 包括 2695 泵, 2487 紫外检测器, Empower 色谱工作站; 微孔滤膜 $\phi = 13$ mm, 4.5 μ m (天津市色谱科学技术公司)。

乙腈为色谱纯, 水为双蒸水并经 0.45 μ m 水系滤膜过滤。对照品均为自行分离精制, 并经 UV、R、FAB-MS、HAMR、CNMR 鉴定结构, HPLC 检测, 面积归一化法计算纯度, 均大于 98% (图 2)。

不同品种淫羊藿植物样品由洛阳陆生植物研究所王忠东教授鉴定并提供; 两年生巫山淫羊藿由陕西省安康市药品检验所胥道宝主任药师鉴定并提供。

2 方法

2.1 检测波长的选择

双藿苷 A、淫羊藿属苷 A、朝藿定 C、淫羊藿苷、淫羊藿属苷 C、意卡瑞苷 A 和去多甲基羟基淫羊藿素结构相似 (图 1), 在本文流动相中的紫外光谱最大吸收均在 270 nm, 故选择 270 nm 为吸收波长。

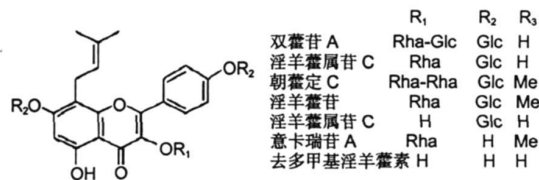


图 1 七种对照品结构示意图

Fig. 1 Structure of seven reference substances

2.2 色谱条件

查阅文献可知, 对化合物 2~5 的 HPLC 分离分析多采用酸性系统流动相^[9,10], 但这种方法在大量样品的长期分析中, 对色谱柱的寿命有非常严重的损害。因此, 本文采用不含酸的梯度洗脱方法对化合物 1~7 进行分离和分析, 结果良好。色谱柱: WATERS SUNF RETM-C₁₈ 柱 (5 μ m, 4.6 \times 250 mm); 流动相: 乙腈-水, 梯度洗脱, 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 灵敏度 0.02 AUFS; 流速: 1 mL/min; 检测波长 270 nm; 分别采用四种梯度条件进行分离 (表 1), 结果在条件 2 (乙腈: 0 min 20%; 10 min 40%; 15 min 45%; 20 min 60%) 下, 七种化合物的分离分析在 30 min 内

实现,各成分的分离度和保留时间均较好的满足了常规分析要求。在上述条件下,各对照品及样品的色谱图如图 2 七种成分色谱峰理论塔板数分别为 8710(1 号峰)、4850(2 号峰)、21195(3 号峰)、

19862(4 号峰)、2828(5 号峰)、4508(6 号峰)、6322(7 号峰),峰间分离度分别为 2.15(1,2 峰)、5.53(2,3 峰)、2.25(3,4 峰)、2.33(4,5 峰)、3.32(5,6 峰)、6.05(6,7 峰)。

表 1 化合物 1~7 色谱行为与条件的考察

Table 1 Chromatographic behavior of compound 1-7 with different HPLC mobile phases

流动相组成 Composition of mobile phase 乙腈-水 Acetonitrile-water	化合物 1~7 的保留时间 t_r (min)
1: 乙腈: 23%	5.9 9.7 35.7 38.1 58.6 > 60 > 60
2 乙腈: (0 min, 20%; 10 min, 40%; 15 min, 45%; 20 min, 60%; v/v)	7.7 8.6 10.8 11.5 13.2 16.6 24.2
3 乙腈: (0 min, 23%; 5 min, 28%; 10 min, 45%; 15 min, 50%; 20 min, 80%; v/v)	6.5 8.0 13.0 13.1 14.0 16.1 23.7
4 乙腈: (0 min, 20%; 5 min, 35%; 10 min, 40%; 15 min, 45%; 20 min, 60%; 25 min, 80%; v/v)	6.8 7.4 8.9 18.5 19.0 19.9 28.1

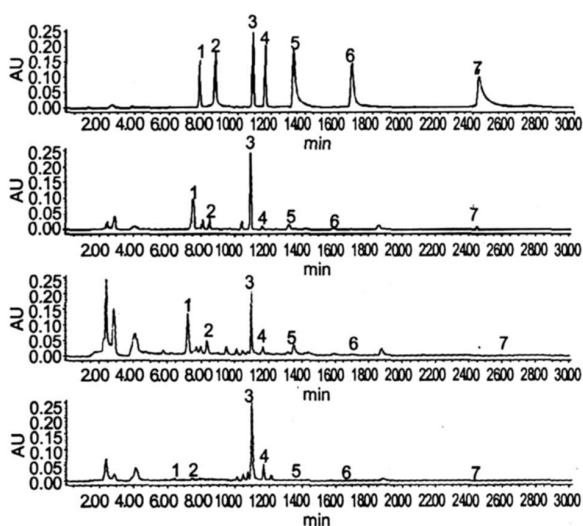


图 2 对照品及样品的 HPLC 图谱

Fig. 2 RPHPLC chromatograms of reference substances and samples

1 双藜苷 A 峰 Peak of Diphylliside A; 2 淫羊藿属苷 A 峰 Peak of Epimedioside A; 3 朝藜定 C 峰 Peak of Epimedin C; 4 淫羊藿苷峰 Peak of Icaritin; 5 淫羊藿属苷 C Epimedioside C; 6 意卡瑞苷 A Icariside A; 7 去多甲基羟基淫羊藿素 Desmethylnhydroicaritin A. 对照品 Reference substances B 巫山淫羊藿根 Root of *E. wushanense*; C 巫山淫羊藿茎 Stem of *E. wushanense*; D 巫山淫羊藿叶 Leaf of *E. wushanense*

表 2 提取条件的考察 ($n=3$, 药材粉末以 100 g 计)

Table 2 Results of different extraction procedure ($n=3$, $m=100$ g)

溶剂 Solvent	方法 Methods	提取率 g/100 g Extraction rate	化合物 1~7 含量 g/100 g (Content of 7 substances)							
			1	2	3	4	5	6	7	
水	超声	21.3	1.95	0.33	2.65	0.09	0.55	-	-	n ^d
70% 乙醇	回流	16.8	1.69	0.23	2.75	0.10	1.05	0.08	-	-
70% 乙醇	超声	17.2	2.10	0.37	3.05	0.11	1.13	0.10	-	-

注: n^d 未检出, + 检测值低于 LOQ。

样 1、5、10、15、20、25、30、35、40 μL , 精密吸取上述化合物 6~7 对照品溶液, 依次进样 1、2、3、4、5、6、7、8、10 μL , 按色谱条件, 实验中分别以信噪比的三倍和 10 倍定义检测限 LOD 和定量限 LQD, 测定峰

面积, 以峰面积为纵坐标, 以对照品进样量为横坐标, 绘制标准曲线, 双藜苷 A、淫羊藿属苷 A、朝藜定 C、淫羊藿苷、淫羊藿属苷 C、意卡瑞苷 A 和去多甲基羟基淫羊藿素的线性回归方程如表 3。

表 3 对照品线性回归结果

Table 3 Determination results of the seven standard substances linear equations

对照品 Control	LOD (μg)	LQD (μg)	线性方程 Linear equations	线性范围 (μg) Linear range	相关系数 r
双藜苷 A	0.004	0.012	$Y = 2 \times 10^6 x + 97327$	0.060~2.400	0.9992
淫羊藿属苷 A	0.004	0.010	$Y = 2 \times 10^6 x + 22973$	0.047~1.880	0.9999
朝藜定 C	0.005	0.014	$Y = 2 \times 10^6 x + 23082$	0.071~2.820	0.9999
淫羊藿苷	0.004	0.011	$Y = 2 \times 10^6 x + 9803.1$	0.054~2.160	0.9999
淫羊藿属苷 C	0.021	0.060	$Y = 3 \times 10^6 x - 518634$	0.149~5.952	0.9997
意卡瑞苷 A	0.180	0.560	$Y = 3 \times 10^6 x - 776078$	1.658~16.58	0.9997
去多甲基羟基淫羊藿素	0.110	0.310	$Y = 3 \times 10^6 x - 934133$	0.928~9.280	0.9996

2.7 精密度实验

精密吸取各对照品溶液 20 μL , 连续进样 6 次, 测定峰面积, 结果 7 种成分含量测定值的 RSD 分别为: 淫羊藿属苷 A 1.19%, 双藜苷 A 1.46%, 淫羊藿苷 0.45%, 朝藜定 C 0.39%, 淫羊藿属苷 C 1.74%, 意卡瑞苷 A 0.72% 和去多甲基羟基淫羊藿素 1.45%。各成分保留时间的 RSD 分别为淫羊藿属苷 A 0.16%, 双藜苷 A 0.11%, 淫羊藿苷 0.09%, 朝藜定 C 0.13%, 淫羊藿属苷 C 0.31%, 意卡瑞苷 A 0.29% 和去多甲基羟基淫羊藿素 0.25%。

2.8 重复性实验

取同一样品 (两年生巫山淫羊藿根) 6 份, 按样品制备方法制备供试品溶液, 各取 20 μL 进样, 测定峰面积, 计算得七种成分的含量分别为: 2.090%, 0.373%, 3.054%, 0.106%, 1.134%, 0.104%, 0.005%, 各成分含量的 RSD 分别为淫羊藿属苷 A 0.028%, 双藜苷 A 0.019%, 朝藜定 C 0.062%, 淫

羊藿苷 0.008%, 淫羊藿属苷 C 0.036%, 意卡瑞苷 A 0.003% 和去多甲基羟基淫羊藿素 0.001%。

2.9 对照品稳定性实验

精密吸取混合对照品溶液 20 μL 分别于配制后的 0.4、8、16、24、48 h 内进样, 测定峰面积。计算 7 种成分的 RSD 分别为 0.9%、0.6%、0.8%、0.4%、0.7%、0.5%、0.9%。结果表明, 对照品溶液在 48 h 内稳定。

2.10 加样回收率

准确称取已测知含量的巫山淫羊藿根样品 5 份, 每份约 0.2 g 平行操作, 分别定量加入淫羊藿属苷 A、双藜苷 A、朝藜定 C、淫羊藿苷、淫羊藿属苷 C、意卡瑞苷 A 和去多甲基羟基淫羊藿素对照品溶液, 待自然挥干后, 按供试品溶液制备方法操作, 并按上述色谱条件测定峰面积, 计算七种成分的平均回收率和 RSD, 结果见表 4。

表 4 加样回收率试验结果 ($n = 5$)Table 4 Recovery rate of samples ($n = 5$)

组分 Substances	1	2	3	4	5	6	7
回收率 (%) Recovery rate	100.59	101.04	100.26	98.99	99.65	100.16	97.96
RSD (%)	1.07	1.10	1.15	0.89	1.26	1.19	1.60

由表 4 可见七种成分回收率为 97.96% ~ 101.04%, 效果良好, 表示了样品处理中七种主要成分提取完全。

3 结果

3.1 同一植物不同部位样品含量的测定

取巫山淫羊藿根、茎、叶,按供试品溶液制备方法操作,每次进样 20 μ L,按照色谱条件测定峰面积,以外标法计算含量,结果见表 5

表 5 同一样品不同部位的含量测定结果 ($n=3$)

Table 5 Results of content determination of different samples ($n=3$)

样品 Sample	产地 Origin	七种成分含量 Content of 7 substances						
		1	2	3	4	5	6	7
根	陕西安康	2.090	0.373	3.054	0.106	1.134	0.104	+ -
茎	陕西安康	0.142	0.055	0.178	0.043	0.018	0.009	n ^d
叶	陕西安康	0.110	0.061	2.003	0.486	0.012	0.005	n ^d

3.2 不同品种样品含量的测定

取不同品种淫羊藿(两年生)的地上部分,按供试品溶液制备方法操作,每次进样 20 μ L,按照色谱条件测定峰面积,以外标法计算含量,结果见表 6

表 6 不同品种样品的含量测定结果 ($n=3$)

Table 6 Results of content determination of different samples ($n=3$)

样品 Sample	产地 Origin	七种成分含量 Content of 7 substances						
		1	2	3	4	5	6	7
淫羊藿 <i>E. brevicornu</i> Maxim	洛阳	0.121	0.079	1.717	2.790	0.038	+ -	n ^d
川西淫羊藿 <i>E. elongatum</i> Kamarov	四川	0.220	0.201	3.197	1.430	0.133	0.034	n ^d
直距淫羊藿 <i>E. mikiñorii</i> Stearn	四川	0.220	0.201	3.197	1.430	0.133	0.034	n ^d
巫山淫羊藿 <i>E. wushanense</i> Ying	四川	0.175	0.075	4.072	0.042	+ -	n ^d	n ^d
心叶淫羊藿 <i>E. parvifolium</i> S. Z. et T. L. Zhang	洛阳	0.131	0.092	1.109	0.485	0.035	+ -	+ -
箭叶淫羊藿 <i>E. pinedium</i> Sagittatum Sieb. et Zucc. Maxim	南阳	0.117	0.038	1.634	0.845	+ -	+ -	+ -
柔毛淫羊藿 <i>E. pubescens</i> Maxim	四川	0.167	0.119	1.922	1.840	0.039	0.078	0.078
粗毛淫羊藿 <i>E. ilicifolium</i> Franch	四川	0.333	0.396	1.849	1.616	0.265	0.296	0.296
长蕊淫羊藿 <i>E. dolichostemum</i> Stearn	四川	0.186	0.080	2.344	0.070	0.060	n ^d	n ^d
朝鲜淫羊藿 <i>E. koranum</i> Nakai	吉林	0.068	0.020	0.204	0.539	+ -	+ -	n ^d

4 讨论

4.1 本实验采用梯度洗脱方法首次同时分离测定了双藜苷 A、淫羊藿属苷 A、朝藜定 C 和淫羊藿苷、淫羊藿属苷 C、意卡瑞苷 A 和去多甲基羟基淫羊藿素七种成分在不同部位、不同品种淫羊藿中的分布,色谱条件稳定,测定结果可靠。由表 5 可知,朝藜定 C、双藜苷 A、淫羊藿苷在巫山淫羊藿根、叶中较多,而在茎中次之。但值得注意的是巫山淫羊藿各部位中朝藜定 C 的含量远远大于淫羊藿苷,尤其是在根中,除主要含朝藜定 C 外的另一种成分双藜苷 A 的含量也达到 2%,两者的含量分别为现行质量控制指标淫羊藿苷的 20 倍和 30 倍,可见巫山淫羊藿显著不同于其它品种的淫羊藿,朝藜定 C 在其药用效果中可能比淫羊藿苷扮演着更重要的角色(尤其是在根部作为药用时),这也为民间将巫山淫羊藿根

作为小黄连使用提供了一定的实验支持。中国药典对淫羊藿的含量测定项只测淫羊藿叶中的淫羊藿苷,显然不适于巫山淫羊藿品种^[7]。

4.2 由表 6 可知,不同品种的淫羊藿中主要成分含量有较大差异,但总黄酮的主要部分为这七种化合物,在考虑药材及制剂质量时,对于品种较多,分布资源较广的淫羊藿药材,作为药用时,应注意品种和药用部位,考察药材的内在质量,不能一概而论。实验所得到的方法能被用做淫羊藿植株中二次代谢产物分布的快速考察、筛选符合要求的淫羊藿原药材和淫羊藿制备药物中的质量考察。

4.3 流动相的选择:实验选择了乙腈-水(25:75)逆流洗脱和乙腈-水(梯度洗脱)体系,考虑到常规分析中的快速测定,从分离情况和出峰时间等综合分析选择乙腈-水梯度洗脱,选择梯度洗脱条件 2(乙腈: 0 min, 20%; 10 min, 40%; 15 min, 45%; 20 min,

60%), 在 30 min 内很好的完成了七种成分的快速分离与分析。

参考文献

- 1 Flora of China(中国植物志). Beijing Science Press, 2001: 262
- 2 Pan Y, Kong LD, et al Antidepressant like effect of icariin and its possible mechanism in mice *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2005, 82: 686-694
- 3 Wang YK, Huang ZQ. Protective effects of icariin on human umbilical vein endothelial cell injury induced by H₂O₂ in vitro *Pharmacological Research*, 2005, 52: 174-182
- 4 Chen KM(陈克明), Ge BF(葛宝丰), et al. Inhibitory effect of total flavonoid extract of *Epimedium sagittatum* on rat osteoporosis induced by ovariectomy *Chin J Clin Rehabilitation* (中国临床康复), 2004, 8: 5681-5683
- 5 Guo BL(郭宝林), Xiao PG(肖培根). Determination *Epimedium flavonoids* by HPLC. *Northwest Pharm J* (西北药学杂志), 1996, 10(5): 201
- 6 Jia MG(贾敏鸽), Sun WJ(孙文基), et al RP-HPLC determination of rohuoside and icariin in herba *Epimedium* of different species and part used *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2005, 25(1): 64
- 7 Ch P(中国药典), Vol I 2005: 267
- 8 Xie J, Sun W. Chemical constituents of roots of *Epimedium wushanense* and evaluation of their biological activities *Natural Product Research*, 2007, 21: 600-605
- 9 Hao ZF(郝振芳), Zhu ZJ(朱智甲), et al Determination of icariin in yishenling oral liquid by second order derivative spectrophotometry. *Chin J Spec Lab*(光谱实验室), 1999, 5: 534-536
- 10 Sha M(沙明), Xue YM(薛雅民). Determination of icariin in Koreanum nakai by HPLC. *Chromatogram* (色谱), 1997, 13: 166-167
- 5 Chen CD(陈朝东). Some cases of clinical application of worm asin o decoction *Human Guiding J Tradit Chin Med*(湖南中医药导报), 2004, 10(4): 54, 60
- 6 Wang JW(王军伟), Ruan B(阮冰). Study advances on chemical constituents and pharmacological activities of *Linder aggregata*. *Zhejiang J Tradit Chin Med* (浙江中医杂志), 2006, 41: 675-677.
- 7 Du ZQ(杜志谦), Xia HL(夏华玲), Jiang HX(江海肖). Analysis of the chemical constituents of essential oil from *Linder aggregata* by GC-MS. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2003, 34(4): 308-310
- 8 Dong Y(董岩), Liu HL(刘洪玲), Wang XF(王新芳). Analysis of volatile compounds in *Linder aggregata* by microwave distillation with GC-MS. *Shandong J Tradit Chin Med* (山东中医杂志), 2005, 24(6): 370-372
- 9 Zhou JB(周继斌), Wang SW(翁水旺), Fan M(范明), et al Determination of the chemical constituents of essential oil in root tuber, root and stem from *Linder aggregata*. *Chin Wild Plant Resour*(中国野生植物资源), 2000, 19(3): 48-49
- 10 Dong XY(董新艳), Zhang XR(张兴儒). Application of supercritical fluid extraction in study of herbal medicine *J Qinghai Univ, Nat Sci*(青海大学学报, 自科版), 2005, 23(3): 15-18
- 11 Ge FH(葛发欢), Hui GJ(辉国钧), Ling J(李菁), et al Modernization of traditional Chinese medicine and application of supercritical fluid extraction *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2000, 12(3): 88-93
- 12 Ge FH(葛发欢), Li Y(李莹), Xie JM(谢健鸣), et al Studies on technology of supercritical CO₂ fluid extraction for volatile oils and saponins in *Bupleurum chinense* DC. *China Mat Med* (中国中药杂志), 2000, 25(3): 149-153
- 13 Wu HQ(吴惠勤), Zhang GY(张桂英), Zeng L(曾莉), et al Analysis of essential oil from rhizoma *acori tatarinowii* by GC-MS with supercritical fluid extraction *J Instru Anal*(分析测试学报), 2000, 19(6): 70-71