

# 高速逆流色谱分离小孢拟盘多毛孢 PM-1 菌株中的除草活性物质

王珺瑶<sup>1</sup> 郑超<sup>2</sup> 张利辉<sup>1</sup> 董金皋<sup>1\*</sup>

(1. 河北农业大学 生命科学学院 真菌毒素与植物分子病理学实验室 河北 保定 071001)  
(2. 河北大学 生命科学学院 河北 保定 071002)

**摘 要:** 【目的】应用高速逆流色谱法(High-speed counter-current chromatography, HSCCC)实现对小孢拟盘多毛孢 *Pestalotiopsis microspora* PM-1 菌株代谢产物中除草活性物质的首次分离。【方法】以正己烷:乙酸乙酯:甲醇:水(4:5:4:5, V/V/V/V)为最佳的两相溶剂体系,上相(水相)为固定相,下相(有机相)为流动相,正相洗脱。【结果】在流速 2 mL/min、转速 900 r/min、检测波长 254 nm 的条件下进行分离,得到 4 个馏分,其中馏分 II 对马唐的活性较强。馏分 II 经高效液相色谱法(High performance liquid chromatography, HPLC)以乙腈:水=75:25 (V/V)为流动相经过 C18 柱进一步分离检测,所得馏分 A 对马唐种子萌发有较强的抑制作用。其保留时间为 7.954 min,该峰经二极管阵列光谱检测为单一组分。【结论】利用最佳的高速逆流色谱条件和高效液相色谱条件对小孢拟盘多毛孢 *Pestalotiopsis microspora* PM-1 菌株代谢产物进行分离,可获得除草活性化合物——馏分 A。

**关键词:** 小孢拟盘多毛孢, 代谢产物, 高速逆流色谱, 除草活性, 分离

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2011AA10A206)

\*通讯作者: ✉: dongjingao@126.com

收稿日期: 2012-06-04; 接受日期: 2012-08-07

# Preparative separation of the herbicidal substance from *Pestalotiopsis microspora* PM-1 by high-speed counter-current chromatography

WANG Jun-Tao<sup>1</sup> ZHENG Chao<sup>2</sup> ZHANG Li-Hui<sup>1</sup> DONG Jin-Gao<sup>1\*</sup>

(1. *Mycotoxin and Molecular Plant Pathology Laboratory, College of Life Science, Agricultural University of Baoding, Baoding, Hebei 071001, China*)

(2. *College of Life Sciences, Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China*)

**Abstract:** [Objective] The separation of a herbicidal active compound from *Pestalotiopsis microspora* PM-1 was to be accomplished by high-speed counter-current chromatography (HSCCC) for the first time. [Methods] The compound was separated by HSCCC from the ethyl acetate crude extract of *Pestalotiopsis microspora* PM-1 with the two-phase solvent system consisting of n-hexane:ethyl acetate:methanol:water:solution (4:5:4:5, V/V/V/V). The upper phase (aqueous phase) was chosen as the stationary phase and the lower phase (organic phase) as the mobile phase. [Results] Under the HSCCC conditions of a flow rate of 2.0 mL/min, the apparatus rotated at 900 r/min and the effluent detected at 254 nm, four fractions were obtained. Fraction II had the most intensive herbicidal activity on *Digitaria sanguinalis*, which was further analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) on C18 column with acetonitrile:water=75:25 (V/V) as the mobile phase under isocratic elution. Fraction A obtained at the retention time of 7.954 min showed an effective herbicidal activity on seed germination of *Digitaria sanguinalis*. The spectral analysis by diode array detection (DAD) for fraction A showed that fraction A is a pure component. [Conclusion] The results showed that the separation methods of high-speed countercurrent chromatography combined with high performance liquid chromatography was effective to obtain the herbicidal compound-fraction A from the metabolites of *Pestalotiopsis microspora* PM-1.

**Keywords:** *Pestalotiopsis microspora*, Metabolites, High-speed counter-current chromatography, Herbicidal activity, Separation

杂草是危害农作物的主要劲敌之一，全世界杂草分布广泛，其中约 1 800 余种杂草所造成的粮食产量损失约占每年粮食总产量的 9.7%<sup>[1]</sup>。自从人类进行农业生产以来，人们就采用各种方式除草。化学除草剂以其高效、使用方便、作用广谱、经济效益显著等优点在 20 世纪中后期得到广泛应用。但近年来随着化学除草剂的大量开发

和使用，生态环境的污染问题日趋严重。而生物除草剂对目标杂草以外的植物影响小，环境负效应小，安全性高，符合可持续农业的发展要求<sup>[2]</sup>。

生物源除草剂可分为植物源除草剂、动物源除草剂和微生物源除草剂，目前人们研究的重点以微生物源除草剂为主<sup>[3]</sup>。与植物相比，微生物能够产生更多具有生物除草活性的化合物，如双

丙氨磷(Bialaphos)和草铵膦(Phosphinothricin, PPT, 商品名为 Glufosinate)<sup>[4]</sup>。

高速逆流色谱在分离提取天然产物方面具有很多优势,它是一种液相分配色谱技术,分离能力强,且分离时间短,数小时即可完成,纯度多在 98%以上<sup>[5]</sup>。其溶剂系统更换灵活,可用于天然产物粗提物的杂质和单个产物的精制,也可与质谱仪或红外光谱联用进行高纯度分析。其分离无需固体载体作固定相,克服了固体载体所带来的样品吸附,既能分离非极性化合物,也能分离极性化合物,制备量大,一步分离便可得到高纯度化合物<sup>[6]</sup>。近年来,高速逆流色谱的技术和设备日渐成熟,已广泛应用于药物和天然产物的分离,目前已通过高速逆流色谱成功从穿心莲中分离出穿心莲内酯<sup>[7]</sup>;从红豆杉中分离出 10-脱乙酰卡巴亭<sup>[8]</sup>及紫杉醇<sup>[9]</sup>等;从山茱萸的正丁醇提取物中分离得到没食子酸<sup>[10]</sup>,从丹参粗提物中得到纯度大于 98%的丹参酚酸 B<sup>[11]</sup>等酚类和脂肪酸类物质。

本实验室前期从发病竹子叶片上分离纯化得到的一株真菌,经活性检测、形态学鉴定和核糖体 ITS 序列比对,明确其为小孢拟盘多毛孢。该属的真菌代谢产物有很强的药理活性和抑菌作用<sup>[12]</sup>。研究表明,小孢拟盘多毛孢 PM-1 菌株在含硫酸亚铁的 PD 培养基中,30 °C 黑暗条件下静置培养 15 d,得到的粗提物除草活性最强<sup>[13]</sup>。

本文应用高速逆流色谱法,选用正己烷:乙酸乙酯:甲醇:水为 4:5:4:5 (V/V/V/V)的两相溶剂体系对小孢拟盘多毛孢 PM-1 菌株的乙酸乙酯萃取物进行分离纯化,得到高纯度的除草活性物质,为开发新型微生物除草剂奠定了基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料

菌株为实验室分离保藏的小孢拟盘多毛孢

PM-1 菌株;供试杂草为马唐(*Digitaria sanguinalis*)、反枝苋(*Amaranthus retroflexus*)、狗尾草(*Setaria viridis*)、虎尾草(*Chloris virgata*)和黄顶菊(*Flaveria bidentis*)。

供试培养基: PDA (马铃薯 200 g,葡萄糖或蔗糖 20 g,琼脂 20 g,水 1 000 mL)培养基、PD (马铃薯 200 g,葡萄糖或蔗糖 20 g,水 1 000 mL)培养基<sup>[13]</sup>。

### 1.2 主要仪器和试剂

**1.2.1 仪器:** 高速逆流色谱仪,上海同田生物技术有限公司 TBE-300A;高效液相色谱仪,美国 Waters 公司(Waters, Milford, MA, USA)生产,配有 600E 泵和二极阵列检测器(DAD);旋转蒸发器,上海洪旋实验仪器有限公司 RE-200;色谱柱,天津博纳艾杰尔科技有限公司 C18 柱(150 mm×4.6 mm I.D., 5.0 μm)。

**1.2.2 试剂:** 甲醇分析醇、甲醇色谱醇、乙腈色谱醇、乙酸乙酯、正己烷、乙醇、琼脂粉、葡萄糖购于保定试剂公司。

### 1.3 方 法

**1.3.1 小孢拟盘多毛孢粗提物的制备:** 在 250 mL 三角瓶中装入 150 mL PD 培养基,高压灭菌备用,将生长良好的菌株定量接入,25 °C 静置培养 10 d。在无菌条件下用 4 层纱布滤去菌丝,滤液用等体积乙酸乙酯萃取 3 次,所得到的有机相 48 °C 旋转蒸发,浓缩至干,甲醇定容。得到的粗毒素于-4 °C 保存备用。

**1.3.2 小孢拟盘多毛孢粗提物除草活性测定:** 采用茎叶处理法。将粗提物晾于培养皿( $d=90$  mm)内,用 0.5% 的三苯乙基酚聚氧乙烯聚氧丙烯醚 EPE 型溶液 1 mL 均匀溶解。将马唐、反枝苋、狗尾草、黄顶菊等待测杂草种植在边长 8 cm、高 9 cm 的塑料盆中,加水后放入 30 °C 培养箱中,发芽后放置在室外 25 °C 自然生长。待杂草长到 3 叶期时,将粗提物均匀喷涂在杂草上,清水和

农药助剂处理作为对照, 每个处理 3 个平行实验, 3 d 后观察结果。

**1.3.3 高速逆流色谱两相溶剂系统的选择:** 溶剂体系的选择很大程度上取决于被分离物质的溶解性。实验利用 Oka 方法<sup>[14-15]</sup>分别对正己烷:乙酸乙酯:甲醇:水不同体积比的溶剂体系进行计算, 通过该方法对马唐进行生理生化检测, 找到在固定相和流动相中溶解比较均衡的溶剂体系, 且  $K$  的范围在 1-2 之间, 作为最合适的 HSCCC 溶剂体系。

除草活性检测: 称取粗提物约 50 mg, 分别加入达到平衡的上下相溶剂 8 mL, 振荡离心使其充分溶解并置于带有双层滤纸的培养皿 ( $d=90$  mm) 中, 待滤纸风干后, 加入灭菌水和经催芽的马唐种子 10 粒, 30 °C、12 h 光照/12 h 黑暗条件下培养, 并用灭菌水的处理作对照, 每个处理平行重复 3 次, 72 h 后测量种子根茎生长大小。根据种子根茎的抑制率选择最佳的 HSCCC 溶剂体系。

$$\text{根(茎)抑制率(\%)} = \frac{\text{对照根(茎)长} - \text{处理根(茎)长}}{\text{对照根(茎)长}} \times 100$$

**1.3.4 高速逆流色谱两相溶剂体系及溶液的制备:** 在分液漏斗中配制正己烷:乙酸乙酯:甲醇:水

的两相溶剂体系, 充分摇匀后静置 6 h, 分开上、下相, 上相为固定相, 下相为流动相, 使用前分别超生脱气 15 min。称取 200 mg 小孢拟盘多毛孢 PM-1 菌株的粗提物加入等体积的上、下相混合溶剂共 20 mL, 并振荡使其完全溶解后备 HSCCC 进样。

## 2 结果与分析

### 2.1 小孢拟盘多毛孢粗提物除草活性测定

用菌株的粗提物对杂草进行除草活性检测, 结果表明, 该菌株粗提物对杂草均有较强的致死性, 其中对马唐的致死率可达 90% 以上, 对反枝苋可达 80% 以上, 对狗尾草、虎尾草可达 75% 以上, 对黄顶菊可达 65% 以上(表 1)。

经观察, 该菌株的粗提物具有较强的除草活性, 对接触到粗提物的部位效果明显(图 1), 在使用时, 可使用喷雾处理法, 处理浓度为甲醇稀释粗提物至 600 mg/L。

### 2.2 利用 Oka 法<sup>[14-15]</sup>选择合适的两相溶剂体系

在高速逆流色谱中, 溶剂体系的选择至关重要, 合适的溶剂体系是其分离的关键。根据色谱理论, 利用 HSCCC 进行样品分离的必要条件是样品在互不相溶的两相中具有合适的分配系数, 一般情况下分配系数在 0.5-2.0 之间。

表 1 小孢拟盘多毛孢粗提物除草活性测定

Table 1 Inhibition rate of the *Pestalotiopsis microspora* crude extract on weeds

杂草 Weed	处理萎蔫率 Wilting percent of stem and leaf (%)	对照萎蔫率 CK wilting percent of stem and leaf (%)
马唐 <i>Digitaria sanguinalis</i>	++++	-
虎尾草 <i>Chloris virgata</i>	+++	-
狗尾草 <i>Setaria viridis</i>	+++	-
反枝苋 <i>Amaranthus retroflexus</i>	+++	-
黄顶菊 <i>Flaveria bidentis</i>	++	-

注: CK: 表面活性剂 0.6% 1601 (三苯乙烯基酚聚氧乙烯聚氧丙烯醚 EPE 型)对照; +: 萎蔫率 30%-55%; ++: 萎蔫率 55%-70%; +++: 萎蔫率 70%-85%; ++++: 萎蔫率 85%-95%; -: 萎蔫率 30% 以下。

Note: CK: The control of surfactant 0.6% 1601 (tiphenyl vinyl phenol polyoxyethylene polyoxypropylene ether EPE); +: The wilting rate of 30% to 55%; ++: The wilting rate of 55% to 70%; +++: The wilting rate of 70% to 80%; ++++: The wilting rate of 85% to 95%; -: The wilting rate of 30% or less.

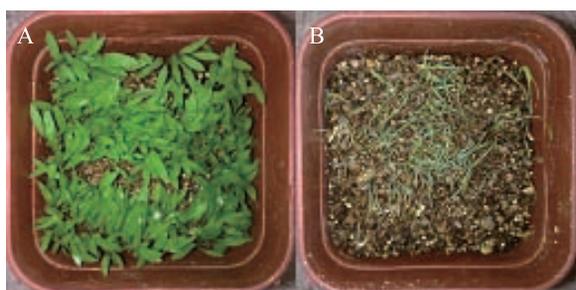


图 1 粗提物对马唐的除草活性

Fig. 1 The herbicidal activity of crude extracts on *Digitaria sanguinalis*

注: A: 水处理; B: 粗提物处理。

Note: A: Treatment with water; B: Treatment with crude extract.

利用 Oka 方法<sup>[14-15]</sup>提供的体积分数(表 2), 对经催芽的马唐进行种子萌发试验。对 10 种 Oka 溶剂体系分离出的两相溶剂体系分别加入 6.25 g/L 的菌株粗提物后, 10 种溶剂体系所得到的上相对马唐根和茎的抑制率呈上升趋势; 所得到的下相对马唐根和茎的抑制率呈下降趋势(图 2)。在组分 7 正己烷:乙酸乙酯:甲醇:水为 4:5:4:5 (V/V/V/V)的两相溶剂体系条件下, 菌株粗提物对根茎的抑制率最接近, 表明粗提物在该条件下溶解性比较平均。综合考虑, 组分 7 为最合适的 HSCCC 两相溶剂体系。

表 2 Oka 溶剂体系  
Table 2 The solvent system of Oka

序号 Number	正己烷 N-hexane	乙酸乙酯 Ethyl acetate	甲醇 Methanol	水 Water	上相/下相 Upper phase/Lower phase
1	10*	0	5	5	1.05
2	9	1	5	5	0.96
3	8	2	5	5	0.88
4	7	3	5	5	0.82
5	6	4	5	5	0.77
6	5	5	5	5	0.74
7	4	5	4	5	0.80
8	3	5	3	5	0.86
9	2	5	2	5	0.93
10	1	5	1	5	0.92

注: \*: 所代表的数字为该溶剂所占的体积分数。

Note: \*: Represent the volume fraction of the solvent.

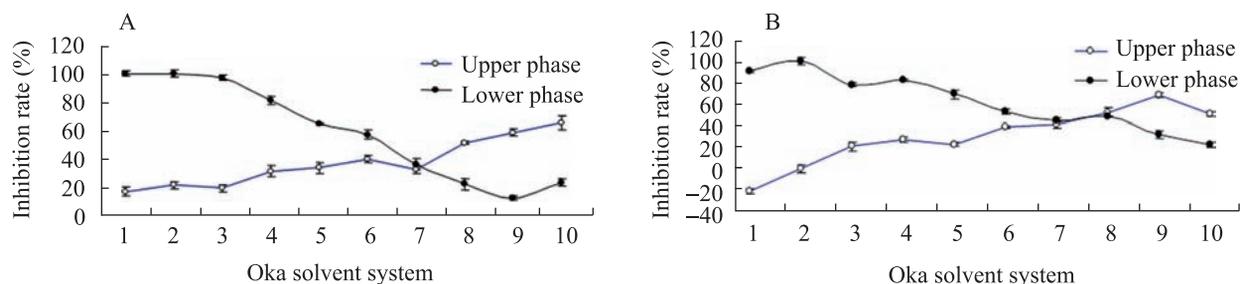


图 2 Oka 溶剂体系对小孢拟盘多毛孢粗提物对马唐萌发的抑制率影响

Fig. 2 Effect of the Oka solvent system on the inhibition rate of *Pestalotiopsis microspora* crude extracts

注: A: 根抑制率; B: 茎抑制率。

Note: A: Inhibition rate of root; B: Inhibition rate of stem.

### 2.3 高速逆流色谱分离结果

以 20 mL/min 的流速将上相泵入并充满分离螺旋管, 开启恒温循环装置使温度保持在 25 °C, 启动检测器和高速逆流主机, 选择正向旋转(FWD)并将转速调至 900 r/min, 以 2 mL/min 的流速泵入流动相。当流动相从管柱出口流出且基线稳定后, 将样品溶液由进样圈注入。高速逆流色谱图见图 3, I、II、III、IV 为分离出的 4 份馏分。

### 2.4 HSCCC 馏分的活性检测

根据图 3 进行手动分段收集, 得到馏分 I、II、III、IV, 将各馏分进行减压浓缩干燥, 得到质量分别为 35、12、17、8 mg, 分别用甲醇稀释至浓度为 600 mg/L 时对马唐进行抑制作用试验,

结果如图 4 所示。通过观察分析, 馏分 II 具有较强的除草活性, 其效果明显, 其他馏分除草效果不明显或无除草效果。

### 2.5 HSCCC 馏分 II 的高效液相色谱分离及活性检测

HSCCC 分离出的馏分 II 具有较强的除草活性。收集馏分 II 对其进行高效液相色谱分析。使用 C18 色谱柱(150 mm×4.6 mm I.D., 5.0 μm)和乙腈:水=75:25 (V/V)流动相以 1.0 mL/min 流速进行等度洗脱, 检测波长为 254 nm。将馏分 II 用甲醇稀释 100 倍后, 10 μL 进样。结果表明, 在该条件下 HSCCC 馏分 II 通过高效液相色谱分析得到 1 个组分, 即馏分 A, 且该组分稳定存在, 其保留时间为 7.954 min (图 5)。

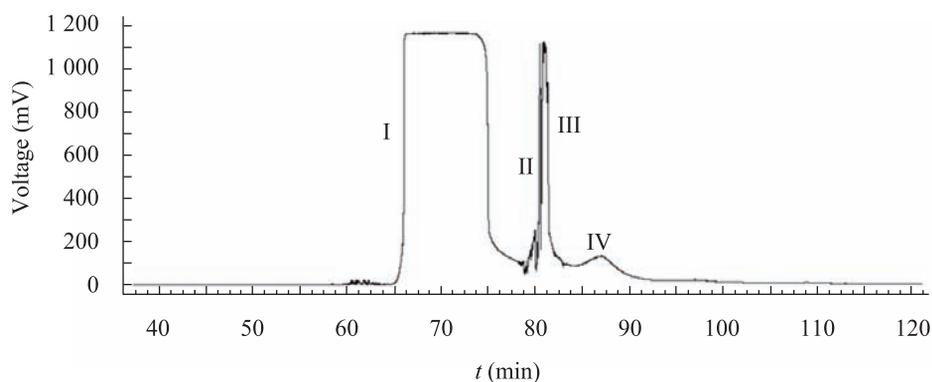


图 3 HSCCC 分离纯化小孢拟盘多毛孢色谱图

Fig. 3 HSCCC chromatogram for the separation and purification of *Pestalotiopsis microspora*

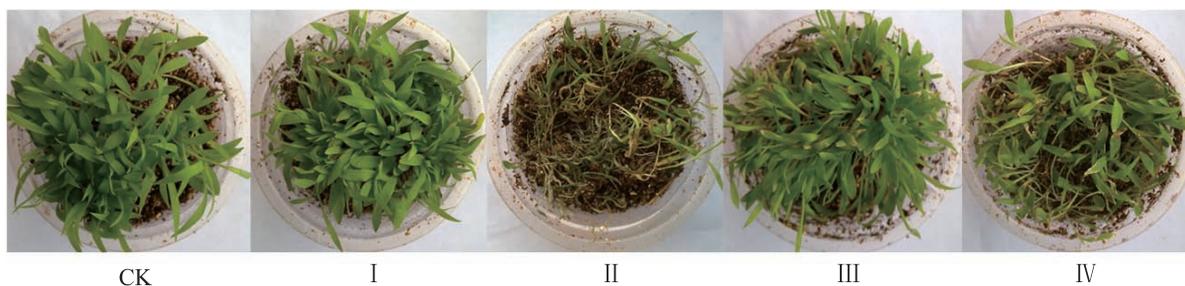


图 4 HSCCC 的 4 种馏分在浓度 600 mg/L 时对马唐的除草活性

Fig. 4 Inhibition effect of the HSCCC four fractions on the growth of *Digitaria sanguinalis* at the concentration of 600 mg/L

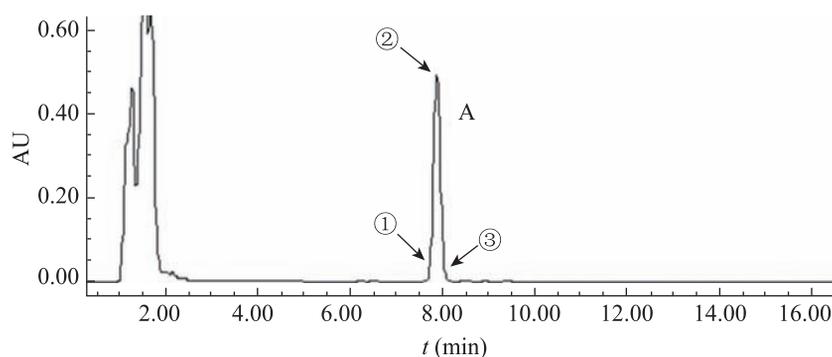


图5 流动相为乙腈:水=75:25 (V/V)条件下 HSCCC 馏分 II 的 HPLC 谱图

Fig. 5 HPLC chromatogram of the HSCCC fraction II with acetonitrile:water=75:25 (V/V) as mobile phase

为了进一步鉴别馏分 A 的纯度, 采用二极管阵列器在 200 nm–400 nm 波长范围内对馏分 A 高效液相色谱峰的不同部位进行在线光谱扫描(①、②、③分别对应 HPLC 馏分 A 进行紫外吸收光谱扫描的位置)。结果(图 6)显示, 馏分 A 在 225 nm 和 275 nm 处有较强的吸收。对高效液相色谱-二极管阵列图进行分析, 结果表明, 馏分 A 色谱峰在①、②、③处的紫外吸收特征相同, 由此可确定馏分 A 为单一组分的纯物质。对其进行活性检测, 该馏分能够抑制杂草种子的萌发, 抑制率可达 80% (图 7)。

### 3 结论与讨论

利用微生物源物质来开发新型除草剂具有许多潜在优势, 在低浓度时微生物代谢产物比合成的化合物具有生物活性的可能性大; 微生物代谢产物在环境中的半衰期比合成农药短得多, 易迅速降解或解毒<sup>[16]</sup>。

鉴于高速逆流色谱技术的成熟, 本试验用乙酸乙酯对小孢拟盘多毛孢 PM-1 菌株进行萃取后得到该菌株的粗提物, 发现粗提物除草范围广, 对马唐、狗尾草、黄顶菊等杂草均有抑制作用, 其

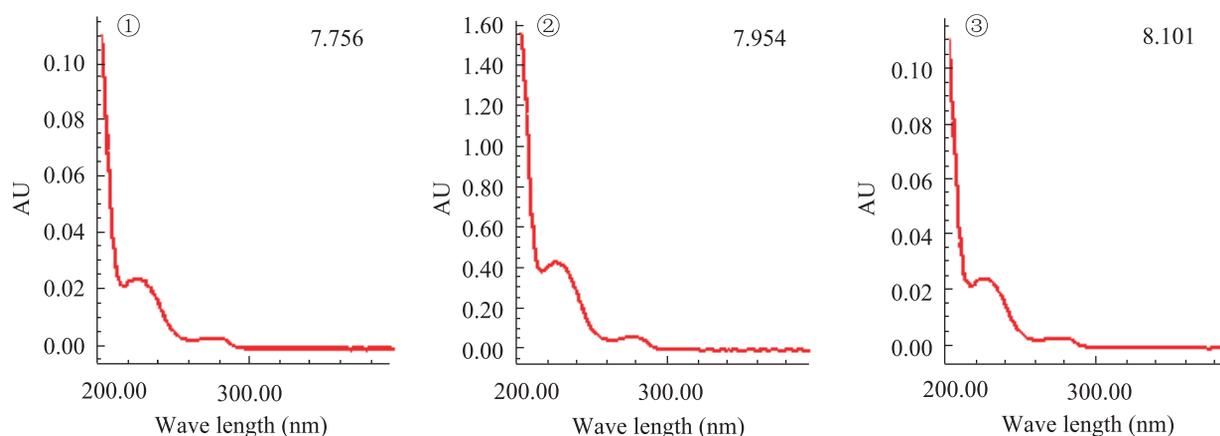


图6 馏分 A 的高效液相色谱-二极管阵列紫外吸收光谱图

Fig. 6 The UV absorption spectra of the fraction A by HPLC-diode array detection

注: ①、②、③分别对应图 5 中的相应位置。

Note: ①、②、③ correspond to the locations in figure 5.

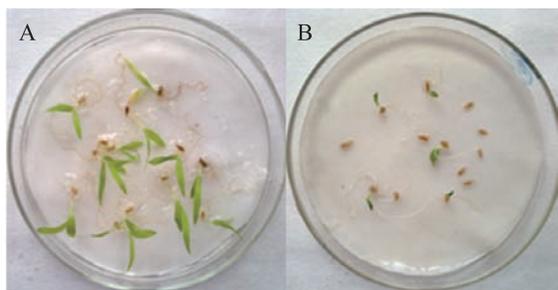


图7 馏分 A 对马唐种子萌发的影响

Fig. 7 Effect of fraction A on *Digitaria sanguinalis* seed germination

注: A: 水处理; B: 馏分 A 处理。

Note: A: Treatment with water; B: Treatment with fraction A.

中对马唐的抑制效果最为明显, 因此本试验采用马唐为除草活性检测对象。

在利用高速逆流色谱分离天然产物的过程中, 两相溶剂的选择至关重要。稳定的两相溶剂体系是否适合于目标物质的分离, 通常要看物质在溶剂体系中的分配系数是否在一个合适的范围内。对高速逆流色谱, 最合适的  $K$  值范围是 0.5–2.0, 如用氯仿: 甲醇: 0.2 mol/L 盐酸(4:1.5:20, V/V/V)为两相溶剂分离黄连中的巴马亭、小檗碱、表小檗碱和黄连碱<sup>[17]</sup>; 用正己烷: 乙酸乙酯: 甲醇: 乙醇: 水(5:7:5:1:6.5, V/V/V/V)分离紫杉醇<sup>[18]</sup>; 用乙酸乙酯: 甲醇: 乙酸: 水(4:1:0.25:5, V/V/V/V)为溶剂系统, 从黄芪粗提物中分离出 2 种异黄酮, 纯度均大于 95%<sup>[19]</sup>; 利用正己烷: 乙酸乙酯: 正丁醇: 甲醇: 乙酸: 水(1:2:1:1:5:1, V/V/V/V)从大豆中分离出 4 种异黄酮, 纯度均大于 90%<sup>[20]</sup>; 用正己烷: 乙酸乙酯: 甲醇: 水(3:6:5:5, V/V/V/V)分离得到纯度分别为 98.2%、92.3%、97.4%的螺旋霉素 I、II、III<sup>[15]</sup>; 采用正丁醇: 乙酸乙酯: 0.005 mol/L 三氟乙酸(1.25:3.75:5, V/V/V)的溶剂体系, 从 *Lysobacter* 发酵液分离的 WAP-8294A 混合物中分离得到了对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌有较强抗性的 WAP-8294 A<sub>2</sub><sup>[21]</sup>等。本文利用 Oka 方法<sup>[14–15]</sup>, 成功找出了适合小孢拟盘多毛孢 PM-1 菌株的最适

两相溶剂体系, 即正己烷: 乙酸乙酯: 甲醇: 水为 4:5:4:5 (V/V/V/V)。

用高速逆流色谱法对小孢拟盘多毛孢代谢产物进行分离, 经过纯化后所得馏分的除草活性和粗提物相比并没有降低; 通过高效液相色谱-二极管阵列分析, 发现小孢拟盘多毛孢菌株分离可得到较稳定且具有除草活性的纯物质, 即馏分 A, 为其后续化学结构和分子式的鉴定奠定了基础。

本研究发现, 小孢拟盘多毛孢 PM-1 菌株的产毒能力会随着时间的延长而发生退化, 因此应不断地对菌株进行复壮以达到较高的除草效果。利用该菌株分离得到的馏分 A 除草活性很强, 但鉴于成本较高, 目前不适用于大规模生产, 因此, 在今后的研究中需要对该菌株进行进一步改良, 为微生物源除草剂的开发和实际应用奠定基础。

## 参 考 文 献

- [1] Li YQ, Sun ZL, Zhuang XF, et al. Research progress on microbial herbicides[J]. Crop Protection, 2003, 22(2): 247–252.
- [2] 刘志俊, 谢德明, 刘志波. 国外农药发展现状及未来展望[J]. 农药科学与管理, 2000, 21(2): 33–37.
- [3] Boyetchko SM. Principles of biological weed control with microorganism[J]. Hort Science, 1997, 32(2): 201–205.
- [4] Bayer E, Gugel KH, Hägele K, et al. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 98. Mitteilung. Phosphinothricin und Phosphinothricyl-alanyl-alanin[J]. Helvetica Chimica Acta, 1972, 55(1): 224–239.
- [5] 李海涛, 王金信, 杨合同, 等. 微生物除草剂的研究现状和应用前景[J]. 山东科学, 2005, 18(1): 30–34.
- [6] 袁黎明, 傅若农, 张天佑. 高速逆流色谱在植物有效成分分离中的应用[J]. 药物分析杂志, 1998, 18(1): 60–64.

- [7] Du Q, Jerz G, Winterhalter P. Separation of andrographolide and neoandrographolide from the leaves of *Andrographis paniculata* using high-speed counter-current chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2003, 984(1): 147–151.
- [8] Gao X, Tian Y, Zhang T, et al. Separation and purification of 10-deacetybaccatin III by high-speed counter-current chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 1998, 813(2): 397–401.
- [9] Vanhaelen-Fastre R, Diallo B, Jaziri M, et al. High-speed counter-current chromatography separation of taxol and related diterpenoids from *Taxus baccata*[J]. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 1992, 15(4): 697–706.
- [10] Tian GL, Zhang TY, Yang FQ, et al. Separation of gallic acid from *Cornus officinalis* Seib. et Zucc by high-speed counter-current chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2000, 886(1/2): 309–312.
- [11] Li HB, Lai JP, Jiang Y, et al. Preparative isolation and purification of salvianolic acid B from the Chinese medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* by high-speed counter-current chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2002, 943(2): 235–239.
- [12] 张剑, 董晔欣, 张金林, 等. 一株具有高除草活性的真菌菌株[J]. *菌物学报*, 2008, 27(5): 645–651.
- [13] 张利辉, 张剑, 董金皋. 小孢拟盘多毛孢 PM-1 菌株的液体发酵及除草活性物质的分离[J]. *植物保护学报*, 2011, 38(4): 369–373.
- [14] Oka F, Oka H, Ito Y. Systematic search for suitable two-phase solvent systems for high-speed counter-current chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 1991, 538(1): 99.
- [15] Oka H, Harada K, Suzuki M, et al. Separation of spiramycin components using high-speed counter-current chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2000, 903(1/2): 93–98.
- [16] Zhang JL, Zhang LH, Liu YC, et al. The herbicidal activity of mutant isolates from *Botrytis cinerea*[J]. *Agricultural Sciences in China*, 2006, 5(8): 622–628.
- [17] Yang F, Zhang T, Zhang R, et al. Application of analytical and preparative high-speed counter-current chromatography for separation of alkaloids from *Coptis chinensis* Franch[J]. *Journal of Chromatography A*, 1998, 829(1/2): 137–141.
- [18] Chiou FY, Kan P, Chu IM, et al. Separation of taxol and cephalomannine by countercurrent chromatography[J]. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 1997, 20(1): 57–61.
- [19] Ma XF, Tu PF, Chen YJ, et al. Preparative isolation and purification of two isoflavones from *Astragalus membranaceus* Bge. var. *Mongholicus* (Bge) Hisao by highspeed counter-current chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2003, 992(1/2): 193–197.
- [20] Du QZ, Li ZH, Ito Y. Preparative separation of isoflavone components in soybeans using high-speed counter-current chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2001, 923(1/2): 271–274.
- [21] Harada KI, Suzuki M, Kato A, et al. Separation of WAP-8294A components, a novel anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* antibiotic, using high-speed counter-current chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2001, 932(1): 75–81.