

甘草化学成分分离、细胞培养和分析研究进展

陈超^{1,2}, 李宁^{1,2}, 倪慧³, 孟大利^{1,2}, 张娟³, 贾晓光^{3*}

1. 沈阳药科大学 中药学院, 辽宁 沈阳 110016

2. 沈阳药科大学 基于靶点的药物设计与研究教育部重点实验室, 辽宁 沈阳 110016

3. 新疆维吾尔自治区中药民族药研究所, 新疆 乌鲁木齐 830002

摘要: 甘草因疗效显著、药理作用明确, 一直以来都是研究的热点。近年来有 20 个黄酮类化合物和 6 个三萜类化合物被陆续分离出来, 其中包括 16 个新的黄酮类化合物和 3 个新的三萜类化合物。细胞培养是获得甘草有效成分的有效途径之一, 目前应用细胞培养技术主要生产甘草黄酮类成分。综述了近年来从甘草中提取的黄酮类、三萜类化合物, 细胞培养方法对甘草黄酮类成分的影响, 以及毛细管电色谱法、HPLC 法、免疫测定法等检测甘草化学成分方法的研究进展。

关键词: 甘草; 黄酮类; 三萜类; 细胞培养; 分析

中图分类号: R282.71; R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2011)03-0188-07

Advances in studies on chemical constituents of isolation, cell culture, and analysis of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*

CHEN Chao^{1,2}, LI Ning^{1,2}, NI Hui³, MENG Da-li^{1,2}, ZHANG Juan³, JIA Xiao-guang³

1. College of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

2. Key Laboratory of Structure-Based Drug Design & Discovery, Ministry of Education, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

3. XinJiang Institute of Chinese Materia Medica and Ethnodrug, Urumqi 830002, China

Abstract: *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* has been the research focus because of its conspicuous healing efficacy and pharmacological activities. Recently, 20 flavonoids and 6 triterpenes compounds, including 16 new flavonoids and 3 new triterpenes have been isolated from this plant. It was also found that cell culture provided an effective way to acquire effective components of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*. The cell culture technique is mainly used for product *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* flavonoids. In this paper, the recent progresses was reported on the chemical components of the plant, the cell culture method for the bioactive flavonoids ingredients and determination of its effective constituents using capillary electrochromatography, HPLC, and immunoassays detection as well.

Key words: *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; flavonoids; triterpenes; cell culture; analysis

甘草又名甜草、蜜草、美草等, 是我国最常用中药之一, 药用部位为豆科 (Leguminosae) 植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *G. inflata* Bat. 或光果甘草 *G. glabra* L. 的干燥根及根状茎^[1-2]。甘草化学成分复杂, 药理作用显著, 其有效成分多年来一直是国内外科研工作者研究的重点。正因为甘草显著的药理作用和广泛用途, 临床常协同使用^[3], 导致甘草的需求量一直以来只增不减, 因此甘草资源短缺问题日渐突出^[4]。研究人员发现甘草细胞培养能产生大量的黄酮类化合物等有效成分, 因此细

胞培养是解决甘草资源短缺的有效方法之一, 致使甘草细胞培养也逐渐成为研究的热点。由于产地不同, 甘草所含化学成分的种数与含量有较大差异, 导致其药效发生变化。为确保甘草的临床用药安全, 对其有效成分的测定显得尤为重要。随着分析测试技术的飞速发展, 一些更为先进的检测和分析仪器相继应用于中药研究领域, 甘草中有效成分的测定方法得到拓展, 检测水平也得到很大提高。综述了近几年来甘草化学成分分离、细胞培养方法及其影响因素和化学成分测定方法的研究进展。

收稿日期: 2010-11-06

基金项目: “十一·五”国家科技重大专项资助项目 (2009ZX09501-011); 新疆维吾尔自治区科学技术厅资助项目 (200915122)

作者简介: 陈超 (1986—), 男, 湖南岳阳人, 硕士研究生, 研究方向为中药化学成分分离及其质量控制。E-mail: chengchao@163.com

*通讯作者 贾晓光 (1955—), 男, 辽宁营口人, 硕士, 教授, 主要从事新疆民族药物的研究与开发工作。

Tel: (0991) 2633141 E-mail: xiaoguangjia@sina.vip.com

1 化学成分

甘草中化学成分十分复杂,除三萜类和黄酮类化合物外,还分离得到香豆素、多糖、氨基酸、生物雌激素和有机酸等。但其有效成分主要为黄酮类^[5]和三萜类化合物。近年来又相继从甘草中分离得到20个黄酮类化合物和6个三萜类化合物,其中包括16个新的黄酮类化合物和3个新的三萜类化合物。

1.1 黄酮类

甘草中黄酮类化合物主要分为黄酮类、黄酮醇类、异黄酮类、查耳酮类、双氢黄酮类、双氢查耳酮类等。邢国秀等^[6]总结了从甘草中分离得到的150多个黄酮类化合物,并给出了相应的名称和结构。随后又有人从甘草中首次分离得到20个黄酮类化合物,其中包括异黄酮类 licoagroside F (1)、licoagrosiflavone (2)、7,8-dihydroxy-4'-methoxy-6-prenylisoflavanone (3)^[7-9],二氢黄酮类 8,5'-dihydroxy-3'-gluflavanone (4)、5,7,3',4'-tetrahydroxy-7- α -rhaflavone (5)、(2*R*,3*R*)-3,4',7-trihydroxy-3'-prenylflavanone (6)^[9-10],二氢异黄酮类 dihydrolicoisoflavone A (7)、2',3-dihydroxy-4'-methoxy-3'',3''-dimethylpyrano[2'',3'':7,8]isoflavanone (8)^[7,9],紫檀素类 gancaonols C (9)、licoagroside D (10)、

licoagroside C (11)^[7,11],黄烷类 6,8-diprenylorobol (12)、gancaonol C (13)、5'-formyl glabridin (14)、8-hydroxymethyl-8-methyl-3,4-dihydro-2*H*,8*H*-pyrano[2,3-*f*]-chromon-3-ol (15)^[7,9,12],查耳酮类化合物 dihydrolicoisoflavone A (16)、3,3',4,4'-tetrahydroxy-2'-methoxy-5-prenylchalcone (17)、2,3',4,4'-tetrahydroxy-3,5'-diprenylchalcone (18)、2,3',4,4', α -pentahydroxy-3,5'-diprenyl-dihydrochalcone (19)、2,3',4,4', α -pentahydroxy-3-prenyl-dihydrochalcone (20)^[9,11],其中化合物1、7、10、11为首次从甘草中分离得到,其余为新化合物。新化合物结构见图1。

1.2 三萜类

甘草属所有植物中均存在五环三萜类化合物。谢彦等^[13]归纳总结了45个三萜皂苷元和16个三萜皂苷,有7种母核结构类型。从甘草中还首次分离得到白桦脂酸(21)、豆甾-3,6-二酮(22)、胡萝卜苷(23)^[14],3个新的三萜类化合物 22-acetoxylglycyrrhizin (24)与 3-*O*-[β -*D*-(6-methyl)glucuronopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-*D*-glucuronopyranosyl]-24-hydroxyglabrolide (25)^[15], 22 β -acetoxyl-glycyrrhaldehyde (26)^[16], 2个新的天然产物(27和28)^[17]。化合物24~28的结构见图2。

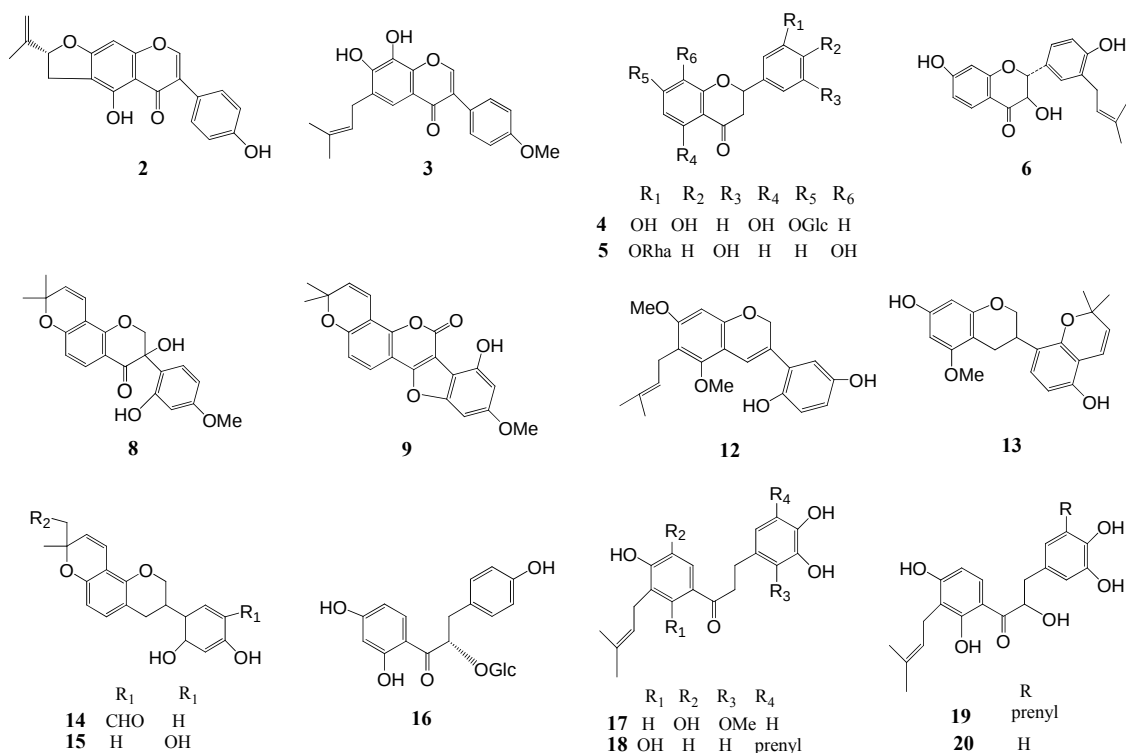


图1 甘草中新黄酮类化合物的结构

Fig. 1 Structures of new flavonoid compounds from *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*

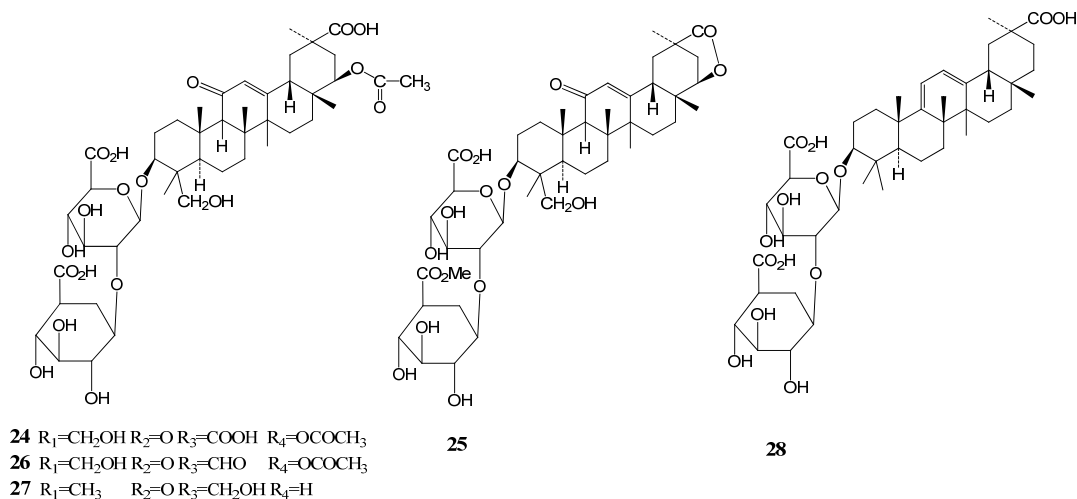


图2 化合物24~28的结构

Fig. 2 Structures of compounds 24—28

2 细胞培养

近年来由于甘草广泛用于医疗和食品工业且需求量大,导致甘草资源严重不足。仅依靠从野生药用植物中提取有用的次级代谢产物势必大量消耗野生资源,甚至导致物种灭绝、生态环境失衡。采用人工栽培方法,植物生长周期长,且部分药用成分的量逐渐降低。采用组织培养技术可以控制植物生长环境,加速繁殖速度,并可从细胞培养物中直接提取有效成分,因此通过大规模细胞培养的方式来生产有价值的活性物质,是解决甘草资源短缺的最有效的方法之一。目前应用细胞培养技术主要生产甘草黄酮类成分,下面总结了甘草细胞培养中影响黄酮类生成的一些主要因素。

2.1 添加剂的影响

郑辉^[18]发现通过向培养基中添加一定浓度的二甲基亚砜、甘露醇、聚山梨酯20和条件培养基,可以提高甘草黄酮类化合物的产量,在培养基中加入茉莉酸甲酯和二氢茉莉酮酸甲酯,使黄酮类的产量分别达108.5、109.2 mg/L,分别为对照组的1.43、1.45倍。还发现复合诱导子和前体均能提高甘草黄酮类的产量,苯丙氨酸+茉莉酸甲酯组合刺激最为有效,甘草黄酮类达125 mg/L。杨世海等^[19]发现在甘草愈伤组织培养过程中添加酵母提取物、水解酪蛋白、真菌诱导子、茉莉酸及稀土元素等,是提高黄酮类化合物产量的有效手段之一。Kovalenko^[20]研究了甘草在MS、B5、N6、NN、6,7V、WP基本培养基中的生长情况。结果显示,B5培养基最利于生物量的积累,异甘草素的量最高;WP培养基最利于甘草素的合成,其次是6,7V培养基;N6培养

基效果最差;当培养基中添加苯乙酸0.1 mg/L时,甘草素的量最高,达57.24 $\mu\text{g/g}$,添加1.0 mg/L时,异甘草素的量最高,达36.45 $\mu\text{g/g}$ 。杨英等^[21]发现在胀果甘草细胞悬浮体系中加入合适浓度的苯丙氨酸、酪氨酸、肉桂酸和乙酸钠4种前体物,不但对细胞的生长无明显抑制作用,而且均能促进细胞内黄酮类的生物合成,但高浓度的肉桂酸对细胞生长有一定的抑制作用。研究还显示,甘草细胞悬浮培养体系中添加水杨酸10 mg/L,可促进甘草细胞的生长,提高总黄酮产量^[22]。鲁守平等^[23]发现在培养基中添加吲哚丁酸0.10 mg/L,可诱导乌拉尔甘草离体根尖伸长并产生较多的侧根;B5大量元素+B5微量元素和1/3MS大量元素+1/3MS微量元素适宜乌拉尔甘草离体根系的生长,培养基中附加维生素B10.50 mg/L,可显著增加乌拉尔甘草离体根系的鲜质量,表明液体悬浮培养适于乌拉尔甘草离体根尖的培养。在悬浮培养条件下甘草离体根中甘草总黄酮物质的质量分数为0.75%,但没有检测到甘草酸。

2.2 培养条件的影响

培养条件在很大程度上影响甘草中黄酮类化合物的生成量。生物体的繁殖生长和黄酮类化合物的产生在整个周期中表现出“S”型的曲线,最合适的培养时间为21 d^[24]。根据生物体和黄酮类化合物的产量,甘草细胞培养最合理的接种物、蔗糖和氮源等(质量)浓度分别为50 g/L(湿质量)、50 g/L、120 mmol/L^[25]。杨世海等^[26]发现将果糖作为碳源,最有利于甘草愈伤组织生物量积累和黄酮类化合物的生物合成,硝态氮有利于甘草愈伤组织生长和黄酮类化合物的积累。当MS培养基中其他成分不变,

NO_3^- 与 NH_4^+ 浓度之比为50:10、氮源的总量为80 mmol/L时,可获得最大的细胞生长量15.02 g/L;在以铵盐为唯一氮源、总量为40 mmol/L的条件下,细胞内黄酮类成分最高达16.47 mg/L。在此基础上进行两步悬浮培养,可使培养基中甘草黄酮类产量达到212.00 mg/L,为对照组的3.64倍。另一项研究表明,甘草愈伤组织的生长及黄酮类化合物的生物合成的适宜温度为25℃,培养温度低于15℃或高于30℃时愈伤组织生长及黄酮类化合物的合成均受到抑制;光照对愈伤组织的生长影响不大,但能促进黄酮类化合物的生物合成^[27]。Yang等^[28]还发现,适当的水分缺失能活化处于干旱压力下生物体的抗氧化防御酶系统,使该系统仍保持稳定性,使黄酮类化合物的生物合成量增加。

2.3 其他影响因素

王磊^[29]发现对甘草种子预处理,可提高发芽率,缩短萌发时间,用浓硫酸处理40 min后,甘草种子的萌发率最高。激素联合使用可以改善愈伤组织的质量,转基因技术和诱导技术能增加黄酮类化合物的产量^[30]。

3 有效成分的测定

甘草有效成分的分析与测定事关甘草临床用药的安全性和有效性,是一项复杂而艰巨的工作。我国甘草种类繁多,且因产地不同,有效成分种类和含量存在很大差异。近年来,为缓解甘草用量的日益加大、资源不足等矛盾,许多人工栽培甘草和非正品甘草相继出现在市场,因此为确保甘草药材质量和临床疗效,对甘草有效成分的测定显得非常重要。测定甘草中有效成分的方法很多,主要用于测定黄酮类和三萜类化合物。近年来,一些更为先进的检测和分析仪器相继应用到中药分析领域,甘草中有效成分的测定方法得到了很大提高和拓展。

3.1 薄层色谱-紫外分光光度法

该方法是将供试品和少量对照品,于同一薄层色谱板上展开来制备供试品中某一物质,该物质经处理后用紫外分光光度法来测定吸光度值,计算出供试品中该物质的量,从而达到有效控制药物内在质量的目的。该方法快速、简便、准确,重现性好,但要求在薄层板上要有好的分离度、能够制备出纯度高的待测物质。曹志红等^[31]采用薄层色谱-紫外分光光度法测定四逆汤中甘草次酸,将供试品和对照品水平条状点于同一硅胶GF₂₅₄薄层板上,以石油醚-甲苯-醋酸乙酯-冰醋酸(4:8:3:0.2)

为展开剂上行展开,展距10 cm,取出晾干,于紫外灯下检视,刮取与对照品相应位置上相同颜色荧光带,用10 mL乙醇超声洗脱5 min,取其上清液滤过,将滤液收集于10 mL量瓶中,补乙醇至刻度;刮取薄层板上相应面积的空白硅胶,随行处理作空白对照,于248 nm波长处测吸光度值,用回归方程计算供试品中甘草次酸的含量。结果甘草次酸为0.26 mg/mL, RSD为.98%,平均回收率为97.45%,表明该方法快速、简便、准确、重现性好,可有效控制四逆汤的内在质量。

3.2 HPLC法

HPLC法在中药的分析和制备方面有许多优势,如灵敏度高、重现性好、良好的分辨率和线性、可同时分析多种成分、易于自动化等。HPLC法还是迄今为止对甘草中化学成分进行定量和定性分析的一种主要方法。由于采用的检测器不同,使得该方法可用于测定甘草中的多种成分。叶静等^[32]采用HPLC-ELSD(蒸发光散射检测器)法测定甘草中甘草皂苷G₂、甘草酸铵、乌拉尔甘草皂苷B3种甘草皂苷的量,条件为Hypersil C₁₈柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm),以甲醇-0.2 mol/L乙酸铵水溶液-冰醋酸(65:34:1)为流动相,体积流量1.0 mL/min, ELSD漂移管温度110℃,载气(N₂)体积流量2.8 L/min。结果甘草皂苷G₂、甘草酸铵、乌拉尔甘草皂苷B的线性范围分别为6.02~120.4、13.22~264.4、6.32~126.4 μg/mL(*r*值各为0.999 6、0.999 7、0.999 8),平均回收率(*n*=6)分别为100.6%、100.8%、99.87%,表明本法简便、重现性好,可用于甘草中上述3种甘草皂苷的测定。赵晓莉等^[33]用HPLC法测定络通胶囊中绿原酸、阿魏酸、甘草苷、甘草素、肉桂酸和哈巴俄苷,采用YMC-C₁₈柱,以乙腈-0.5%磷酸水溶液为流动相,梯度洗脱,双波长检测($\lambda_1=76$ nm, $\lambda_2=327$ nm),体积流量1.0 mL/min,柱温30℃。结果6个成分均能达到基线分离,各成分的平均回收率在94.1%~98.8%,表明本检测方法简便、准确、重现性好,可作为络通胶囊质量控制的方法。

另外,用HPLC法同时测定多种成分取得了很大发展。李伟等^[34]建立了一种同时测定甘草中4个黄酮类化合物(甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素)和3个三萜类化合物(甘草酸、甘草皂苷G₂、乌拉尔甘草皂苷B)的HPLC-DAD法:采用C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-

(0.5%醋酸铵+1%冰醋酸), 梯度洗脱, 0~12 min 从 6:94→22:78, 12~25 min 从 22:78→25:75, 25~45 min 从 25:75→40:60, 45~50 min 从 40:60→6:94, 保持 5 min, 按检测波长时间序列采样。结果 7 种成分的线性关系良好, 平均加样回收率在 98%~103%, 表明该方法准确、灵敏度高, 可用于甘草药材质量的评价。陈云华等^[35]采用 HPLC 法同时测定甘草中甘草酸、甘草苷、异甘草素的量, 采用 C₁₈ 反相色谱柱, 1%磷酸水-乙腈梯度洗脱, 对不同色谱峰分别采用 248、276、360、370 nm 紫外波长检测。结果甘草酸的回归方程为 $Y=1 \times 10^6 X+16\,220$, $r^2=1$; 甘草苷的回归方程为 $Y=2 \times 10^6 X+49\,444$, $r^2=0.999\,5$; 异甘草素的回归方程为 $Y=1 \times 10^7 X+4.466\,7$, $r^2=1$; 上述 3 个成分的加样回收率分别为 98.01%、102.63%、98.18%, 表明本方法准确、稳定、可靠, 可用于甘草中甘草酸、甘草苷和异甘草素 3 种成分的同时测定。

3.3 毛细管电色谱法

该方法具有分析时间短、效率高、简单、容易清洗色谱柱和耗费溶剂少等特点。Chen 等^[36]采用加压液体提取法和配有峰抑制二级管阵列检测器的毛细管色谱法同时测定甘草中 5 种黄酮类化合物(甘草苷、异甘草苷、芒柄花苷、甘草素、异甘草素), 条件为 Hypersil C₁₈ 柱, 毛细管(25 cm×100 μm×3 μm), 流动相为 10 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 3.0)-乙腈(65:35), 在 25 kV 和 30 ℃条件下, 检测波长为 275、360、254 nm。结果在测试范围内线性良好($r^2>0.999\,3$), 检测下限和限量分别低于 2.1、8.3 μg/mL, 回收率为 98.2%~103.8%, 表明该方法可用于甘草中这 5 种化合物的定量控制。

3.4 液相色谱-质谱法

近年来, 液相色谱-质谱(LC-MS)技术已广泛应用于甘草的质量和有效性分析。因甘草三萜类和黄酮类化合物分子结构中具有羧基或酚羟基极性基团, 使得这 2 类化合物在电喷射离子化进程中容易被离子化, 形成特征离子碎片, 从而用于鉴定甘草中三萜类和黄酮类化合物。荆晶等^[37]建立 LC-MS 法测定人血浆中的甘草次酸。向人空白血浆 0.5 mL 中加入甘草次酸及内标格列喹酮, 以醋酸乙酯萃取后取上清液挥干, 再用流动相溶解, 进行 LC-MS 测定。色谱条件: 岛津 VP-ODS 色谱柱(150 mm×2.0 mm, 2 μm), 甲醇-3 mmol/L 醋酸铵水

溶液-冰醋酸(92:8:2)为流动相, 体积流量 0.2 mL/min。质谱条件: 电喷雾离子化(ESI)方式, 采用选择性离子检测(SIM), 检测离子为正离子, 甘草次酸 SIM 的离子为 $[M+H]^+$ ($m/z\,471$), 内标格列喹酮 SIM 的离子为 $[M+H]^+$ ($m/z\,528$)。结果, 本方法线性范围为 5~500 ng/mL, 最低定量限为 5 ng/mL, 准确度、精密度和稳定性均符合有关要求, 表明本法简便、灵敏度高, 可用于药动学试验中人血浆的甘草次酸的测定。

3.5 免疫测定法

免疫测定法表现出更高的特异性和更低的检测限, 灵敏度大约是 HPLC 的 500 倍, 更为重要的是可避免耗时的样品预处理过程。免疫测定法已大量用于甘草酸和甘草次酸的测定。Morinaga 等^[38]利用膜定量分析法定量分析甘草和其他传统中药中甘草皂苷。将甘草皂苷标准物、甘草提取物和传统中药点于聚醚砜薄膜上, 用流动相乙腈-水-甲酸(45:55:2)于层析槽中展开后, 干燥, 于室温下浸入含 NaIO₄(10 mg/mL)的水溶液中 1 h, 然后用水清洗, 加入含有牛血清白蛋白(BAS)的碳酸盐缓冲液(pH 9.6) 50 mmol/L, 于室温下搅拌 3 h, 用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤聚醚砜薄膜, 用含有 5%脱脂奶的 PBS 处理 2 h 以减少特异性吸附, 在聚醚砜薄膜上形成甘草皂苷-BAS 偶联体。抗甘草皂苷单克隆抗体被结合后, 标有过氧化物酶的第二抗体直接对抗第一抗体, 最后有酶的基质反应并染色, 经扫描的染色薄膜和着色点用 NIH Image 专业图像分析软件进行定量分析。结果最少能清晰检测到 0.5 μg 的甘草皂苷, 可用于含甘草皂苷在 1.0~8.0 μg 的定量分析。Xu^[39]建立了一步免疫色谱法和酶联免疫法(ELISA)定量分析甘草酸: 采用免疫亲和色谱从甘草根粗提物中精制甘草酸, 然后用 ELISA 定量。结果表明该方法快速、可靠、灵敏, 可用来进一步分离和定量甘草酸。此外其他免疫测定方法, 如侧向流动浸渍片和细胞质基因组共振法也用于甘草酸的测定。

4 结语

近年来, 随着甘草的需求量不断增加, 野生甘草大面积减少, 许多栽培品种、与甘草同属不同种的植物被作为甘草代用品得到研究和应用。对于不同来源的甘草药材进行系统的化学成分研究有利于阐明其差异和共性, 为临床安全、合理用药奠定基础。近几年陆续发现的甘草中新化合物, 主要以

黄酮类化合物为主。

甘草愈伤组织培养、细胞悬浮培养、毛状根培养可以缓解甘草野生植物资源的不足,同时避免了人工栽培周期长、有效成分含量降低等缺点,是获得甘草黄酮类化合物的切实可行的手段。用这几种培养方法既可以获得甘草总黄酮,还可根据需要通过改变培养条件或添加剂来获得所需化合物,其中以细胞培养技术获得甘草黄酮类化合物是一种极有价值方法,具有广阔前景。由于该方法近些年才逐渐被重视和研究,技术上还有待进一步地成熟和完善。

甘草中有效成分的分析、测定是化学研究、药理研究、中药材指纹图谱研究、临床用药安全研究中的重要基础工作。随着分析测试技术的飞速发展,甘草中有效成分的测定方法得到了很大的改进,由单一成分测定发展到可同时测定多种成分,从传统的紫外单波长检测发展到 DAD、ELSD、MS 等先进检测手段的应用。今后可借鉴其他传统中药材有效成分的现代分析、测试方法,将 HPLC-NMR、HPLC-MS-MS、HPLC-TOF-MS 等更多的手段引入到甘草的研究中。

对甘草化学成分进行更广泛、深入的研究,阐明新成分与甘草药理作用的机制的相关性及其在甘草不同品中量的差异等均是今后进一步深入研究的方向。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] Hou Y Y, Yang Y, Yao Y, *et al.* Neuroprotective of glycyrrhizin against ischemic vascular dementia *in vivo* and glutamate-induced damage *in vitro* [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(2): 125-131.
- [3] 李若洁, 石倩, 程彬峰, 等. 甘草酸协同麻黄碱的平喘作用机制研究 [J]. *药物评价研究*, 2010, 33(3): 183-186.
- [4] 王连喜, 李剑平, 李琪, 等. 乌拉尔甘草研究现状与可持续利用 [J]. *中草药*, 2009, 40(3): 496-499.
- [5] 何花, 葛志伟, 刘雳, 等. 甘草黄酮对阿霉素细胞毒性的影响及其构效关系研究 [J]. *中草药*, 2010, 41(6): 941-945.
- [6] 邢国秀, 李楠, 王童, 等. 甘草中黄酮类化学成分的研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2003, 28(7): 593-597.
- [7] Fukai T, Marumo A, Kaitou K, *et al.* Anti-helicobacter pylori flavonoids from licorice extract [J]. *Life Sci*, 2002, 71(8): 1449-1463.
- [8] Li W, Asada Y, Koike K. Flavonoids from *Glycyrrhiza pallidiflora* hairy root cultures [J]. *Phytochemistry*, 2001, 60(10): 595-598.
- [9] Kuroda M, Mimaki Y, Honda S. Phenolics from *Glycyrrhiza glabra* roots and their PPAR- γ ligand-binding activity [J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18(2): 962-970.
- [10] 吴汉夔, 赵芸, 牟新利, 等. 新疆甘草化学成分研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2006, 18(3): 415-417.
- [11] Li W, Koike K, Asada Y. Flavonoids from *Glycyrrhiza pallidiflora* hairy root cultures [J]. *Phytochemistry*, 2002, 60(4): 351-355.
- [12] Kuroda M, Mimaki Y, Sashida Y, *et al.* Phenolics with PPAR- γ ligand-binding activity obtained from licorice (*Glycyrrhiza uralensis* roots) and ameliorative effects of glycyrrin on genetically diabetic KK-Ay mice [J]. *Phytochemistry*, 2003, 13(11): 4267-4272.
- [13] 谢彦, 徐淑永, 曾和平. 甘草属植物中三萜类化合物研究概述 [J]. *广州化工*, 2004, 32(1): 1-5.
- [14] 石荣火, 阚毓铭, 李祥, 等. 刺果甘草二氯甲烷提取部位化学成分研究 [J]. *中药材*, 2001, 24(1): 38-39.
- [15] 朱绪民, 邸迎彤, 彭树林, 等. 乌拉尔甘草中的化学成分 [J]. *中草药*, 2003, 34(3): 199-201.
- [16] Zhang H, Wang S S, Li W. A new oleanane-type triterpene glycoside from *Glycyrrhiza uralensis* [J]. *World Sci Technol*, 2009, 11(2): 253-256.
- [17] Jin W, Li Y, Nakajima J, *et al.* Oleanane-type triterpene glycosides from *Glycyrrhiza uralensis* [J]. *Nat Prod Commun*, 2007, 2(3): 243-248.
- [18] 郑辉. 甘草细胞放大培养调控研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2008.
- [19] 杨世海, 刘晓峰, 果德安, 等. 不同附加物对甘草愈伤组织培养中黄酮类化合物形成的影响 [J]. *中国药学杂志*, 2006, 41(2): 96-99.
- [20] Kovalenko P G. Transient gene expression and total flavonoids production in the electroporated licorice *Glycyrrhiza glabra* L. suspension protoplasts [J]. *Биополимеры и клетка*, 2004, 20(5): 421-428.
- [21] 杨英, 何峰, 季家兴, 等. 四种前体对胀果甘草细胞悬浮培养生产甘草黄酮的调控效果评价 [J]. *武汉植物学研究*, 2007, 25(5): 484-489.
- [22] 杨英, 何峰, 季家兴, 等. 外源水杨酸对悬浮培养甘草细胞中甘草黄酮积累的影响 [J]. *植物生理学通讯*, 2008, 44(3): 130-132.
- [23] 鲁守平, 孙群, 杨艳春, 等. 乌拉尔甘草离体根尖培养方法的建立 [J]. *中国农学通报*, 2008, 24(2): 101-105.
- [24] 杨英, 郑辉, 李贇, 等. 外源水杨酸对悬浮培养甘草细胞中甘草黄酮积累的影响 [J]. *植物生理学通*

- 讯, 2008, 44(3): 504-506.
- [25] Yang Y, He F, Yu L J, *et al.* Flavonoid accumulation in cell suspension cultures of *Glycyrrhiza inflata* Batal under optimizing conditions [J]. *J Biosci*, 2009, 60(1/2): 68-72.
- [26] 杨世海, 刘晓峰, 马秀华, 等. 不同理化因子对甘草愈伤组织生长和黄酮类化合物合成的影响 [J]. 吉林农业大学学报, 2006, 28(1): 51-54.
- [27] 高艳丽, 高山林, 焦小珂, 等. 培养基中氮源对胀果甘草细胞悬浮培养生产黄酮类化合物的影响 [J]. 海峡药学, 2008, 20(10): 136-139
- [28] Yang Y, He F, Yu L J, *et al.* Influence of drought on oxidative stress and flavonoid production in cell suspension culture of *Glycyrrhiza inflata* Batal [J]. *J Biosci*, 2007, 62(5/6): 410-416.
- [29] 王磊. 甘草细胞培养生产甘草黄酮的条件优化及黄酮含量分析研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2007.
- [30] Zhang H C, Liu J G, Lu H Y, *et al.* Enhanced flavonoid production in hairy root cultures of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch by combining the over-expression of chalcone isomerase gene with the elicitation treatment [J]. *Plant Cell Rep*, 2009, 28(8): 1205-1213.
- [31] 曹志红, 吴雨航. 四逆汤中甘草次酸的含量测定 [J]. 中国中医急症, 2005, 14(2): 164.
- [32] 叶静, 肖美添, 汤须崇, 等. HPLC-ELSD 法测定甘草中 3 种甘草皂苷的含量 [J]. 广东药学院学报, 2009, 25(4): 368-370.
- [33] 赵晓莉, 陈晓燕, 狄留庆, 等. HPLC 法测定络通胶囊中绿原酸、阿魏酸、甘草苷、甘草素、肉桂酸和哈巴俄苷 [J]. 中草药, 2008, 23(2): 212-215.
- [34] 李伟, 王跃飞, 文红梅, 等. HPLC-DAD 同时分析甘草中 7 种有效成分 [J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(24): 1914-1918.
- [35] 陈云华, 赵晓霞, 王文全, 等. 高效液相色谱法同时测定甘草中甘草酸、甘草苷、异甘草素的含量 [J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(8): 52-53.
- [36] Chen X J, Zhao J, Meng Q, *et al.* Simultaneous determination of five flavonoids in licorice using pressurized liquid extraction and capillary electrochromatography coupled with peak suppression diode array detection [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(10): 7329-7335.
- [37] 荆晶, 陈西敬, 任伟超, 等. LC-MS 法测定人血浆中的甘草次酸 [J]. 药物分析杂志, 2007, 27(5): 673-676.
- [38] Morinaga O, Fujino A, Tanaka H, *et al.* An on-membrane quantitative analysis system for glycyrrhizin in licorice roots and traditional Chinese medicines [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2005, 383(4): 668-672.
- [39] Xu J, Tanaka H, Shoyama Y. One-step immunochromatographic separation and ELISA quantification of glycyrrhizin from traditional Chinese medicines [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 850(1/2): 53-58.

版权合作声明

中国药学会于 2009 年与中国学术期刊（光盘版）电子杂志社签订数字出版独家合作协议，在协议期间，中国药学会主办的科技期刊（包括天津中草药杂志社出版的 4 本期刊《现代药物与临床》、《中草药》、*Chinese Herbal Medicines*（中草药英文版）、《药物评价研究》杂志）的网络版由中国学术期刊（光盘版）电子杂志社（其出版和信息服务网站为“中国知网”）独家出版发行，读者可登陆“中国知网”（www.cnki.net）查阅浏览全文。

天津中草药杂志社