

利用免疫亲和色谱柱特异性敲除甘草酸的方法学研究

曾文浩¹, 孔慧³, 屈保平³, 张美龄¹, 王咏枝¹, 闫昕¹, 赵琰³, 屈会化^{2*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100029
2. 北京中医药大学 科研实验中心, 北京 100029
3. 北京中医药大学基础医学院, 北京 100029

摘要: 目的 制备特异性敲除甘草酸的免疫亲和色谱柱。方法 抗甘草酸单克隆抗体与 CNBr 活化的 Sepharose 4BTM 凝胶偶联制备甘草酸特异性敲除免疫亲和色谱柱, 利用 HPLC 法测定敲除液与洗脱液中甘草酸质量浓度, 考察甘草酸免疫亲和色谱柱的最大载样量、敲出率、精密度、准确度及稳定性等参数。结果 甘草酸免疫亲和色谱柱的最大载样量为 1.326 11 mg; 日内及日间精密度总 RSD 分别为 0.65%, 相对误差 (RE) 为 0.37%; 免疫亲和色谱柱稳定性实验显示 32 d 内甘草酸敲除率的 RSD 为 1.37%, 稳定性良好。结论 制备的甘草酸特异性敲除免疫亲和色谱柱能快速、高效、稳定地敲除甘草酸。

关键词: 甘草酸; 单克隆抗体; 免疫亲和色谱柱; 敲除; HPLC

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)16-2838-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.16.010

Methodology on specific knock out of glycyrrhizic acid by immunoaffinity chromatography column

ZENG Wen-hao¹, KONG Hui³, QU Bao-ping³, ZHANG Mei-ling¹, WANG Yong-zhi¹, YAN Xin¹, ZHAO Yan³, QU Hui-hua²

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
2. Center of Scientific Research, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
3. School of Preclinical Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To prepare the glycyrrhizic acid (GA) immunoaffinity chromatography column, which could specifically knock out the GA. **Methods** An immunoaffinity chromatography (IAC) column was developed by covalently coupling the anti-GA-MAb to CNBr-activated SepharoseTM 4B. The concentration of GA was detected by HPLC, and the maximum coupling capacity, stability, precision, and accuracy of the IAC column for GA were studied. **Results** The maximum capacity of the IAC column for GA was 1.326 11 mg, the precision (RSD) of GA was 0.65%, and the accuracy (RE) was 0.37%. RSD of GA stayed 1.37% during 32 d, which showed a pretty well stability. **Conclusion** GA-IAC column could rapidly, effectively, and stably knock out the GA.

Key words: glycyrrhizic acid; monoclonal antibodies; immunoaffinity chromatography column; knock-out; HPLC

中药活性成分是中药发挥疗效的基础, 中药活性成分的研究不仅是中药质量控制的基础, 更是中医药现代化的关键环节。目前, 中药活性成分的研究主要采用的是“还原论”^[1]“靶向技术”^[2]或“血清药理学”^[3]等技术, 但上述技术在揭示中药活性成分对中药材或复方的关联度及贡献度等方面还存在不足。因此, 本课题组提出基于小分子单克隆抗体的免疫亲和色谱特异性敲除技术研究中药物质基

础的新思路与方法^[4-6]。

免疫亲和色谱特异性敲除技术原理类似于“基因敲除”技术^[7], 可通过对比药物中某一特定成分敲除前后的功效变化, 从而阐释该成分与整体药效的相关性, 可用于解析药物的活性成分与该药物功效的关联度、贡献度大小及活性成分与其他成分之间相互作用关系等问题。利用中药活性成分的单克隆抗体制备免疫亲和色谱柱, 可以特异性地从药材

收稿日期: 2016-03-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81473338, 81274043)

作者简介: 曾文浩 (1992—), 男, 在读硕士, 研究方向为中药免疫分析方法。Tel: 18010108007 E-mail: zwhao01@foxmail.com

*通信作者 屈会化 (1966—), 男, 硕士生导师, 研究方向为中药小分子单克隆抗体技术。Tel: 13661101910 E-mail: zhaoyandr@gmail.com

或复方中敲除该化合物,且“原样”保留其余成分。这种高特异性、高灵敏度的化合物分离纯化技术是目前其他色谱技术难以实现的,这为中药物质基础的研究提供了更加科学便捷的技术支持^[8-10]。

甘草酸(glycyrrhizic acid, GA)是甘草中最重要的活性成分之一^[11-13],具有免疫调节、抗炎、抗病毒、抗癌、抑菌、解毒、保护心血管、保护脑损伤及保护肝脏^[14-19]等作用。本实验利用抗GA单克隆抗体(monoclonal antibodies, mAbs)^[20-22]制备了GA特异性敲除免疫亲和色谱柱(immunoaffinity chromatography, IAC),考察GA-IAC柱特异性敲除GA的各项参数。本实验通过特异性敲除实验验证栀子苷能作为GA-IAC柱的内标物质;通过测定GA-IAC柱的最大载样量,考察了GA-IAC柱能否用于甘草提取液的敲除实验;通过考察GA-IAC柱的精密度及稳定性等参数,检验GA-IAC柱特异性敲除GA方法的稳定性及可靠性。上述参数的测定,为GA特异性敲除技术的建立提供科学依据,也为今后明确GA的药效及作用机制,阐释甘草的物质基础,揭示中药多成分间的相互作用以及复方的配伍机制研究提供新思路。

1 仪器与材料

CPA225D 电子天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;Agilent 1260 Infinity LC 高效液相色谱仪,德国Agilent Technologies;色谱柱:Reliasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),型号:2108055,美国Orochem公司;中压色谱柱(20 cm×2.5 cm),型号:7374521,美国Bio-rad公司;QYC-200 恒温振荡摇床,上海福玛实验设备有限公司;EL×800 酶标仪,美国伯腾仪器有限公司。

对照品GA(批号13083101,质量分数≥98%)、栀子苷(批号110749-200714,质量分数≥98%),成都曼斯特生物科技有限公司;CNBr 活化 Sepharose 4B 凝胶,批号10223816,瑞士Amersham Biosciences;乙腈,批号1401-7,色谱纯,德国Merck;BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号20510203),北京索莱宝科技有限公司;去离子水,北京中医药大学逸夫科研楼;其他化学试剂(分析纯)均购于北京化工厂。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent 1260 色谱仪, DAD 检测器; 色谱柱为 Reliasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为

1%醋酸铵水溶液(醋酸-水1:99, 0.06 mol/L 醋酸铵)-乙腈; 体积流量 1 mL/min; 检测波长 254 nm; 进样量 10 μL; 柱温 30 °C; 梯度洗脱: 0~12 min, 6%~22%乙腈; 12~25 min, 22%~25%乙腈; 25~45 min, 25%~40%乙腈; 45~50 min, 40%~6%乙腈; 50~57 min, 6%乙腈。

2.2 样品溶液的配制

配制GA的对照品溶液作为上样液,并以一定质量浓度栀子苷溶液作为内标物质,用于GA的质量浓度标准曲线测定,以及GA特异性敲除实验。

精密称定10.0 mg GA,去离子水溶解,5 mL 量瓶定容,制成2.00 mg/mL 对照品母液。精密称定5.0 mg 栀子苷,去离子水溶解,5 mL 量瓶定容,制成1.00 mg/mL 对照品母液。利用GA对照品母液配制1.75、1.50、1.25、1.00、0.50、0.25、0.10、0.05 mg/mL GA 对照品溶液(去离子水稀释,含250 μg/mL 栀子苷)。

2.3 GA 标准曲线绘制

用栀子苷作为测定的内标物质,在相同的色谱条件下,对上述已配制好的对照品溶液进行测定,以GA的质量浓度为横坐标(X),以GA的吸收面积与栀子苷的吸收面积的比值为纵坐标(Y)得线性回归方程 $GA Y=445.62 X+55.104, R^2=0.999 8$, 线性范围 57.5~1 750 μg/mL, 保留时间 40.47 min, 检测限(LOD)为 57.5 μg/mL。结果表明GA的测定具有较宽的线性范围,且线性关系良好。

2.4 偶联率测定

通过BCA(Bicinchoninic acid)法计算蛋白质的量,在96孔板中加入PBS稀释的牛血清白蛋白(BSA)对照品梯度工作液及待测蛋白样品溶液,加入BCA工作液,酶标仪562 nm 波长扫描吸光度(A)值,测定蛋白质量浓度,计算抗GA抗体(GA-mAbs)与Sepharose 4B™ 凝胶的偶联率及偶联比,计算公式为偶联率=(偶联前抗体量-偶联后抗体量)/偶联前抗体量,偶联比=(偶联前抗体量-偶联后抗体量)/琼脂糖凝胶体积。

2.5 GA 免疫亲和色谱柱的制备

称取12 g CNBr 活化的 Sepharose 4B™ 凝胶,用100 mL HCl(1 mol/L, pH 3)溶胀,搅拌0.5 h。用2 000 mL 的 HCl(1 mol/mL, pH 3)溶液冲洗柱子,再以5倍柱体积去离子水平衡柱子。称取400 mg GA-mAb 冻干粉溶解于1 mL 的 0.1 mol/L NaHCO₃(pH 8.3, 含 0.5 mol/L NaCl)溶液,将抗体溶液加

入溶胀好的凝胶中, 再将凝胶转移至锥形瓶中, 37 °C, 120 r/min, 摇床振荡孵育 2 h。振荡后溶液转移至 20 cm×2.5 cm 的中压色谱柱内, 以 5 倍柱体积 0.1 mol/L NaHCO₃ (pH 8.3, 含 0.5 mol/L NaCl) 溶液冲洗凝胶至 A 值为 0, 测定流出液蛋白量, 计算偶联率。再用 3 倍柱体积去离子水平衡色谱柱。将色谱柱中凝胶转移至 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0, 不含 NaCl) 溶液中, 37 °C, 50 r/min, 摇床振荡孵育 2 h, 将凝胶转移回中压色谱柱中, 以 3 倍柱体积去离子水平衡凝胶, 再用 5 倍柱体积的 0.1 mol/L NaAc-HAc (pH 4, 含 0.5 mol/L NaCl) 溶液及 5 倍柱体积的 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0, 含 NaCl) 溶液交替冲洗凝胶, 后去离子水平衡中压色谱柱, 再用 0.01 mol/L PBS 封存, 4 °C 保存备用。测得偶联后(未结合)的抗体量为 100.4 mg, 计算抗 GA-mAbs 与琼脂糖凝胶偶联率 74.9%, 偶联比为 5.99 : 1, 表明 Sepharose 4BTM 凝胶对抗 GA-mAbs 有较强的结合能力。

2.6 GA-IAC 参数考察

2.6.1 特异性敲除实验

精确量取 1 mL 质量浓度为 500 μg/mL (含 250 μg/mL 栀子苷内标) 的 GA 对照品溶液, 室温条件下将样品进样到 GA-IAC 内, 孵育 15 min, 以去离子水为敲除液, 收集 5 倍柱体积 (250 mL) 敲除液, 以甘氨酸盐酸缓冲液 (pH 2.7, 含 0.5 mol/L NaCl) 为洗脱液, 收集 5 倍柱体积 (250 mL) 洗脱液, 再用去离子水平衡 GA-IAC, 至 pH 值恢复中性, 放入 4 °C 保存。将收集到的敲除液和洗脱液分别用旋转蒸发仪浓缩、蒸干, 1 mL 纯甲醇复溶, 收集复溶液, 0.22 μm 微孔滤膜滤过复溶液, HPLC 测定敲除液与洗脱液中化学成分种类及其量。

偶联在 Sepharose 4BTM 凝胶上的抗 GA-mAbs, 能特异性吸附样品中的 GA, 而其他成分则随着流动相离开柱子。当进样 500 μg/mL (含 250 μg/mL 栀子苷内标) GA 对照品溶液 (图 1-A) 流经 GA-IAC 柱后, HPLC 法测定敲除液 (图 1-B) 中栀子苷质量浓度为 259.0 μg/mL, 回收率为 103.6%, 未测到 GA; 洗脱液 (图 1-C) 中 GA 质量浓度为 312.1 μg/mL, 且未测到栀子苷成分。敲除液与洗脱液 HPLC 结果显示 GA-IAC 柱对栀子苷无特异性吸附, 可选择其作为内标物质。

2.6.2 最大载样量与敲除率考察

考察制备的 GA-IAC 柱最大载样量, 为之后利用 GA-IAC 柱敲除 GA 的上样量限定范围。精确量取 1 mL 质量浓度不同

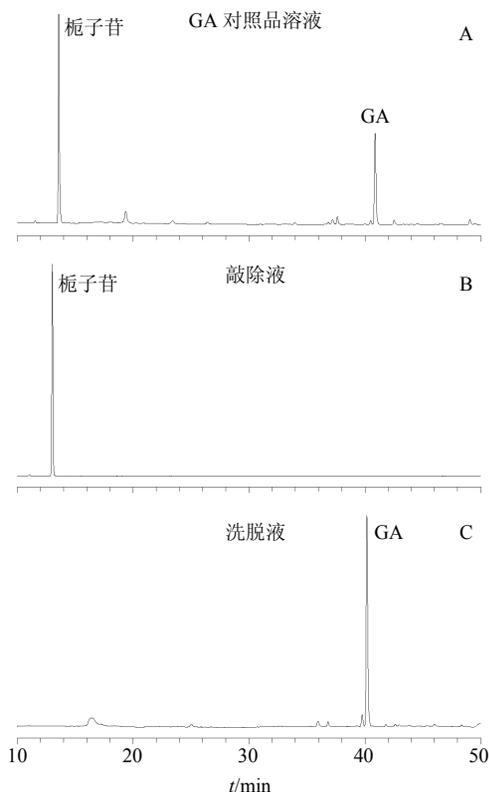


图 1 GA 特异性敲除研究结果

Fig. 1 Specific knock out of GA by HPLC

的 GA 对照品溶液 (1.75、1.50、1.25 mg/mL, 含 250 μg/mL 栀子苷内标), 将 GA 样品进样到 GA-IAC 柱内, 以去离子水为敲除液, 以甘氨酸盐酸缓冲液 (pH 2.7, 含 0.5 mol/L NaCl) 为洗脱液, 分别收集 5 倍柱体积敲除液与洗脱液, 再用去离子水平衡色谱柱至 pH 值为 7。将收集到的敲除液和洗脱液分别蒸干, 1 mL 纯甲醇复溶, 收集复溶液, 0.22 μm 微孔滤膜滤过复溶液, HPLC 测定敲除部分与洗脱部分中 GA 的量, 测得 GA-IAC 柱对 GA 的回收率与敲除量。其中, 敲除量表示 GA-IAC 柱从上样溶液中吸附 GA 的量, 即 GA-IAC 柱的载样量。

通过 HPLC 法测定 GA-IAC 柱敲除 3 个不同质量浓度的 GA 对照品溶液, 测得 GA-IAC 柱的最大载样量及回收率如表 1 所示。GA-IAC 柱的最大载样量 = 每克葡聚糖凝胶载样量平均值 × 葡聚糖凝胶用量 (12 g), 测得最大载样量为 110.51 μg/g × 12 g = 1.326 12 mg, 表明 GA-IAC 柱特异性吸附 GA 效果好, GA-mAbs 活性高。

2.6.3 精密度与准确性试验

考察 GA-IAC 柱的精密度与准确度, 验证 GA-IAC 柱特异性敲除 GA 方法的科学性。精确量取 1 mL 不同质量浓度的 GA 对照品溶液 (1.75、1.50、1.25 mg/mL, 含 250 μg/mL

栀子苷), 将 3 种质量浓度 GA 样品连续 3 d 进样到 GA-IAC 柱内, 每个质量浓度样品进样 3 次, 分别收集敲除液和洗脱液, 旋转蒸发仪蒸干, 1 mL 纯甲醇复溶, 收集复溶液, 0.22 μm 微孔滤膜滤过复溶液, HPLC 检测敲除液中 GA 的量, 计算日内及日间 GA 质量浓度的总 RSD 和相对误差 (RE), 并用以评价 GA-IAC 柱敲除 GA 的日内及日间精密度和准确度。计算 GA 质量浓度的总 RSD 和 RE, 结果如表 2 所示, 测得 GA 质量浓度的总 RSD 值为 0.65%, RE 值为 0.37%, 符合方法的要求。

表 1 GA-IAC 柱的载样量与敲除率

Table 1 Knock out efficiency and capacity of IAC column for GA

| 进样量/ (mg·mL ⁻¹) | 组分 | GA 质量浓 度/(μg·g ⁻¹) | 回收率/ % | 敲除率/ % | 凝胶敲除 量/(μg·g ⁻¹) |
|--------------------------------|-----|-----------------------------------|-----------|-----------|---------------------------------|
| 1.25 | 敲除液 | 0 | 59.48 | 100.00 | 104.17 |
| | 洗脱液 | 743.48 | | | |
| 1.50 | 敲除液 | 177.75 | 65.55 | 88.15 | 112.91 |
| | 洗脱液 | 805.54 | | | |
| 1.75 | 敲除液 | 343.92 | 73.81 | 80.35 | 117.17 |
| | 洗脱液 | 947.73 | | | |
| 平均值 | | | 66.28 | 89.50 | 110.51 |

表 2 GA-IAC 柱精密度与准确度考察

Table 2 Assay accuracy and precision of GA-IAC column

| 进样量/ (mg·mL ⁻¹) | 敲除量/μg | | | | RSD/% | RE/% |
|--------------------------------|----------|----------|----------|----------|-------|------|
| | 1 d | 2 d | 3 d | 平均值 | | |
| 1.75 | 1 412.07 | 1 409.82 | 1 396.35 | 1 406.08 | 0.60 | 0.46 |
| 1.50 | 1 307.38 | 1 317.07 | 1 342.64 | 1 322.25 | 1.35 | 0.55 |
| 1.25 | 1 250.00 | 1 250.00 | 1 250.00 | 1 250.00 | 0 | 0 |
| 平均值 | 1323.15 | 1325.63 | 1329.66 | 1326.11 | 0.65 | 0.37 |

2.6.4 重复性与稳定性试验 测定 GA-IAC 柱在相同敲除、洗脱条件, 以及相同实验环境 (包括温度、湿度等) 下, 对 GA 的特异性敲除的效果随时间变化的规律, 考察该方法的重复性与稳定性。

同一条件下测定第 1、2、4、8、16、32 天时间点的 GA-IAC 柱敲除 GA 的敲除率。取 1 mL (1.5 mg/mL, 含 250 μg/mL 栀子苷内标) GA 样品, 流经 GA-IAC 柱, 收集敲除液及洗脱液, 蒸干后甲醇复溶, HPLC 测定敲除液及洗脱液中 GA 质量浓度, 计算 RSD 值, 验证 GA-IAC 柱特异性敲除 GA 的重复性与稳定性。

测定在第 1、2、4、8、16、32 天时间点的 GA-IAC

柱敲除 GA (1.5 mg/mL, 含 250 μg/mL 栀子苷) 样品的敲除率, 测得 GA-IAC 敲除结果见表 3, 在 32 d 内, GA-IAC 柱敲除率的 RSD 值为 1.37%, 表明制备的 GA-IAC 柱具有较好的重复性与稳定性。

表 3 GA-IAC 柱重复性与稳定性试验

Table 3 Repeatability and stability of GA-IAC column

| 时间/d | GA/(μg·mL ⁻¹) | | | 敲除率/% |
|-------|---------------------------|--------|----------|-------|
| | 进样液 | 敲除液 | 敲除量 | |
| 1 | 1 457.03 | 149.65 | 1 307.38 | 89.73 |
| 2 | 1 450.16 | 133.08 | 1 317.07 | 90.82 |
| 4 | 1 521.36 | 152.53 | 1 368.83 | 89.97 |
| 8 | 1 563.24 | 144.15 | 1 419.08 | 90.78 |
| 16 | 1 484.49 | 186.44 | 1 298.05 | 87.44 |
| 32 | 1 457.11 | 149.31 | 1 307.80 | 89.75 |
| 平均值 | 1 488.90 | 152.53 | 1 336.37 | 89.75 |
| RSD/% | 3.02 | 10.76 | 3.57 | 1.37 |

3 讨论

甘草作为最常用的中药之一, 对于其化学成分及药理活性的研究早已开展的十分透彻, 但是过往的研究往往割裂了活性成分 GA 与甘草饮片或复方的关联度, 不能论证 GA 在中药或复方整体中的关联性与贡献度大小。因此, 本实验制备出能特异性敲除 GA 的免疫亲和色谱柱, 为 GA 的药理活性研究提供新的方法。

本实验重点在于考察所制备的 GA-IAC 柱的各项参数。实验结果表明 GA-IAC 柱对 GA 具有很强的特异性吸附能力, 其最大载样量能达到 1.326 11 mg, 进一步研究可用于敲除甘草提取液中的 GA 成分。通过分析 GA-IAC 柱的精密度及准确度实验结果, 表明利用 GA-IAC 柱特异性敲除 GA 的方法是有效可行的。本实验考察 GA-IAC 柱的稳定性, 实验结果显示 GA-IAC 柱在 32 d 内 GA 敲除率的 RSD 值为 1.37%, 表明偶联在琼脂糖凝胶上的抗 GA-mAb 在此时间段内活性较好, GA-IAC 柱对 GA 的特异性吸附效果良好, 该方法具有较好的重复性与稳定性。上述实验结果表明本实验成功制备了可用于特异性敲除 GA 的 IAC。且在前期研究中本课题组进行 GA-IAC 敲除甘草提取液中 GA 的研究^[19], 实验结果表明, GA-IAC 能敲除甘草提取液中的 GA, 且敲出率可达到 100%, 表明 GA-IAC 能应用于甘草提取液中 GA 的敲除研究。

前期研究中发现, 利用去离子水作为敲除液,

甘氨酸盐酸缓冲液 (pH 3) 作为洗脱液, 能取得较好的敲除洗脱效果^[20]。偶联在葡聚糖凝胶上的抗 GA-mAb 作为一种蛋白质, 敲除液和洗脱液对抗体活性有十分重要的影响, 从而对 GA-IAC 柱的敲除效果产生巨大的影响。本实验选择去离子水及甘氨酸盐酸 (pH 3), 其对抗体活性影响较小, 在较长时间内对色谱柱的敲除效率无不良影响, 且去离子水作敲除液可直接用于后续 GA 细胞实验或动物药理学实验当中, 无须复杂的有机溶剂处理过程。也有文献报道^[23]采用 5 mmol/L PBS (含 50 mmol/mL NaCl, pH 7) 作为敲除液, 20 mmol/L PBS (含 30% 甲醇, 500 mmol/L NaCl, pH 7) 作为洗脱液。但对比本实验制备的 GA-IAC 柱, 在对 GA 的敲除效率, 色谱柱的载样量, 色谱柱的稳定性等方面, 本实验制备的 GA-IAC 柱明显高于文献结果。且本实验制备的色谱柱的操作更便捷、无污染, 适合用于更进一步研究 GA 的药理药效学实验中, 这都表明本实验制备的 GA-IAC 柱具有更加独特的应用优势。

作为一种研究 GA 药理活性的新途径, 利用 GA-IAC 特异性敲除 GA 的方法还有需要改进的方面, 如色谱柱对有机试剂的耐受性, 抗 GA-mAb 活性的保存, GA-IAC 柱的最佳使用条件等方面, 都需要对其进行进一步的优化考察。

参考文献

- [1] 李 梢, 王永炎. 医学研究中系统论与还原论的关联关系 [J]. 北京中医药大学学报, 2005, 28(5): 1-5.
- [2] 肖震宇, 何少忠, 彭卫卫. 中药靶向治疗肿瘤的基础与临床研究进展 [J]. 中国药房, 2011, 22(23): 2204-2206.
- [3] 李 芳, 李 辉. 血清药理学在中药药效学中的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2013, 41(32): 12607-12609.
- [4] 赵 琰, 屈会化, 王庆国. 利用单克隆抗体特异性敲除技术解析中药药效物质基础的新方法 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(17): 2906-2910.
- [5] 屈会化, 赵 琰, 王庆国. 基于中药活性小分子单克隆抗体的复方配伍机理研究新思路 [J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(10): 1416-1419.
- [6] 屈会化, 赵 琰, 王庆国. 中药小分子单克隆抗体技术平台的构建 [J]. 中草药, 2014, 45(7): 895-899.
- [7] 陶 果, 信吉阁, 肖 晶, 等. 基因敲除技术最新研究进展及其应用 [J]. 安徽农业科学, 2013, 41(29): 11605-11608.
- [8] 谢彬彬. 葛根素单克隆抗体免疫亲和色谱柱的制备 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2012.
- [9] 何 洲. 绿原酸与清开灵注射液过敏反应相关性的研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2011.
- [10] 孔 靛, 李宝才, 向 诚. 中药有效成分组的研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(22): 3289-3296.
- [11] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [12] Zheng Q Y, Ye M. Chemical analysis of Chinese herbal medicine Gan-ao (licorice) [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(11): 1954-1969.
- [13] Farag M A, Porzel A, Wessjohann L A. Comparative metabolite profiling and fingerprinting of medicinal licorice roots using a multiplex approach of GC-MS, LC-MS and 1D NMR techniques [J]. *Phytochemistry*, 2012, 76: 60-72.
- [14] 张明发, 沈雅琴. 甘草酸及其衍生物的抗炎和抗变态反应研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(5): 359-364.
- [15] Rackova L. Mechanism of anti-inflammatory action of licorice extract and glycyrrhizin [J]. *Nat Prod Res*, 2007, 21(14): 1234-1241.
- [16] Yamazaki S, Morita T, Endo H, et al. Isoliquiritigenin suppresses pulmonary metastasis of mouse renal cell carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2002, 183(1): 23-30.
- [17] Lee C K, Park K K, Lin S S, et al. Effects of the licorice extract against tumor growth and cisplatin-induced toxicity in a mouse xenograft model of colon cancer [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(11): 2191-2195.
- [18] Kang J S, Yoon Y D, Kang I J C, et al. Glabridin in an isoflavan from licorice root inhibits inducible nitric oxide synthase expression and improves survival of mice in experimental model of septic shock [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 312(3): 1187-1194.
- [19] 张明发, 金玉洁, 沈雅琴. 甘草酸保护脑损伤及改善记忆功能的药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(1): 59-63.
- [20] Zhang Y, Qu H H, Zeng W H, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay and immunoaffinity chromatography for glycyrrhizic acid using an anti-glycyrrhizic acid monoclonal antibody [J]. *J Sep Sci*, 2015, 38(13): 2363-2370.
- [21] 张 越, 屈会化, 吴婷婷, 等. 甘草酸单克隆抗体的制备与鉴定 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(5): 770-774.
- [22] 张 越. 甘草酸、柚皮苷单克隆抗体的制备及其酶联免疫分析方法的建立 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.
- [23] Xu J S, 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.