

反相二维色谱制备甘草中黄酮类化合物

朱靖博^{1,2}, 籍立新¹, 萧伟², 丁燕^{1*}, 黄文哲², 屠鹏飞^{2,3}, 王永华^{2,4}

1. 大连工业大学食品学院, 辽宁 大连 116034

2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

3. 北京大学, 北京 100871

4. 西北农林科技大学, 陕西 杨凌 712100

摘要: **目的** 构建甘草黄酮类化合物系统性分离制备方法。**方法** 采用特异性吸附材料富集甘草中的黄酮类化合物, 以自主研发的制备色谱工厂系统, 采用色谱分离专家系统软件优化分离制备条件, 通过上样量和富集次数等参数的考察, 建立了基于分离富集模式的反相二维色谱制备甘草黄酮有效部位及单体化合物的方法。**结果** 建立了以 C₁₈ 为分离、富集填料, 甲醇-水、乙腈-水为一维、二维分离流动相, 水为富集稀释液, 梯度洗脱体积流量和稀释富集液的体积流量均为 21 mL/min, 上样量 300 mg, 富集次数 3 次的二维色谱分离制备甘草黄酮的方法, 其分离过程具有良好的重复性。应用该方法分离制备, 可重复获得 16 个甘草黄酮部位和甘草苷、甘草素、芒柄花黄素、刺甘草查耳酮、7,4'-二羟基黄酮、4'-O-[β-D-apio-D-furanosyl-(1→2)-β-D-glucopyranosyl] liquiritigenin、异甘草素、甘草酚、甘草香豆素共 9 个单体化合物。**结论** 建立的甘草黄酮的制备方法为甘草资源的综合利用和甘草黄酮活性药物开发奠定了基础。

关键词: 反相二维色谱; 甘草; 黄酮类化合物; 色谱分离专家系统; 甘草苷; 甘草素; 芒柄花黄素; 刺甘草查耳酮; 7,4'-二羟基黄酮; 4'-O-[β-D-apio-D-furanosyl-(1→2)-β-D-glucopyranosyl] liquiritigenin; 异甘草素; 甘草酚; 甘草香豆素

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)09-2033-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.09.009

Preparation of flavonoids from *Glycyrrhiza uralensis* by two-dimensional reversed-phase liquid chromatography

ZHU Jing-bo^{1,2}, JI Li-xin¹, XIAO Wei², DING Yan¹, HUANG Wen-zhe², TU Peng-fei^{2,3}, WANG Yong-hua^{2,4}

1. College of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China

2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

3. Peking University, Beijing 100871, China

4. Northwest A&F University, Yangling 712100, China

Abstract: Objective To develop a systematic chromatography separation method for flavonoids from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. (GU). **Methods** A new method for the separation of effective parts and monomers of flavonoids from GU by two-dimensional reversed-phase liquid chromatography was developed using the self-developed preparation chromatography plant system with independent intellectual property rights. Flavonoids compounds were enriched with specific adsorption materials. The separation conditions of the chromatography were optimized by the chromatographic separation expert system software, and the loading weight of samples and the enrichment times of a separation were investigated. **Results** The process of chromatography separation of flavonoids from GU had good precision and reproducibility with C₁₈ as separation and enrichment solid phase and the methanol/water and acetonitrile/water as mobile phase of one-dimensional and two-dimensional chromatography system. The dilution solution which used for one-dimensional and two-dimensional enrichment chromatography was water. The flow rate of gradient elution and dilution enrichment solution was 21 mL/min. The sample loading amount of chromatography separation was 300 mg each time. A total

收稿日期: 2017-12-25

基金项目: 国家自然科学基金-联合基金项目 (U1603285); 辽宁省教育厅基本科研项目 (2016J008); 江苏省“双创计划”项目 (苏人才 [2015] 26 号); 连云港市“高层次创新创业领军人才集聚工程”资助 (连人才 [2016] 1 号)

作者简介: 朱靖博 (1963—), 男, 博士, 教授, 研究方向为天然产物化学与利用。Tel: 13904118804 E-mail: zhujingb@sina.com

*通信作者 丁燕 (1980—), 女, 博士, 讲师, 研究方向为天然产物化学与功能性研究。Tel: 13842658035 E-mail: dingyan_515@hotmail.com

of 16 flavonoids parts contained stable chemical composition were obtained by the repeatable separation method after three times of enrichment. Nine pure compounds were obtained and identified by NMR and MS, which were liquiritin, liquiritigenin, formononetin, echinatin, 7,4'-dihydroxyflavone, 4'-O-[β -D-apio-D-furanosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranosyl] liquiritigenin, isoliquiritigenin, glycyrol, and glycycomarin. **Conclusion** The study can provide a certain reference value for the systematic separation and cognition for flavonoids from GU.

Key words: two-dimensional reversed-phase liquid chromatography; *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.; flavonoids; chromatographic isolation expert system; liquiritin; liquiritigenin; formononetin; echinatin; 7,4'-dihydroxyflavone; 4'-O-[β -D-apio-D-furanosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranosyl] liquiritigenin; isoliquiritigenin; glycyrol; glycycomarin

中药化学成分组成极为复杂^[1], 建立一种高效、高通量、系统性地分离制备中药成分的方法是研究阐明中药药效物质基础的先决条件。二维色谱因其更高的峰容量、分辨率和高通量^[2-4], 显著提高了中药化学成分分析和识别的效率^[2,5-7]。在中药成分制备领域, 专业化的二维制备色谱分离中药有效成分及其装置的研制尚未见报道, 常规的液相色谱在分离制备过程中上样量少, 有效部位获得的物质量少和重复性差, 系统性及在线操作手段复杂等, 制约了中药有效成分的系统性认知、活性成分研究及新药创制。中药有效成分的系统性认知和有效部位的重复性获得是中药药效物质基础、作用机制和质量评价研究的基础。甘草为豆科 (Leguminosae) 蝶形花亚科 (Papilionatae Taub.) 甘草属 *Glycyrrhiza* Linn. 多年生草本植物, 黄酮类化合物为其主要活性成分^[8], 治疗和预防疾病已经有几千年的历史^[10], 国内外已从甘草中分离鉴定出 300 多个黄酮类化合物^[11-12]。

本实验在中药化学成分系统分离策略及设备研究的基础上^[13], 以甘草黄酮富集物为对象, 以实验室自主研发的基于分离-富集模式的反相二维色谱仪-制备色谱工厂 (preparative chromatography platform, PCP) 为手段, 通过色谱条件优化, 上样量和富集次数等参数考察, 方法学的验证, 建立了一个可重复获得有效部位, 高通量, 系统性分离制备甘草中黄酮类化合物的方法。

1 实验材料

1.1 试剂与材料

甲醇、乙腈均为色谱级, 天津康科德科技有限公司; 乙醇, 天津科米欧化工试剂有限公司; 超纯水, 实验室自制; Sephadex LH-20 凝胶, 北京慧德易有限公司; Ultamate 3000 型高效液相色谱仪, 美国 Dionex 公司; 聚酰胺, 80~100 目, 青岛海洋化工工厂。

甘草, 购自河北安国药材市场, 经大连工业大学朱靖博教授鉴定为豆科蝶形花亚科甘草属植物乌

拉尔甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根部。

1.2 分离-富集模式的 PCP

2D-1000 型制备色谱工厂, 大连博迈科技发展有限公司, 为自主研发的集分离方法开发、在线分离-富集于一体的天然药物二维制备色谱仪, 应用于中药、植物药、海洋药物中化合物的系统性分离。其原理如图 1 所示。该色谱仪包括控制系统、泵入系统、进样系统、检测系统、一维色谱分离-富集柱系统、二维色谱分离-富集柱系统和 2 位 8 通阀。在同一台仪器上实现分离方法开发与优化、天然药物的二维色谱分离制备。

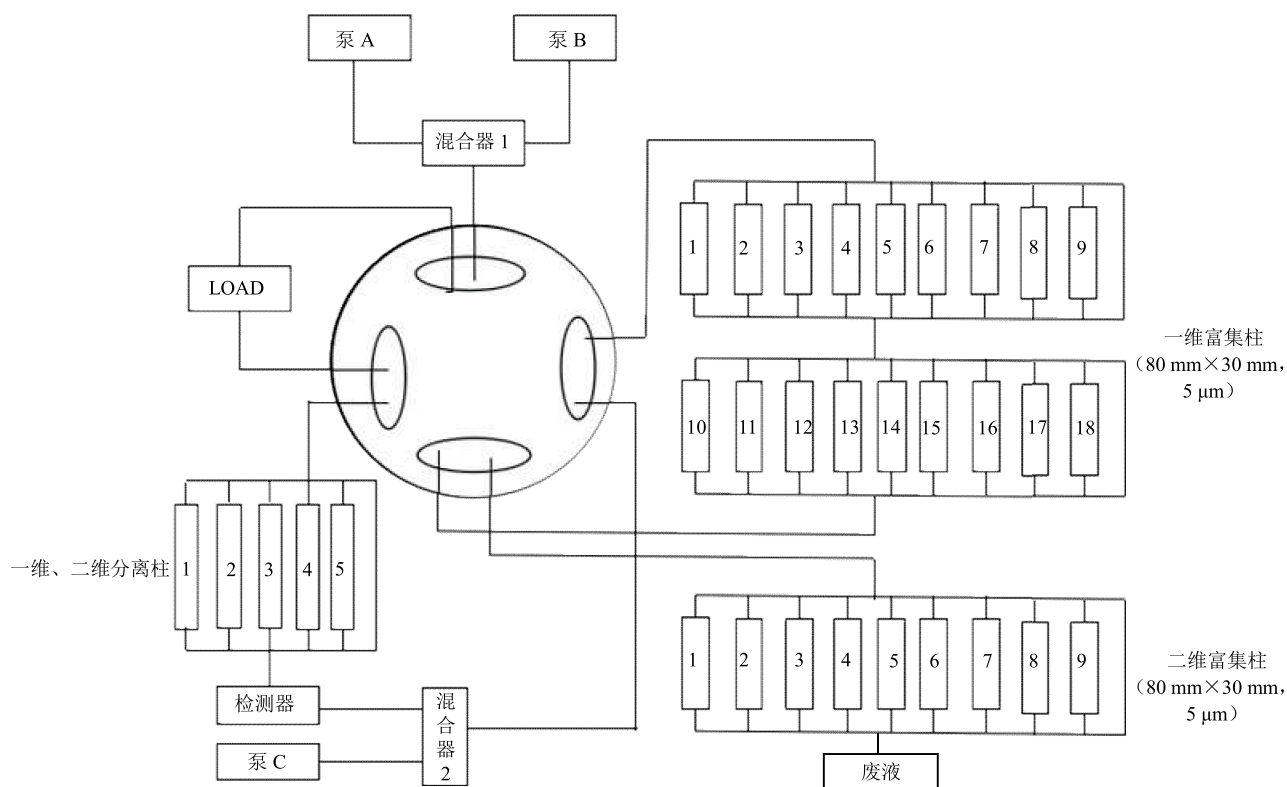
2 方法与结果

2.1 甘草黄酮类化合物的富集

称取 4 kg 过 40 目筛的甘草粉末, 甲醇渗漉提取 24 h, 将滤液浓缩得到提取物 598.2 g。将提取物用 1.5 L 20%乙醇水溶解, 过聚酰胺色谱柱 (120 cm $\times$ 7.5 cm), 以 20%和 80%乙醇洗脱, 收集含黄酮洗脱液, 浓缩后以 900 mL 水溶解, 过 LH-20 色谱柱 (100 cm $\times$ 3.5 cm), 以 30%和 90%乙醇洗脱, 收集含有黄酮的洗脱液, 浓缩干燥后得到甘草黄酮富集物 JLXA-RG-14G 17.2 g, 总黄酮质量分数为 47.8%。甘草提取液和黄酮富集物的色谱图见图 2。提取每个色谱峰的紫外光谱特征, 以黄酮类化合物紫外光谱图具有的 2 个特有的紫外吸收带 I (300~400 nm) 和带 II (240~285 nm) 为指标, 可以得出图 2-b 中 3、4、6、7、8、9、10、12、16、17、20、24、26、27、28、30、32、34、41 号色谱峰在 (240~285 nm) 和 (300~400 nm) 有特征紫外吸收带, 初步判断为黄酮类化合物。

2.2 甘草黄酮的一维、二维色谱分离条件的建立与优化

在反相色谱中, 化合物的色谱行为遵循公式 $\ln k = a + cC_B$ 。色谱专家系统软件 XTool 是基于该原理设计的进行色谱分离参数优化的专业软件。将 PCP 切换到方法开发模式, 以方法开发柱 1 C₁₈ (250



一维、二维分离柱 1-色谱柱 C_{18} (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m) 一维和二维分离柱 2~5- (250 mm × 30 mm, 5 μ m) 泵 A、B-梯度洗脱泵
泵 C-富集稀释液 LOAD-2 位 6 通阀
separation column of one- and two-dimensional chromatography: 1- C_{18} (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m) 2~5- C_{18} (250 mm × 30 mm, 5 μ m)
pump A, B-gradient elution pump pump C-diluent solution of enrichment LOAD was two position six way valve

图 1 PCP 工作原理

Fig. 1 Principle diagram of PCP

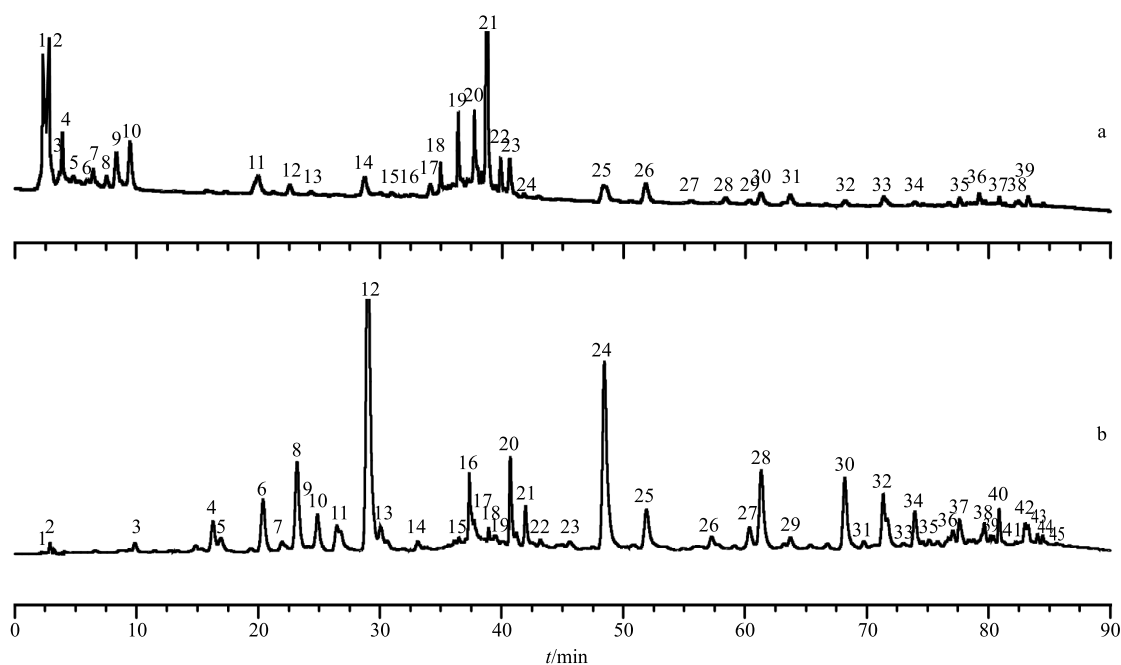


图 2 甘草提取液 (a) 和黄酮富集物 (b) 色谱图

Fig. 2 Chromatograms of licorice extracts (a) and flavonoids enrichment (b) from GU

mm×4.6 mm, 5 μm) 和 PDA 二极管阵列紫外检测器检测在 (I) 0~50 min, 50%~100% 甲醇; (II) 0~50 min, 45%~100% 甲醇; (III) 0~50 min, 40%~100% 甲醇的流动相下的 3 mg/mL JLXA-RG-14G 样品进行的 3 个色谱条件 HPLC 分析, 获得样品的色谱分离和每个峰的紫外光谱信息。提取每个峰的紫外光谱并与黄酮类化合物的特征紫外吸收对比, 确认要分离的对象。

整理 3 个条件下色谱峰保留时间、峰纯度及紫外光谱信息, 确定了 28 个分离对象。将色谱峰信息输入色谱专家系统软件 XTool 进行色谱分离模拟与优化, 预测得到一维分离条件并进行实际分离验证。3 mg/mL JLXA-RG-14G 样品进行 3 个色谱条件分析和基于 3 个色谱条件进行优化分离的色谱图如图 3 和 4 所示。模拟预测色谱峰的保留时间和实际分离验证色谱峰的保留时间的相对偏差值均小于 1.0%。模拟分离和实际分离的保留时间几乎相同, 甘草黄酮富集物中的常量和微量成分都得到较好的分离。对于方法开发柱得到的分离条件, 进一步优化体积流量和分离梯度, 得到用于一维色谱制备分离的流动相条件及色谱图见图 5, 28 个主要化合物得到了良好的分离。

一维色谱制备分离的体积流量依据优化的色谱条件, 按照公式 $F_{\text{Prep}} = F_{\text{Anal}} \times D_{\text{Prep}}^2 / D_{\text{Anal}}^2$ 进行线性

放大, 其中, F_{Anal} 和 D_{Anal} 分别代表方法开发柱洗脱液的体积流量和色谱柱内径, F_{Prep} 和 D_{Prep} 分别代表制备柱洗脱液的体积流量和色谱柱内径^[14], 得到梯度洗脱体积流量为 21 mL/min, 稀释泵体积流量 21 mL/min 为制备条件。二维分离的色谱条件构建与优化与一维色谱分离的方法相同, 样品为经过一维色谱分离富集的 16 个流分, 流动相采用乙腈-水体系。

2.3 一维分离最大上样量、富集时间参数和富集次数考察

将黄酮富集物配制成 10、50、100、300、400 mg/mL 溶液, 按照优化的一维分离制备条件, 以梯度洗脱体积流量 21 mL/min、稀释泵体积流量 21 mL/min 为制备条件定量注入样品, 以主要峰的分度为指标确定一维分离最大上样量。甘草黄酮富集物上样量 10、50、100、300、400 mg 的分离结果见图 6, 表明样品装载量在 10~300 mg 时, 7 个主要峰的分度均大于 1.5, 满足分离要求。当上样量达到 400 mg 时, 峰 5 和峰 6 的分度分别为 1.2、0.8, 均低于 1.5, 无法达到完全分离的要求, 最终确定上样量为 300 mg。

以时间为流分富集触发点, 将甘草黄酮富集为 16 个组分, 其分离切割方法见图 7。一维分离条件为甲醇 (A)-水 (B), 0~8 min, 30%~45% 甲醇;

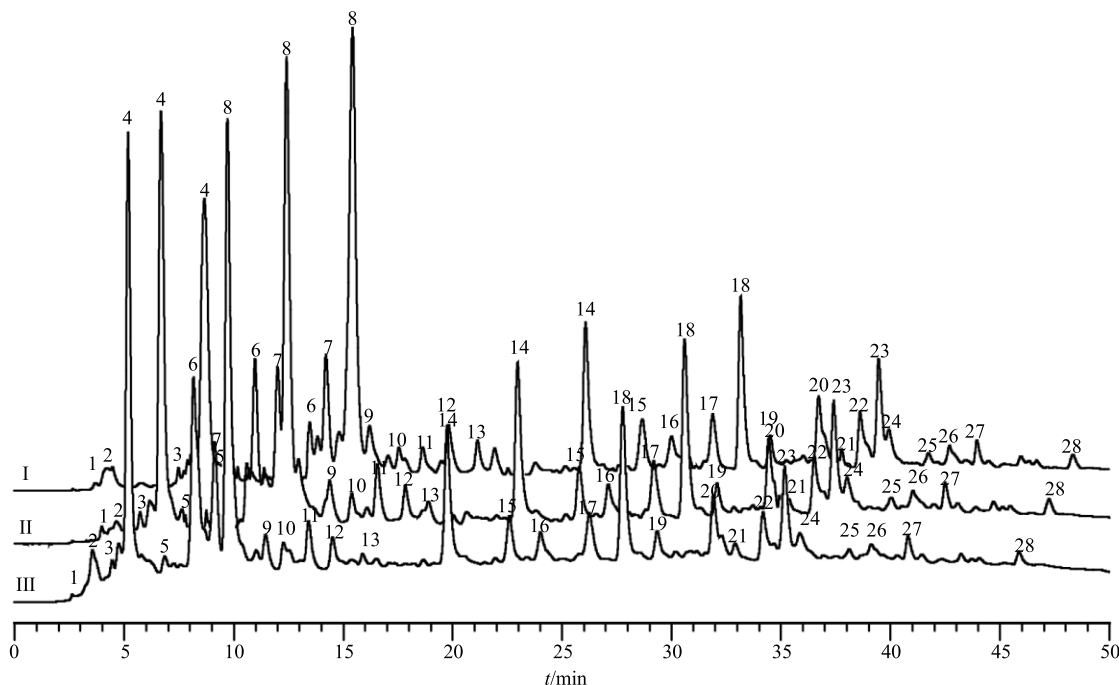


图 3 3 个色谱条件和优化条件下 JLXA-RG-14G 分离色谱图

Fig. 3 Chromatograms of JLXA-RG-14G under three optimized chromatographic conditions

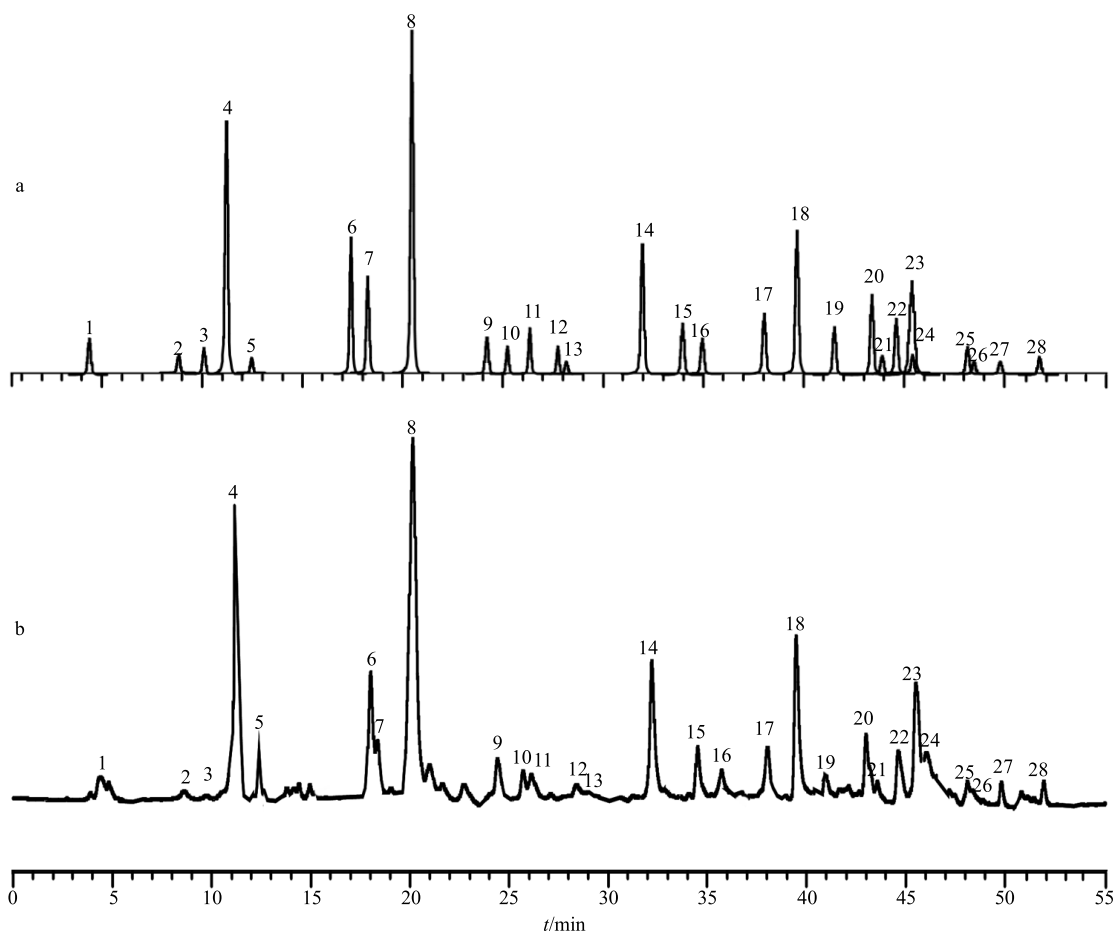


图 4 XTool 模拟预测色谱图 (a) 和验证分离色谱图 (b)

Fig. 4 Predictive chromatogram by XTool (a) and validated chromatogram (b) under same condition

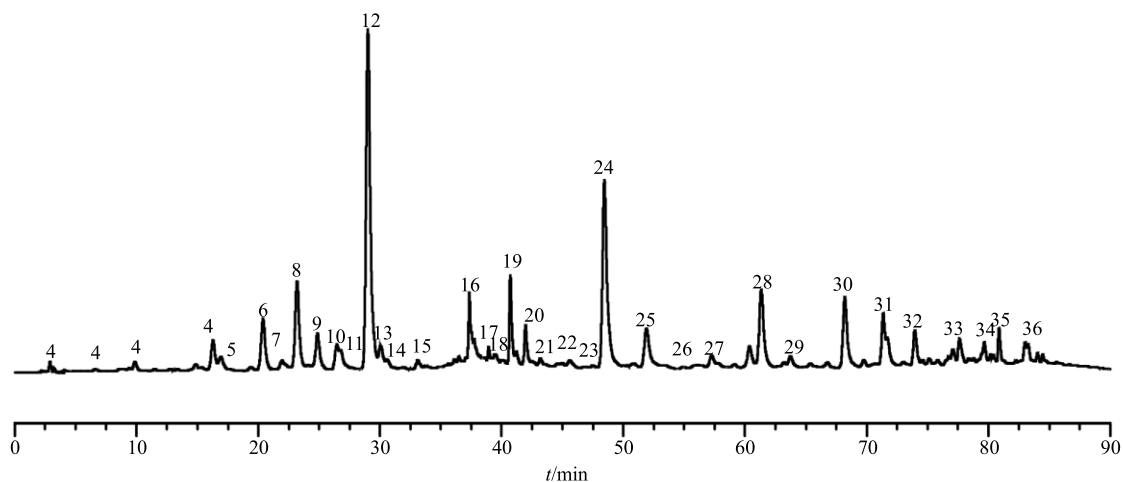


图 5 优化的一维分离色谱图

Fig. 5 Optimized chromatogram of onedimensional chromatography

8~25 min, 45%~50%甲醇; 25~26 min, 50%~55%甲醇; 26~36 min, 55%甲醇; 36~37 min, 55%~60%甲醇; 37~52 min, 60%甲醇; 52~53 min, 60%~70%甲醇; 53~70 min, 70%~80%甲醇; 70~75 min, 80%~100%甲醇; 75~80 min,

100%甲醇; 80~85 min, 100%~30%甲醇; 85~90 min, 30%甲醇。富集柱富集时间为(1) 0~8.9 min; (2) 8.9~15.9 min; (3) 15.9~21.6 min; (4) 21.6~29 min; (5) 29~33 min; (6) 33~37.3 min; (7) 37.3~41.5 min; (8) 41.5~46 min; (9) 46~54 min;

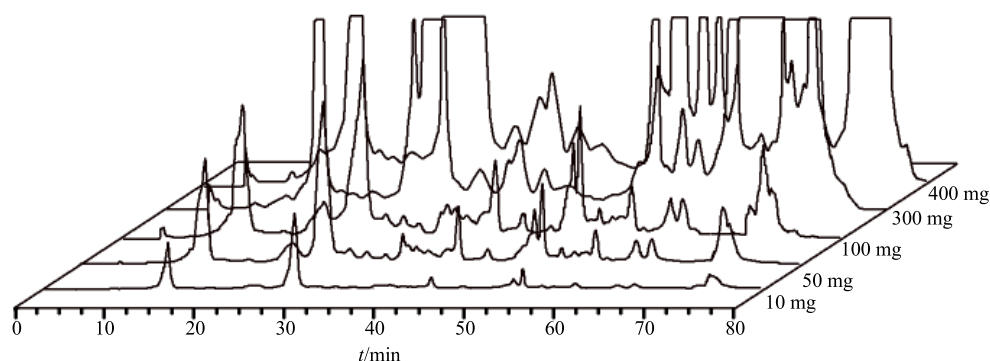


图 6 一维色谱分离最大样品载样量考察

Fig. 6 Investigation of loading weight on one-dimensional chromatography

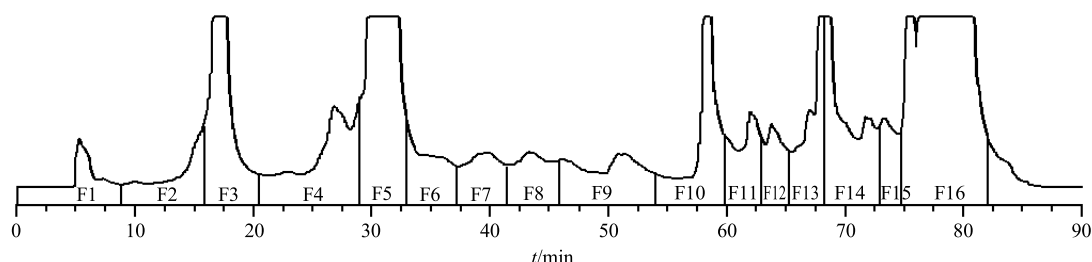


图 7 JLXA-RG-14G 一维分离制备流分收集色谱图

Fig. 7 Chromatogram of fraction collection of JLXA-RG-14G by one-dimensional chromatography

(10) 54~59.9 min; (11) 59.9~63 min; (12) 63~65.3 min; (13) 65.3~68.3 min; (14) 68.3~73 min; (15) 73~74.8 min; (16) 74.8~82.0 min。

重复一维分离富集，同时对富集柱流出液进行 HPLC 监测，当检测到目标样品峰信号时，则为富集柱最大承载量，确定了一维富集柱富集次数。一维分离富集 3 次后，16 个富集柱流出液检测均无样品流出，当富集第 4 次后，3 号富集柱检测有样品峰出现，确定一维分离富集的次数为 3 次。

2.4 一维色谱分离制备重复性考察

采用建立的分离条件重复进行 3 次一维分离，记录一维主要色谱峰的保留时间 (t_R) 和峰面积并计算 RSD (表 1)。7 个主要峰的保留时间 RSD 为 0.4%~1.9%，峰面积 RSD 为 1.5%~2.6%。浓缩、干燥 3 次一维分离 16 个富集柱得到的样品并计量其质量，计算出 RSD 为 1.2%~4.0% (表 2)，一维色谱分离制备具有良好的重复性，可以获得组成及质量稳定的组分。

2.5 一维、二维色谱分离制备结果

按照“2.2”“2.3”项的色谱条件对甘草黄酮富集物进行在线分离制备，以时间为触发点，分离制备得到 16 个馏份，重复分离至一维富集柱最大承载量。将系统的 2 位八通阀切换至二维分离状态，16

表 1 一维色谱分离保留值重复性考察

Table 1 Investigation of retention value repeatability of one-dimensional preparative chromatography

化合物	t_R /min	RSD/%	峰面积/(mAU·s)	RSD/%
F1	19.2	1.9	414 307.5	1.5
F2	32.8	1.8	615 033.8	1.9
F3	44.3	1.4	136 748.5	2.3
F4	61.2	0.5	248 340.4	1.8
F5	64.4	0.4	150 054.1	2.2
F6	70.9	0.6	299 841.4	2.6
F7	77.5	0.4	1 121 033.4	1.5

根富集柱作为二维分离制备的上样柱，以优化的二维分离条件进行二维分离制备，收集得到的色谱峰为单峰的馏分，以 MS、NMR 鉴定其结构。一维分离制备得到的 16 个部位中，Fr. 1 质量最低，为 5.71 mg，Fr. 3 号富集柱质量最多，为 41.00 mg，其他各组分质量分别在 10.00~35.00 mg。16 个富集柱富集黄酮部位的总质量为 237 mg，得率为 79%。在线二维分离制备收集得到为单峰的馏份，质量分数均大于 98%，得到单体化合物 1~9，单体化合物 1~9 的得率分别为 10.6%、28.3%、18.5%、31.4%、58.1%、32.9%、27.8%、23.3%、23.8%。通过核磁共振、质谱对其进行结构鉴定， ^{13}C -NMR 信息见表 3。

表 2 一维分离获得的黄酮部位质量重复性考察

Table 2 Investigation of flavonoids part weights repeatability of one-dimensional preparative chromatography

FC (富集柱号)	平均质量/mg	RSD/%
1	5.71	1.2
2	13.32	2.3
3	41.00	2.4
4	21.02	3.8
5	22.34	2.6
6	35.31	1.6
7	13.02	2.7
8	14.31	4.0
9	12.74	3.6
10	18.04	2.6
11	15.02	1.7
12	21.03	3.8
13	14.70	3.9
14	18.00	2.6
15	13.02	3.7
16	14.31	4.0

9 个化合物分别为甘草苷^[15] (**1**, 12 mg)、甘草素^[16] (**2**, 30 mg)、芒柄花黄素^[17] (**3**, 10 mg)、刺甘草查尔酮^[18] (**4**, 12 mg)、7,4'-二羟基黄酮^[19] (**5**, 25 mg)、4'-O-[β -D-apio-D-furanosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranosyl] liquiritigenin^[15] (**6**, 22 mg)、异甘草素^[18] (**7**, 15 mg)、甘草酚^[20] (**8**, 10 mg)、甘草香豆素^[21] (**9**, 15 mg)。

3 讨论

本实验以甘草为研究对象, 使用特异性吸附色谱填料富集得到甘草黄酮富集物, 以自主研发的制备色谱工厂系统, 采用色谱分离专家系统软件优化分离制备条件, 建立了基于分离富基模式的反相二维色谱制备分离甘草黄酮有效部位及单体化合物的方法。应用该方法分离制备可重复获得的 16 个甘草黄酮部位, 进一步分离得到 9 个单体化合物, 结构分别鉴定为甘草苷、甘草素、芒柄花黄素、刺甘草查耳酮、7,4'-二羟基黄酮、4'-O-[β -D-apio-D-furanosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranosyl] liquiritigenin、异甘草素、甘草酚、甘草香豆素。本实验建立的方法可以系统、重复、高效率地分离制备甘草中的黄酮类化学成分, 对甘草资源的综合利用和甘草黄酮活性药物开发奠定了基础。

将复杂的天然产物分离成 18 个可重复获得的

表 3 化合物 1~9 的 ¹³C-NMR 信息

Table 3 ¹³C-NMR of compounds 1—9

碳位	δ_c								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
C1	—	—	—	114.8	—	—	127.6	154.2	162.3
C2	79.3	79.6	153.4	160.3	163.4	78.6	131.8	120.6	120.6
C3	43.6	43.5	124.2	99.3	104.5	43.1	116.8	160.0	137.9
C4	191.8	192.2	176.6	161.8	176.3	189.7	160.0	99.0	158.5
C5	128.5	128.5	127.1	108.4	126.4	128.2	116.8	—	114.2
C6	110.5	110.4	115.1	130.3	114.7	110.7	131.8	158.8	159.9
C7	165.5	165.4	163.2	—	162.4	165.0	—	120.7	97.7
C8	102.5	102.5	101.9	—	102.4	102.6	—	113.7	155.8
C9	164.0	164.2	158.4	—	157.4	163.0	—	156.9	119.3
C10	113.1	113.6	116.8	—	116.1	113.3	—	98.1	106.8
C1'	133.1	130.0	124.3	129.9	121.8	132.4	114.5	22.0	153.5
C2'	127.4	127.6	129.9	131.0	128.0	127.9	165.6	122.3	102.7
C3'	116.3	114.9	115.1	115.5	115.9	116.1	103.8	131.2	155.9
C4'	157.8	157.6	158.4	162.0	160.7	157.3	167.6	16.6	106.8
C5'	116.5	114.9	115.1	115.5	115.9	116.1	108.7	24.5	131.3
C6'	127.4	127.6	129.9	131.0	128.0	127.9	133.3	—	22.3
C1''	100.9	—	—	—	—	98.8	—	—	122.5
C2''	73.5	—	—	—	—	75.9	—	—	130.9
C3''	76.6	—	—	—	—	76.1	—	—	16.6
C4''	70.0	—	—	—	—	70.0	—	—	25.3
C5''	76.8	—	—	—	—	76.7	—	—	—
C6''	61.2	—	—	—	—	60.6	—	—	—
C1'''	—	—	—	—	—	108.7	—	—	—
C2'''	—	—	—	—	—	76.8	—	—	—
C3'''	—	—	—	—	—	79.2	—	—	—
C4'''	—	—	—	—	—	64.3	—	—	—
C5'''	—	—	—	—	—	73.9	—	—	—
-O-CH ₃	—	—	54.3	55.6	—	—	—	61.9	62.2
C=O	—	—	—	187.6	—	—	192.8	—	—
α	—	—	—	118.4	—	—	118.3	—	—
β	—	—	—	138.2	—	—	145.1	—	—
C4a	—	—	—	—	—	—	—	153.4	—
C6a	—	—	—	—	—	—	—	102.5	—
C6b	—	—	—	—	—	—	—	114.8	—
C10a	—	—	—	—	—	—	—	156.8	—
C11a	—	—	—	—	—	—	—	159.3	—
C11b	—	—	—	—	—	—	—	100.1	—

组分或有效部位, 二维分离使其进一步分离得到单体化合物, 全部的分离工作在计算机控制下完成,

极大地提高了中药等天然药物系统性分离制备的效率,为中药、植物药、海洋药物有效部位、成分的制备分离、活性筛选提供了高效、可靠的平台。

参考文献

- [1] 梁鑫淼, 丰加涛, 金郁, 等. 中药质量控制技术发展展望 [J]. 色谱, 2008, 26(2): 130-135.
- [2] 沈保家, 秦昆明, 刘启迪, 等. 二维色谱技术及其在中药领域中的应用 [J]. 中国科学: 化学, 2013, 43(11): 1480-1489.
- [3] 陈学国, 孔亮, 盛亮洪, 等. 全二维液相色谱串联质谱用于银杏叶提取物成分分析的研究 [J]. 色谱, 2005, 23(1): 46-51.
- [4] 高辉, 温学森, 马小军, 等. 二维液相色谱技术在药物分析中的应用 [J]. 药物分析杂志, 2007(4): 616-620.
- [5] 张艳海, 金燕, 王峥涛. 在线二维多中心切割液相色谱法测定三七、人参及其相关产品中8种人参皂苷 [J]. 中草药, 2017, 48(5): 894-901.
- [6] 唐涛, 张维冰, 李彤, 等. 六味地黄丸组分的二维液相色谱分离 [J]. 分析化学, 2007, 35(12): 1767-1771.
- [7] 高雯, 宋慧鹏, 杨华, 等. 在线二维液相色谱技术在中药研究中的应用进展 [J]. 色谱, 2017, 35(1): 121-128.
- [8] Pan X, Liu H, Jia G, *et al.* Microwave-assisted extraction of glycyrrhizic acid from licorice root [J]. *Biochem Eng J*, 2000, 5(3): 173-177.
- [9] Pasquali R, Ambrosi B, Armanini D, *et al.* Cortisol and ACTH response to oral dexamethasone in obesity and effects of sex, body fat distribution, and dexamethasone concentrations: a dose-response study [J]. *JCEM*, 2002, 87(1): 166-175.
- [10] 赵艳敏, 刘素香, 张晨曦, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS 技术的甘草化学成分分析 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2061-2068.
- [11] Wang M, Wey S, Zhang Y, *et al.* Role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in development, cancer, and neurological disorders [J]. *Antioxid Redox Sign*, 2009, 11(9): 2307-2315.
- [12] 张娟, 刘芬, 李宁, 等. UPLC-TOF-MS 法鉴定胀果甘草药渣中黄酮类成分 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(6): 558-561.
- [13] 李怡佳. 中药化学成分系统分离策略及设备研究 [D]. 大连: 大连工业大学, 2016.
- [14] 邢倩倩, 傅青, 金郁, 等. 亲水/反相二维色谱法制备桔梗中的三萜皂苷 [J]. 色谱, 2014, 32(7): 767-772.
- [15] Nakanishi T, Inada A, Kambayashi K, *et al.* Flavonoid glycosides of the roots of *Glycyrrhiza uralensis* [J]. *Phytochemistry*, 1985, 24(2): 339-341.
- [16] Kuroyanagi M, Ueno A, Hirayama Y, *et al.* Anti-androgen active constituents from *dalbergia cochinchinensis* PIERRE [J]. *Nat Med*, 1996, 50(6): 408-412.
- [17] Yasuda T, Kano Y, Saito K, *et al.* Urinary and biliary metabolites of daidzin and daidzein in rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 1994, 17(10): 1369-1374.
- [18] Wang Y H, Hong B, Dou D Q, *et al.* Study on the flavonoids constituents of cultivated licorice [J]. *Northwest Pharm J*, 2004, 19(6): 252-253.
- [19] Shirataki Y, Yokoe I, Komatsu M. Two new flavone glycosides from the roots of *Sophora subprostrata* [J]. *IJAC*, 1986, 10(4): 327-334.
- [20] Shiozawa T, Urata S, Kinoshita T, *et al.* Revised structures of glycyrol and isoglycyrol, constituents of the root of *Glycyrrhiza uralensis* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2008, 37(8): 2239-2240.
- [21] Zeng L, Zhang R Y, Meng T, *et al.* Determination of nine flavonoids and coumarins in licorice root by high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 1990, 4(3): 247-254.