

学校编码：10384

分类号_____密级_____

学 号：21720091152188

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

葛根素单克隆抗体的制备及其应用

Preparation and Application of Monoclonal Antibody
against Puerarin

吴俊杰

指导教师姓名：徐金森副教授

专业名称：细胞生物学

论文提交日期：2012年10月

论文答辩时间：2012年11月

学位授予日期：2012年 月

答辩委员会主席：_____

评 阅 人：_____

2012年09月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为()课题(组)的研究成果，获得()课题(组)经费或实验室的资助，在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于：

() 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

() 2.不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。)

声明人（签名）：

年 月 日

目录	
摘要	1
Abstract	2
第一章 前言	4
1 葛根的研究概况	4
1.1 葛根概述.....	4
1.2 葛根的主要化学成分.....	6
1.3 葛根素(Puerarin, PU).....	9
2 单克隆抗体技术及其在中药研究中的应用	13
2.1 单克隆抗体技术.....	13
2.2 单克隆抗体技术在中药研究中的应用.....	16
3 酶联免疫吸附分析方法及人工抗原的合成	19
3.1 ELISA 技术的原理.....	19
3.2 ELISA 技术的类型.....	20
3.3 ELISA 技术的常见问题及其解决方法.....	22
3.4 人工抗原合成的常用方法.....	22
4 研究的意义和内容	23
4.1 研究的意义.....	23
4.2 研究的主要内容.....	23
第二章 材料与方	25
1 实验材料	25
1.1 主要仪器.....	25
1.2 主要试剂与材料.....	26
1.3 中药、中成药及其活性成分的标准品.....	26
1.4 常用溶液的配制.....	27
2 实验方法	28
2.1 葛根素单克隆抗体的制备.....	28
2.2 PU 的单克隆抗体的应用.....	36

第三章 结果与分析	40
1 人工抗原的合成效果	40
1.1 人工抗原合成的产率.....	40
1.2 人工抗原中连接的半抗原数目的测定.....	40
2 免疫小鼠抗血清效价的检测	42
2.1 免疫过程中小鼠的抗血清效价.....	42
2.2 细胞融合前小鼠的抗血清效价.....	43
3 细胞融合和阳性杂交瘤的筛选	44
3.1 细胞融合效果的观察.....	44
3.2 阳性杂交瘤的筛选.....	45
4 PU 单克隆抗体的大量生产	46
5 PU 单克隆抗体纯度和分子量的鉴定	47
5.1 抗体的 MALDI-TOF-MS 鉴定.....	47
5.2 抗体的 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定.....	49
6 检测 PU 含量的竞争 ELISA 方法的建立	49
6.1 测定 PU 含量的标准曲线的建立.....	49
6.2 方法的灵敏度和抗体的亲和力的测定.....	51
6.3 方法的特异性.....	54
7 中药及中成药中 PU 含量的测定	54
7.1 竞争 ELISA 法检测 PU 含量.....	54
7.2 传统的 HPLC 法检测 PU 含量.....	54
7.3 竞争 ELISA 法和 HPLC 法检测结果的比较分析.....	56
第四章 讨论与总结	57
1 讨论	57
2 总结	58
参考文献	59
致谢	67

Content

Chinese Abstract	1
English Abstract	2
Chapter One Introduction	4
1 Research Status of Pueraria	4
1.1 Overview of Pueraria	4
1.2 Chemical composition of Pueraria	6
1.3 Puerarin (PU).....	9
2 MAb in TCM Studies	13
2.1 MAb technology.....	13
2.2 Application of MAb technology in TCM.....	16
3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	19
3.1 The technical principle of ELISA experiment.....	19
3.2 The technical type of ELISA experiment.....	20
3.3 The common problems and the solutions of ELISA	22
3.4 The common method for the synthesis of artificial antigens	22
4 The Significance and the Main Work of the Study	23
4.1 The significance	23
4.2 The main work	23
Chapter Two Experiment's Materials and Methods	25
1 Materials	25
1.1 Main experimental instruments.....	25
1.2 Main reagent and materials	26
1.3 TCM and its standard ingredients	26
1.4 The preparation of common solutions.....	27
2 Methods	28
2.1 Preparation of MAb against puerarin.....	28
2.2 Application of MAb of puerarin.....	36

Chapter Three Results and Analysis	40
1 The Synthetic Effect of the Artificial Antigens	40
1.1 Productivity of the artificial antigens	40
1.2 Determination of hapten number of the artificial antigen	40
2 Determination of Titres of Antiserum of the Immune Mouse	42
2.1 Antibody titres in mouse after immunization.....	42
2.2 The titres of antiserum before cell fusion.....	43
3 Cell Fusion and Selection of Positive Hybridomas	44
3.1 The result of cell fusion.....	44
3.2 Positive hybridomas's selection	45
4 Large-scale Production of MAb against puerarin	46
5 Purification and MW of the MAb	47
5.1 Determination of MAb by MALDI-TOF-MS	47
5.2 Analysis of MAb by SDS-PAGE	49
6 Competitive ELISA Methods for PU	49
6.1 Establishment of the standard curve.....	49
6.2 The sensitivity and affinity of the method.....	51
6.3 The specificity of the method.....	54
7 Quantification of PU in TCM Extractions	54
7.1 Quantification of PU by competitive ELISA	54
7.2 Quantification of PU by HPLC	54
7.3 Comparison between competitive ELISA and HPLC	56
Chapter Four Discussion and Conclusion	57
1 Discussion	57
2 Conclusion	58
Reference	59
Acknowledgement	67

摘要

葛根为豆科植物野葛或粉葛的干燥根，为常用中药之一，具有解肌退热、生津、透疹、升阳止泻的功效，多用于治疗外感发热、头痛、项强、消渴、麻疹不透、热痢、泄泻、高血压等症状。葛根素(Puerarin, PU)是葛根的主要活性成分，属于黄酮类化合物，药理作用广泛，是一种很有开发前景的药物。

本实验采用杂交瘤技术制备葛根素的单克隆抗体，在此基础上建立葛根素的酶联免疫吸附分析法检测技术，对葛根中药及中成药中葛根素的含量进行检测和评价。

主要的实验结果如下：

(1) 采用高碘酸钠法合成免疫人工抗原 PU-BSA 和包被人工抗原 PU-HSA，经 MALDI-TOF-MS 鉴定，载体蛋白连接的半抗原数分别为 18 和 16 个。

(2) 以免疫人工抗原 PU-BSA 免疫 Bal b/C 小鼠 4 只，加强免疫 4 次后，选择效价 32,000 的 2 号小鼠作为免疫脾细胞的供体。

(3) 使用 PEG-1450 法融合小鼠免疫脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞 SP 2/0，对杂交瘤进行培养，运用有限稀释法筛选，获得 2 株稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞。

(4) 选择两株效价最高的杂交瘤细胞株 HB₈H₉A₁₀G₄ 和 IG₆H₃D₁A₁₀ 制备小鼠腹水，以 Protein G 亲和层析柱分离纯化单克隆抗体。冻干后 PU 单克隆抗体的平均产量分别为 4.74 mg/mL 和 4.73 mg/mL，单抗的分子量约为 140 kDa。

(5) HB₈H₉A₁₀G₄ 和 IG₆H₃D₁A₁₀ 单克隆抗体的性质检测结果显示，两者的 IC₅₀ 分别为 0.051 μg/mL 和 0.053 μg/mL，与 PU 结构类似物的交叉反应率小于 0.01%，亲和常数分别为 1.554×10^{-7} mol/L 和 1.357×10^{-7} mol/L，属于高亲和力抗体。

(6) 将单克隆抗体应用于葛根中药及中成药中葛根素含量的竞争 ELISA 法检测，结果与 HPLC 法的检测结果高度一致。

实验研究表明，建立 PU 的单克隆抗体技术平台测定葛根中药及中成药中 PU 含量具有切实的技术可行性。此外，葛根素单克隆抗体还可以应用于葛根素亲和层析柱分离纯化、中药复方药理的研究等方面。

关键词： 葛根素；单克隆抗体；竞争 ELISA 法；HPLC 法

Abstract

Pueraria is the dry root of *Pueraria lobata* (wild) Ohwi or *Pueraria thomsonii* Benth, one of characteristic traditional Chinese medicines, has many pharmaceutical effects, such as anti-inflammatory, reducing blood sugar, blood pressure, and so on. Pharmaceutical researches indicated that puerarin, an isoflavone, is the major pharmaceutical ingredient of herbal Pueraria, functioning lots of bio-medical effects as a promising natural drug exploration.

To develop a novel approach to fast and sensitive assay of PU, the author firstly prepared the monoclonal antibody (MAb) against PU (PU-MAb) using hybridoma technology, then successfully quantified the PU of the herbal Pueraria extracts based on the established enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In addition, PU-MAb can also be used in affinity chromatography, pharmacology and other pharmaceutical researches.

The main results are as follows:

(1) The artificial antigens PU-BSA and PU-HSA were synthesized following sodium periodate oxidation method. The hapten number of each artificial antigen was determined to be 18 and 16 by MALDI-TOF-MS.

(2) Four mice were immunized with emulsion of PU-BSA and Freund's adjuvant, and the second mouse of highest antiserum titer value (32,000) was selected and used in the following cell fusion operations.

(3) The myeloma SP 2/0 and the spleen cells of the immunized mouse were successfully fused by PEG-1450. After three rounds of limiting dilution cultures, two hybridoma cell lines secreting PU-MAb were selected.

(4) Two best hybridoma cell lines HB₈H₉A₁₀G₄ and IG₆H₃D₁A₁₀ were injected separately into the lab mice's abdominal cavity to induce ascites including PU-MAb. Protein G affinity chromatography was used to purify the PU-MAb, yielding the PU-MAb 4.74 mg/mL and 4.73 mg/mL on average. The molecule weight of the PU-MAb was evaluated to be 140 kDa.

(5) The cross-reactivities of PU-MAb and several selected PU chemical analogs were lower than 0.01%. The IC_{50} for PU-MAb was 0.051 $\mu\text{g/mL}$ for $\text{HB}_8\text{H}_9\text{A}_{10}\text{G}_4$ and 0.053 $\mu\text{g/mL}$ for $\text{IG}_6\text{H}_3\text{D}_1\text{A}_{10}$. The affinity constants of PU-MAb from two cell lines were 1.554×10^{-7} mol/L and 1.357×10^{-7} mol/L.

(6) Competitive ELISA method was established to quantify PU form herbal Pueraria extracts and several Chinese patent drugs. The results showed good agreement of ELISA and conventional HPLC determinations.

In conclusion, the established ELISA assay was sensitive and accurate in detecting PU form Pueraria extracts and Chinese patent drugs. This proved higher feasibility in TCM researches and explorations.

Keywords: Puerarin; Monoclonal Antibody; Competitive ELISA; HPLC

第一章 前言

1 葛根的研究概况

1.1 葛根概述

2005 年版的《中华人民共和国药典》中指出，葛根为蔷薇目豆科葛属植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd) Ohwi (如图 1 所示) 或甘葛藤 (习称粉葛) *Pueraria thomsonii* Benth 的干燥根^[1]。葛根是我国传统沿用的中药，用葛根治疗一般疾病和疑难杂病在我国古代的医学著作《神农本草经》、《本草纲目》、《伤寒杂病》和《医学大辞典》中早有记载。日本的《日养食》和《和歌食物本草》也记载它是有“甘淡、无毒、除热、止渴、通便、解酒、养胃”之功效。现代药理研究证明，葛根具有解肌退热、生津、透疹、升阳止泻的功效，多用于治疗外感发热、头痛、项强、消渴、麻疹不透、热痢、泄泻、高血压等症^[2]。



图 1 野葛的植株形态及其药材

Fig.1 Morphology and medicinal materials of *P.lobata* (Willd) Ohwi

1.1.1 葛属植物及其分布

葛始载于《神农本草经》，列为中品。陶宏景谓“即今之葛根，人皆蒸食之。当取入土深大者，破而日干之。”陈藏器谓“根堪作粉。”李时珍谓“其根外紫内白，长者七八尺。其叶有三尖，如枫叶而长，面青背淡。其花成穗，累累相缀，红紫色。其荚如小黄豆荚，亦有毛。”葛属植物全世界约有 20 种，主要分布于亚热带和温带地区，我国为葛属植物的资源中心，约有 9 个种和 2 个变种，集中分布在

云南及其临近省份（如表 1 所示）^[3-4]。11 种葛属植物除粉葛以人工栽培为主外，其余均以野生为主。各地药用葛根主要为野葛和粉葛，尤以野葛分布最广、产量最高、资源最多和黄酮含量最高^[5]。高效液相色谱分析表明，野葛和粉葛均以葛根素的色谱峰为主，而野葛的葛根素含量远远高于粉葛。峨眉葛的主要色谱峰为葛根素和大豆苷元，云南葛的各种成分含量均很低。从成分分析结果看，野葛的葛根素及黄酮显著高于本属的其他植物^[6-7]。故下面以野葛为主要叙述对象。

表 1 我国葛属植物的种类和分布

Tab.1 Varieties and distributions of *Pueraria* in China

中文名	学名	分布
野葛	<i>P.lobata</i> (Willd) Ohwi	全国
粉葛	<i>P.thomsonii</i> Benth	广西、广东、四川、云南
食用葛	<i>P.edulis</i> Pamp	云南、四川、广西
峨眉葛	<i>P.omeiensis</i> Wang & Tang	四川、贵州、云南
云南葛	<i>P.peduncularis</i> Grah ex Benth	云南、四川、西藏
越南葛	<i>P.montana</i> (Lour) Merr	广西、广东、福建、云南、台湾
三裂叶葛	<i>P.phaseoloides</i> (Roxb) Benth	浙江、台湾、广东、海南
萼花葛	<i>P.calycine</i> Frarcher	云南
狐尾葛	<i>P.alopercuroides</i> Craib	云南
思茅葛	<i>P.wallichii</i> DC	云南
掸邦葛	<i>P.stricta</i> Kurz	云南

1.1.2 野葛的形态特征

野葛为多年生落叶藤本植物，其块根入药，根呈圆柱形、肥厚；野葛藤长可达 10 m 以上，全株被黄褐色粗毛。叶互生，具长柄，单生或 3 叶复出；顶端小叶的柄较长，呈菱形或卵形，长 5.5~9.0 cm，宽 4.5~18 cm，顶端渐尖，基部呈圆形，有时有 3 波状浅裂，背面有粉霜，两面有毛；侧生小叶呈宽卵形，有时有裂片，基部为楔形，托叶盾形，小托叶针状。总状花序，腋生，花密集，小苞片卵形或披针形；萼片钟形，萼齿 5，上面 2 齿合生，下面 1 齿较长，内外皆有黄

色柔毛；花冠紫红色。荚果条形，长 5~10 cm，扁平，密生黄色长硬毛。种子卵圆形而扁，赤褐色，有光泽。花期 6~9 月，果期 8~10 月。

1.1.3 野葛的生境

野葛适应性强，适宜于低海拔地区生长，一般海拔在 600 m 以下地区生长良好。其多分布在向阳或背面湿润的山坡、沟谷两旁、林地路旁。喜温暖、潮湿的环境，有一定的耐寒抗旱能力，一般在 15 °C 以上开始生长发育，20~30 °C 生长迅速，25~30 °C 有利于块根的形成。野葛为喜光、短日照植物，一般 6~11 月为花果期。野葛对土壤要求不严格，但以疏松肥沃、排水良好的壤土或砂壤土为好。

1.2 葛根的主要化学成分

葛根中主要的有效成分是异黄酮类化合物以及少量的黄酮类物质，多达 30 多种^[8]，其中葛根素、大豆苷、大豆苷元和大豆苷元-4, 7-二葡萄糖苷等为异黄酮主分（如图 2 所示），也是药理作用的主要活性物质，葛根素或异黄酮含量为判断葛根品质优劣的主要指标^[9]。

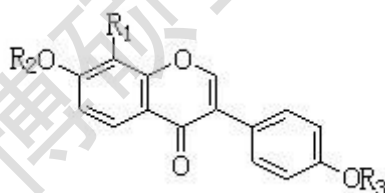


图 2 葛属植物异黄酮类化合物母核分子结构式

Fig.2 Molecular structure of isoflavonoids nucleus in Pueraria

其中，不同基团对应不同的物质（如表 2 所示）。

表 2 葛根中不同的异黄酮类物质具有不同的基团

Tab.2 Different isoflavonoids with different chemical group in Pueraria

物质	基团		
	R ₁	R ₂	R ₃
大豆苷元	H	H	H
大豆苷	H	葡萄糖	H
葛根素	葡萄糖	H	H
大豆苷元-4, 7-二葡萄糖苷	H	葡萄糖	葡萄糖

1.2.1 异黄酮类

异黄酮是葛根的主要活性成分，包括苷和苷元。Kinjo 等^[10]从野葛的根中分离得到了 15 个异黄酮类化合物，其中苷元类成分有大豆苷元(Daidein)、染料木素(Genistein)、芒柄花素(Formononetin)、香豆雌酚(Coumestrol)和异甘草素(Isoliquiritigenin)。苷类成分有葛根素(Puerarin)、大豆苷(Daidzin)、染料木苷(Genistin)、3'-羟基葛根素(3'-Hydroxypuerarin)、3'-甲氧基葛根素(3'-Methoxypuerarin)、大豆苷元芹菜糖基葡萄糖苷(Daideinapiosylglucoside)、染料木素芹菜糖基葡萄糖苷(Genisteinapiosylglucoside)、大豆苷元二葡萄糖苷(Daidzeindiglucoside)、葛根素木糖苷(Puerarinxyloside)和染料木素葡萄糖苷(Genistinglucoside)。Bhutain 等从葛属植物 *P.tuberosa* 中分离得到另一种新的异黄酮类物质 4, 6-二乙酰基葛根素。野原稔弘等还首次从葛根中分离鉴定出金雀黄素-8-芹菜糖基葡萄糖苷和大豆黄素-8-芹菜糖基葡萄糖苷两种异黄酮物质。Rong 等^[11]通过高效液相色谱(HPLC)、光二极管阵列(PDA)和质谱(MS)等检测手段，从野葛的根中鉴定出另八个异黄酮类化合物，苷类成分有葛根素葡萄糖苷(Pueraringlucoside)、3'-甲氧基大豆苷(3'-Methoxydaidzin)、3'-甲氧基木糖苷(3'-Methoxyxyloside)和 3'-Hydroxypuerarindeoxyhexoside。Hirakura 等^[12]也从野葛根中分离出两个异黄酮苷类化合物，分别为 Malonydaidzin 和 3'-Hydroxyglucosylpuerarin。Takash 等^[13]从氯化铜处理过的野葛根中分离出三个异黄酮苷元类化合物，分别为 Prenyldaidein、Prenylgenistein 和 Tuberosin。Yukio 等^[14]从野葛根中分离出两个异黄酮苷元类化合物，分别为葛香豆雌酚(Puerarol)

和 Psoralidinmethylether。葛根总黄酮含量和总黄酮中各黄酮物质的相对比例随葛根品种、产地和采收季节不同而存在较大差异^[15]。郑皓、赵冉^[16]对不同产地不同品种的葛根进行研究发现,野生粉葛、栽培粉葛、野葛和峨眉葛中异黄酮含量分别为 8.89%、9.85%、21.59%和 14.82%。冯维希等^[17]用 HPLC 法测定云台山葛根不同部位葛根素的含量,根、茎、叶和花中葛根素平均含量分别为 3.48%、1.04%、0.04%和 0.02%。刘舒平^[18]采用 HPLC 法测定葛根生品及米汤煨、麸煨、醋煨、炒炭、炒黄等炮制品中的葛根素含量,其结果分别为 5.13%、3.90%、3.93%、5.13%、2.42%和 4.90%。刘逢芹等^[19]对济南附近的野葛就不同采集时间野葛不同部位总黄酮和葛根素含量进行测定,根中葛根素和异黄酮含量分别为 5.08%和 12.50%,而茎中普遍较低,但秋冬季节采收的藤茎二者含量相对较高,分别为 2.28%和 7.14%。仲英等人的研究表明,采集季节不同,葛根总黄酮的含量存在显著差异,6 月份采集的葛根素含量高达 3.5%,8 月份则为 0.4%。葛根总异黄酮含量随产地和品种而变化,野葛中总黄酮含量一般为 7.6%,峨眉葛为 1.7%,三裂叶葛为 1.58%,云南葛为 0.5%^[8]。据报道,印度葛(*P.tuberosa* DC)^[20]和泰国葛(*P.mirifica* Shaw et Suva)^[21]均含有异黄酮类化合物葛根素、大豆苷和大豆苷元等成分。日本学者野原稔弘分析比较了中国华南产粉葛和韩国以及日本产野葛的总黄酮含量,结果表明,中国华南粉葛含量为 3.6%,而日本和韩国产野葛为 14%,存在极显著差异。

1.2.2 芳香类

Nohara 等^[22]对葛根进一步分离得到两个芳香类化合物,以前分离鉴定为葛根苷 A、B(Pueroside A、B)^[23]的结构应更正为 Butenolides。Hirakura 等^[12]分离得到一种新的芳香类化合物 Kuzubutenolide A。

1.2.3 三萜类

Arao 等^[24-26]从葛根中得到 12 个新的三萜类皂苷, Soyasaponin A₃、葛根皂苷(SA₁~SA₄)、葛根皂苷 SB₁、葛根皂苷(A₁~A₅)和葛根皂苷 C₁。Kinjo 等^[27]已从葛根醇提液过柱后的皂苷部分分离得到 7 个三萜类化合物,槐二醇、2'-羟基槐二醇、大豆苷元(A、B)、葛根苷元(A、B、C)。

1.2.4 其它成分

葛根中还含有氯化胆碱、二氯化乙酰胆碱、长塞因、甘露醇、乳酸镁、谷甾

醇、胡萝卜苷、6, 7-二甲氧基香豆素、5'-甲基海因、胆碱和乙酰胆碱等生物碱类物质^[28]。葛根中淀粉和氨基酸占有相当大的部分，葛根中含有约占鲜重20%~25%的高级淀粉和丰富的人体必需氨基酸和矿物质等营养成分，尤其是人体不能合成的必需氨基酸。范淑英等^[29]对长阳野葛研究发现，野葛根、藤中都含有较高的营养成分和药用成分，其中粗蛋白含量达16.2%。

1.3 葛根素(Puerarin, PU)

1.3.1 PU 的理化性质

PU 单体系从葛根干燥根中分离提纯而得。其化学名为 8-β-D-葡萄糖吡喃糖-4', 7-二羟基异黄酮(8-β-D-Glucopyranosyl-7-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one)。分子式是 C₂₁H₂₀O₉，分子量为 416.38^[30]，化学结构式如图 3 所示。

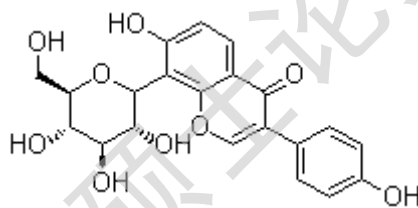


图 3 PU 的结构式

Fig.3 Chemical structure of puerarin

葛根素低含量为棕色粉末，高含量为白色针状结晶粉末（甲醇-醋酸），属于黄酮类。熔点 187~189 °C，甲醇中溶解，乙醇中略溶，水中微溶，氯仿或乙醚中不溶^[31]。葛根素的水溶性不好，在水中的溶解度为 0.46 g/100 mL。pH 值对葛根素的溶解度也有影响，葛根素络合助溶时 pH 值应在 6.5 以下。吴正红等^[32]利用分光光度法比较了 PVA、PVP、CMC-Na、MC 和 HPCM 对葛根素的助溶作用，结果表明以 PVP 的效果最佳。

1.3.2 PU 的提取分离方法

葛根素的提取方法主要有热回流法、冷浸法^[33]、逆流萃取法^[34]、超声萃取法^[35]等。最常用的方法为热回流法。李翠莲等^[36]对葛根素采取不同溶剂（水、50%乙醇、高浓度乙醇）的提取方法，并用高效液相色谱法对得到的葛根素进行含量分析，结果以高浓度乙醇提取得到的葛根素产率最高。郭建平等对葛根总黄

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.