

[J]. 华西药 学杂志, 2013, 28(4): 428-429.

[8] 韩宁娟, 方欢乐, 牛 睿, 等. 盐酸小檗碱提取方法研究进展[J]. 生物化工, 2018, 4(2): 135-137.

[9] 杨庆珍, 郑司浩, 黄林芳. 小檗碱提取方法和药理活性研究进展[J]. 中国新药杂志, 2015, 24(5): 519-525; 532.

[10] 傅灵艳, 艾琴英, 曾治君, 等. 黄连中小檗碱提取工艺研究[J]. 江西中医药大学学报, 2018, 30(5): 66-69.

[11] 范东旭. 大叶小檗 (*Berberis amurensis* Rupr.) 生药学及药理活性的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2012.

[12] 赵 磊, 张启立, 汪 洁, 等. 中心组合设计-响应面法优化新大黄牡丹汤提取工艺[J]. 中成药, 2016, 38(6): 1265-1268.

[13] 马 肖, 金永新, 陈煜娟, 等. 中心组合设计-响应面法优化复方当归补血汤提取工艺[J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25(9): 66-70.

[14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版二部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 875.

[15] 张彦辉. 高效液相色谱法测定黄连配方颗粒及饮片 中盐酸小檗碱的含量[J]. 黑龙江科技信息, 2016(35): 41.

[16] 陈 凯, 李 慧, 王佳奇, 等. 响应面法优化黄连饮片中盐酸小檗碱提取工艺[J]. 中国兽药杂志, 2016, 50(4): 21-28.

[17] 黄 潇, 肖 雄, 高文军, 等. Plackett-Burman 试验、最速上升试验及 Box-Behnken 试验联用优化 梔子多酚超声提取工艺[J]. 中国医药科学, 2015, 5(19): 61-64; 111.

[18] 漆立军, 覃鸿恩, 黄华斌. 中心组合设计-响应面法优化银杏活脑胶囊的提取工艺[J]. 医药导报, 2017, 36(6): 668-672.

[19] 王 朵, 程 方, 王赛璐, 等. 响应面中心组合设计法优化制备载磁活性炭[J]. 环境工程学报, 2016, 10(8): 4079-4086.

[20] 丁仲鹏, 毕玉芬, 戴 云, 等. 中心组合试验设计响应面分析法优化蜂胶总多酚提取工艺[J]. 食品科学, 2013, 34(2): 17-21.

[21] 王书宁, 祝洪艳, 郜玉钢, 等. 黄藤总生物碱回流提取工艺的优化[J]. 中成药, 2018, 40(6): 1399-1403.

[22] 潘诗哲, 但 凡, 樊洁敏, 等. 响应面法优化荷叶生物碱盐提取工艺及其纯化[J]. 精细化工, 2019, 36(8): 104-109; 115.

[23] 蒲忠慧, 苏海国, 王 力, 等. 正交试验法优选川芎总生物碱的提取工艺[J]. 成都中医药大学学报, 2017, 40(2): 20-24.

[24] 杨家强, 车万莉, 彭红艳, 等. Box-Behnken 响应面法优化荜茇总生物碱的提取工艺研究[J]. 中国药房, 2018, 29(13): 1802-1805.

[25] 刘 欣, 杨 新, 张 丽, 等. 星点设计-效应面法优化半枝莲总生物碱提取工艺[J]. 江汉大学学报 (自然科学版), 2016, 44(5): 448-455.

松茸水提物提取工艺优化及其单糖组成分析

李祯鑫, 黄 真, 程汝滨, 钟晓明*
(浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053)

摘要: **目的** 优化松茸水提物提取工艺, 并分析其单糖组成。**方法** 以提取温度、液料比、提取时间、提取次数为影响因素, 多糖提取率为评价指标, 正交试验优化提取工艺。水提醇沉法得到粗多糖后用三氟乙酸水解, 加入 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP) 进行衍生化, HPLC 法分析单糖组成。**结果** 最佳条件为药材加入 50 倍量水, 90 ℃ 下回流提取 2 h, 重复 3 次, 多糖提取率为 17.44%。多糖主要由甘露糖、葡萄糖、半乳糖、木糖、岩藻糖组成, 摩尔比为 1:3.39:1.19:0.24:0.40。**结论** 该方法快速稳定, 准确简便, 可用于松茸及其相关制剂的质量控制。

关键词: 松茸水提物; 提取; 单糖; 正交试验; HPLC

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)04-1008-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.04.033

松茸主要分布在吉林、云南、四川、西藏等地^[1-2], 含有多糖、多酚、麦角甾醇、挥发性有机化合物等大量活性成分^[3-4], 近年来由于其所含多糖具有较高的药用价值而受到广泛关注^[5]。研究表明, 来自松茸子实体的水溶性松茸

多糖是该药材主要有效物质之一, 具有良好的药理活性, 如抗肿瘤^[6-7]、免疫调节^[8]、抗氧化^[9], 并可通过抑制人体内黑色素瘤细胞生成黑色素来起到美白肌肤的效果^[10], 在化妆品领域有着的广阔的开发前景。

收稿日期: 2020-05-11
基金项目: 株式会社高丝研究所横向课题 (2016-HT-146)
作者简介: 李祯鑫 (1995—), 男, 硕士生, 从事中药品质评价及资源开发利用研究。Tel: 15967402713, E-mail: lzx2288@sina.com
* 通信作者: 钟晓明 (1962—), 男, 硕士, 教授, 博士生导师, 从事中药品质评价及资源开发利用研究。Tel: (0571) 61768168, E-mail: zxm_k6@sina.com

目前，松茸尚未被《中国药典》收录，其质量标准的缺乏制约了该药材及其相关制剂的开发利用。因此，本实验参考文献[11-13]报道的方法，采用正交试验优化松茸水提物提取工艺，并通过柱前衍生化 HPLC 法分析其单糖组成，以期为该药材后续开发和质量标准建立提供依据。

1 材料

1.1 仪器 高效液相色谱仪（配置 Waters 1525 二元泵、Waters 2489 紫外检测器、Waters 2707 自动进样器、Empower 2 工作站，美国 Waters 公司）；DZF 数显鼓风干燥箱（上海博讯实业有限公司）；AL104 电子天平〔梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司〕；KQ-300DE 超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；RE-52AA 旋转蒸发仪（上海亚荣生化仪器厂）；UV-1800 紫外分光光度计（日本岛津公司）；离心机（湖南湘仪实验仪器开发有限公司）。

1.2 试剂与药物 松茸于 2018 年采自云南香格里拉，经浙江中医药大学药学院中药鉴定教研室陈孔荣副教授鉴定为口蘑科口蘑属真菌松茸 *Tricholoma matsutake*。葡萄糖（批号 S10S9I69833）、甘露糖（批号 A16O6L4546）、半乳糖（批号 Z22J9H64187）、木糖（批号 B02M6W1）、岩藻糖（批号 M23F8K29918）对照品均购于上海源叶生物科技有限公司；1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮（批号 K1820098）购于阿拉丁试剂（上海）有限公司；磷酸二氢钾（批号 20181207）购于国药集团化学试剂有限公司。乙腈为色谱纯；其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 提取工艺优化

2.1.1 对照品溶液制备 精密称取葡萄糖对照品 5.74 mg，置于 25 mL 量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀，精密吸取 2.5 mL，置于 5 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀，即得（终质量浓度为 114.8 μg/mL）。

2.1.2 供试品溶液制备 称取药材粉末（过 50 目筛）0.5 g，置于 50 mL 圆底烧瓶中，室温下 4 000 r/min 离心 10 min，取上清液，置于 100 mL 量瓶中，加水定容，即得。

2.1.3 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 0.15、0.25、0.35、0.45、0.55、0.65 mL，置于 10 mL 试管中，加水至 1 mL，加入 1 mL 5% 苯酚溶液、5.0 mL 浓硫酸，摇匀，沸水浴 20 min，冷却至室温，在 490 nm 波长下检测吸光度。以多糖提取率为横坐标（*X*），吸光度为纵坐标（*A*）进行回归，得方程为 $A = 0.009\ 5X - 0.001\ 1$ （ $r = 0.999\ 5$ ），在 17.22~74.62 μg/mL 范围内线性关系良好。

2.1.4 正交试验 在前期单因素试验及方法学考察基础上，选择提取温度（*A*）、液料比（*B*）、提取时间（*C*）、提取次数（*D*）作为影响因素，多糖提取率作为评价指标（*Y*）， $L_9(3^4)$ 正交试验优化提取工艺，因素水平见表 1。精密称定药材粉末 3 份，每份 0.5 g，置于圆底烧瓶中进行回流提取，结果见表 2，方差分析见表 3。

由此可知，各因素影响程度依次为 $D>A>B>C$ ，除提取次数（ $P<0.05$ ）外各因素均无明显影响。最终确定，最优

表 1 因素水平

水平	<i>A</i> 温度/℃	<i>B</i> 液料比	<i>C</i> 提取时间/h	<i>D</i> 提取次数/次
1	80	30∶1	1	1
2	90	40∶1	2	2
3	100	50∶1	3	3

表 2 试验设计与结果

试验号	<i>A</i> 温度/℃	<i>B</i> 液料比	<i>C</i> 提取时间/h	<i>D</i> 提取次数/次	<i>Y</i> 提取率/%
1	80	30∶1	1	1	13.83
2	80	40∶1	2	2	17.13
3	80	50∶1	3	3	17.25
4	90	30∶1	2	3	17.40
5	90	40∶1	3	1	15.13
6	90	50∶1	1	2	17.36
7	100	30∶1	3	2	16.44
8	100	40∶1	1	3	16.79
9	100	50∶1	2	1	14.75
K1	16.070	15.890	15.993	14.570	—
K2	16.630	16.350	16.427	16.977	—
K3	15.993	16.453	16.273	17.147	—
R	0.637	0.563	0.434	2.577	—

表 3 方差分析

来源	离均差平方和	自由度	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
<i>A</i>	0.725	2	2.500	—
<i>B</i>	0.54	2	1.862	—
<i>C</i>	0.29	2	1.000	—
<i>D</i>	12.46	2	42.966	<0.05

工艺为药材加入 50 倍量水，在 90 ℃下回流提取 2 h，重复 3 次。

2.1.5 验证试验 精密称定 3 份药材粉末，每份 2.0 g，按优化工艺进行提取，测得提取率分别为 17.53%、17.48%、17.32%，平均 17.44%，RSD 为 0.63%，表明该工艺稳定可行。

2.2 单糖组成分析

2.2.1 色谱条件 Waters Xbridge C_{18} 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 25 mmol/L 磷酸盐缓冲液（*A*）-乙腈（*B*），梯度洗脱（1~10 min，18% *B*；10~12 min，18%~20% *B*；12~60 min，20% *B*）；体积流量 1 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 250 nm；进样量 5 μL。

2.2.2 对照品溶液制备 精密称取对照品甘露糖、葡萄糖、半乳糖、木糖、岩藻糖 10.19、25.14、11.82、3.22、2.70 mg，置于 1 mL 量瓶中，加水定容，分别精密吸取 500、350、350、150、300 μL，置于 2 mL 容量瓶中，加水定容，即得。

2.2.3 粗多糖制备 精密称取药材提取物 5.00 g，热水溶解，加 4 倍量无水乙醇沉淀，4 ℃下静置过夜，4 000 r/min 离心 10 min，弃去上清液，沉淀干燥，即得，性状为棕褐色固体粉末，质量为 0.894 g。

2.2.4 供试品溶液制备 精密称取粗多糖 10.0 mg，置于 5 mL 量瓶中，加水定容，精密吸取 1.0 mL 至 5 mL 试管中，

加入 4 mol/L 三氟乙酸 1.0 mL，橡胶塞密封，110 ℃下加热 4 h，冷却至室温，置于真空干燥箱中干燥，1.0 mL 甲醇吹洗试管，干燥，重复 3 次，200 μL 蒸馏水复溶，即得。

2.2.5 PMP 衍生化 取水解后的供试品溶液 200 μL，加入 0.5 mol/L PMP 甲醇溶液、0.3 mol/L NaOH 溶液各 200 μL，充分溶解后移至 2 mL 离心管中，70 ℃水浴加热 100 min，冷却至室温，加入 0.3 mol/L HCl，充分混匀，加入 1.0 mL 三氯甲烷充分振荡，取上清液，重复 3 次，0.22 μm 微孔滤膜过滤，即得。

2.2.6 方法学考察

2.2.6.1 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 700、550、400、250、100 μL，置于 1 mL 量瓶中，加水定容，按“2.2.5”项下方法衍生化，在“2.2.1”项色谱条件下进样测定。以各单糖质量浓度为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行回归，结果见表 4，可知均在各自范围内线性关系良好。

表 4 各单糖线性关系			
单糖	回归方程	r	线性范围/ (μg·mL ⁻¹)
甘露糖	$Y=1\,000\,000X-44\,562$	0.999 9	254.750~1 783.250
葡萄糖	$Y=8\,000\,000X+10\,329$	0.999 9	439.950~3 079.650
半乳糖	$Y=1\,000\,000X-182\,724$	0.999 9	206.850~1 447.950
木糖	$Y=1\,000\,000X+44\,287$	0.999 9	24.150~169.050
岩藻糖	$Y=9\,000\,000X-41\,757$	0.999 8	40.500~283.500

2.2.6.2 精密度试验 取对照品溶液，按“2.2.5”项下方法衍生化，在“2.2.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得甘露糖、葡萄糖、半乳糖、木糖、岩藻糖峰面积 RSD 分别为 1.26%、0.76%、0.97%、1.04%、0.65%，表明仪器精密度良好。

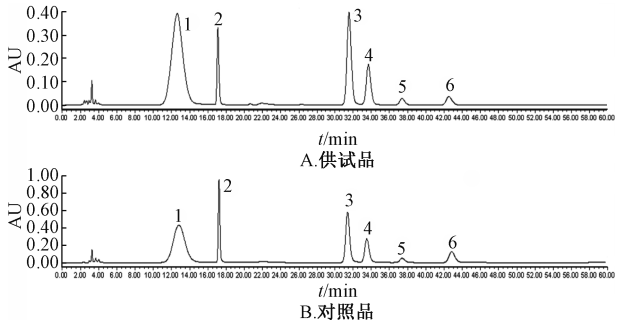
2.2.6.3 稳定性试验 精密称取粗多糖，按“2.2.4”项下方法制备供试品溶液，按“2.2.5”项下方法衍生化，于 0、2、4、8、16 h 在“2.2.1”项色谱条件下进样测定，测得甘露糖、葡萄糖、半乳糖、木糖、岩藻糖峰面积 RSD 分别为 1.13%、2.41%、1.21%、1.48%、1.31%，表明溶液在 16 h 内稳定性良好。

2.2.6.4 重复性试验 精密称取粗多糖 6 份，按“2.2.4”项下方法制备供试品溶液，按“2.2.5”项下方法衍生化，在“2.2.1”项色谱条件下进样测定，测得甘露糖、葡萄糖、半乳糖、木糖、岩藻糖峰面积 RSD 分别为 2.48%、2.13%、2.31%、1.73%、2.11%，表明该方法重复性较好。

2.2.6.5 加样回收率试验 精密称取各单糖含量已知的粗多糖 6 份，精密加入等同于样品量的对照品溶液，按“2.2.4”项下方法制备供试品溶液，按“2.2.5”项下方法衍生化，在“2.2.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，甘露糖、葡萄糖、半乳糖、木糖、岩藻糖平均加样回收率分别为 100.37%、95.21%、101.89%、103.78%、97.71%，RSD 分别为 1.38%、2.14%、1.95%、1.72%、2.72%。

2.2.7 分析结果 精密称取粗多糖 3 份，每份 10.0 mg，1010

按“2.2.4”项下方法制备供试品溶液，按“2.2.5”项下方法衍生化处理，在“2.2.1”项色谱条件下进样测定。结果显示，多糖主要由甘露糖、葡萄糖、半乳糖、木糖、岩藻糖组成，摩尔比为 1 : 3.39 : 1.19 : 0.24 : 0.40，其中葡萄糖、半乳糖、甘露糖质量占比较高，分别为 55.12%、19.41%、16.28%。HPLC 色谱图见图 1。



1. PMP 2. 甘露糖 3. 葡萄糖 4. 半乳糖 5. 木糖 6. 岩藻糖

图 1 各单糖 HPLC 色谱图

3 讨论

3.1 提取工艺选择 陈炼红^[14]等采用响应面法优化松茸多糖复合酶法提取工艺，但其最终提取率仅为 6.95%，而工艺条件要求高，成本昂贵，工业化生产限制较多。本实验采用热回流法优化提取工艺，条件温和，操作简单，松茸水提物中多糖提取率可达 17.44%，适用于工业化大规模生产。

3.2 色谱条件选择 在水相中加入适量缓冲盐时，能改善单糖衍生物的 HPLC 色谱图峰型，故本实验考察了乙酸铵、磷酸盐缓冲系统，结果发现，乙酸铵缓冲系统虽然在 pH 为 5.5 左右时可使峰型对称，拖尾程度降低，但存在缓冲盐用量大、水相易霉变、出峰时间不稳定等诸多问题，故选用磷酸盐缓冲系统，此时拖尾因子小，出峰稳定，分离度好，适用于 XBridge C₁₈ 柱对单糖衍生物的分析。

3.3 单糖组成分析 刘刚^[15]等初步确定，松茸多糖由葡萄糖、木糖和半乳糖组成；高瑞希^[16]等发现，松茸多糖含有木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖、葡萄糖醛酸。本实验采用 PMP 柱前衍生化 HPLC 法分析松茸多糖的单糖组成，发现其中同时存在甘露糖、葡萄糖、半乳糖、木糖、岩藻糖，并首次建立同时对上述 5 种单糖进行定量测定的方法，可用于松茸及其相关制剂的质量控制。

4 结论

本实验对松茸水提物提取工艺及单糖组成进行了系统研究，先采用正交试验优化提取工艺，再通过 PMP 柱前衍生化 HPLC 法分析单糖组成，发现有甘露糖、葡萄糖、半乳糖、木糖、岩藻糖 5 种，摩尔比为 1 : 3.39 : 1.19 : 0.24 : 0.40。而且，该方法准确度和精密度良好，灵敏度高，操作简便，可用于松茸多糖组成分析，也可为其他药材的相关研究提供参考依据。

参考文献：

[1] 陈 韵. 松茸多糖的提取、分离和纯化及抗氧化活性的研

究[D]. 聊城: 聊城大学, 2017.

[2] 刘 刚, 施 偲, 王 辉, 等. Box-Behnken 响应面分析法优化松茸多糖提取工艺[J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(1): 18-20.

[3] Meng X, Liang H B, Luo L X. Antitumor polysaccharides from mushrooms: A review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities [J]. *Carbohydr Res*, 2016, 424(4): 30-41.

[4] 刘 博. 松茸多糖的分离纯化与抗肿瘤活性的研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2007.

[5] 王 琪, 王 领, 何聪芬, 等. 松茸多糖 TMSP-5 亚组分 II 的美白活性及途径研究[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(1): 134-138.

[6] Ding X, Li J, Hou Y L, *et al.* Comparative analysis of macrophage transcriptomes reveals a key mechanism of the immunomodulatory activity of *Tricholoma matsutake* polysaccharide[J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(1): 503-513.

[7] 刘 刚, 王 辉, 张 洪, 等. 松茸多糖体外抗肿瘤活性研究[J]. 中华中医药学刊. 2013, 31(2): 267-270; 453.

[8] Li Q, Wang Y Z, Chen Y L, *et al.* Investigation of the immunomodulatory activity of *Tricholoma matsutake* mycelium in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(4): 4320-4326.

[9] Kim S S, Lee J S, Cho J Y, *et al.* Process development for mycelial growth and polysaccharide production in *Tricholoma matsutake* liquid culture[J]. *J Biosci Bioeng*, 2010, 109(4): 351-355.

[10] Satooka H, Cerda P, Kim H J, *et al.* Effects of matsutake mushroom scent compounds on tyrosinase and murine B16-F10 melanoma cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 487(4): 840-846.

[11] 高天慧, 陈雯清, 陈诗韵, 等. 醋制蓬莪术中总姜黄素回流提取工艺的优化[J]. 中成药, 2019, 41(5): 975-979.

[12] 李 萍, 秦国正, 付 双, 等. 打破碗花花多糖微波提取工艺的优化及其抗氧化活性[J]. 中成药, 2018, 40(4): 954-957.

[13] 李 敏, 周 静, 虞 立, 等. 丹参酮Ⅱ_A 提取工艺的优化[J]. 中成药, 2018, 40(3): 741-744.

[14] 陈炼红, 杨丽珠, 索化夷, 等. 响应面法优化松茸多糖酶法提取工艺及其体外抗氧化性分析[J]. 食品科学, 2014, 35(16): 23-28.

[15] 刘 刚, 王 辉, 周 建, 等. 柱前衍生化毛细管气相色谱法分析松茸多糖的单糖组成[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 62-64.

[16] 高瑞希, 李 竣, 柴万鹏, 等. 松茸多糖成分分析[J]. 华中师范大学学报 (自然科学版), 2013, 47(5): 658-660.

明目-11 历史沿革及临床应用

晓 琴^{1,2}, 布仁巴图^{1*}, 鲁占军¹, 苏日古嘎², 韩永青¹, 张天资¹
(1. 内蒙古民族大学附属医院, 内蒙古 通辽 028000; 2. 内蒙古民族大学蒙医药学院, 内蒙古 通辽 028000)

摘要: 蒙药明目-11 最早记载于《医法之海》, 作为传统验方是临床常用的疗效较好的蒙成药, 由诃子、红花、人工牛黄、丁香、手参、滑石、赭石 (制)、熊胆粉、朱砂、白矾砂、姜黄组成, 具有清肝热、明目功效, 对血希拉性眼疾、昏朦、目赤、翳障、干性结膜炎及眼底血管性疾病引起的视网膜、脉络膜出血、尤其湿性黄斑变性疗效确切显著, 具有潜在的开发利用价值。本文对明目-11 进行方源、方解分析, 并综述该方临床应用, 为其进一步开发利用提供科学依据。

关键词: 明目-11; 历史沿革; 临床应用

中图分类号: R29 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)04-1011-05

doi: 10. 3969/j. issn. 1001-1528. 2021. 04. 034

收稿日期: 2019-11-25
基金项目: 国家自然科学基金项目 (81760027/81860763); 内蒙古自治区自然科学基金项目 [2017MS(LH)0822]; 内蒙古卫生计生委科研项目 (201702117); 内蒙古民族大学科研项目 (NMDBS1801)
作者简介: 晓 琴 (1981—), 女, 博士生, 主任医师, 从事眼科临床、蒙药方剂配伍规律及临床研究。Tel: 04758214451, E-mail: hanxiaqin1981@126.com
*** 通信作者:** 布仁巴图 (1962—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事蒙医内科、蒙药方剂配伍规律及临床研究。E-mail: dr_burenbatu@126.com
网络出版日期: 2020-04-01
网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20200401.1122.002.html>