

UPLC 法测定不同加工方式梅花鹿鹿茸中的核苷类成分

孙印石^{1,2}, 王燕华², 王玉方¹, 陈宝², 陈丽雪²

1. 中国农业科学院特产研究所, 吉林 长春 130112

2. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

摘要: 目的 建立 UPLC 法同时测定梅花鹿鹿茸(花鹿茸)中胞嘧啶、尿嘧啶、腺嘌呤、鸟嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、尿苷、胸腺嘧啶、肌苷、鸟苷、腺苷、2'-脱氧鸟苷、 β -胸苷 13 种核苷类成分含量的方法, 研究不同加工方式的花鹿茸核苷类成分含量的差异及其在不同部位中的分布差异。方法 水超声辅助提取花鹿茸样品中的核苷类成分, 色谱柱 Acquity UPLC[®] HSS T3 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m), 乙腈(A)-0.006%甲酸水溶液(B)梯度洗脱, 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 进样量 3 μ L; 检测波长 260 nm。结果 13 种成分基本达到基线分离, 线性范围内均具有良好的线性关系($r>0.999\ 6$); 排血茸和带血茸的蜡片、粉片、纱片部位核苷类成分的总量分别是 4.47、3.95、2.68 g/kg 和 4.14、3.44、2.51 g/kg, 煮炸茸和冻干茸 3 个部位核苷类成分的量分别为 4.60、2.95、2.74 g/kg 和 5.06、4.24、2.31 g/kg。结论 就核苷类成分总量而言, 排血茸蜡片、粉片、纱片部位高于带血茸, 冻干茸蜡片、粉片部位高于煮炸茸, 纱片部位低于煮炸茸。

关键词: 核苷; 核酸碱基; 胞嘧啶; 尿嘧啶; 腺嘌呤; 鸟嘌呤; 次黄嘌呤; 黄嘌呤; 尿苷; 胸腺嘧啶; 肌苷; 鸟苷; 腺苷; 2'-脱氧鸟苷; β -胸苷; 梅花鹿; 鹿茸; 排血茸; 带血茸; 煮炸茸; 冻干茸; 蜡片; 粉片; 纱片; UPLC; 分布差异

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)04-0840-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.04.014

Simultaneous determination of nucleosides and nucleobases in *Cervi Cornu Pantotrichum* of sika deer (*Cervus nippon*) with different processing methods by UPLC

SUN Yin-shi^{1,2}, WANG Yan-hua², WANG Yu-fang¹, CHEN Bao², CHEN Li-xue²

1. Institute of Special Wild Economic Animal and Plant, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130112, China

2. College of Traditional Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: Objective To establish the method of simultaneous determination of the content of 13 nucleosides and nucleobases, including cytosine, uracil, adenine, guanine, 6-hydroxypurine, 2,6-dihydroxypurine, uridine, thymine, inosine, guanosine, adenosine, 2'-deoxyguanosine (2'-dG), beta-thymidine, in *Cervi Cornu Pantotrichum* (CCP) of sika deer (*Cervus nippon*) by UPLC, and compare the distribution differences of nucleosides and nucleobases in different zones of the CCP with different processing methods. **Methods** The nucleosides and nucleobases in CCP were extracted by water with assistance of ultrasound. Acquity UPLC HSS T3 column (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m) was used as chromatographic column to separate the nucleosides and nucleobases. Thirteen target compounds were eluted with acetonitrile 100% (eluent A) and water plus 0.006% formic acid (eluent B) at a flow rate of 0.3 mL/min. The column temperature was 30 $^{\circ}$ C, and the injection volume was 3 μ L and the detection wavelength was 260 nm. **Results** A total of 13 nucleosides and nucleobases basically reached the baseline separation with a good linearity within linear range ($r>0.999\ 6$). The nucleosides and nucleobases content in wax slices, powder slices, gauze slices of CCP without and with blood were respectively 4.47, 3.95, 2.68 g/kg and 4.14, 3.44, 2.51 g/kg. And those three parts of CCP with boiling and freeze-drying processing were respectively 4.60, 2.95, 2.74 g/kg and 5.06, 4.24, 2.31 g/kg. **Conclusion** As far as the total content of nucleosides and nucleobases were concerned, the wax slices, powder slices and gauze slices of CCP without blood were all higher than those of CCP with blood. The wax slices, powder slices of CCP with freeze-drying processing were more than those of CCP with boiling processing, while the gauze slices of

收稿日期: 2017-10-25

基金项目: 吉林省科技计划项目(20170201034YY, 20170309002YY, 20170311027YY); 中国农业科学院科技创新工程项目(CAAS-ASTIP-2016-ISAPS)

作者简介: 孙印石(1980—), 内蒙古兴安盟人, 研究员, 博士, 主要从事特种动植物贮藏与产品研发。E-mail: sunyinshi2015@163.com

which were less than those of CCP with boiling processing.

Key words: nucleosides; nucleobases; cytosine; uracil; adenine; guanine; 6-hydroxypurine; 2,6-dihydroxypurine; uridine; thymine; inosine; guanosine; adenosine; 2'-deoxyguanosine; beta-thymidine; sika deer (*Cervus nippon* Temminck); *Cervi Cornus Pantotrichum* (CCP); CCP without blood; CCP with blood; CCP with boiling processing; CCP with freeze-drying processing; wax slices; powder slices; gauze slices; UPLC; distributional difference

梅花鹿 *Cervus nippon* Temminck 系哺乳纲偶蹄目鹿科鹿属动物, 其雄鹿未骨化密生茸毛的幼角称为花鹿茸。梅花鹿主产于吉林、辽宁等地, 列属东北特种经济动物。作为与人参、貂皮齐名的“东北三宝”之一, 鹿茸富含氨基酸、多糖、脂肪酸、矿物质元素等营养物质以及核苷类、性激素类、多肽、生长因子、生物胺等多种功能性成分^[1-12]。其中, 包括核苷、碱基在内的核苷类物质是一类具有广泛生理活性的水溶性成分, 其具有的抗肿瘤^[13-14]、抗病毒^[13,15]、抗抑郁^[16-17]、神经再生^[18]等作用引起越来越多科研工作者的关注。Li 等^[19]检测到鹿茸中含有 17 种核苷类成分, Bi 等^[6]建立了 HPLC-DAD 同时测定鹿茸中 10 种核苷类成分的方法, 宗颖等^[20]从花鹿茸中分离得到 11 种核苷类成分。本研究比较了不同加工方式及不同部位花鹿茸中核苷类成分含量的差异, 旨在为花鹿茸的生产加工及质量评价提供理论依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器与设备

Acquity UPLC H-Class 超高效液相色谱仪, 四元溶剂管理器, PDA 检测器, 工作站 Empower 3.0 版本, 美国 Waters 公司; MS204S 电子分析天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; Milli-Q Advantage A10 超纯水器, 美国 Millipore 公司; WP-UP-WF-40 微量分析型超纯水机, 四川沃特尔特水处理设备有限公司; EX125DZH 电子天平, 奥豪斯仪器有限公司; XW-80A 微型漩涡混合仪, 上海沪西分析仪器有限公司; JP-100ST 超声清洗机, 广州市洁盟超声波清洗设备有限公司; TGL-16G 高速台式离心机, 上海安亭科学仪器厂。

1.2 材料

鲜鹿茸, 购自中国农业科学院特产研究所左家试验站, 经李春义研究员鉴定其为梅花鹿 *Cervus nippon* Temminck 的茸角(二杠)。参照文献方法^[21], 随机选取 3 对鲜鹿茸进行排血茸(P)与带血茸(D)的对比加工, 另取 3 对进行沸水煮炸 (boiling processing, B)与冷冻干燥(freeze-drying processing, F)的对比加工。按蜡片(wax slices, w)、粉片(powder

slices, p)、纱片 (gauze slices, g) 将加工完的鹿茸分别进行切片、分段、粉碎、过筛 (40 目)、装袋, 标记对应的名称见表 1。

表 1 样品名称与符号简写

Table 1 Sample names and corresponding shorthand symbols

样品名称	符号简写	样品名称	符号简写
排血茸蜡片	Pw	带血茸蜡片	Dw
排血茸粉片	Pp	带血茸粉片	Dp
排血茸纱片	Pg	带血茸纱片	Dg
煮炸茸蜡片	Bw	冻干茸蜡片	Fw
煮炸茸粉片	Bp	冻干茸粉片	Fp
煮炸茸纱片	Bg	冻干茸纱片	Fg

1.3 试药

对照品尿嘧啶 (批号 TM0313XB13)、胞嘧啶 (批号 TN1128XA13)、腺嘌呤 (批号 X18N6M6005)、鸟嘌呤 (批号 KM0522CA14)、次黄嘌呤 (批号 TM0313XC13)、黄嘌呤 (批号 AJ0722MA14)、尿苷 (批号 TM0313XA13)、胸腺嘧啶 (批号 140708-200401)、肌苷 (批号 TJ0623XA13)、鸟苷 (批号 AJ0609NA14)、腺苷 (批号 KM0529CA14)、2'-脱氧鸟苷 (批号 N07A7W12580)、 β -胸苷 (批号 DN1122WB13), 均购自上海源叶生物科技有限公司, HPLC 测定质量分数均 $\geq 98\%$ 。甲酸, 美国 Mreda 公司; 乙腈, 美国 Honeywell 公司; 均为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Acquity UPLC[®] HSS T3 柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m); 流动相为乙腈-0.006%甲酸水溶液, 洗脱程序: 0~1 min, 0.006%甲酸水溶液; 1~8 min, 0~8%乙腈; 8~9 min, 8%~15%乙腈; 9~10.5 min, 15%乙腈; 10.5~11 min, 15%~0 乙腈; 11~15 min, 0.006%甲酸水溶液; 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 进样量 3 μ L; 检测波长 260 nm。

2.2 对照品溶液的配制

精密称取胞嘧啶、尿嘧啶、腺嘌呤、鸟嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、尿苷、胸腺嘧啶、肌苷、鸟苷、

腺苷、2'-脱氧鸟苷、 β -胸苷 13 种对照品 5 mg, 分别置于 10 mL 量瓶中, 鸟嘌呤、黄嘌呤加 0.1% 氢氧化钾溶液, 其他对照品加超纯水溶解, 室温定容。取各对照品溶液 2 mL 于 50 mL 量瓶中, 超纯水定容, 配制成混合对照品母液。

2.3 供试样品溶液的配制

准确称取花鹿茸样品粉末 0.10 g, 置于 4 mL 离心管, 准确加入 3 mL 蒸馏水, 涡旋使样品与液体充分接触, 密封冷藏过夜。超声辅助萃取 60 min 后, 13 000 r/min 离心 10 min。上清液经 0.22 μ m 水系微孔滤膜滤过至进样瓶, 进样测定。13 种核苷类组对照品色谱图及花鹿茸样品色谱图见图 1。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察

依次精密吸取混合对照品母

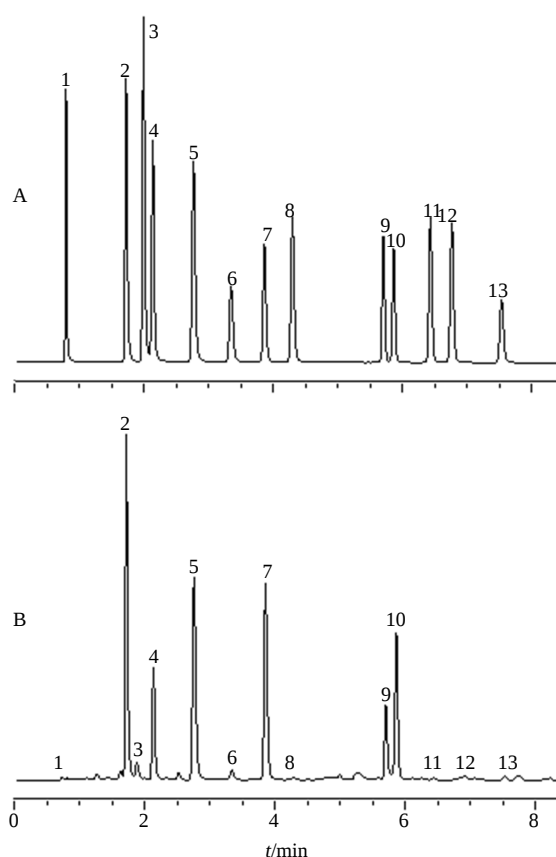
液 1、2、3、4、5、6、8、10 mL 于 10 mL 量瓶中, 定容至刻度, 摇匀, 配制成系列质量浓度的混合对照品溶液, 按“2.1”项下的色谱条件进行测定, 以峰面积 (Y) 对质量浓度 (X) 进行线性回归, 绘制标准曲线, 得到 13 种核苷类成分的线性回归方程。逐级稀释混合标准品母液, 按信噪比 (S/N) = 3 计算检出限, 按 $S/N=10$ 计算定量限。结果见表 2。

2.4.2 精密度试验 取同一混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 按“2.1”项下的色谱条件测定, 计算各成分峰面积的相对标准偏差 (RSD) 值。结果胞嘧啶、尿嘧啶、腺嘌呤、鸟嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、尿苷、胸腺嘧啶、肌苷、鸟苷、腺苷、2'-脱氧鸟苷、 β -胸苷峰面积的 RSD 值分别是 0.20%、0.29%、0.10%、0.48%、0.28%、0.27%、0.18%、0.11%、0.11%、0.11%、0.07%、0.09%、0.22%。

2.4.3 重复性试验 准确称取花鹿茸样品 Pg 0.10 g, 6 份, 按“2.3”项下方法制备供试样品溶液, 按“2.1”项色谱条件测定, 对各成分峰面积积分, 计算 RSD 值。结果胞嘧啶、尿嘧啶、腺嘌呤、鸟嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、尿苷、胸腺嘧啶、肌苷、鸟苷、腺苷、2'-脱氧鸟苷、 β -胸苷质量浓度的 RSD 值分别是 0%、1.25%、1.34%、1.80%、1.46%、1.29%、1.71%、1.71%、1.80%、1.59%、1.28%、0%、1.86%。

2.4.4 稳定性试验 取同一花鹿茸样品的供试样品溶液, 按“2.1”项下色谱条件分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样测定, 对各成分峰面积积分, 计算 RSD 值。结果胞嘧啶、尿嘧啶、腺嘌呤、鸟嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、尿苷、胸腺嘧啶、肌苷、鸟苷、腺苷、2'-脱氧鸟苷、 β -胸苷峰面积的 RSD 值分别是 0%、0.22%、1.53%、0.83%、0.42%、1.63%、0.62%、1.70%、1.10%、0.97%、1.32%、0%、0.98%。

2.4.5 加样回收率试验 准确称取已知各成分量的同一花鹿茸样品 6 份, 每份 0.05 g, 精密加入含胞嘧啶 2.06 μ g/mL、尿嘧啶 20.12 μ g/mL、腺嘌呤 2.04 μ g/mL、鸟嘌呤 19.12 μ g/mL、次黄嘌呤 20.32 μ g/mL、黄嘌呤 1.72 μ g/mL、尿苷 20.20 μ g/mL、胸腺嘧啶 2.05 μ g/mL、肌苷 20.32 μ g/mL、鸟苷 16.32 μ g/mL、腺苷 2.02 μ g/mL、2'-脱氧鸟苷 2.02 μ g/mL、 β -胸苷 1.88 μ g/mL 的混合对照品溶液 10 mL, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 对各成分峰面积进行积分, 计算加样回收率的平均值。结果 13 种成分的平均加样回收率分别为 92.13%、98.58%、97.46%、96.84%、100.91%、94.45%、



1-胞嘧啶 2-尿嘧啶 3-腺嘌呤 4-鸟嘌呤 5-次黄嘌呤 6-黄嘌呤
7-尿苷 8-胸腺嘧啶 9-肌苷 10-鸟苷 11-腺苷 12-2'-脱氧鸟苷
13- β -胸苷
1-cytosine 2-uracil 3-adenine 4-guanine 5-6-hydroxypurine
6-2,6-dihydroxypurine 7-uridine 8-thymine 9-inosine 10-guanosine
11-adenosine 12-2'-deoxyguanosine 13-beta-thymidine

图1 核苷类成分对照品 (A) 及鹿茸样品 (B) UPLC 图
Fig. 1 UPLC of reference substances (A) and CCP samples (B) of nucleosides and nucleobases

97.27%、95.38%、98.51%、93.35%、101.74%、93.25%、96.39%，RSD 分别为 3.25%、2.87%、2.31%、3.89%、2.03%、2.56%、3.54%、4.91%、4.42%、2.59%、3.41%、4.83%、3.05%。

2.5 样品定量测定

准确称取花鹿茸样品粉末，每个样品 3 份，按

“2.3”项下方法制备供试样品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定，结果如表 3 和表 4 所示。

2.5.1 排血茸与带血茸核苷类成分的比较 由表 3 可知，各核苷类组分在排血茸与带血茸不同部位的分布规律相似。胞嘧啶、尿嘧啶、腺嘌呤、鸟嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、胸腺嘧啶、肌苷、腺苷、 β -胸

表 2 核苷类成分的回归方程、检出限、定量限

Table 2 Regression equation, detection limit and quantitative limit of nucleosides and nucleobases

成分	回归方程	R^2	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	检出限/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	定量限/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$
胞嘧啶	$Y=189.81 X+83.69$	0.999 95	2.06~20.64	10.32	34.40
尿嘧啶	$Y=240.78 X+73.21$	0.999 97	2.01~20.12	10.06	33.53
腺嘌呤	$Y=307.35 X+55.61$	0.999 94	2.04~20.44	10.22	34.07
鸟嘌呤	$Y=178.44 X+115.93$	0.999 66	1.91~19.12	19.12	63.73
次黄嘌呤	$Y=191.62 X+17.71$	0.999 94	2.03~20.32	20.32	67.73
黄嘌呤	$Y=156.18 X+72.33$	0.999 96	1.72~17.20	17.20	57.33
尿苷	$Y=139.64 X+46.91$	0.999 96	2.02~20.20	20.20	67.33
胸腺嘧啶	$Y=194.63 X+69.05$	0.999 95	2.05~20.48	20.48	68.27
肌苷	$Y=86.91 X+29.52$	0.999 93	2.03~20.32	20.32	67.73
鸟苷	$Y=121.96 X+33.42$	0.999 92	1.63~16.32	16.32	54.40
腺苷	$Y=139.86 X+49.63$	0.999 95	2.02~20.24	20.24	67.47
2'-脱氧鸟苷	$Y=172.51 X+25.87$	0.999 87	2.02~20.20	20.20	67.33
β -胸苷	$Y=108.97 X+30.12$	0.999 97	1.88~18.80	18.80	62.67

表 3 排血茸与带血茸核苷类成分测定结果

Table 3 Nucleosides and nucleobases content in CCP without and with blood (mg/kg)

样品名称		质量分数/ $(\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1})$						
		胞嘧啶	尿嘧啶	腺嘌呤	鸟嘌呤	次黄嘌呤	黄嘌呤	尿苷
蜡片	Pw	4.37 ± 0.09^b	$1\ 011.33 \pm 5.51^a$	22.76 ± 1.03^b	358.86 ± 2.83^b	$1\ 044.49 \pm 5.32^a$	73.13 ± 1.50^a	805.64 ± 3.74^b
	Dw	4.82 ± 0.03^a	969.34 ± 0.90^b	25.63 ± 0.33^a	368.15 ± 0.67^a	$1\ 013.05 \pm 5.50^b$	62.29 ± 0.53^b	699.14 ± 0.30^d
粉片	Pp	2.83 ± 0.41^c	668.06 ± 1.29^d	4.33 ± 0.10^c	347.16 ± 1.54^c	706.59 ± 2.23^c	54.68 ± 1.32^d	885.37 ± 2.97^a
	Dp	3.13 ± 0.02^c	710.66 ± 2.28^c	3.71 ± 0.37^c	337.83 ± 6.40^d	697.64 ± 4.41^d	59.89 ± 2.43^c	672.24 ± 5.20^e
纱片	Pg	2.29 ± 0.07^d	264.25 ± 0.54^e	1.87 ± 0.06^d	266.42 ± 0.11^e	395.91 ± 0.87^f	21.06 ± 0.12^e	785.65 ± 0.27^c
	Dg	—	247.71 ± 0.36^f	1.93 ± 0.02^d	242.87 ± 1.11^f	403.25 ± 1.72^e	15.51 ± 0.45^f	786.29 ± 0.73^c
样品名称		质量分数/ $(\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1})$						
		胸腺嘧啶	肌苷	鸟苷	腺苷	2'-脱氧鸟苷	β -胸苷	总量
蜡片	Pw	13.88 ± 0.39^a	531.09 ± 2.84^a	514.50 ± 2.85^d	34.81 ± 1.29^b	8.82 ± 0.20^a	41.75 ± 1.38^a	$4\ 465.43 \pm 8.40^a$
	Dw	12.67 ± 0.17^b	428.60 ± 0.99^c	424.96 ± 0.62^f	94.54 ± 0.45^a	1.92 ± 0.03^d	35.29 ± 0.15^b	$4\ 140.40 \pm 4.08^b$
粉片	Pp	12.84 ± 0.56^b	512.76 ± 5.60^b	714.31 ± 4.50^a	7.83 ± 0.12^c	6.41 ± 0.23^b	24.81 ± 0.74^d	$3\ 947.98 \pm 8.00^c$
	Dp	10.88 ± 0.60^c	349.47 ± 0.89^e	551.06 ± 1.77^c	6.32 ± 0.10^d	4.23 ± 0.33^c	30.98 ± 0.03^c	$3\ 438.05 \pm 24.38^d$
纱片	Pg	2.04 ± 0.12^d	355.81 ± 0.96^d	570.15 ± 0.34^b	4.94 ± 0.17^e	0.66 ± 0.09^e	11.14 ± 0.32^f	$2\ 682.20 \pm 2.26^e$
	Dg	1.11 ± 0.01^e	323.57 ± 1.01^f	471.80 ± 0.57^e	4.28 ± 0.15^e	—	14.25 ± 0.01^e	$2\ 512.58 \pm 3.54^f$

同一列上标字母相同表示没有显著性差异 ($P>0.05$)，否则有显著性差异 ($P<0.05$)；“—”表示含量低于定量限或检出限，下同

The superscripts in the same row containing the same letter indicates that there is no significant difference ($P>0.05$); otherwise there is significant difference ($P<0.05$); That the symbol “—” means the content is lower than quantitative limit or detection limit, same as below

表 4 煮炸茸与冻干茸核苷类成分测定结果

Table 4 Nucleosides and nucleobases content in CCP with boiling and freeze-drying processing

样品名称	质量分数/(mg·kg ⁻¹)						
	胞嘧啶	尿嘧啶	腺嘌呤	鸟嘌呤	次黄嘌呤	黄嘌呤	尿苷
蜡片 Bw	—	899.95±4.62 ^a	6.25±0.01 ^c	424.63±1.06 ^c	773.78±2.19 ^b	25.07±0.94 ^b	524.50±0.84 ^e
Fw	8.05±0.23 ^a	739.91±5.80 ^b	25.46±1.73 ^a	619.83±3.46 ^b	1 163.03±34.65 ^a	38.15±1.22 ^a	1 087.44±12.76 ^a
粉片 Bp	1.27±0.03 ^d	518.32±5.30 ^d	0.62±0.02 ^d	264.46±9.44 ^e	457.26±9.13 ^d	15.48±0.42 ^c	504.32±4.11 ^f
Fp	2.85±0.11 ^b	642.98±6.91 ^c	9.55±0.03 ^b	875.63±16.01 ^a	1 140.36±6.24 ^a	24.85±1.12 ^b	1 052.03±9.24 ^b
纱片 Bg	1.34±0.10 ^d	324.74±1.11 ^e	—	239.49±4.52 ^d	382.64±0.96 ^e	9.65±0.26 ^d	726.70±1.68 ^c
Fg	1.65±0.25 ^c	225.54±0.46 ^f	5.66±0.19 ^c	332.57±1.50 ^f	545.70±3.90 ^c	9.69±0.24 ^d	592.11±6.61 ^d

样品名称	质量分数/(mg·kg ⁻¹)						
	胸腺嘧啶	肌苷	鸟苷	腺苷	2'-脱氧鸟苷	β-胸苷	总量
蜡片 Bw	14.58±0.29 ^a	755.81±4.22 ^a	1 113.04±4.92 ^a	36.11±1.89 ^b	0.32±0.01 ^b	28.45±0.48 ^d	4 602.48±11.29 ^b
Fw	8.73±0.31 ^c	507.33±4.93 ^b	773.64±16.02 ^b	38.32±0.50 ^a	—	51.43±0.72 ^a	5 061.32±64.39 ^a
粉片 Bp	10.48±0.57 ^b	457.95±0.48 ^c	648.64±1.88 ^c	28.62±0.97 ^c	0.15±0.01 ^c	37.51±0.65 ^c	2 945.07±26.88 ^d
Fp	7.06±0.35 ^d	176.22±2.03 ^f	248.70±1.90 ^f	14.79±0.03 ^e	0.54±0.06 ^a	48.73±1.73 ^b	4 244.28±41.79 ^c
纱片 Bg	3.68±0.01 ^e	405.61±4.47 ^d	599.07±9.57 ^d	16.79±0.01 ^d	—	28.91±0.48 ^d	2 738.62±12.80 ^e
Fg	—	272.19±5.07 ^e	289.37±1.96 ^e	11.50±0.10 ^f	—	23.03±0.27 ^e	2 309.02±19.07 ^f

苷等组分在排血茸与带血茸不同部位的含量均表现为蜡片>粉片>纱片；尿苷、鸟苷在蜡片、粉片、纱片部位的分布则相对较为均匀，而且鸟苷的分布呈现粉片>纱片>蜡片的趋势。2'-脱氧鸟苷在不同部位的分布无明显规律，可能是由于其本身在鹿茸中的含量较低，在样品前处理、色谱分析、数据处理等环节出现的人为或系统误差均会引起其最终结果的较大变化。13种成分中以尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷占比较大，这可能也是人们早期对这几种核苷类成分研究较多的原因之一。尿嘧啶在排血茸与带血茸蜡片、粉片、纱片部位的含量分别为1 011.33、668.06、264.25 mg/kg 和 969.34、710.66、247.71 mg/kg；次黄嘌呤在排血茸与带血茸蜡片、粉片、纱片部位的含量依次为1 044.49、706.59、395.91 mg/kg 和 1 013.05、697.64、403.25 mg/kg；尿苷在排血茸与带血茸蜡片、粉片、纱片部位的含量分别是805.64、885.37、785.65 mg/kg 和 699.14、672.24、786.29 mg/kg。

核苷类成分的总量在排血茸与带血茸不同部位的分布规律相似，即蜡片部位最高，粉片部位次之，纱片部位最低。排血茸蜡片、粉片、纱片部位核苷类成分的总量分别为4.47、3.95、2.68 mg/kg，带血茸蜡片、粉片、纱片部位核苷类成分的总量分别为4.14、3.44、2.51 mg/kg。对不同部位之间的核苷类

成分总量做显著性差异分析，结果表明，排血茸蜡片部位与粉片部位差异极显著 ($P<0.01$)，粉片部位与纱片部位差异极显著 ($P<0.01$)；带血茸蜡片部位与粉片部位差异极显著 ($P<0.01$)，粉片部位与纱片部位差异极显著 ($P<0.01$)。蜡片部位，排血茸高于带血茸，差异极显著 ($P<0.01$)；粉片部位，排血茸高于带血茸，差异极显著 ($P<0.01$)；纱片部位，排血茸高于带血茸，差异极显著 ($P<0.01$)。

2.5.2 煮炸茸与冻干茸核苷类成分的比较 煮炸茸与冻干茸核苷类组分的含量差异较为明显，其不同部位的分布规律也有所差异。尿嘧啶、腺嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、胸腺嘧啶、腺苷等组分在煮炸茸与冻干茸中的分布趋势相同，即蜡片>粉片>纱片。鸟嘌呤、肌苷、鸟苷、2'-脱氧鸟苷等组分的含量在煮炸茸中呈蜡片>粉片>纱片的趋势，但这几种组分在冻干茸中则无相同分布规律。胞嘧啶、尿苷、β-胸苷等组分在冻干茸不同部位呈现蜡片>粉片>纱片，但其在煮炸茸中的分布则无明显规律。腺嘌呤、鸟嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤等嘌呤类组分在冻干茸中的含量明显高于煮炸茸，胞嘧啶也具有相似规律；肌苷和鸟苷则表现为相反的情况，即在煮炸茸中的含量高于冻干茸。

煮炸茸与冻干茸核苷类成分总量的分布趋势基

本一致,即蜡片>粉片>纱片。煮炸茸蜡片、粉片、纱片部位核苷类成分的量依次是 4.60、2.95、2.74 g/kg,冻干茸不同部位的含量分别是 5.06、4.24、2.31 g/kg。

3 讨论

3.1 提取工艺的优化

参考文献方法^[22-26],对提取溶剂(蒸馏水、10%甲醇、50%乙醇)、物料固液比(1:10、1:20、1:30)、提取温度(常温、50℃)、提取时间(30、60 min)进行方法预实验。按相同色谱条件分析不同提取方法得到的样品供试液,结果表明,蒸馏水提取液中核苷类成分出峰较多且各成分峰面积最大,50%乙醇提取液中未检测到目标待测物;按物料固液比 1:10 得到的供试样品溶液较难经过微孔滤膜,按 1:20 和 1:30 的物料固液比制备的供试品溶液可得到紫外吸收强度适中的色谱峰;50℃超声提取后的供试品溶液较难滤过,可能是由于在较高温度下多糖等成分溶出;适当增加提取时间可提高提取率。最终采用蒸馏水,物料固液比 1:30,常温超声提取 60 min。

3.2 色谱条件的选择

由于核苷类成分极性大,具有良好的水溶性,故本研究选用高耐水性的 Acquity UPLC[®] HSS T3 色谱柱。流动相先后采用乙腈-水和乙腈-甲酸水,不断调试甲酸、水的体积比,比较 13 种核苷类成分的分离效果,最终采用乙腈-0.006%甲酸水作为流动相。对混合对照品溶液在 210~400 nm 波长内进行全波长扫描,13 种核苷类成分的最大吸收波长分别是 274.9、258.4、262.0、247.3、249.2、266.9、262.0、264.5、248.5、253.5、252.8、258.4、266.9 nm,综合考虑各成分紫外吸收强度及分离效果,最终采用 260 nm 波长进行检测。

3.3 花鹿茸中的核苷类成分

13 种核苷类成分在花鹿茸中均检测到,尤以尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷、鸟嘌呤、肌苷、鸟苷等成分的含量较高,以排血茸蜡片为例,这几种成分的量分别是 1 011.33、1 044.49、805.64、358.86、531.09、514.50 mg/kg;腺嘌呤、黄嘌呤、胸腺嘧啶、腺苷、β-胸苷等成分次之,排血茸蜡片中这几种核苷类成分的量依次为 22.76、73.13、13.88、34.81、41.75 mg/kg;胞嘧啶、2'-脱氧鸟苷最少,排血茸蜡片中这两种成分的量分别是 4.37、8.82 mg/kg。

综上所述,排血茸蜡片、粉片、纱片 3 个部位

核苷类成分的量均高于带血茸($P<0.01$),冻干茸蜡片、粉片部位高于煮炸茸($P<0.01$),纱片部位低于煮炸茸($P<0.01$)。

参考文献

- [1] Sui Z, Zhang L, Huo Y, et al. Bioactive components of velvet antlers and their pharmacological properties [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 87(1): 229-240.
- [2] 王燕华, 张秀莲, 赵 卉, 等. 不同加工方式对鹿茸中粗蛋白与水解氨基酸量的影响研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(15): 3085-3091.
- [3] Tseng S H, Sung C H, Chen L G, et al. Comparison of chemical compositions and osteoprotective effects of different sections of velvet antler [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151(1): 352-360.
- [4] Estevez J A, Landete-Castillejos T, Martínez A, et al. Antler mineral composition of Iberian red deer *Cervus elaphus hispanicus* is related to mineral profile of diet [J]. *Acta Theriol (Warsz)*, 2009, 54(3): 235-242.
- [5] 王燕华, 金春爱, 孙印石, 等. 不同加工方式的鹿茸脂肪酸的气相色谱分析 [J]. *中草药*, 2017, 48(12): 2431-2441.
- [6] Bi D, Zhang L M L, Tang W L, et al. Quantitative analysis of nucleosides and nucleobases in deer antler: variation in different species [J]. *Pharm Anal Acta*, 2016, 7(4): 474.
- [7] Lu C, Wang M, Mu J, et al. Simultaneous determination of eighteen steroid hormones in antler velvet by gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2013, 141(3): 1796-1806.
- [8] 周 冉, 王 飞, 郝 洁, 等. 超滤浓缩技术分离鹿茸中胰岛素样生长因子-1 [J]. *中草药*, 2013, 44(10): 1257-1262.
- [9] Ma C, Long H, Yang C, et al. Anti-inflammatory role of pilose antler peptide in LPS-induced lung injury [J]. *Inflammation*, 2017, 40(3): 904-912.
- [10] Cox H D, Eichner D. Detection of human insulin-like growth factor-1 in deer antler velvet supplements [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2013, 27(19): 2170-2178.
- [11] 王 楠, 高晓霞, 代子彦, 等. 鹿茸药效物质基础、药理作用、临床应用及质量控制的研究进展 [J]. *中草药*, 2017, 48(22): 4784-4790.
- [12] 桂丽萍, 郭 萍, 郭远强. 鹿茸化学成分和药理活性研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2010, 33(3): 237-240.
- [13] Baker D C, Chu C K. *Nucleosides and Nucleotides as Antitumor and Antiviral Agents* [M]. Berlin: Springer, 2012.

- [14] Lee Y S, Park S M, Kim H M, *et al.* C5-Modified nucleosides exhibiting anticancer activity [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2009, 19(16): 4688-4691.
- [15] Arribas J R, Delgado R, Arranz A, *et al.* Lopinavir-ritonavir monotherapy versus lopinavir-ritonavir and 2 nucleosides for maintenance therapy of HIV: 96-week analysis [J]. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2009, 51(2): 147-152.
- [16] Gonçalves F M, Neis V B, Rieger D K, *et al.* Signaling pathways underlying the antidepressant-like effect of inosine in mice [J]. *Purinergic Signal*, 2017, 13(2): 203-214.
- [17] Bettio L E B, Neis V B, Pazini F L, *et al.* The antidepressant-like effect of chronic guanosine treatment is associated with increased hippocampal neuronal differentiation [J]. *Eur J Neurosci*, 2016, 43(8): 1006-1015.
- [18] Ribeiro F F, Xapelli S, Miranda-Lourenço C, *et al.* Purine nucleosides in neuroregeneration and neuroprotection [J]. *Neuropharmacology*, 2016, 104(5): 226-242.
- [19] Li F, Duan J, Qian D, *et al.* Comparative analysis of nucleosides and nucleobases from different sections of *Elaphuri Davidiani Cornu* and *Cervi Cornu* by UHPLC-MS/MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 83(9): 10-18.
- [20] 宗颖, 张辉, 牛晓晖, 等. 梅花鹿茸生物碱类成分及其对小鼠脾细胞增殖的影响 [J]. *中药材*, 2014, 37(5): 752-755.
- [21] 李和平, 王春生. 生态养鹿 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2011.
- [22] Guo S, Duan J, Qian D, *et al.* Content variations of triterpenic acid, nucleoside, nucleobase, and sugar in jujube (*Ziziphus jujuba*) fruit during ripening [J]. *Food Chem*, 2015, 167(2): 468-474.
- [23] Zhou G, Pang H, Tang Y, *et al.* Hydrophilic interaction ultra-performance liquid chromatography coupled with triple-quadrupole tandem mass spectrometry (HILIC-UPLC-TQ-MS/MS) in multiple-reaction monitoring (MRM) for the determination of nucleobases and nucleosides in ginkgo seeds [J]. *Food Chem*, 2014, 150(9): 260-266.
- [24] Du L, Qian D, Jiang S, *et al.* Comparative characterization of nucleotides, nucleosides and nucleobases in *Abelmoschus manihot* roots, stems, leaves and flowers during different growth periods by UPLC-TQ-MS/MS [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2015, 1006(23): 130-137.
- [25] Wang H, Wu Q, Wu C, *et al.* Simultaneous determination of 16 nucleosides and nucleobases in *Euryale ferox* Salisb. by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem triple quadrupole mass spectrometry (HPLC-ESI-TQ-MS/MS) in multiple reaction monitoring (MRM) mode [J]. *J Chromatogr Sci*, 2015, 53(8): 1386-1394.
- [26] 樊修和, 吴启南, 蒋征, 等. UPLC-MS/MS法测定不同产地浮萍中9种核苷类成分的量 [J]. *中草药*, 2015, 46(21): 3253-3257.