

基于主成分分析和聚类分析的发酵虫草菌粉类产品氨基酸比较研究

赵加茜¹, 朱卫丰¹, 陈丽华^{1*}, 管咏梅¹, 周国平², 周敏², 杨明³

1. 江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

2. 江西省药品检验检测研究院, 江西 南昌 330029

3. 江西国药有限责任公司, 江西 南昌 330052

摘要: 目的 分析不同发酵虫草菌粉类产品氨基酸的含量差异, 结合聚类分析和主成分分析法评价发酵虫草菌粉类产品的质量。方法 采用氨基酸自动分析仪测定氨基酸含量, 色谱柱为 LCA K06/Na 离子柱, 流动相为柠檬酸钠 0.06 mol/L (pH 3.45) (A) -柠檬酸钠 0.1 mol/L (pH 10.85) (B), 梯度洗脱: 0~3.5 min, 100% A; 3.5~11.0 min, 85% A; 11.0~17.0 min, 80% A; 17.0~23.5 min, 67% A; 23.5~28.0 min, 20% A; 28.0~45.0 min, 100% B, 体积流量为 0.45 mL/min 洗脱泵+0.25 mL/min 衍生泵; 检测波长 440 nm (脯氨酸)+570 nm (其余氨基酸); 温度为 58~74 °C 梯度控温, 进样 50 µL, 外标法测定氨基酸含量。结果 分别对 3 种发酵虫草菌粉类产品 A、B、C 中氨基酸进行含量测定, 产品 A 总氨基酸质量分数为 251.82~265.93 mg/g, 产品 B 总氨基酸质量分数为 279.67~333.40 mg/g, 产品 C 总氨基酸质量分数为 321.37~370.86 mg/g, 样品各批次间一致性较好。产品 A 和产品 B 为同一原料药, 氨基酸含量差异不明显, 产品 C 中组氨酸和精氨酸含量与产品 A 和产品 B 存在较大差异。主成分分析筛选的前 3 个主成分的累积方差贡献率达到 93.551%, 包含了各样品中氨基酸含量的大部分信息。聚类分析将 30 批样品聚为 2 类, 其中产品 A 和产品 B 聚为一类, 产品 C 聚为一类, 聚类分析结果与实际情况相符。变量聚类分析表明当氨基酸变量聚为 5 类时, 随机选择其中的 5 个变量能够准确反映发酵虫草菌粉氨基酸的质量。结论 通过氨基酸含量差异研究, 能够有效区别不同发酵虫草菌粉类产品, 结合主成分分析和聚类分析能够客观评价发酵虫草菌粉类产品的质量。

关键词: 主成分分析; 聚类分析; 发酵虫草菌粉; 氨基酸; 质量控制

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)12-2866-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.12.019

Comparative study on amino acids of fermented *Cordyceps* powder products based on principal component analysis and cluster analysis

ZHAO Jia-qian¹, ZHU Wei-feng¹, CHEN Li-hua¹, GUAN Yong-mei¹, ZHOU Guo-ping², ZHOU Min², YANG Ming³

1. Key Laboratory for Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. Jiangxi Provincial Research Institute For Drug Control, Nanchang 330029, China

3. Jiangxi National Medicine Co., Ltd., Nanchang 330052, China

Abstract: Objective To analyze the differences in amino acid content of different fermented *Cordyceps* powder products, and evaluate the quality of fermented *Cordyceps* powder products by combining cluster analysis and principal component analysis.

Methods Automatic amino acid analyzer was used to determine the content of amino acid. The column was LCAK06/Na Ionic column with mobile phase A (trisodium citrate, 0.06 mol/L, pH 3.45) and mobile phase B (trisodium citrate, 0.10 mol/L, pH 10.85) at a flow rate of 0.45 mL/min elution pump and 0.25 mL/min derivative pump by gradient elution (around 3.5 min, 100%A; 3.5—11.0 min, 85%A; 11.0—17.0 min, 80%A; 17—23.5 min, 67%A; 23.5—28 min, 20%A; 28—45 min, 100%B); The detection wavelength was 440 nm for proline and 570 nm for the remaining amino acids; The temperature was set at 58—74 °C

收稿日期: 2018-05-20

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2011ZX09201-201-30); 国家中药标准化项目 (ZYBZH-C-JX-39); 江西省高等学校科技落地计划项目 (产学研合作 KJLD13061)

作者简介: 赵加茜, 男, 在读研究生, 从事中药制剂学与制剂新技术研究。Tel: 18146701669 E-mail: 948768081@qq.com

*通信作者 陈丽华, 女, 教授, 从事中药制剂学与制剂新技术研究。Tel: (0791)87118614 E-mail: chllly98@163.com

as gradient temperature control, and the injection volume was 50 μL . The content of amino acid was determined by external standard method. **Results** The content of amino acids in three products of fermented *Cordyceps* powder was detected, and the total content of amino acid were 251.82—265.93 mg/g in product A, 279.67—333.40 mg/g in product B, and 321.37—370.86 mg/g in product C, respectively. The consistency between batches of samples was good. Product A and product B were the same active pharmaceutical ingredient, and the difference in amino acid content was not obvious. The content of histidine and arginine in product C was quite different from that of product A and product B. The cumulative variance contribution rate of the first three principal components of the principal component analysis screening reached 93.551%, which contains most of the information of the amino acid content of each sample. The cluster analysis clustered 30 batches of samples into two categories, in which product A and product B were grouped together, and product C was grouped into one group. The cluster analysis results were consistent with the actual situation. Variable cluster analysis showed that the five variables randomly selected could accurately reflect the quality of amino acid the fermented *Cordyceps* powder when the amino acid variables were clustered into five categories. **Conclusion** According to the comparative study on the differences in the content of amino acid, different fermented *Cordyceps* powder products can be effectively distinguished. The combination of principal component analysis and cluster analysis can objectively evaluate the quality of fermented *Cordyceps* powder products.

Keywords: principal component analysis; cluster analysis; fermented *Cordyceps* powder; amino acid; quality control

冬虫夏草为麦角菌科真菌冬虫夏草菌 *Cordyceps sinensis* 寄生在蝙蝠蛾科昆虫幼虫上的子座和幼虫尸体的干燥复合体,性甘、平,归肺、肾经。具有补肾益肺、止血化痰等功能,常用于治疗肾虚精亏、阳痿遗精、腰膝酸痛、久咳虚喘、劳嗽咯血等症^[1]。近年来,随着对冬虫夏草资源的过度开发,再加上其寄主的专一性和生长环境的局限性,造成冬虫夏草资源短缺,市场供不应求^[2]。发酵虫草菌粉是从冬虫夏草中分离提取的药用菌株经过深层发酵得到的菌粉,研究表明发酵虫草菌粉具有与冬虫夏草相似的化学成分及药理作用,可作为冬虫夏草的替代品使用^[3]。发酵虫草菌粉含有虫草多糖、核苷类及碱基、氨基酸、甾醇类等化学成分,其中氨基酸是组成蛋白质的基本结构和生物代谢的重要物质,是发酵虫草菌粉强健滋补、提高免疫力的重要物质基础之一,同时与辅助治疗消化系统疾病及抑制病菌等有必然的联系^[4-5]。目前,氨基酸主要通过衍生化的方式检测,分为高效液相-柱前衍生法和氨基酸自动分析仪-柱后衍生法^[6-9]。氨基酸自动分析仪是氨基酸测定的专用仪器,与其他测定方法相比,氨基酸自动分析仪自动化程度高,茚三酮溶液与氨基酸进行在线柱后衍生,衍生化条件更容易控制。与文献报道的发酵虫草制剂氨基酸含量测定方法相比^[10-11],本实验采用的氨基酸自动分析仪柱后衍生法灵敏度高、专属性强,能够准确测定发酵虫草菌粉氨基酸含量。通过分析氨基酸含量差异,结合主成分分析与聚类分析法对不同发酵虫草菌粉类产品进行归类,能够客观准确地区别不同发

酵虫草菌粉类产品,为发酵虫草菌粉类产品的质量控制在提供一定的参考。

1 仪器与材料

Sykam S433D 型氨基酸自动分析仪(德国 Sykam 公司)、PHS-3C 型 pH 计(上海雷磁有限公司)、BS124S 型电子天平(德国 Sartorius 公司)、恒温干燥箱(上海博讯有限公司)、门冬氨酸(Asp,批号 140691-201602)、苏氨酸(Thr,批号 140682-201302)、丝氨酸(Ser,批号 140688-201102)、谷氨酸(Glu,批号 140690-201604)、甘氨酸(Gly,批号 140689-201605)、丙氨酸(Ala,批号 140680-201604)、缬氨酸(Val,批号 140681-201202)、甲硫氨酸(Met,批号 140684-201102)、异亮氨酸(Ile,批号 140683-201302)、亮氨酸(Leu,批号 140687-201503)、酪氨酸(Tyr,批号 140609-201513)、苯丙氨酸(Phe,批号 140676-201706)、组氨酸(His,批号 140693-201102)、赖氨酸(Lys,批号 140673-201509)、精氨酸(Arg,批号 140685-201707)、脯氨酸(Pro,批号 140677-201507)对照品及茚三酮(Sigma 公司);抗坏血酸、苯酚、三水乙酸钠、醋酸钾、乙酸、柠檬酸三钠(二水)、氢氧化钠、柠檬酸、硼酸、甲醇、浓盐酸均为分析纯,水为超纯水。发酵虫草菌粉产品 A(批号 16010005、16070345、16080393、16110701、16090394、16030133、16050229、16040185、16020075、16050347,编号 1~10)购于江西某公

司; 产品 B (批号 160401、160501、160502、160601、160701、160702、160703、161202、161203、161204, 编号 11~20) 购于江西某公司; 产品 C (批号 1606203、1604172、1605171、1604101、1603206、1605172、1606124、1606106、1603102、1604137, 编号 21~30) 购于浙江某公司。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 茛三酮溶液的制备 称取三水乙酸钠 272.0 g、醋酸钾 196.0 g, 量取乙酸 200 mL, 加适量水溶解后定容至 1 000 mL 即得钠钾缓冲液。称取茛三酮 20.0 g、苯酚 2.0 g, 加入甲醇 600 mL, 缓慢搅拌溶解后加钠钾缓冲液 400 mL 混合, 氮吹 10 min, 再加入 0.2 g 抗坏血酸后氮吹 10 min 即得。

2.1.2 样品稀释液的制备 称取二水合柠檬酸三钠 11.8 g、柠檬酸 6.0 g、苯酚 2.0 g 加适量水溶解后加入浓盐酸 10.4 mL, 定容至 1 000 mL, 用氢氧化钠溶液调节 pH 值为 2.2, 即得。

2.1.3 对照品溶液的制备 精密称取各氨基酸对照品适量置同一容量瓶中, 加入样品稀释液定容即得混合对照品溶液。

2.1.4 供试品溶液的制备 精密称取发酵虫草菌粉 0.1 g 置 25 mL 水解管中, 加入 6 mol/L 盐酸溶液 10 mL 后充氮气密封, 置 110 °C 烘箱中水解 18 h, 取出后放至常温, 将水解液用滤纸滤过并用水定容至 50 mL。取定容后的氨基酸水解液 2 mL, 用样品稀释液定容至 10 mL, 即得供试品溶液。

2.2 方法学考察

2.2.1 色谱条件 色谱柱: LCA K06/Na 离子柱; 流动相: 流动相 A (称取二水合柠檬酸三钠 11.8 g、柠檬酸 6.0 g、苯酚 0.5 g, 加适量水溶解, 加甲醇 65 mL 和浓盐酸 5.6 mL, 用水定容至 1 000 mL, NaOH 调 pH 至 3.45)、流动相 B (称取二水合柠檬酸三钠 19.6 g、氢氧化钠 3.1 g、硼酸 5.0 g, 加适量水溶解并定容至 1 000 mL, HCl 调 pH 值至 10.85); 梯度洗脱 (0~3.5 min, 100% A; 3.5~11.0 min, 85% A; 11.0~17.0 min, 80% A; 17.0~23.5 min, 67% A; 23.5~28.0 min, 20% A; 28.0~45.0 min, 100% B); 体积流量 0.45 mL/min 洗脱泵+0.25 mL/min 衍生泵; 检测波长 440 nm (Pro) +570 nm (其余氨基酸); 温度 58~74 °C 梯度控温; 进样量 50 μ L。

2.2.2 系统适应性试验 取混合对照品溶液和供试品溶液适量, 在“2.2.1”项下色谱条件进样测定,

记录色谱图, 见图 1。结果表明在 440、570 nm 波长下氨基酸对照品和供试品分离较好。

2.2.3 线性关系考察 取混合对照品, 用样品稀释液稀释成系列浓度, 按“2.2.1”项下色谱条件进行测定, 以峰面积为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X) 进行线性回归, 建立各氨基酸的线性回归方程, 结果见表 1。

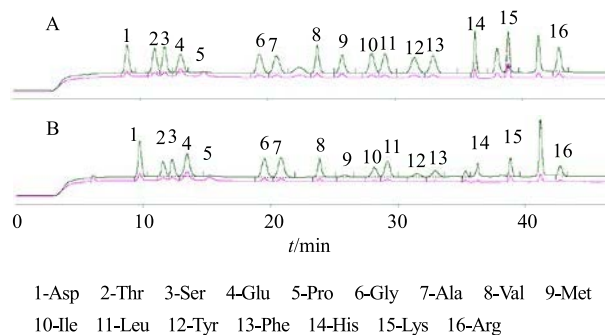


图 1 混合对照品 (A) 和供试品 (B) 溶液氨基酸色谱图
Fig. 1 HPLC of amino acids of reference substances solution (A) and sample solution (B)

2.2.4 精密度试验 取混合对照品适量, 在“2.2.1”项下色谱条件进样连续测定 6 次, 记录峰面积, 计算各氨基酸峰面积的 RSD。结果表明, 各氨基酸峰面积的 RSD 均小于 4%, 表明仪器精密度良好。

2.2.5 重复性试验 取供试品溶液 6 份, 在“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 并计算各氨基酸质量分数的 RSD。结果表明, 各氨基酸质量分数的 RSD 均小于 4%, 表明方法重复性良好。

2.2.6 稳定性试验 取供试品溶液 (批号 16010005), 在“2.2.1”项下色谱条件分别于 0、2、4、6、8、10、24 h 进样测定, 记录峰面积, 计算各氨基酸峰面积的 RSD。结果表明, 各氨基酸峰面积的 RSD 均小于 4%。

2.2.7 加样回收率试验 取已测定的供试品 6 份加入等量的对照品, 在“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 计算各氨基酸的加样回收率。结果表明, 各氨基酸的平均加样回收率在 98%~103%, RSD 在 0.33%~1.77%。

2.3 样品测定

分别取发酵虫草菌粉类产品 A、产品 B 和产品 C 各 10 批次, 按照“2.1.4”项下制备供试品溶液, 并在“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 采用外标一点法计算各氨基酸和总氨基酸的含量, 结果见表 2~4。

表 1 氨基酸回归方程

Table 1 Regression equation of amino acids

检测成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Asp	$Y=597.10 X+0.109 5$	1.000 0	3.391~26.232
Thr	$Y=677.26 X+0.015 8$	1.000 0	1.549~12.453
Ser	$Y=802.29 X-0.194 8$	1.000 0	1.492~11.581
Glu	$Y=549.82 X-0.116 4$	1.000 0	3.826~30.704
Pro	$Y=193.30 X-0.073 2$	1.000 0	1.674~13.831
Gly	$Y=1 080.6 X-0.177 8$	1.000 0	1.635~12.559
Ala	$Y=908.33 X-0.021 4$	1.000 0	2.230~18.105
Val	$Y=709.13 X+0.325 2$	1.000 0	2.701~13.961
Met	$Y=463.79 X+0.107 8$	1.000 0	1.325~ 3.127
Ile	$Y=630.18 X+0.319 7$	1.000 0	1.521~11.576
Leu	$Y=1 042.40 X-122.44$	0.999 9	2.193~18.557
Tyr	$Y=454.11 X-0.076 3$	1.000 0	1.086~ 6.409
Phe	$Y=495.85 X+0.020 2$	1.000 0	1.308~10.606
His	$Y=534.99 X-0.232 1$	1.000 0	1.414~10.972
Lys	$Y=609.42 X+0.234 4$	1.000 0	1.376~11.547
Arg	$Y=450.32 X-0.102 9$	1.000 0	1.589~13.228

表 2 产品 A 氨基酸含量

Table 2 Contents of amino acids in product A

批号	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)																总计
	Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg	Pro	
16020075	30.00	14.15	13.30	34.55	14.21	19.83	16.03	3.83	12.69	21.29	8.15	12.01	12.66	13.00	15.28	15.41	256.39
16050229	29.14	13.65	12.95	34.05	13.64	19.23	16.89	5.28	12.73	20.47	8.27	11.67	12.74	12.45	14.88	16.18	254.22
16090394	30.35	14.21	13.73	34.76	14.25	19.86	17.07	4.75	13.26	21.45	8.85	12.09	13.08	13.46	15.68	16.40	263.25
16010005	30.10	14.10	13.46	34.25	14.01	19.51	15.94	3.78	12.65	21.22	8.64	11.92	12.86	13.02	15.30	15.45	256.21
16110701	29.46	13.98	13.20	33.96	13.96	19.55	15.77	3.92	12.52	20.83	8.32	11.68	12.77	12.59	14.98	14.92	252.41
16030133	30.19	14.23	13.49	35.10	14.29	19.72	17.30	4.11	13.28	21.63	8.48	12.18	12.84	12.25	15.09	16.94	261.12
16040185	30.88	14.55	13.85	36.15	14.46	20.34	16.54	4.09	13.37	21.74	8.51	12.49	13.35	13.16	15.71	16.74	265.93
16050347	30.67	14.29	13.49	36.36	14.47	20.30	16.41	3.99	13.32	21.69	8.16	12.49	12.86	13.52	15.94	15.31	263.27
16070345	29.43	13.73	12.96	34.30	13.93	19.83	15.86	3.66	12.71	20.17	7.92	11.48	12.51	12.56	14.89	15.88	251.82
16080393	30.04	14.03	13.50	34.94	13.89	19.85	17.32	5.18	13.12	20.80	8.42	12.08	13.12	12.89	15.50	16.80	261.48

表 3 产品 B 氨基酸含量

Table 3 Contents of amino acids in product B

批号	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)																总计
	Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg	Pro	
160401	32.15	14.74	14.41	39.08	24.54	24.30	16.89	3.43	13.08	21.23	7.60	12.59	13.22	14.14	18.77	20.89	291.06
160501	30.34	13.57	13.74	37.38	25.63	23.71	15.76	3.76	12.26	20.13	7.97	11.67	12.05	12.98	17.87	20.85	279.67
160502	32.68	14.83	14.78	40.18	27.70	25.26	17.55	3.27	13.08	21.54	7.79	12.63	13.18	14.48	19.56	22.18	300.69
160601	34.34	15.29	15.52	42.32	29.23	25.69	17.72	3.99	14.04	23.38	8.52	13.53	13.75	15.16	20.31	23.82	316.61
160701	35.26	15.63	15.72	44.06	30.62	26.98	18.22	3.81	14.27	23.82	8.39	13.90	13.91	15.21	20.65	23.98	324.43
160702	36.23	16.08	16.19	45.25	31.52	27.67	18.62	3.94	14.64	24.41	8.69	14.25	14.31	15.66	21.32	24.62	333.40
160703	35.33	15.71	15.75	44.28	31.09	27.31	18.40	3.67	14.21	24.20	8.64	13.94	14.01	15.31	20.85	24.35	327.05
161202	33.82	15.26	15.64	41.37	31.31	26.96	17.69	3.45	13.51	22.02	7.80	12.61	13.54	14.72	19.75	24.52	313.97
161203	34.61	15.47	16.13	43.06	15.07	28.58	17.93	3.66	13.89	22.04	7.33	12.95	13.65	15.20	20.89	26.49	306.95
161204	33.47	15.02	15.59	41.05	31.53	26.82	17.29	3.49	13.45	21.19	7.32	12.44	13.37	14.59	19.66	24.75	311.03

表 4 产品 C 氨基酸含量
Table 4 Contents of amino acids in product C

批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)																总计
	Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg	Pro	
1604101	32.49	14.67	16.72	38.22	19.75	21.88	17.01	5.91	10.87	19.90	8.67	10.91	37.45	19.59	31.04	16.29	321.37
1603206	33.62	15.91	17.58	39.47	20.91	22.25	16.70	4.74	11.28	21.31	9.18	10.89	37.14	21.16	33.67	17.07	332.88
1605171	34.35	15.50	17.67	44.71	23.09	22.38	16.93	5.23	12.00	21.10	10.24	11.53	38.16	21.61	35.76	18.13	348.39
1606124	34.28	15.38	17.55	42.15	21.18	23.45	17.86	5.88	11.78	21.00	9.66	11.47	38.64	21.53	33.84	16.61	342.26
1603102	34.42	15.71	18.01	40.98	21.74	24.29	18.02	6.12	11.63	21.18	9.90	11.49	40.78	21.73	35.79	18.35	350.14
1606203	33.30	15.53	17.37	43.19	19.89	21.87	16.48	5.27	11.63	21.20	9.23	11.34	33.83	22.88	31.05	17.20	331.26
1605172	33.72	15.56	17.63	41.10	20.99	22.22	16.96	4.98	11.45	21.07	9.50	11.32	37.22	22.91	32.43	17.32	336.38
1604137	32.49	15.07	16.99	39.58	20.70	22.15	17.40	6.05	11.37	20.59	9.10	10.97	37.42	20.40	33.25	16.45	329.98
1604172	37.40	18.09	19.77	48.06	24.32	24.63	19.18	5.92	13.44	24.52	10.02	12.46	35.37	25.18	33.02	19.48	370.86
1606106	33.09	15.12	16.89	39.73	20.25	22.58	16.45	4.81	11.30	20.54	9.02	11.15	38.32	20.88	32.71	16.70	329.54

2.4 结果分析

2.4.1 氨基酸含量分析 10 批次发酵虫草菌粉产品 A 总氨基酸含量为 251.82~265.93 mg/g, 平均为 258.61 mg/g, 10 批次发酵虫草菌粉产品 B 总氨基酸量为 279.67~333.40 mg/g, 平均为 310.49 mg/g, 10 批次发酵虫草菌粉产品 C 总氨基酸含量为 321.37~370.86 mg/g, 平均为 339.31 mg/g。各批次间总氨基酸含量稳定性较好。与产品 A 相比, 产品 B 总氨基酸含量稍高, 主要表现为 Glu、Gly、Ala、Arg 和 Pro 比产品 A 含量稍高; 产品 A 和产品 B 原料药相同, 产品 B 在制备过程中加入辅料, 故推测产品 B 总氨

基酸含量高于产品 A 的原因因为辅料水解产生少量氨基酸。

产品 C 总氨基酸含量高于产品 A 和产品 B, 其中 His 和 Arg 含量明显高于产品 A 和产品 B, 通过 His 和 Arg 的含量, 可以明显区分产品 C 和产品 A、B。

2.4.2 主成分分析 将各产品氨基酸含量数据导入分析软件 SPSS 21.0 中, 对 30 批样品进行主成分分析, 计算主成分特征值、方差贡献率和累积方差贡献率, 结果见表 5、6 和图 2。

结果表明, 氨基酸前 3 个主成分的累积方差贡

表 5 主成分分析特征值和方差贡献率
Table 5 Eigenvalues and contribution to variance of each principal component

成分	初始特征值			提取平方和载入		
	特征值	方差/%	累积/%	特征值	方差/%	累积/%
Asp	7.752	48.448	48.448	7.752	48.448	48.448
Thr	6.073	37.954	86.402	6.073	37.954	86.402
Ser	1.144	7.149	93.551	1.144	7.149	93.551
Glu	0.411	2.568	96.119			
Pro	0.290	1.812	97.931			
Gly	0.118	0.740	98.671			
Ala	0.070	0.437	99.109			
Val	0.057	0.354	99.462			
Met	0.036	0.225	99.688			
Ile	0.017	0.103	99.791			
Leu	0.011	0.072	99.863			
Tyr	0.010	0.065	99.927			
Phe	0.005	0.032	99.960			
His	0.004	0.027	99.987			
Lys	0.001	0.007	99.994			
Arg	0.001	0.006	100.000			

表 6 主成分矩阵

Table 6 Principal component matrix

氨基酸	主成分		
	1	2	3
Asp	0.975	0.192	-0.027
Thr	0.946	0.029	0.165
Ser	0.928	-0.344	-0.083
Glu	0.953	0.199	-0.069
Gly	0.659	0.483	-0.377
Ala	0.695	0.598	-0.356
Val	0.780	0.366	0.285
Met	0.380	-0.782	0.279
Ile	0.011	0.933	0.331
Leu	0.577	0.640	0.453
Tyr	0.545	-0.651	0.404
Phe	0.223	0.925	0.244
His	0.605	-0.785	-0.084
Lys	0.781	-0.601	-0.036
Arg	0.758	-0.623	-0.160
Pro	0.483	0.785	-0.324

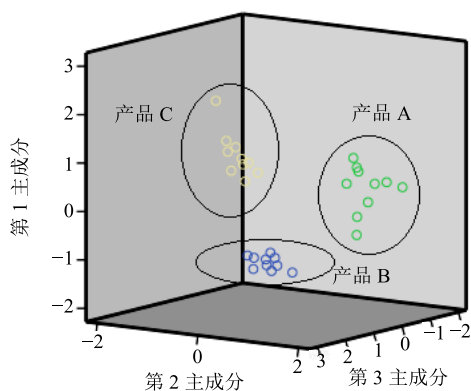


图 2 发酵虫草菌粉主成分分析三维投影图

Fig. 2 PCA three-dimension alprojection of fermented *Cordyceps* powder

献率达到 93.551%, 且特征值 $\lambda_1=7.752$, $\lambda_2=6.073$, $\lambda_3=1.144$, 表明前 3 个因子包含了各样品中氨基酸含量的大部分信息, 在氨基酸含量测定中起主导作用, 其中第 1 组分贡献率最大为 48.448%, 其次是第 2 组分贡献率 37.954% 和第 3 组分贡献率 7.194%。由旋转后的主成分因子的载荷矩阵可知在第 1 主成分中 Asp、Thr、Ser 和 Glu 的系数占较大的比重, 涵盖了发酵虫草菌粉类产品氨基酸的大部分信息。

分别以第 1、2、3 主成分为坐标轴建立三维坐标系, 进行投影即得 30 批样品的三维投影图。由图 2 可知, 30 批样品共分为 3 大类, 产品 A 聚为一类, 产品 B 聚为一类, 产品 C 聚为一类。各批次样品聚类较为集中, 表明相同产品间氨基酸含量较为稳定, 差异性较小, 批间一致性较好。

2.4.3 聚类分析 将发酵虫草菌粉产品氨基酸含量数据导入分析软件 SPSS 21.0 中, 对 30 批不同类型的样品进行个案聚类分析, 聚类距离为夹角余弦, 聚类方法为组间连接, 结果见图 3。

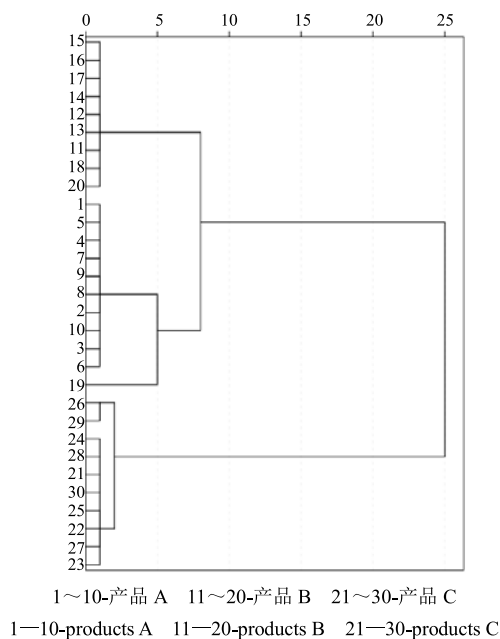


图 3 不同发酵虫草菌粉产品聚类分析树状图

Fig. 3 Cluster analysis dendrogram of different fermented *Cordyceps* powder products

结果表明, 30 批次样品系统被聚为 2 大类, 分别标记为组 1 和组 2。产品 A 和 B 聚为一类(组 1), 产品 C 聚为一类(组 2)。由于产品 A 和产品 B 菌种及生产工艺一致, 均由同一厂家生产, 故被聚为一类, 这与实际情况相符。

将发酵虫草菌粉氨基酸进行变量聚类分析, 结果见图 4。结果表明 16 种氨基酸变量被聚为 2 大类, 当 16 种氨基酸变量聚为 5 类时, 随机选择其中的 5 种变量进行系统聚类时, 得到的结果与个案聚类结果一致。表明变量聚为 5 类时, 随机选择的氨基酸能够代表发酵虫草菌粉产品类氨基酸含量的所有信息, 数据处理更加简便。

3 讨论

发酵虫草菌粉氨基酸主要以粗蛋白的形式存在,

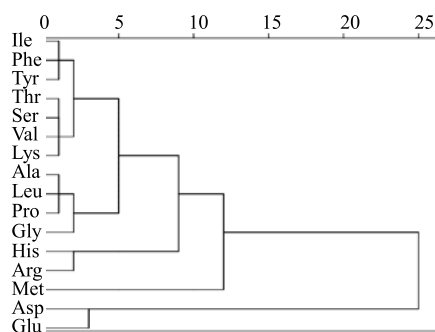


图 4 发酵虫草菌粉氨基酸变量聚类分析树状图

Fig. 4 Cluster analysis dendrogram of amino acid variable of fermented *Cordyceps* powder

进行测定时首先要将粗蛋白水解为游离氨基酸。氨基酸常用的水解溶剂为浓盐酸, 实验中考察了浓盐酸浓度和加入量对氨基酸水解的影响, 最终确定取 0.1 g 样品加入 6 mol/L 盐酸溶液 10 mL。查阅文献时发现, 氨基酸常用水解温度为 110 °C 温和水解和 150 °C 高温水解, 在实际操作过程中发现 150 °C 高温水解条件较难达到, 高温水解过程中水解管易爆裂, 所以实验中选择 110 °C 温和水解条件。对水解时间进行考察发现, 110 °C 条件下水解 18 h 时氨基酸水解完全, 色谱峰分离度较好, 综合考虑选择水解时间为 18 h。最终确定氨基酸水解条件: 取 0.1 g 样品加入 6 mol/L 盐酸溶液 10 mL 在 110 °C 下水解 18 h。

氨基酸自动分析仪是采用柱后在线衍生的方式进行氨基酸测定, 其基本结构与高效液相色谱仪相似。使用的色谱柱为 LCA K06/Na 离子柱, 使氨基酸分离度更加高效, 流动相充氮气保护, 能够保证流动相的稳定, 防止氨基酸在检测过程中被氧化。氨基酸与茚三酮溶液反应后, 脯氨酸生成黄色化合物在 440 nm 波长下有最大吸收, 其余氨基酸生成蓝紫色化合物在 570 nm 下有最大吸收, 故在氨基酸检测过程中选择双波长检测的方式测定氨基酸含量。

本研究探讨了发酵虫草菌粉类产品中总氨基酸含量, 3 种发酵虫草菌粉产品均是独家生产的品种, 样品总氨基酸含量较为稳定, 批间一致性较好。通过分析 3 种产品氨基酸含量上的差异, 能够初步

判断不同种类的发酵虫草菌粉类产品; 主成分分析法能够通过成分的贡献率和成分之间的相关性, 聚类分析法能够对氨基酸含量数据进行客观充分的多元分析, 2 种分析方法能够相互补充, 对发酵虫草菌粉产品样本做更细致的分类, 能够客观准确地区分不同发酵虫草菌粉类产品, 为发酵虫草菌粉原料药质量控制和完善发酵虫草菌粉类产品的质量标准的提供一定的实验依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] Xiao J H. Efficient extraction and rapid quantitative determination of nucleoside compounds from *cordycepsjiangxiensis*, a new cordyceps producing-cordycepin [J]. *Latin Amer J Pharm*, 2014, 31(31): 1161-1169.
- [3] 吴 瑶, 陈丽华, 朱卫丰, 等. 发酵虫草菌粉类产品质量标准研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(20): 220-227.
- [4] 黄慧莲, 杨敏娟, 管咏梅, 等. 近 5 年发酵虫草菌粉的化学成分和临床应用研究进展 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2014, 16(10): 2242-2247.
- [5] 王 丽, 宋志峰, 黄 璜, 等. HPLC 测定不同产地冬虫夏草中氨基酸的含量 [J]. *中成药*, 2010, 32(6): 984-987.
- [6] 赵 岩, 徐 莹, 侯莹莹, 等. 柱前衍生 RP-HPLC 测定女贞子中 21 种氨基酸含量 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(14): 79-83.
- [7] 陈 蓉, 张 超, 顾 倩, 等. 柱前衍生-HPLC 法同时测定不同产地茯苓中 18 种氨基酸含量 [J]. *药物分析杂志*, 2017, 37(2): 297-303.
- [8] 陈萍红, 王书芳, 龚行楚. 柱前衍生 RP-HPLC 法测定阿胶中 13 种氨基酸 [J]. *中草药*, 2013, 44(14): 1995-1999.
- [9] 艾则孜·莫合买提, 沙丽娜, 巴哈尔古丽·黄尔汗, 等. 柱后衍生阳离子交换色谱法测定桦菌芝中氨基酸的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2012, 32(11): 1972-1975.
- [10] 邹秦文, 肖新月, 程显隆, 等. 百令胶囊中 17 种氨基酸的柱前衍生化 RP-HPLC 法含量测定 [J]. *药物分析杂志*, 2010, 30(9): 1630-1635.
- [11] 张 萍, 周玉春, 王 晓, 等. HPLC 柱前衍生化法测定发酵虫草制剂中总氨基酸的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2016, 36(8): 1338-1348.