

基于指纹图谱和多指标定量测定的鹿茸饮片质量控制研究

孙伟杰¹, 吕程², 杨重晖¹, 刘莉², 李江丹², 李冰慧², 王任晶², 许宁², 杨洋¹, 尹程程¹, 赵大庆^{1*}, 齐滨^{2*}

1. 长春中医药大学吉林省人参科学院, 吉林 长春 130117

2. 长春中医药大学, 吉林 长春 130117

摘要: 目的 采用 HPLC 法建立鹿茸饮片指纹图谱, 并测定核苷类成分含量, 进行聚类分析与主成分分析 (PCA), 比较鹿茸饮片中 6 种核苷成分 (尿嘧啶、腺嘌呤、次黄嘌呤、尿苷、肌苷和鸟苷) 的差异。方法 采用 HPLC 法对 16 批不同批次鹿茸饮片 6 种核苷类成分进行测定, 运用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价软件 (2012 版)”进行评价, 并结合 PCA 和正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 等化学计量学方法对 4 种饮片 (蜡片、粉片、纱片和骨片) 进行区分与比较。结果 建立了鹿茸核苷类成分 HPLC 指纹图谱, 相似度均达 0.960 以上, 确定了 6 个共有峰 (尿嘧啶、腺嘌呤、次黄嘌呤、尿苷、肌苷和鸟苷) 构成鹿茸饮片的特征峰, 尿嘧啶、次黄嘌呤和肌苷是差异性化合物, 可作为鉴别和区分鹿茸饮片质量控制指标。结论 该法所建立的鹿茸核苷类成分指纹图谱特征性强、方法简便, 结合 6 种核苷类成分含量测定可更好控制其质量, 对鹿茸饮片的鉴定及质量控制具有指导意义和参考价值。

关键词: 鹿茸饮片; 指纹图谱; 核苷成分; 主成分分析; 正交偏最小二乘判别分析; 质量控制

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)22-5448-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.22.010

Quality evaluation of *Cervi Cornu Pantotrichum* based on fingerprint analysis and quantitative analysis of multi-components

SUN Wei-jie¹, LV Cheng², YANG Chong-hui¹, LIU Li², LI Jiang-dan², LI Bing-hui², WANG Ren-jing², XU Ning², YANG Yang¹, YIN Cheng-cheng¹, ZHAO Da-qing¹, QI Bin²

1. Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China

2. Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China

Abstract: Objective To establish the fingerprints of nucleosides in *Cervi Cornu Pantotrichum* (CCP) pieces by HPLC method, perform cluster analysis and principal component analysis (PCA), and compare the differences of six nucleosides in CCP pieces. **Methods** A total of 16 batches of CCP pieces from different origins were determined by HPLC. Sixteen batches from different origins in China were collected to assess the similarities according to similarity evaluation for “chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine” (2012), and four kinds of decoction pieces were distinguished and compared by chemometric methods such as principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA). **Results** The HPLC fingerprints of CCP nucleosides were established and the similarity was above 0.960. Six common peaks of uracil, adenine, hypoxanthine, uridine, inosine, and guanosine were identified. Among them, uracil, hypoxanthine, and inosine were different compounds, which can be used as a quality control indicator for identifying and distinguishing CCP pieces. **Conclusion** The CCP nucleoside fingerprints established by the method are characterized by strong features and simple methods. The combination of six nucleosides can better control the quality, which has guiding significance and reference value for the identification and quality control of CCP.

收稿日期: 2019-06-05

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFC1706604); 吉林省科技发展计划 (20190101010JH); 长春市科技局医药健康产业科技创新重大专项 (18YJ013); 国家中药标准化项目 (ZYBZH-Y-JL-26)

作者简介: 孙伟杰 (1995—), 男, 安徽宿州人, 在读硕士, 从事天然药物化学及新药开发研究。E-mail: sunweijie0128@foxmail.com

*通信作者 齐滨 (1978—), 男, 副教授, 博士, 从事中药质量标准化的研究。Tel: (0431)86172211 E-mail: qibin88@126.com

赵大庆 (1963—), 男, 研究员, 博士生导师, 从事中药有效成分研究与开发。E-mail: cnzhaodaqing1963@163.com

Key words: *Cervi Cornu Pantotrichum* pieces; fingerprint; nucleoside; principal component analysis; orthogonal partial least squares discriminant analysis; quality control

鹿茸为鹿科动物梅花鹿 *Cervus nippon* Temminck 或马鹿 *Cervus elaphus* Linnaeus 的雄鹿未骨化密生鸾毛的幼角切制而成^[1]。其味甘、咸，性温，入手厥阴、少阴，足少阴、厥阴经^[2-3]；主治肾虚、头晕、耳聋、目暗、阳痿、滑精、宫冷不孕、羸瘦、神疲、畏寒、腰脊冷痛、筋骨痿软、崩漏带下、阴疽不敛及久病虚损等症。现代药理研究表明鹿茸具有抗氧化、抗衰老、抗疲劳、抗肿瘤、抗应激、保护肝脏、促进组织伤口愈合、治疗骨质疏松症等作用^[4-12]。按鹿茸自顶端至低端切制依次将鹿茸饮片划分为蜡片、粉片、纱片和骨片 4 种^[13-16]。由于各饮片所在部位不同，导致蜡片、粉片、纱片和骨片之间的性状差异较大，而针对鹿茸 4 种饮片化学成分差异的研究较少^[17-19]，因此，需要建立合适的鉴别和区分方法，全面分析比较 4 种饮片化学成分，并找出异同点。

指纹图谱结合多指标含量测定已广泛应用于中药材质量控制和相近品种区分与鉴别等方面^[20-23]。本研究拟采用 HPLC 法^[24]全面分析鹿茸化学成分，建立鹿茸化学成分指纹图谱^[25]，为鹿茸饮片的鉴别与质量控制提供方法与理论依据。在此基础上，建立鹿茸饮片中尿嘧啶、腺嘌呤、次黄嘌呤、尿苷、肌苷和鸟苷 6 种成分的含量测定方法，以此测定 6 种化学成分的含量。基于含量测定结果，进一步结合主成分分析（principal component analysis, PCA）和正交偏最小二乘判别分析（orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA）等化学计量学方法对 4 种鹿茸饮片进行区分与比较，并寻找差异性成分。通过以上研究，以期对鹿茸饮片的质量控制、区分与鉴别提供方法和数据支撑。

1 仪器与试剂

DZF-6050 型电热恒温真空干燥箱，上海博讯实业有限公司；LC-2030 型高效液相色谱仪，日本岛津公司；梅特勒 MS204S 型分析天平，瑞士梅特勒-托利多公司；Eppendorf 5920R 低速离心机，德国 Eppendorf 艾本德股份公司。

对照品尿嘧啶（批号 140669-201305，质量分数 98.56%）、肌苷（批号 100469-201302，质量分数 99.10%），均购自中国食品药品检定研究院；对照品腺嘌呤（批号 B20211，质量分数 98.39%）、次黄

嘌呤（批号 B21357，质量分数 98.97%）、尿苷（批号 B20907，质量分数 99.45%）、鸟苷（批号 B20905，质量分数 98.73%），均购自上海源叶生物科技有限公司。不同来源的鹿茸饮片经长春中医药大学药学院姜大成教授鉴定为鹿科动物梅花鹿 *Cervus nippon* Temminck 雄鹿未骨化密生鸾毛的幼角。16 批鹿茸饮片来源见表 1。

表 1 鹿茸样品来源

Table 1 Source of CCP samples

编号	批号	规格	采集地点与来源
L1	X1701002	蜡片	吉林双阳梅花鹿二杠
L2	X1701005	蜡片	吉林敦化梅花鹿二杠
L3	X1701007	蜡片	辽宁西丰梅花鹿二杠
L4	X1710003	蜡片	吉林敦化梅花鹿二杠
F1	X1701002	粉片	吉林双阳梅花鹿二杠
F2	X1701005	粉片	吉林敦化梅花鹿二杠
F3	X1701007	粉片	辽宁西丰梅花鹿二杠
F4	X1710003	粉片	吉林敦化梅花鹿二杠
S1	X1701002	纱片	吉林双阳梅花鹿二杠
S2	X1701005	纱片	吉林敦化梅花鹿二杠
S3	X1701007	纱片	辽宁西丰梅花鹿二杠
S4	X1710003	纱片	吉林敦化梅花鹿二杠
G1	X1701002	骨片	吉林双阳梅花鹿二杠
G2	X1701005	骨片	吉林敦化梅花鹿二杠
G3	X1701007	骨片	辽宁西丰梅花鹿二杠
G4	X1710003	骨片	吉林敦化梅花鹿二杠

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Aglient Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为 0.07%冰醋酸水溶液-甲醇，采用等度洗脱，洗脱程序为 0~30 min，4%甲醇；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；进样量 5 μL，检测波长为 254 nm；理论塔板数按次黄嘌呤峰计算应不小于 9 900，拖尾因子为 1.17。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取尿嘧啶、腺嘌呤、次黄嘌呤、尿苷、肌苷和鸟苷对照品各 5.00 mg，分别溶解后置于同一 50 mL 量瓶中，加蒸馏水定容至刻度，配制成含尿嘧啶、腺嘌呤、次黄嘌呤、尿苷、肌苷和鸟苷 0.1 mg/mL 的混合对照品溶液储备液，用 0.45 μm 的微

孔滤膜滤过，取续滤液作为混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取鹿茸饮片粉末（过 40 目筛）0.5 g，置于具塞锥形瓶中，精密加入 10 mL 蒸馏水，超声提取 30 min，9 800 r/min 离心 10 min，取上清液，用 0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液作为供试品溶液。

2.4 鹿茸指纹图谱研究

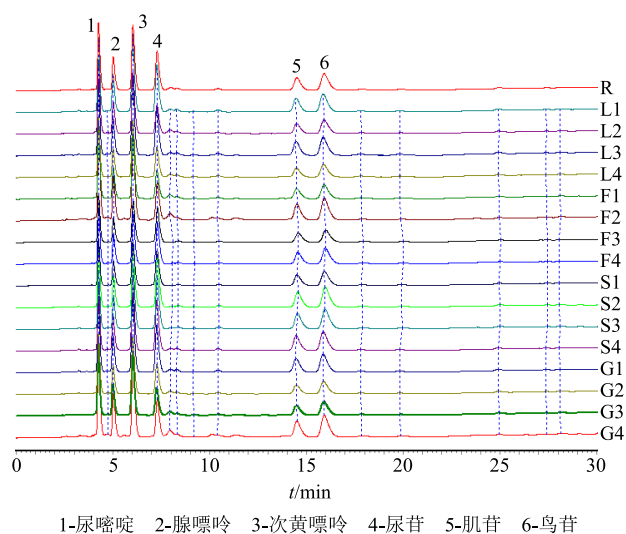
为了全面分析鹿茸饮片化学成分，为其质量控制提供依据，本研究应用 HPLC 法对 16 批鹿茸饮片进行了分析，建立了鹿茸饮片的化学指纹图谱。

2.4.1 精密度试验 取鹿茸饮片样品（F1），按照“2.3”项下方法制备供试品溶液，进行色谱分析，连续进样 6 次，记录色谱图。以次黄嘌呤色谱峰为参照峰，计算指纹图谱中各共有峰的相对保留时间和相对峰面积，结果表明各共有峰的相对保留时间的 $\text{RSD} < 0.31\%$ ，各共有峰相对峰面积的 $\text{RSD} < 1.1\%$ ，表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取鹿茸（F1）供试品溶液，分别于制备后 0、2、6、8、24、48 h 进样分析，以次黄嘌呤色谱峰为参照峰，计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积，结果各共有峰的相对保留时间的 $\text{RSD} < 0.39\%$ ，各共有峰的相对峰面积的 $\text{RSD} < 1.9\%$ 。

2.4.3 重复性试验 精密称取鹿茸样品（F1）粉末 6 份，每份 0.5 g，按“2.3”项下方法制备供试品溶液进样分析，以次黄嘌呤色谱峰为参照峰，计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积，结果各共有峰的相对保留时间的 $\text{RSD} < 0.35\%$ ，各共有峰的相对峰面积的 $\text{RSD} < 2.1\%$ 。

2.4.4 鹿茸饮片指纹图谱的建立及相似度评价 将 16 批鹿茸饮片按“2.3”项下方法制备供试品溶液，进行色谱分析，记录色谱图。采用药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）”对 16 批鹿茸样品的指纹图谱进行相似度分析，导入实验数据进行全谱峰匹配，设置样品 1 作为参照图谱，采用中位数法计算，经过多点校正，进行全谱峰匹配，生成对照指纹图谱（R）。综合考虑峰面积及色谱峰分离度，确定以保留时间为 7.24 min 的 3 号峰次黄嘌呤为参照峰，最终确定 6 个共有峰。通过与对照品比对，指认出 6 个共有峰，分别为尿嘧啶（1 号峰）、腺嘌呤（2 号峰）、次黄嘌呤（3 号峰）、尿苷（4 号峰）、肌苷（5 号峰）、鸟苷（6 号峰）。16 批鹿茸饮片色谱峰图及其对照指纹图谱见图 1。



1-尿嘧啶 2-腺嘌呤 3-次黄嘌呤 4-尿苷 5-肌苷 6-鸟苷
1-uracil 2-adenine 3-hypoxanthine 4-uridine 5-inosine 6-guanosine

图 1 16 批鹿茸饮片的 HPLC 指纹图谱及其对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 HPLC fingerprint and control fingerprint (R) of 16 batches of CCP pieces

将 16 批鹿茸饮片指纹图谱与对照指纹图谱进行相似度评价，结果 L1~L4、F1~F4、S1~S4、G1~G4 与对照指纹图谱的相似度分别为 0.968、0.979、0.968、0.969、0.975、0.980、0.967、0.976、0.986、0.977、0.969、0.973、0.971、0.977、0.980、0.984。各批鹿茸饮片的相似度结果均大于 0.960，表明所建立的指纹图谱方法可用于鹿茸饮片的鉴定和质量控制。

2.5 鹿茸饮片含量测定

采用 HPLC 法建立了不同等级鹿茸饮片的指纹图谱，确定了 6 个共有峰。由图 1 可知，16 个批次不同等级鹿茸饮片的色谱图较为相似，但是还不足以评价不同等级鹿茸饮片之间质量差异。因此，进一步建立鹿茸多成分含量测定方法，对鹿茸指纹图谱指认的 6 个共有成分（尿嘧啶、腺嘌呤、次黄嘌呤、尿苷、肌苷、鸟苷）进行含量测定。根据测定结果分析鹿茸蜡片、粉片、纱片和骨片之间成分含量差异、进一步结合统计学方法，以期能够区分蜡片、粉片、纱片和骨片。

2.5.1 线性关系考察 精密量取“2.2”项下混合对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL，分别置于 10 mL 量瓶中，定容至刻度，即得不同质量浓度的系列混合对照品溶液。按照“2.1”项下色谱条件分别进样 5 μL ，重复 3 次。以各对照品的质量浓度为横坐标（X），相应的峰面积积分值为纵坐标（Y），绘制标准曲线，进行线性回归，得回归方程分别为

尿嘧啶 $Y=23\,524\,313\,X-106\,306$, $r^2=1.000\,0$; 腺嘌呤 $Y=29\,859\,947\,X-1\,009$, $r^2=1.000\,0$; 次黄嘌呤 $Y=2\,490\,4591\,X-113\,190$, $r^2=0.999\,7$; 尿苷 $Y=12\,737\,730\,X-58\,009$, $r^2=1.000\,0$; 肌苷 $Y=13\,255\,261\,X-59\,841$, $r^2=0.999\,5$; 鸟苷 $Y=14\,887\,793\,X-67\,415$, $r^2=0.999\,8$; 结果表明 6 种成分在 0.01~0.10 mg/mL 呈良好的线性关系。

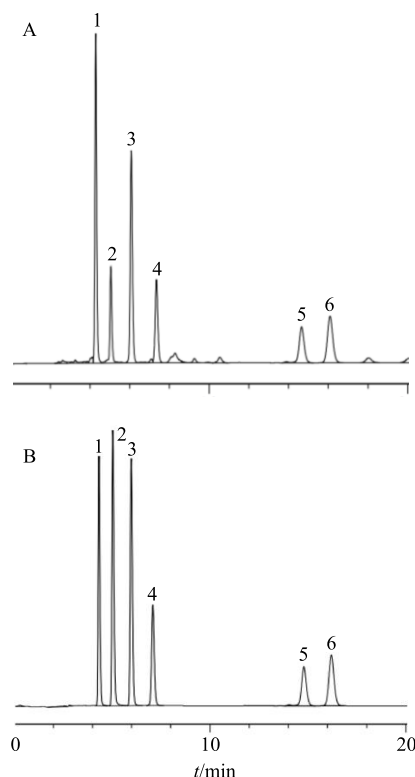
2.5.2 精密度试验 取鹿茸饮片样品(F1),按“2.3”项下方法制备供试品溶液,连续进样 6 次,并记录各个成分峰面积,计算 RSD,结果显示尿嘧啶、腺嘌呤、次黄嘌呤、尿苷、肌苷和鸟苷峰面积的 RSD 分别为 0.84%、0.95%、0.45%、0.75%、0.35%、0.54%,结果表明仪器精密度良好。

2.5.3 稳定性试验 取鹿茸饮片(F1)供试品溶液分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 测定各成分的峰面积,记录峰面积并计算 RSD,结果显示尿嘧啶、腺嘌呤、次黄嘌呤、尿苷、肌苷和鸟苷峰面积的 RSD 分别为 0.96%、1.02%、0.76%、0.93%、1.25%、1.31%,结果表明所测定的成分在 24 h 内稳定性良好。

2.5.4 重复性试验 精密称取鹿茸样品(F1)粉末 6 份,按照“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下方法进样分析,采用外标法计算各化学成分的含量,并计算 RSD,结果显示尿嘧啶、腺嘌呤、次黄嘌呤、尿苷、肌苷和鸟苷质量分数的 RSD 分别为 0.96%、0.86%、1.25%、1.34%、1.56%、0.92%,结果表明该方法具有良好的重复性。

2.5.5 加样回收率试验 精密称取已知含量的鹿茸样品(F1)粉末 0.25 g,平行 6 份分别加入 6 种成分对照品适量,按“2.3”项下方法制备供试品溶液并进样分析,记录各化学成分峰面积并计算含量。按照以下公式计算加样回收率[回收率=(测得含量-饮片含量)/对照品加入量],结果显示尿嘧啶、腺嘌呤、次黄嘌呤、尿苷、肌苷和鸟苷的平均加样回收率分别为 100.31%、101.25%、99.63%、99.85%、100.96%、101.43%,RSD 分别为 0.93%、0.85%、1.15%、1.31%、1.25%、1.24%,以上结果表明建立的含量测定方法准确性良好。

2.5.6 样品含量测定 按照“2.3”项下方法制备 16 批次不同等级鹿茸饮片样品溶液,按照“2.1”项下方法进样分析,测定不同等级鹿茸饮片中尿嘧啶、腺嘌呤、次黄嘌呤、尿苷、肌苷和鸟苷的含量。鹿茸样品和混合对照品色谱图见图 2。16 批鹿茸饮片含量测定结果见表 2。



1-尿嘧啶 2-腺嘌呤 3-次黄嘌呤 4-尿苷 5-肌苷 6-鸟苷
1-uracil 2-adenine 3-hypoxanthine 4-uridine 5-inosine 6-guanosine

图 2 鹿茸饮片样品(A)和混合对照品(B)的 HPLC 图
Fig. 2 HPLC of CCP pieces sample (A) and mixed reference substance (B)

表 2 鹿茸饮片 6 种成分含量测定结果 ($n=3$)

Table 2 Content of six constituents in CCP pieces ($n=3$)

序号	质量分数/(mg·g ⁻¹)					
	尿嘧啶	腺嘌呤	次黄嘌呤	尿苷	肌苷	鸟苷
L1	1.187 1	0.363 3	1.049 8	0.859 2	0.591 5	0.610 5
L2	1.102 0	0.520 3	0.991 2	0.743 3	0.602 8	0.868 5
L3	1.164 9	0.363 1	1.011 4	0.661 4	0.690 5	0.821 8
L4	0.976 8	0.299 2	0.766 3	0.622 1	0.523 2	0.674 2
F1	0.626 5	0.284 8	0.691 2	1.027 9	0.493 8	0.581 6
F2	0.547 3	0.231 6	0.587 7	0.536 8	0.429 1	0.594 1
F3	0.669 1	0.322 5	0.698 4	0.721 6	0.540 7	0.792 6
F4	0.655 9	0.221 2	0.591 3	0.557 5	0.431 4	0.528 7
S1	0.573 0	0.218 1	0.557 3	0.679 2	0.404 6	0.446 8
S2	0.591 1	0.344 4	0.623 8	0.758 6	0.411 1	0.572 1
S3	0.494 6	0.178 2	0.478 2	0.502 0	0.299 5	0.356 1
S4	0.578 8	0.177 3	0.504 9	0.403 5	0.287 2	0.380 3
G1	0.357 4	0.223 1	0.431 1	0.633 3	0.336 1	0.477 5
G2	0.425 6	0.226 3	0.456 6	0.587 4	0.348 0	0.513 3
G3	0.381 7	0.134 4	0.403 5	0.501 6	0.246 2	0.338 2
G4	0.367 3	0.218 1	0.443 9	0.670 5	0.306 8	0.426 9

2.6 基于化学计量学方法的不同等级鹿茸饮片的比较与区分

为了进一步比较与区分不同等级鹿茸饮片，寻找化学成分的差异，采用化学计量学方法以测得的 6 种成分的含量为变量，对 16 批鹿茸饮片进行分析。

2.6.1 聚类分析 本实验运用 SPSS 19.0 统计软件以 16 批鹿茸饮片峰面积为变量，以平方欧氏距离 (Euclidean 距离) 为区间，采用组内均连法，对 16 批鹿茸饮片指纹图谱进行系统聚类分析，结果见图 3。由聚类分析树状图可知，16 批鹿茸样品可分为 4 类，L1~L4 为一类，G1~G4 为一类，F1、F3、F4 为一类，剩余 5 批为一类。由结果可知，采用聚类分析可以将蜡片、骨片与粉片和纱片很明显的区分开来，但是粉片与纱片区分不是很清晰，仍可归为一类。由此可见，聚类分析法既能全面反映 16 批鹿茸样品 HPLC 色谱图之间的相似关系，又能反映不同批次产品之间的差异。

2.6.2 PCA PCA 属于一种非监督的多元统计的分析方法，在不丢失太多信息的基础上通过正交变换将一组可能存在相关性的变量转换为一组线性不相关的变量，转换后的这组变量称为主成分^[26-27]。其目的在于减少变量的数目使多变量数据集可视化，

结合原始变量的线性关系生成影响分类较大的主成分，该方法被广泛应用于中药材区分与鉴别中。

为了进一步鉴别和区分 4 种鹿茸饮片，以所测定的 6 种成分的含量为变量进行 PCA。由 PCA 可知前 2 个主成分累积贡献率为 92.9%，其中第 1 主成分贡献率为 81.1%，第 2 主成分贡献率为 11.2%。由初始因子载荷矩阵可知前 2 个成分已基本能反映 4 种鹿茸饮片的主要特征。结果见表 3、4。

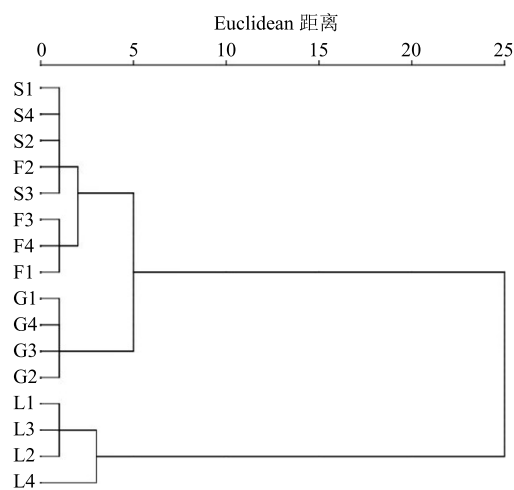


图 3 鹿茸饮片聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis of CCP pieces

表 3 特征值与方差贡献率

Table 3 Characteristic values and cumulative variance proportion

成分	初始特征值			提取平方和载入		
	合计	方差贡献率/%	累积贡献率/%	合计	方差贡献率/%	累积贡献率/%
1	4.868	81.134	81.134	4.868	81.134	81.134
2	0.712	11.862	92.995	0.712	11.862	92.995
3	0.281	4.691	97.686	0.281	4.691	97.686
4	0.122	2.041	99.727	0.122	2.041	99.727
5	0.009	0.157	99.884	0.009	0.157	99.884
6	0.007	0.116	100.000	0.007	0.116	100.000

表 4 初始因子载荷矩阵

Table 4 Component matrix

因子	载荷					
	1	2	3	4	5	6
F1	0.891	-0.398	0.210	0.032	0.008	0.055
F2	0.937	0.101	-0.211	0.258	-0.031	0.001
F3	0.956	-0.212	0.187	0.045	0.031	-0.059
F4	0.676	0.705	0.212	-0.011	0.015	0.013
F5	0.978	-0.280	0.001	-0.193	-0.067	-0.011
F6	0.932	0.014	-0.336	-0.125	0.051	0.009

依据前 2 个成分的含量建立的 PCA 模型累积解释能力参数 R^2_x 和预测能力参数 Q^2 分别为 0.930 和 0.701，说明所建立的模型的区分度和预测程度都较好。以前 2 个主成分建立坐标系，得到 16 批鹿茸饮片的 PCA 得分图，见图 4。由 PCA 得分图可知，鹿茸蜡片与骨片明显分布于 2 个区域，可以被分为 2 类，而粉片与纱片分在 1 个区域，区分不够明显，可以被分为第 3 类，提示鹿茸饮片在化学成分的量上存在一定的差异性。

2.6.3 OPLS-DA OPLS-DA 利用正交信号矫正过

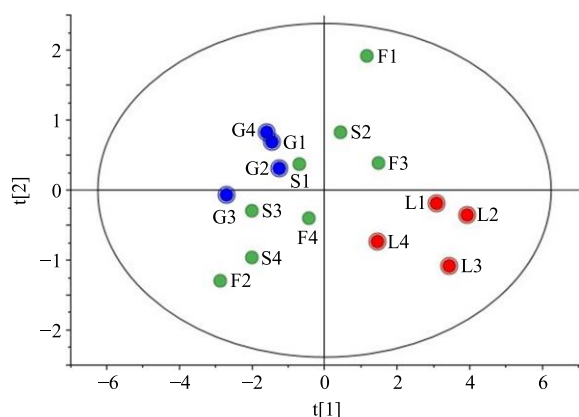


图 4 鹿茸饮片 PCA 得分

Fig. 4 PCA scores plots of CCP pieces

滤原理, 从正交预测变量中收集出对预测有用的变量^[28-29], 可以很好地区分组间差异并寻找差异性化合物。为了进一步区分 4 种鹿茸饮片及寻找差异化合物, 首先进行无监督的 PCA 之后, 再进一步采用有监督的 OPLS-DA 对鹿茸饮片进行分析。以 6 种化学成分的含量作为输入变量, 以 16 批鹿茸饮片为输出变量进行 OPLS-DA。建立的 OPLS-DA 模型中, 累积解释能力参数 R_x^2 和 R_y^2 分别为 0.929 和 0.946, 预测能力参数 Q^2 为 0.897, 一般认为 R^2 和 Q^2 大于 0.5 时, 模型具有较好的稳定性及预测能力, 故本实验所建立的 OPLS-DA 模型的稳定性及预测能力均可达到要求, 可用于鉴别与区分 4 种鹿茸饮片。由 OPLS-DA 得分图 (图 5) 可知, 与聚类分析和 PCA 分析结果相似, 蜡片与骨片可以很好地被分为两类, 但是粉片和纱片区分不够明显。鹿茸蜡片与骨片分布相对集中, 而粉片与纱片分布较分散, 结果提示不同饮片之间有较大差异, 蜡片与骨片质量较稳定。

对 4 组饮片的数据差异性进行整体分析, 得到变量权重重要性排序 (variable importance in projection, VIP) 预测值, 一般认为 $VIP > 1$ 的变量可视为 4 组鹿茸饮片的差异性标志物。6 种成分尿

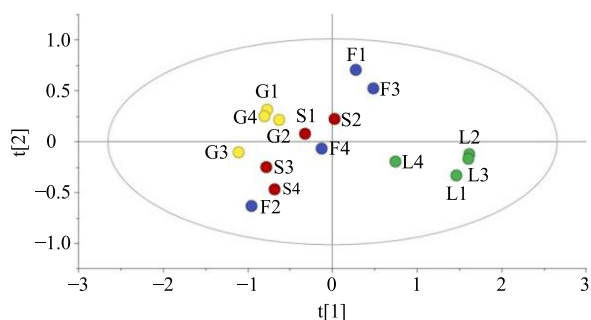


图 5 鹿茸饮片 OPLS-DA 得分

Fig. 5 OPLS-DA scores plots of CCP pieces

嘧啶、次黄嘌呤、肌苷、腺嘌呤、鸟苷、尿苷的 VIP 值分别为 1.25、1.21、1.07、0.91、0.91、0.40, 可知尿嘧啶、次黄嘌呤和肌苷的 VIP 分别为 1.25、1.21、1.07。因此确定尿嘧啶、次黄嘌呤和肌苷为 4 种鹿茸饮片的差异性化合物, 可以作为区分和鉴别 4 种饮片的指标性成分。对 4 种饮片的差异性化合物进行统计分析, 结果显示蜡片的含量均高于其他 3 种饮片, 骨片的含量均低于其他 3 种饮片。

3 讨论

本研究采用二极管阵列检测器对鹿茸样品进行全波长扫描, 结果显示在 254 nm 波长下鹿茸样品峰数目多且分离度良好, 因此将 254 nm 作为鹿茸样品特征指纹图谱及含量测定检测波长; 通过比较冷凝回流、超声与震荡提取 3 种提取方法, 结果显示震荡提取含量最低, 冷凝回流与超声结果相近, 考虑到操作的方便性, 采用超声提取; 考察了甲醇、乙腈和水 3 种溶剂, 结果显示采用甲醇和乙腈作为溶剂, 色谱峰的峰形较差, 故采用水作为提取溶剂; 通过比较 10、20、30 倍溶剂用量, 结果显示 20 倍后含量不再增加, 故选用 20 倍溶剂体积; 通过比较提取 10、30、60 min, 结果显示提取 30 min 后含量不再增加, 故采用 30 min 作为提取时间。

本研究采用 HPLC 法对 16 批次的鹿茸饮片进行分析, 建立了鹿茸饮片化学指纹图谱, 结果显示相似度均大于 0.960, 表明 4 种鹿茸饮片所含化学成分基本一致, 所建立的指纹图谱可用于鹿茸饮片的鉴定与质量控制。由于不同鹿茸饮片所在鹿茸部位不同, 按照市面划分自鹿茸顶端至底部依次为蜡片、粉片、纱片和骨片, 导致饮片之间性状差异较大, 因此本研究在建立鹿茸指纹图谱的基础上对 6 种成分进行含量测定。

含量结果见表 4, 结果显示鹿茸饮尿片中 6 种成分总量为 2.00~4.83 mg/g, 以所测定的 6 种成分作为质量控制指标, 建议蜡片、粉片、纱片和骨片 6 种成分总量分别不低于 3.50、2.80、2.30、2.00 mg/g。6 种成分中尿嘧啶、次黄嘌呤和尿苷质量分数最高, 分别为 0.35~1.18 mg/g、0.40~1.05 mg/g、0.40~1.03 mg/g, 腺嘌呤质量分数最低, 为 0.13~0.52 mg/g, 而肌苷和鸟苷成分质量分数差异不大, 分别为 0.24~0.69 mg/g、0.33~0.86 mg/g。

为了进一步比较 4 种鹿茸饮片化学成分差异, 并寻找差异性成分, 进一步采用 PCA 和 OPLS-DA 等化学计量学方法, 对 4 种鹿茸饮片进行分析比较。

结果表明,基于 6 种化学成分的含量测定结果,可以较好地地区分蜡片、骨片与粉片和纱片,尿嘧啶、次黄嘌呤和肌苷为 4 种饮片之间的差异性化合物,可以作为区分和鉴别 4 种饮片的质量控制指标。

本研究采用 HPLC 法建立不同批次鹿茸饮片特征指纹图谱,并对其相似度进行分析,然后采用聚类分析和 PCA 对 16 批鹿茸样品数据进行分析。所建立的方法简便、准确,为鹿茸饮片的质量控制提供有效的方法与理论依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 周景春, 王 飞. 壮肾阳益精血的鹿茸 [J]. 首都食品与医药, 2017, 7(13): 51.
- [3] 张宗保. 鹿茸益肾胶囊治疗肾阳虚证阳痿的药效学研究 [J]. 中国执业药师, 2014, 11(6): 20-23.
- [4] 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.
- [5] 晋大鹏, 胡志帅, 陈书明. 鹿茸的化学成分及其生物活性研究进展 [J]. 山西中医学院学报, 2009, 10(2): 67-68.
- [6] 裴纹萱, 李 飞, 董 玲. 鹿茸的化学成分及生物活性研究进展 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2012, 14(5): 2065-2069.
- [7] 宫瑞泽, 王燕华, 赵 卉, 等. 鹿茸加工过程中 5-羟甲基糠醛的产生及影响因素探讨 [J]. 中草药, 2018, 49(14): 3270-3278.
- [8] Thelen T H. Effects of harvest on antlers of simulated populations of elk [J]. *J Wildlife Manage*, 1991, 55(2): 243-249.
- [9] 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.
- [10] Kruuk L E B, Slate J, Pemberton J M, *et al.* Antler size in red deer: Heritability and selection but no evolution [J]. *Evolution*, 2002, 56(8): 1683-1695.
- [11] 王婧瑜. 鹿茸中促细胞增殖的有效部位的研究及其主成分分析 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2015.
- [12] 孙印石, 王燕华, 王玉方, 等. UPLC 法测定不同加工方式梅花鹿鹿茸中的核苷类成分 [J]. 中草药, 2018, 49(4): 840-846.
- [13] 雒伟伟, 赵海平, 齐晓妍, 等. 鹿茸药材鉴定和质量控制的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(21): 70-74.
- [14] 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.
- [15] Li C, Zhao H, Liu Z, *et al.* Deer antler a novel model for studying organ regeneration in mammals [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014, 56(7): 111-122.
- [16] 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.
- [17] 姚梦杰, 胡淑春, 张 辉, 等. 鹿茸及其产品质量评价研究 [J]. 吉林中医药, 2016, 36(6): 594-597.
- [18] 胡翠英, 刘传明, 赵 静, 等. 鹿茸及鹿源系列中药真伪鉴别与质量评价研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(10): 76-78.
- [19] Lee S R, Jeon B T, Kim S J, *et al.* Effects of antler development stage on fatty acid, vitamin and GAGs contents of velvet antler in spotted deer (*Cervus nippon*) [J]. *Asian Aust J Anim Sci*, 2007, 20(10): 1546-1550.
- [20] 谢培山. 中药色谱指纹图谱鉴别的概念、属性、技术与应用 [J]. 中国中药杂志, 2001, 26(10): 653-655.
- [21] 邓 斌, 王秋燕, 周成高, 等. 益肾排毒丸中有效成分含量测定及指纹图谱研究 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(4): 658-662.
- [22] 李 强, 杜思邈, 张忠亮, 等. 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3095-3104.
- [23] Gao S M, Liu J S, Wang M, *et al.* Quantitative and HPLC fingerprint analysis combined with chemometrics for quality evaluation of *Codonopsis Radix* processed with different methods [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(2): 160-168.
- [24] Kassab S E, Hegazy G H, Eid N M, *et al.* ChemInform abstract: Synthesis of 1*H*-indole-2,3-dione-3-thiosemicarbazone ribonucleosides as antibacterial agents [J]. *Cheminform*, 2010, 29(1): 72-80.
- [25] 付小梅, 孙 茜, 刘 婧, 等. 基于聚类分析和主成分分析的栀子指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2018, 49(19): 186-194.
- [26] 曲雷鸣, 李 峰, 龚 伟, 等. 基于药效评价的主成分分析法对不同规格鹿茸差异性研究 [J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(4): 52-57.
- [27] Yang J, Zhang D D, Frangi A F, *et al.* Two-dimensional PCA: A new approach to appearance-based face representation and recognition [J]. *IEEE T Pattern Anal*, 2004, 26(1): 131-137.
- [28] 王悦云, 王雪飞, 陈小秀, 等. 基于主成分分析和聚类分析研究贵州不同产地粗毛淫羊藿指纹图谱 [J]. 种子, 2018, 37(9): 11-17.
- [29] 杨宝慧, 刘天易, 陈雅慧, 等. 基于指纹图谱结合多成分定量分析的视疲宁片质量评价研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(24): 31-36.