

多组分定量结合 AHP-熵权法对不同产地梅花鹿茸饮片质量综合评价

申 柯¹, 姚晓煜¹, 李建国², 孙晓菲², 夏国凤², 张守君², 王 彬¹, 赵晓莉¹, 谢 辉^{1*}, 毛春芹¹, 陆兔林^{1*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 吉林敖东延边药业股份有限公司, 吉林 敦化 133700

摘要: **目的** 建立一种能够对梅花鹿茸饮片质量进行综合评价的方法, 为梅花鹿茸饮片质量标准的完善及优质梅花鹿茸饮片的筛选提供依据。 **方法** 收集 30 批次的梅花鹿茸药材, 采用柱前 (PITC) 衍生法检测梅花鹿茸饮片中氨基酸含量, 并利用主成分分析 (principal components 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不同产地梅花鹿茸饮片的氨基酸含量进行分析; 再将浸出物含量、总氮含量和氨基酸含量结果结合 AHP-熵权法建立梅花鹿茸饮片综合质量评价方法。 **结果** 建立了梅花鹿茸饮片氨基酸含量 HPLC 法测定方。PCA 分析结果显示不同产地梅花鹿茸饮片的氨基酸含量差异显著; OPLS-DA 分析结果显示甘氨酸、羟脯氨酸和脯氨酸是引起梅花鹿茸饮片质量差异的差异标志物; 通过 AHP-熵权法分析发现: 3 个产地梅花鹿茸饮片的综合评分中, 吉林敦化产区综合总分为 7.410, 辽宁西丰产区综合总分为 3.974, 吉林长春产区综合总分为 3.595, 可知吉林敦化的梅花鹿茸饮片的质量最佳。 **结论** 所建立的方法操作便捷、结果准确; 多指标含量测定联合 AHP-熵权法全面客观, 可用于不同产地梅花鹿茸饮片综合品质的评价, 为后续梅花鹿茸定量质量控制研究提供参考。

关键词: 梅花鹿; 鹿茸; 主成分分析; 正交偏最小二乘判别分析法; AHP-熵权法; 质量评价; 甘氨酸; 羟脯氨酸; 脯氨酸
中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)21-7474-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.21.025

Comprehensively evaluation of quality of sika deer antler decoction pieces from different origins by determination of multi-component content combined with AHP-entropy weight method

SHEN Ke¹, YAO Xiaoyu¹, LI Jianguo², SUN Xiaofei², XIA Guofeng², ZHANG Shoujun², WANG Bin¹, ZHAO Xiaoli¹, XIE Hui¹, MAO Chunqin¹, LU Tulin¹

1. School of Pharmacy, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jilin Aodong Yanbian Pharmaceutical Co., Ltd., Dunhua 133700, China

Abstract: Objective A method was established to comprehensively evaluate the quality of sika deer antler decoction pieces from different origins, so as to provide a basis for the improvement of the quality standards of sika deer antler decoction pieces and the screening of high-quality sika deer antler decoction pieces. **Methods** Thirty batches of sika deer antler velvet were collected, and the amino acid content of sika deer antler decoction pieces from different origins was analyzed by pre-column (PITC) derivatization method, and the amino acid content of sika deer antler decoction pieces from different origins was analyzed by chemometric methods such as principal component analysis and orthogonal partial least squares discriminant analysis. Then, the results of extract content, total nitrogen content and amino acid content were combined with the AHP-entropy weight method to establish a comprehensive quality evaluation method for sika deer antler decoction pieces. **Results** A method for the determination of amino acid content of sika deer antler decoction pieces (HPLC method) was established, and the results of methodological investigation met the requirements of the

收稿日期: 2024-04-03

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2023YFC3504200); 江苏省研究生实践创新计划项目 (SJCX24_0908); 江苏省研究生科研创新计划项目 (KYCX24_2299)

作者简介: 申 柯, 硕士研究生, 主要研究中药炮制及中药饮片质量标准。E-mail: 376619652@qq.com

*通信作者: 陆兔林, 教授, 博士生导师, 主要从事中药炮制及中药饮片质量标准研究。E-mail: ltl2021@njucm.edu.cn

谢 辉, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中药制剂技术与质量评价研究。E-mail: njxh66@njucm.edu.cn

Chinese Pharmacopoeia. The results of PCA analysis showed that the amino acid content of sika deer antler decoction pieces from different origins was significantly different. The results of OPLS-DA analysis showed that glycine, hydroxyproline and proline were differential quality markers that caused the quality difference of sika deer antler decoction pieces. Through the analysis of AHP-entropy weight method, the comprehensive score of sika deer antler decoction pieces from the three producing areas was 7.410 in Dunhua City, 3.974 in Xifeng County, Liaoning Province, and 3.595 in Shuangyang District, Jilin Province. **Conclusion** The established method is convenient to operate and the results are accurate; The determination of multi-index content combined with AHP-entropy weight method is comprehensive and objective, which can be used to evaluate the comprehensive quality of sika deer antler decoction pieces from different origins, and provide a reference for subsequent quantitative quality control research on sika deer antler velvet.

Key words: *Cervus nippon* Temminck; *Cervi Cornu Pantotrichum*; principal component analysis; orthogonal partial least squares discriminant analysis; AHP-entropy weight method; quality evaluation; glycine; hydroxyproline; proline

鹿茸的药用历史可以追溯到东汉末期,早在《神农本草经》等古籍中就有对鹿茸的记载:“四月角欲生时,取其茸,阴干,以形如小紫茄子者为上。”^[1]古代医家也将鹿茸列为上品补药,认为其有滋补强壮、补肾益精、滋阴补阳、强筋骨等功效。至今《中国药典》2020 年版中规定,鹿茸为鹿科动物梅花鹿 *Cervus nippon* Temminck 或马鹿 *C. elaphus* Linnaeus 的雄鹿未骨化密生茸毛的幼角,前者习称“花鹿茸”,后者习称“马鹿茸”。甘、咸,温,归肾、肝经,具有壮肾阳、益精血、强筋骨等功效^[2]。自古至今,鹿茸一直都是味珍贵的滋补药材。

《中国药典》2020 年版中收录含鹿药味药品 47 种;国家药品监督管理局登记含鹿茸药品 929 种,含鹿药味保健食品 222 种。鹿茸每年在中药大品种进出口贸易额中占比超过 60%,鹿茸在中药产业及国民经济中占据重要地位^[3]。鹿茸应用广泛,已经成为我们日常生活中不可或缺的一味中药。但在《中国药典》2020 年版和各省市级标准中,鹿茸项下大多无含量测定项或仅以外观性状为依据进行品质等级划分^[4]。鹿茸质量评价指标缺失、专属特征性鉴别薄弱等问题导致了国内鹿茸市场的混乱,因此加快鹿茸指标性成分研究及标准化质量控制体系建设是缓解这些情况的关键。

梅花鹿茸中成分复杂多样,主要含有鹿茸多肽、蛋白质、氨基酸、激素、脂类、多糖、多胺、生物碱等多种化学成分^[5]。其中,蛋白质是鹿茸中含量最高且非常重要的生物活性物质,而氨基酸是蛋白质的基本结构单位和参与生物代谢过程的重要物质^[6]。有研究表明,由于鹿茸种类、生长环境、采收季节等情况的不同,氨基酸的种类虽无明显差异,但其含量差异却较为显著^[7-10]。另有研究报道,三杈鹿茸中的氨基酸含量高于二杠鹿茸中氨基酸含量,推测可能与其采收期相关,二杠鹿茸在 40 d 时采收,很有可能

因生长时间较短,营养富集不充分导致^[11]。基于此,说明氨基酸含量可以作为评价鹿茸品质优劣的参考指标对梅花鹿茸饮片进行质量评价。但单独依靠氨基酸含量难以综合评判梅花鹿茸饮片的质量,参考《中国药典》及各省市地方标准和炮制规范有关鹿茸的项下,决定对梅花鹿茸饮片的浸出物含量和总氮含量进行测定,完善 AHP-熵权法加权依据的科学性,综合评判梅花鹿茸饮片的质量。本实验旨在为梅花鹿茸饮片的质量评价提供科学的依据,对其合理开发和充分利用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

DFY-300 型摇摆式高速万能粉碎机(温岭市林大机械有限公司);CAV64C 型电子天平(上海奥豪斯有限公司);PT-124/85s 型电子分析天平(华志电子科技有限公司);四号筛(江苏省南京市雄晨筛网厂);HH4 型数显恒温水浴锅(国华电器有限公司);KQ-500B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)。

1.2 试剂与药材

L-羟基脯氨酸(上海麦克林生化科技股份有限公司,批号 C11478024,质量分数 99%);甘氨酸(批号 S29A10I96410,质量分数≥99%),L-脯氨酸(批号 Z12O11H127142,质量分数≥99%),L-亮氨酸(批号 J07GB154079,质量分数≥98%),L-赖氨酸(批号 J19IB217736,质量分数≥98%)均购于上海源叶生物科技有限公司;甲醇、乙腈(色谱纯,美国 Fisher 公司);白酒(天津渔阳酒业有限责任公司);异硫氰酸苯酯(批号 C12095842,上海麦克林生化科技股份有限公司),三乙胺(批号 20141217,国药集团化学试剂有限公司),正己烷(批号 20221124,国药集团化学试剂有限公司),无水醋酸钠(批号 20231128,

国药集团化学试剂有限公司) 等均为分析纯。

30 批梅花鹿茸药材分别采集于吉林敦化、辽宁西丰和吉林长春, 具体样品批次信息见表 1, 经南京中医药大学药学院陈建伟教授鉴定为鹿科动物梅花鹿 *C. nippon* Temminck 的未骨化密生茸毛的幼角。

表 1 30 批梅花鹿茸来源信息
Table 1 Source information of 30 batches of plum deer antler

编号	产地	编号	产地
S1	辽宁西丰	S16	吉林敦化
S2	辽宁西丰	S17	吉林敦化
S3	辽宁西丰	S18	吉林敦化
S4	辽宁西丰	S19	吉林敦化
S5	辽宁西丰	S20	吉林敦化
S6	辽宁西丰	S21	吉林长春
S7	辽宁西丰	S22	吉林长春
S8	辽宁西丰	S23	吉林长春
S9	辽宁西丰	S24	吉林长春
S10	辽宁西丰	S25	吉林长春
S11	吉林敦化	S26	吉林长春
S12	吉林敦化	S27	吉林长春
S13	吉林敦化	S28	吉林长春
S14	吉林敦化	S29	吉林长春
S15	吉林敦化	S30	吉林长春

2 方法与结果

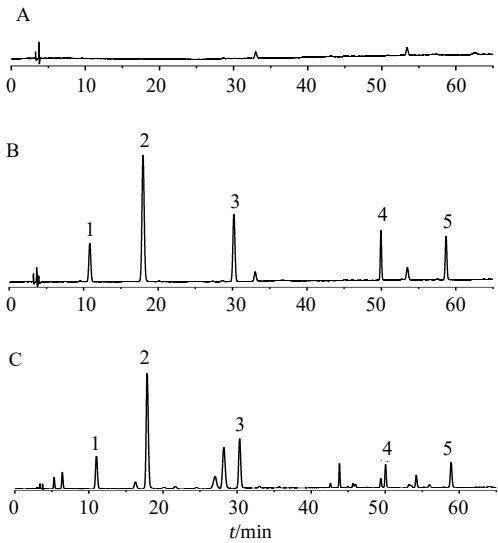
2.1 梅花鹿茸饮片的制备

前期以软硬程度为指标对《中国药典》2020 年版^[2]中记载的鹿茸炮制方法进行参数优化, 得到的具体炮制工艺参数如下: 取鹿茸, 大小分档, 火燎其表面茸毛, 刮净, 以布带缠绕茸体, 自锯口面小孔灌入热白酒, 并不断添酒, 室温下润制 5~7 h, 待鹿茸润至稍膨胀, 取出, 蒸制 2 min, 切成薄片并压平, 置于烘箱, 55 °C 条件下烘 60 min, 即得, 编号同药材。后续取样均是从整根梅花鹿茸药材炮制得到的饮片中 (其中有蜡片、半腊片、粉片和血片) 均匀取样。

2.2 氨基酸含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Merck Purospher® Star LRP-18 endcapped (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以 0.1 mol/L 醋酸钠 (用醋酸调 pH 至 6.5) (A) -乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~10 min, 95% A; 10~24 min: 95%~92% A; 24~35 min, 92%~85% A; 35~40 min, 85%~80% A; 40~50 min, 80%~75% A; 50~

65 min, 75%~70% A); 检测波长 254 nm; 柱温 35 °C; 体积流量 1 mL/min; 进样量 2 μL。色谱图见图 1。



1-羟脯氨酸; 2-甘氨酸; 3-脯氨酸; 4-亮氨酸; 5-赖氨酸。
1-Hyp; 2-Gly; 3-Pro; 4-Leu; 5-Lys.

图 1 空白样品 (A)、混合对照品 (B) 和梅花鹿茸饮片样品 (C) HPLC 图

Fig. 1 HPLC figure of blank sample (A), mixed control product (B) and plastron antler decoction piece sample (C)

2.2.2 对照品溶液的制备^[12] 取羟脯氨酸、甘氨酸、脯氨酸、亮氨酸、赖氨酸对照品适量, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 用 0.1 mol/L 稀盐酸定容至刻度, 制成每 1 mL 含羟脯氨酸 1.242 7 mg、甘氨酸 2.844 2 mg、脯氨酸 2.000 6 mg、亮氨酸 1.008 9 mg、赖氨酸 0.814 5 mg 的混合溶液即得。精密吸取混合对照品溶液 300 μL, 置于 5 mL 量瓶中, 依次加入 1 mol/L 的三乙胺乙腈溶液和 0.1 mol/L PITC 乙腈溶液各 0.5 mL, 混匀后, 室温放置 1 h, 加 50% 乙腈至刻度, 摇匀。取 1 mL, 加入正己烷 1 mL, 振摇, 放置 10 min, 取下层溶液, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得混合对照品储备液。

2.2.3 供试品溶液的制备 将梅花鹿茸饮片粉碎过 65 目筛, 精密称取粉末 0.1 g, 置氨基酸水解管中, 加入 6 mol/L 盐酸溶液 7 mL, 置于 150 °C 烘箱中水解 3 h, 放冷, 移至蒸发皿, 并用水分次洗涤, 洗液并入蒸发皿中, 水浴蒸干, 残渣加 0.1 mol/L 盐酸溶解, 转移至 10 mL 量瓶中, 加 0.1 mol/L 盐酸至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液。

2.2.4 线性关系考察 分别精密量取“2.2.2”项下混合对照品储备液,用 0.1 mol/L 盐酸稀释成不同浓度对照品溶液,分别进样,记录各指标性成分峰面积的值,以色谱峰面积为纵坐标 (Y),各对照品质量浓度为横坐标 (X) 绘制标准曲线,进行线性回归,得回归方程: 羟脯氨酸: $Y=3\,910X-0.352\,1$, $r=0.999\,9$, 线性范围为 4.66~74.56 $\mu\text{g/mL}$; 甘氨酸: $Y=6\,289.1X-1.664\,6$, $r=0.999\,7$, 线性范围为 10.67~170.65 $\mu\text{g/mL}$; 脯氨酸: $Y=4\,549.8X-0.464\,6$, $r=0.999\,4$, 线性范围为 7.50~120.04 $\mu\text{g/mL}$; 亮氨酸: $Y=4\,002.5X+2.477\,1$, $r=0.999\,5$, 线性范围为 3.78~60.54 $\mu\text{g/mL}$; 赖氨酸: $Y=5\,869X-1.364\,6$, $r=0.999\,8$, 线性范围为 3.05~48.87 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2.5 精密度试验 精密称取鹿茸饮片粉末 (S12) 0.1 g, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,连续进样 6 次,每次进样 2 μL ,记录峰面积,计算羟脯氨酸、甘氨酸、脯氨酸、亮氨酸、赖氨酸峰面积的 RSD 分别为 0.37%、0.93%、0.34%、0.53%、1.18%。

2.2.6 重复性试验 精密称取鹿茸饮片粉末 (S12) 0.1 g, 按“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液进样,记录峰面积,计算各成分羟脯氨酸、甘氨酸、脯氨酸、亮氨酸、赖氨酸并计算 RSD。结果羟脯氨酸、甘氨酸、脯氨酸、亮氨酸、赖氨酸质量分数的 RSD 分别为 0.71%、0.59%、0.64%、0.42%、0.58%。

2.2.7 稳定性试验 精密称取鹿茸饮片粉末 (S12) 0.1 g, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样分析,记录 5 种成分的峰面积,羟脯氨酸、甘氨酸、脯氨酸、亮氨酸、赖氨酸峰面积的 RSD 分别为 0.63%、2.36%、0.78%、1.96%、3.31%。

2.2.8 加样回收率试验 精密称取鹿茸饮片粉末 (S12) 0.05 g, 共 6 份,每份供试品中加入与各成分含量相等的对照品,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,进样,记录峰面积,计算各份样品中 5 种氨基酸含量,并计算加样回收率。5 种氨基酸成分的平均加样回收率为 95.63%~100.56%, RSD 为 0.74%~2.65%,均符合规定,表明本方法测定结果的准确度良好,测定结果可靠。

2.2.9 30 批梅花鹿茸饮片中氨基酸的含量测定 精密吸取 30 批鹿茸样品供试品溶液,依法进样分析,计算 5 种氨基酸成分含量,结果见表 2。

表 2 30 批梅花鹿茸饮片氨基酸含量测定结果

Table 2 Determination of amino acid content in 30 batches of porcine antler slices

编号	羟脯氨酸/%	甘氨酸/%	脯氨酸/%	亮氨酸/%	赖氨酸/%
S1	3.41	6.91	4.50	3.73	4.05
S2	3.36	6.79	4.43	3.65	3.87
S3	3.01	6.86	4.66	3.46	3.28
S4	2.97	6.66	4.58	3.38	3.46
S5	3.78	6.43	4.61	2.57	2.49
S6	3.59	6.04	4.97	2.76	3.45
S7	3.26	6.13	4.76	3.2	3.66
S8	3.36	6.18	4.44	3.12	3.18
S9	3.65	6.21	4.16	3.44	3.68
S10	3.85	6.56	4.19	3.51	3.49
S11	4.63	8.62	4.71	4.42	3.45
S12	4.52	8.53	4.89	4.16	4.21
S13	4.48	8.87	5.50	3.27	4.35
S14	4.89	8.68	5.11	3.18	4.30
S15	4.90	8.96	5.49	3.38	4.58
S16	4.98	8.32	5.46	3.37	4.83
S17	4.24	8.51	5.95	3.89	3.92
S18	4.11	8.67	5.84	3.46	4.86
S19	4.38	8.60	5.01	3.37	3.17
S20	4.66	8.78	4.64	3.84	3.43
S21	2.88	7.26	4.04	3.65	2.75
S22	3.94	7.19	4.11	3.24	2.65
S23	2.11	7.39	4.20	3.27	2.52
S24	3.17	7.48	4.26	3.31	2.55
S25	2.57	7.89	3.87	3.13	2.11
S26	2.79	7.92	3.94	3.15	3.33
S27	2.22	7.41	3.71	3.34	3.12
S28	2.47	7.36	3.32	2.78	3.10
S29	2.55	7.66	3.49	3.77	2.05
S30	2.76	7.43	3.78	3.01	3.59

2.3 化学计量学分析

2.3.1 主成分分析 (principal components analysis, PCA) PCA 是对多个变量进行线性转换,得到数量较少的主要变量的分析方法。即从多个变量之间进行关联分析,选出一些具有重要性的主成分,使其尽量保留原始变量的信息来实现对数据的降维^[10]。罗旖璐等^[13]利用 PCA 法分别对不同产地鸭跖草进行含量差异进行了分析,陶晓赛等^[14]对盾叶薯蓣中 31 个色谱峰进行 PCA 分析来分析不同产地盾叶薯蓣的成分差异,所以 PCA 法在进行多指标综合评价中有广泛的应用。通过 OriginPro 2018C 软件对以上 5 种氨基酸含量数据构建 PCA 模型图 (图 2),

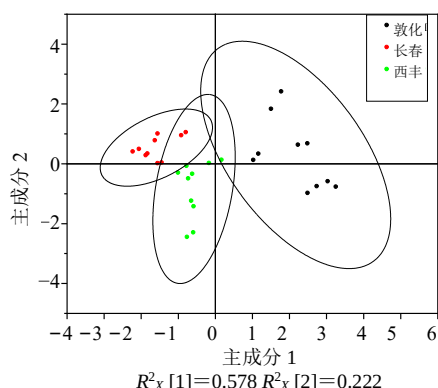


图 2 30 批梅花鹿茸饮片氨基酸含量 PCA 得分图

Fig. 2 PCA score of amino acid content in 30 batches of plum deer antler slices

共提取出 2 个主成分 ($R^2_X=0.8>0.5$), 表明提取的这 2 个主成分可以反映样品数据中的绝大部分信息。不同产地样品间差异明显, 各个产地均能聚为一类, 表面不同产地梅花鹿茸饮片样品可以被区分。

2.3.2 正交偏最小二乘法判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) PCA 结果显示不同产地的梅花鹿茸饮片质量差异较大, 为探索引起质量差异的因素, 进而以表 2 中的含量数据为变量, 运行 SIMCA14.1 软件构建 OPLS-DA 模型 (图 3)。相比于 PLS-DA, 该方法可以在不降低模型预测能力的前提下, 有效减少模型的复杂性和增强模型的解释能力, 从而最大程度诠释组间差异^[15]。 R^2 描述模型的拟合程度, Q^2 描述了 X 预测 Y 的能力。一般认为, Q^2 大于 0.5 表明模型具有良好的可靠性和可预测性, 大于 0.9 即为非常优秀, 且 R^2 、 Q^2 差距最好不大于 0.3。在该模型中, 模型参数 $R^2_X=0.973$ 、 $R^2_Y=0.912$ 、 $Q^2=0.892$, 均高于 0.5, 表明所建立的模型较为稳定可靠、预测能力强。对构建的 OPLS-DA 模型随机排列置换检验 200 次, 结果 R^2 截距值为 0.057 (<0.3), Q^2 截距值为 -0.394 (<0), 表明所构建的模型结果可靠、未过度拟合 (图 4)。根据变量重要性投影 (variable importance projection, VIP) 图 (图 5) 可知, VIP 值大于 1 的有 1、2 号峰, 说明梅花鹿茸饮片质量差异大可能由以上 2 个成分引起。另外, 3 号峰的 VIP 值为 0.989, 接近 1, 对梅花鹿茸饮片质量也可能产生比较大的影响。

2.4 其他指标成分含量测定

仅以氨基酸的含量难以综合判定鹿茸饮片的质量, 参考《山东省中药饮片炮制规范》(2023 年

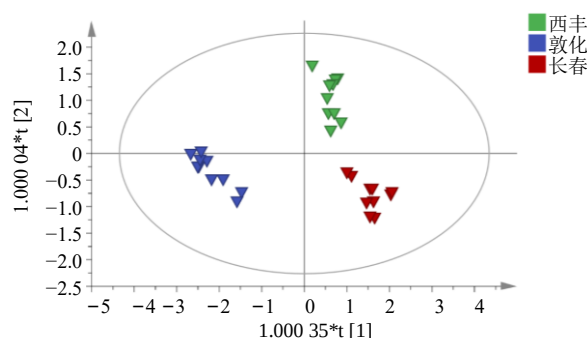


图 3 30 批梅花鹿茸饮片氨基酸含量 OPLS-DA 得分图

Fig. 3 OPLS-DA score of amino acid content in 30 batches of porcine antler slices

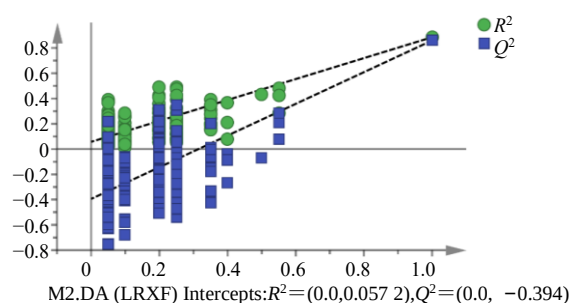


图 4 30 批梅花鹿茸饮片氨基酸含量 200 次检验置换图

Fig. 4 Replacement chart of amino acid content in 30 batches of porcine antler slices tested 200 times

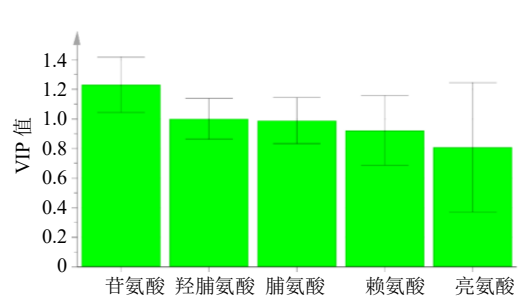


图 5 30 批梅花鹿茸饮片氨基酸含量的 VIP 值图

Fig. 5 VIP value diagram of amino acid content of 30 batches of plum deer antler slices

版) (<https://db.ouryao.com/>) 中将总氮含量做为鹿茸的含量测定指标, 总氮含量表示梅花鹿茸饮片中各种形态无机和有机氮的总量, 包括 NO_3^- 、 NO_2^- 和 NH_4^+ 等无机氮和蛋白质、氨基酸和有机胺等有机氮, 总氮含量乘 6.25 即为蛋白质含量^[16], 而蛋白质是动植物的主要组成部分之一, 所以总氮含量是鹿茸质量控制必不可少的指标。根据《中国

药典》2020 年版^[2]，对于活性成分或指标性成分不清或含量很低或尚无精确的定量方法的药材，浸出物含量是控制其质量的关键指标。综上，本研究接下来对梅花鹿茸饮片的浸出物以及总氮含量进行测定，做为后续加权依据，综合评判饮片的质量。

2.4.1 水溶性浸出物测定^[2] 按照《中国药典》2020 年版（四部）通则 2201 水溶性浸出物测定法项下的热浸法测定。

2.4.2 醇溶性浸出物测定^[2] 根据《山东省中药饮片炮制规范（2023 年版）》，以 70%乙醇作溶剂，按照《中国药典》2020 年版（四部）通则 2201 浸出物测定法项下的热浸法测定。

2.4.3 总氮含量测定^[2] 按照《中国药典》2020 年版（四部）通则 0731 蛋白质含量测定法中的第一法（凯式定氮法）对鹿茸饮片进行总氮含量的测定。

取 30 批鹿茸饮片进行浸出物和总氮含量测定，测定结果见表 3。结果显示，30 批不同产地的鹿茸饮片水溶性浸出物质量分数在 19.49%~28.31%，醇溶性浸出物质量分数在 9.47%~13.81%，总氮质量分数测定结果为 7.16%~10.41%。

2.5 AHP-熵权法评价饮片质量

2.5.1 AHP 法确定各指标成分权重 AHP 即层次分析法，是一种定性和定量相结合、系统化和层次化的分析方法^[17]。根据影响不同产地梅花鹿茸饮片指标间的相互关系，确立 3 个层次的综合评价模型，构成目标层、指标层和方案层，根据指标层对 30 批梅花鹿茸饮片质量进行评价。层次结构的第 1 个层次用于定义目标，即不同产地梅花鹿茸饮片的品质评价。第 2 级为指标层，即与梅花鹿茸饮片质量有关的影响因子，方案层位于第 3 层，即 30 批不同产地梅花鹿茸饮片样品。具体步骤如下。

（1）构建判断矩阵：根据梅花鹿茸饮片中各指标成分的含量及重要程度，将指标成分含量作为权重予以量化。参照“2.3”项描述，总氮含量和浸出物含量是控制梅花鹿茸饮片质量的关键指标。而氨基酸是鹿茸有机成分中含量最高的营养物质，其种类与含量决定着蛋白质品质的高低。鹿茸中含 20 种以上氨基酸，总氨基酸含量约占 50%以上，其中甘氨酸含量最高，脯氨酸含量也较高^[18-19]，另外有报道，羟脯氨酸是构成胶原蛋白的特异性氨基酸，不参与其他蛋白质的合成，系胶原蛋白合成过程中已合成肽链中的羟脯氨酸被羟化酶转化而成^[20-21]，宫

表 3 不同产地鹿茸饮片浸出物和总氮含量测定结果

Table 3 Determination of extract and total nitrogen content of antler decoction pieces from different origins

编号	水溶性浸出物/%	醇溶性浸出物/%	总氮/%
S1	23.55	10.15	8.93
S2	21.43	12.63	8.61
S3	22.86	11.32	8.49
S4	24.11	9.47	7.16
S5	20.44	10.20	8.54
S6	22.79	12.89	7.89
S7	23.25	12.28	8.79
S8	20.69	10.64	8.54
S9	23.74	11.43	6.35
S10	23.15	13.43	9.18
S11	26.40	12.05	8.91
S12	25.78	14.21	8.13
S13	23.28	13.53	9.47
S14	24.52	11.22	10.41
S15	27.10	11.46	9.70
S16	28.19	13.51	9.71
S17	27.98	11.29	9.06
S18	25.79	10.11	8.69
S19	28.31	12.42	9.22
S20	26.57	13.81	9.77
S21	24.11	10.13	8.21
S22	20.44	12.47	8.04
S23	25.69	11.11	8.39
S24	21.27	9.75	7.86
S25	20.02	10.11	8.38
S26	24.53	12.65	8.17
S27	25.67	11.71	8.42
S28	19.49	10.48	7.22
S29	24.79	11.54	7.47
S30	20.57	12.68	8.83

瑞泽等^[3]将羟脯氨酸定为鹿茸指标成分之一。

除此之外，鹿茸中还含有人体不能合成的必需氨基酸，其中赖氨酸和亮氨酸含量较高^[20]。综上，判断总氮含量的重要程度优先于浸出物含量和氨基酸含量；浸出物含量的重要程度优先于氨基酸含量；而甘氨酸、羟脯氨酸的重要程度大于其他 3 种氨基酸，脯氨酸的重要程度大于赖氨酸和亮氨酸的含量，最终确定优先顺序为总氮>浸出物>甘氨酸=羟脯氨酸>脯氨酸>赖氨酸=亮氨酸。再根据 AHP 理论判断矩阵 1~9 标度，对同一层次内 n 个指标的

相对重要程度进行打分, 见表 4。根据公式 (1) 构建判断矩阵 A, 打分结果见表 5, 用 a_{ef} 表示因素 e 相对于因素 f 的比较结果。

$$A = (a_{ef})_{n \times n} = \begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} & \cdots & a_{1n} \\ a_{21} & a_{22} & \cdots & a_{2n} \\ \cdots & \cdots & \cdots & \cdots \\ a_{n1} & a_{n2} & \cdots & a_{nn} \end{bmatrix} \quad (1)$$

表 4 AHP 构建判断矩阵的标准

Table 4 Criterion for constructing judgment matrix by AHP

因素 e 比因素 f	量化值
表示两因素之间相比, 同等重要	1
表示两因素之间相比, 稍微重要	3
表示两因素之间相比, 明显重要	5
表示两因素之间相比, 强烈重要	7
表示两因素之间相比, 极端重要	9
两相邻判断的中间值	2、4、6、8
倒数	若因素 e 与因素 f 的重要性之比为 a_{ef} , 则因素 f 与因素 e 重要性之比为 $a_{ef}=1/a_{ef}$

表 5 指标成对比较的判断优先矩阵

Table 5 Judgment priority matrix of index pair comparison

评价指标	得分							
	总氮	水溶性浸出物	醇溶性浸出物	甘氨酸	羟脯氨酸	脯氨酸	亮氨酸	赖氨酸
总氮	1	2	2	6	6	7	8	8
水溶性浸出物	1/2	1	1	5	5	6	7	7
醇溶性浸出物	1/2	1	1	5	5	6	7	7
甘氨酸	1/6	1/5	1/5	1	1	2	4	4
羟脯氨酸	1/6	1/5	1/5	1	1	2	4	4
脯氨酸	1/7	1/6	1/6	2	2	1	2	2
亮氨酸	1/8	1/7	1/7	1/4	1/4	1/2	1	1
赖氨酸	1/8	1/7	1/7	1/4	1/4	1/2	1	1

(2) 计算主观权重系数 (W_j^s): 首先对判断矩阵 A 进行几何平均 (方根法), 按公式 (2) 计算得到初始权重系数 (W_j'), a_{jn} 表示第 j ($j=1, 2, \dots, n$) 个指标因素对第 n ($n=1, 2, \dots, j$) 个指标因素的比较结果, 然后按照公式 (3) 计算归一化 W_j^s , 得到 9 个指标的 W_j^s , 得到总氮、醇溶性浸出物、水溶性浸出物、甘氨酸、羟脯氨酸、赖氨酸、脯氨酸、亮氨酸的权重分别为 0.316、0.217、0.217、0.070、0.070、0.060、0.026、0.026。

$$W_j' = (a_{j1}a_{j2} \cdots a_{jn})^{1/n} \quad (2)$$

$$W_j^s = W_j' / \sum_{j=1}^n W_j' \quad (3)$$

(3) 一致性检验: 对矩阵进行一致性检验。首先根据公式 (4) 计算最大特征根 (λ_{max}), 再根据公式 (5) 计算一致性指标 (consistency index, CI), 得到 CI 为 0.047, 一致性比例 (consistency ratio, CR) ($CR=CI/RI$, RI 为自由度指标) 为 $0.032 < 0.1$,

表明该矩阵符合一致性检验。

$$\lambda_{max} = \left[\sum_{j=1}^n \left(\sum_{j=1}^n a_{jn} W_j' / W_j' \right) \right] / n \quad (4)$$

$$CI = (\lambda_{max} - n) / (n - 1) \quad (5)$$

2.5.2 熵权法确定各指标成分权重 熵权法是一种在综合考虑各因素所提供信息量的基础上, 根据各项指标观测值所提供信息量的大小来确定指标权重的方法^[23-24]。具体步骤如下。

(1) 建立试验原始数据矩阵: 现有 m 个样本, n 个评价指标, 原始数据矩阵 $R = (X_{ij})_{m \times n}$, 以羟脯氨酸、甘氨酸、脯氨酸、亮氨酸、赖氨酸、醇溶性浸出物含量、水溶性浸出物含量及总氮含量 8 个指标为评价指标, 建立原始数据矩阵 (R)。

(2) 将原始数据转化为概率矩阵: 根据公式 (6) 将原始数据矩阵 R 转化为概率矩阵 (P), P_{ij} 表示在第 j 个指标下第 i 个样本的概率。

$$P_{ij} = Y_{ij} / \sum_{i=1}^m Y_{ij} \quad (6)$$

(3) 按照公式 (7) 求各指标的信息熵 (E_j)。

$$E_j = -k \sum_{i=1}^m P_{ij} \ln P_{ij}, \quad k = 1 / \ln m \quad (7)$$

(4) 按照公式 (8) 确定各指标权重系数 (W_j^o)。

$$W_j^o = (1 - E_j) / \sum_{j=1}^n (1 - E_j) \quad (8)$$

通过计算, 总氮、醇溶性浸出物、水溶性浸出物、羟脯氨酸、甘氨酸、脯氨酸、亮氨酸、赖氨酸的权重系数分别为 0.068、0.146、0.145、0.141、0.169、0.118、0.092、0.121。

2.5.3 综合评分 AHP 法侧重于决策者的主观爱好, 而熵权法侧重于挖掘数据本身所蕴含的客观信息, 因此, 将主观权重与客观权重综合考虑, 采用 AHP 得主观权重系数 (W_j^s), 运用熵权法得客观权重系数 (W_j^o), 将主观权重系数和客观权重系数综合考虑, 按照下列公式计算综合权重 (W_j)。由表 6 中结果可知, 总氮含量权重系数的占比最高。

$$W_j = (W_j^s + W_j^o) / \sum_{j=1}^n (W_j^s + W_j^o) \quad (9)$$

根据 W_j 得分对 3 个产地 30 批梅花鹿茸饮片进行评分, 30 批梅花鹿茸饮片综合评分结果见表 7, 其中吉林敦化产区综合总得分为 7.425, 辽宁西丰产区综合总分为 3.956, 吉林长春产区综合总分为 3.590, 评分结果说明吉林敦化的梅花鹿茸饮片质量最优。

表 6 综合权值

Table 6 Synthetic weight

评价指标	醇溶性浸出物	水溶性浸出物	总氮	羟脯氨酸	甘氨酸	脯氨酸	亮氨酸	赖氨酸
W_j^o	0.146	0.144	0.068	0.141	0.169	0.118	0.092	0.121
W_j^s	0.217	0.217	0.316	0.070	0.070	0.060	0.030	0.030
W_j	0.182	0.181	0.192	0.105	0.119	0.089	0.059	0.074

表 7 30 批梅花鹿茸饮片综合评分结果

Table 7 Comprehensive score of 30 batches of plum deer antler slices

序号	综合评分	序号	综合评分
S1	0.444	S16	0.861
S2	0.464	S17	0.730
S3	0.413	S18	0.632
S4	0.295	S19	0.729
S5	0.283	S20	0.800
S6	0.424	S21	0.363
S7	0.457	S22	0.392
S8	0.309	S23	0.406
S9	0.325	S24	0.285
S10	0.543	S25	0.262
S11	0.702	S26	0.486
S12	0.745	S27	0.436
S13	0.739	S28	0.181
S14	0.710	S29	0.367
S15	0.777	S30	0.413

3 讨论

3.1 梅花鹿茸饮片含量测定条件的优化过程

根据国家药典委发布的《关于氨基酸分析指导原则的公示 (第二次)》(<https://www.chp.org.cn/>), 本研究采用柱前 PITC 衍生氨基酸测定法。该方法

基于氨基酸与异硫氰酸苯酯 (PITC) 反应, 生成有紫外吸收的苯氨基硫甲酰氨基酸衍生物 (PTC-氨基酸)。随后 PTC-氨基酸经反相液相色谱分离并使用紫外检测器在 254 nm 波长处检测, 在一定的浓度范围内 (1~1 250 pmol) 其响应值与氨基酸浓度成正比。因此, 梅花鹿茸饮片供试品在进样分析之前需要先经过酸水解和衍生化处理。前期实验中, 通过比较不同取样量 (0.05、0.1、0.15、0.2 g)、浓盐酸加入量 (5、7、10 mL)、提取时间 (1、2、3、5 h) 以及后续衍生化的取样量 (0.1、0.3、0.5 mL), 综合考察后发现, 采用 0.1 g 的取样量进行酸水解, 加入 7 mL 浓盐酸, 水解 3 h, 并在衍生化时取样量为 0.3 mL 时, 氨基酸峰面积最高且色谱峰稳定。

3.2 评价结果分析

中药所含成分的复杂多样性决定了传统的单一成分或单指标评价难以全面表征其整体质量, 而多组分含量测定对于中药质量控制的整体性和客观性具有重要意义。本实验建立了 HPLC 法对梅花鹿茸饮片中的 5 种氨基酸的含量进行测定, 该方法稳定可行且具有良好的重现性。对不同产地的 30 批梅

花鹿茸饮片进行的 PCA 分析结果表明, PCA 评价对区别梅花鹿茸饮片产地具有一定的指导意义; OPLS-DA 分析结果显示, 甘氨酸、羟脯氨酸和脯氨酸的含量是造成不同产地梅花鹿茸饮片质量差异的主要差异指标。

传统中药鉴别方法主要是性状鉴别法, 即根据药材的外观性状如形、色、气、味等, 直接利用看、摸、闻、尝等方法, 这种传统的性状鉴别方法是在历代医药学家对中药真伪优劣鉴别实践经验的基础上概括和总结而成, 故又被称为经验鉴别法。^[25]通过前期对于梅花鹿茸饮片的观察, 发现不同产地同一药用部位的花鹿茸饮片的外观性状差异较小, 很难通过外观性状来判断其质量优劣与否, 最终决定采用浸出物、总氮及氨基酸含量作为 AHP-熵权法判断梅花鹿茸饮片质量的考察指标。AHP-熵权法结合决策人的主观判断和各项指标的客观信息, 提高了数据的合理性和质量参数的科学性。即将 5 种氨基酸含量、浸出物含量和总氮含量综合考虑, 采用 AHP-熵权法分别计算相应的权重值, 再将这 2 种方法得到的权重值进行综合评判, 最终得到科学的复合权重系数, 以此对 3 个产地的梅花鹿茸饮片质量进行评分。AHP-熵权法得到的 5 种氨基酸的拟合权值与 OPLS-DA 分析得到的氨基酸成分的 VIP 值进行对比, 发现 5 种氨基酸含量对于区分不同产地梅花鹿茸饮片时重要程度基本一致, 研究认为甘氨酸、羟脯氨酸和脯氨酸可能是 3 个产地梅花鹿茸的差异质量标志物。综上, 所建立的 AHP-熵权法能有效地对不同产地的梅花鹿茸饮片进行质量评价, 为其品质筛选和质量控制提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 徐树楠, 牛兵占. 神农本草经 [M]. 石家庄: 河北科学技术出版社, 1994: 23.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 95-488.
- [3] 宫瑞泽, 陆雨顺, 张磊, 等. 基于中药质量标志物 (Q-Marker) 的鹿茸质量控制标准体系构建 [J]. 中草药, 2021, 52(9): 2851-2862.
- [4] 刘松鑫, 宫瑞泽, 王泽帅, 等. 基于主成分分析和判别分析对花鹿茸和马鹿茸 9 类化学成分对比研究 [J]. 中草药, 2021, 52(1): 82-90.
- [5] 郭晓晗, 程显隆, 李明华, 等. 鹿茸的化学成分及质量控制方法研究进展 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38(4): 551-565.
- [6] 张玲莺, 李墨翰, 李乳妹, 等. 鹿茸多肽研究进展 [J]. 肉类研究, 2019, 33(6): 64-69.
- [7] 金凤, 张爽, 赵旻, 等. 不同规格鹿茸药材的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2023, 40(10): 1329-1336.
- [8] 陆雨顺, 王泽帅, 毕晓东, 等. 鹿茸饮片浸出物提取方法的建立及多成分测定在质量评价中的应用 [J]. 中草药, 2021, 52(2): 357-366.
- [9] 王艳梅, 邹兴淮. 东北梅花鹿茸不同部位水解氨基酸含量的比较分析 [J]. 经济动物学报, 2003, 7(4): 18-21.
- [10] Sunwoo H H, Nakano T, Hudson R J, et al. Chemical composition of antlers from wapiti (*Cervus elaphus*) [J]. *J Agric Food Chem*, 1995, 43(11): 2846-2849.
- [11] 李泽鸿, 武丽敏, 姚玉霞, 等. 梅花鹿鹿茸不同产品中氨基酸含量的比较 [J]. 氨基酸和生物资源, 2007, 29(3): 16-18.
- [12] 高萌, 牟丽燕, 张科卫, 等. 基于指纹图谱结合多元统计分析不同干燥方式蟾蜍肉氨基酸类成分 [J]. 中国现代中药, 2023, 25(6): 1287-1295.
- [13] 刘盼盼, 郑鹏程, 龚自明, 等. 工夫红茶品质分析与综合评价 [J]. 食品科学, 2021, 42(12): 195-205.
- [14] 陶晓赛, 龚海燕, 谢彩侠, 等. 基于 UPLC 指纹图谱结合化学计量学评价不同产地盾叶薯蓣药材质量 [J]. 中草药, 2021, 52(1): 227-233.
- [15] 谭昊, 聂建光, 杜艳红, 等. 全二维气相色谱-飞行时间质谱解析红星清香型白酒风味成分特征 [J]. 酿酒科技, 2022(8): 54-58.
- [16] Kjeldahl J. Neue methode zur bestimmung des stickstoffs in organischen Körpern [J]. *Z Für Anal Chem*, 1883, 22(1): 366-382.
- [17] 陈振东, 施洋, 张晓霞, 等. 层次分析法结合响应面法优化黄芩汤的提取工艺 [J]. 中医药导报, 2023, 29(1): 45-49.
- [18] Jeon B, Kim S, Lee S, et al. Effect of antler growth period on the chemical composition of velvet antler in Sika Deer (*Cervus nippon*) [J]. *Mamm Biol*, 2009, 74(5): 374-380.
- [19] Jeon B T, Moon S H, Lee S R, et al. Changes of amino acid, fatty acid and lipid composition by the growth period in velvet antler [J]. *Korean J Food Sci Anim Resour*, 2010, 30(6): 989-996.
- [20] 张嵩, 李峰. 不同规格鹿茸商品药材中氨基酸含量分析 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(12): 1919-1923.
- [21] 宫瑞泽, 赵卉, 曲迪, 等. 不同产地加工及炮制方法对鹿茸中胶原蛋白含量的影响 [J]. 食品科学, 2019, 40(22): 1-6.
- [22] 孙人杰, 田茂雨, 何琴, 等. 层次分析-熵权法评价结合正交试验优化铁皮石斛颗粒配方工艺 [J]. 食品工业科技, 2024, 26: 1-16.
- [23] 牛成琳, 殷洪梅, 宋明明, 等. 基于改进 AHP-熵权-关联度及化学计量学的经典名方一贯煎提取工艺研究 [J]. 中草药, 2024, 55(4): 1178-1188.
- [24] 耿华, 王烨燃. 中药“辨状论质”理论溯源与展望 [J]. 中华医史杂志, 2022, 52(5): 270-275.

[责任编辑 时圣明]