

不同产地梅花鹿鹿茸药材中5种核苷类成分的含量测定及聚类分析^Δ

刘雪莹*, 赵雨, 何慧楠, 李雪惠, 刘莉, 齐滨[#](长春中医药大学药学院, 长春 130117)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)14-1945-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.14.17

摘要 目的:建立同时测定梅花鹿鹿茸药材中尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷、肌苷、鸟苷5种核苷类成分含量的方法,并比较不同产地梅花鹿鹿茸药材中上述核苷类成分含量的差异。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent Eclipse Plus C₁₈,流动相为甲醇-0.07%冰醋酸溶液(4:96, V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为254 nm,柱温为28 ℃,进样量为5 μL。采用SPSS 19.0软件对30批不同产地梅花鹿鹿茸药材(S1~S30)进行聚类分析。结果:尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷、肌苷、鸟苷的检测质量浓度线性范围均为0.001~0.01 mg/mL(*r*均为0.999 9);定量限分别为1.489 1、1.927 9、4.880 9、7.884 6、8.092 1 ng,检测限分别为0.446 7、0.578 4、1.464 3、2.365 4、2.427 7 ng;精密度、稳定性、重复性试验的RSD均小于2%;加样回收率分别为99.69%~103.65%(RSD=1.40%, *n*=9)、97.77%~103.26%(RSD=1.67%, *n*=9)、97.82%~101.81%(RSD=1.12%, *n*=9)、99.30%~104.82%(RSD=1.72%, *n*=9)、98.13%~100.20%(RSD=0.64%, *n*=9)。30批药材样品中尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷、肌苷、鸟苷的含量存在差异。上述药材样品可聚为3大类,即S16~S18、S22~S30聚为一类,S8~S15、S19~S21聚为一类,S1~S7聚为一类。结论:该方法精密度、稳定性、重复性均较好,可用于同时测定梅花鹿鹿茸药材中尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷、肌苷、鸟苷的含量;梅花鹿鹿茸药材的质量受生态环境、养殖技术等因素的影响,存在较大差异。

关键词 梅花鹿鹿茸;尿嘧啶;次黄嘌呤;尿苷;肌苷;鸟苷;高效液相色谱法;含量测定;聚类分析

Content Determination and Cluster Analysis of 5 Nucleosides Contents in *Cervus nippon* from Different Producing Areas

LIU Xueying, ZHAO Yu, HE Huinan, LI Xuehui, LIU Li, QI Bin (College of Pharmacy, Changchun University of TCM, Changchun 130117, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To set up a method for simultaneous determination of 5 nucleosides as uracil, hypoxanthine, uridine, creatinine and guanosine in *Cervus nippon*, to compare the differences of above nucleosides content in *C. nippon* among different producing areas. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent Eclipse Plus C₁₈ column with methanol-0.07% glacial acetic acid (4:96, V/V) as mobile phase at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was 254 nm. The column temperature was set at 28 ℃, and sample size was 5 μL. Cluster analysis was conducted for 30 batches of *C. nippon* from different producing areas by using SPSS 19.0 software. RESULTS: The linear ranges of uracil, hypoxanthine, uridine, creatinine and guanosine were 0.001-0.01 mg/mL (all *r*≥0.999 9). The limits of quantitation were 1.489 1, 1.927 9, 4.880 9, 7.884 6, 8.092 1 ng, and the limits of detection were 0.446 7, 0.578 4, 1.464 3, 2.365 4, 2.427 7 ng, respectively. RSDs of precision, stability, reproducibility tests were lower than 2%. The recoveries were 99.69%-103.65% (RSD=1.40%, *n*=9), 97.77%-103.25% (RSD=1.67%, *n*=9), 97.82%-101.81% (RSD=1.12%, *n*=9), 99.30%-104.82% (RSD=1.72%, *n*=9) and 98.13%-100.20% (RSD=0.64%, *n*=9). The contents of uracil, hypoxanthine, uridine, creatinine and guanosine were significantly different in 30 batches of *C. nippon*, which were clustered into 3 categories. S16-S18 and S22-S30 were clustered into one category; S8-S15 and S19-S21 were clustered into one category; S1-S7 were clustered into one category. CONCLUSIONS: The method has good precision, stability and reproducibility. It is suitable for simultaneous determination of uracil, hypoxanthine, uridine, creatinine and guanosine in *C. nippon*. The quality of *C. nippon* has great difference due to ecological environment and technical factors of farming.

KEYWORDS *Cervus nippon*; Uracil; Hypoxanthine; Uridine; Creatinine; Guanosine; HPLC; Content determination; Cluster analysis

鹿茸为鹿科动物梅花鹿(*Cervus nippon* Temminck)或马鹿(*Cervus elaphus* Linnaeus)的雄鹿未骨化密生茸

毛的幼角^[1]。梅花鹿鹿茸因具有改善神经功能及性功能障碍,抗疲劳、抗衰老、抗氧化等药理作用^[2-3],而奠定了其在医药及保健领域的地位。目前,梅花鹿鹿茸的药效成分未明确,在加工、质量评定、真伪鉴别等工作中,缺少以化学成分作为指标的科学标准,因而制约了其开发与利用。

相关调查数据显示,我国市场上的鹿茸药材约有

^Δ 基金项目:国家中药标准化项目(2016)

* 硕士研究生。研究方向:中药有效成分及应用开发。E-mail: 1048634009@qq.com

[#] 通信作者:副教授,博士。研究方向:中药质量标准化。电话: 0431-86172211。E-mail: 24328678@qq.com

80%产于梅花鹿^[4]。由于受药材来源、生态环境、市场供需等因素的影响,使大量的梅花鹿鹿茸易混品与伪品流入了药材市场,因此建立全面、系统地控制梅花鹿鹿茸药材质量的分析方法十分必要。鹿茸中主要含有脂类、多糖、多胺、蛋白质及多肽、激素样物质、生物碱类、核苷类等多种化学成分^[5-7]。鹿茸中核苷类成分是抗衰老的主要成分之一,包括尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷等。有研究表明,次黄嘌呤可抑制与神经系统老化有关的单胺氧化酶的活性,从而发挥抗氧化及抗衰老的作用^[8];核苷类成分具有调节免疫功能、促进肠道修复、降血压、抗心律失常、抗缺血性损伤、保肝、镇静等生物活性^[9]。因此,该类成分与鹿茸的生物活性有一定的关联,可作为鹿茸药材的质量评价指标之一。而目前,对不同产地的梅花鹿鹿茸药材中核苷类成分的系统研究尚未见报道。为此,本研究采用高效液相色谱法(HPLC)同时测定了14个省(区)的30批梅花鹿鹿茸药材样品中尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷、肌苷、鸟苷5种核苷类成分的含量,并通过聚类分析比较了不同产地药材样品的含量差异,从而为筛选优良种质资源、规范养殖和制订相关质量标准提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

LC-2030型HPLC仪,包括四元泵、真空脱气机、自动进样器、紫外-可见光检测器、柱温箱、色谱工作站(日本岛津公司);DZF-6050型电热恒温真空干燥箱(上海博讯实业有限公司);Eppendorf 5920R型低速离心机(德国艾本德公司);KQ3200型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);MS204S型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.2 试剂

尿嘧啶对照品(批号:140669-201305)、肌苷对照品(批号:100469-201302)均由中国食品药品检定研究院提供;次黄嘌呤对照品(批号:B20211)、尿苷对照品(批号:B20907)、鸟苷对照品(批号:B20905)均由上海源叶生物科技有限公司提供,经HPLC峰面积归一化法计算纯度均不低于98%;甲醇为色谱纯,冰醋酸为分析纯,水为纯化水。

1.3 药材

梅花鹿鹿茸药材样品(编号:S1~S30)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(*C. nippon Temminck*)的雄鹿未骨化密生茸毛的幼角。药材样品来源见表1。

2 方法与结果

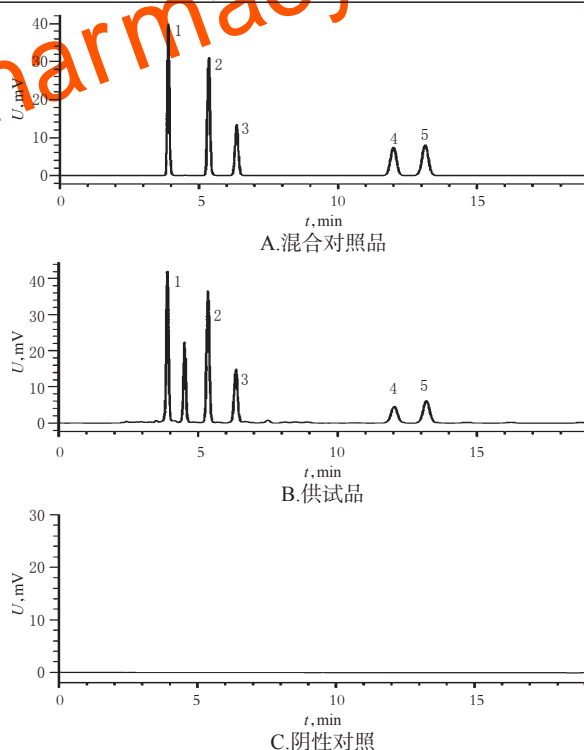
2.1 色谱条件与系统适用性

色谱柱:Agilent Eclipse Plus C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.07%冰醋酸溶液(4:96, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:28 ℃;进样量:5 μL。在该色谱条件下,理论板数以次黄嘌呤峰计应不低于10 000,分离度均大于1.5,阴性对照对测定无干扰,详见图1。

表1 梅花鹿鹿茸药材样品来源

Tab 1 Sources of *C. nippon*

编号	药材	采集地	采集时间
S1	梅花鹿鹿茸	黑龙江七台河	2016年5-7月
S2	梅花鹿鹿茸	黑龙江大庆	2016年5-7月
S3	梅花鹿鹿茸	黑龙江伊春	2016年5-7月
S4	梅花鹿鹿茸	吉林东丰	2016年5-7月
S5	梅花鹿鹿茸	吉林敦化	2016年5-7月
S6	梅花鹿鹿茸	吉林双阳	2016年5-7月
S7	梅花鹿鹿茸	吉林白山	2016年5-7月
S8	梅花鹿鹿茸	吉林永吉	2016年5-7月
S9	梅花鹿鹿茸	吉林四平	2016年5-7月
S10	梅花鹿鹿茸	辽宁西丰	2016年5-7月
S11	梅花鹿鹿茸	辽宁本溪	2016年5-7月
S12	梅花鹿鹿茸	河北廊坊	2016年5-7月
S13	梅花鹿鹿茸	河南南阳	2016年5-7月
S14	梅花鹿鹿茸	河南淇县	2016年5-7月
S15	梅花鹿鹿茸	安徽淮南	2016年5-7月
S16	梅花鹿鹿茸	山西晋中	2016年5-7月
S17	梅花鹿鹿茸	山西临汾	2016年5-7月
S18	梅花鹿鹿茸	青海西宁	2016年5-7月
S19	梅花鹿鹿茸	浙江宁波	2016年5-7月
S20	梅花鹿鹿茸	浙江金华	2016年5-7月
S21	梅花鹿鹿茸	浙江温州	2016年5-7月
S22	梅花鹿鹿茸	四川甘孜	2016年5-7月
S23	梅花鹿鹿茸	四川凉山	2016年5-7月
S24	梅花鹿鹿茸	湖南邵阳	2016年5-7月
S25	梅花鹿鹿茸	湖南平江	2016年5-7月
S26	梅花鹿鹿茸	新疆巴州	2016年5-7月
S27	梅花鹿鹿茸	甘肃天祝	2016年5-7月
S28	梅花鹿鹿茸	广东惠州	2016年5-7月
S29	梅花鹿鹿茸	内蒙古呼伦贝尔	2016年5-7月
S30	梅花鹿鹿茸	内蒙古兴安盟	2016年5-7月



注:1.尿嘧啶;2.次黄嘌呤;3.尿苷;4.肌苷;5.鸟苷

Note: 1. uracil; 2. hypoxanthine; 3. uridine; 4. creatinine; 5. guanosine

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取尿嘧啶对照品、次黄嘌呤对照品、尿苷对照品、肌苷对照品、鸟苷对照品各5 mg,置于50 mL量瓶中,加水稀释并定容,摇匀,得单一对照品溶液。精密量取上述单一对照品溶液各1 mL,置于同一10 mL量瓶中,加水定容,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得各成分质量浓度均为0.01 mg/mL的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密称取干燥的药材样品细粉(过四号筛)0.5 g,置于具塞锥形瓶中,加水7.5 mL,超声(功率:250 W,频率:40 kHz,下同)提取30 min后,10 000 r/min离心10 min,分离提取液后,残渣再超声提取1次。合并2次提取液,置于50 mL量瓶中,加水定容,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液 以4%甲醇为阴性对照溶液。

2.3 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,置于10 mL量瓶中,加水定容,摇匀,即得系列混合对照品溶液。精密量取上述系列混合对照品溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以各待测成分检测质量浓度(x , mg/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,回归方程与线性范围见表2。

表2 回归方程与线性范围

Tab 2 Results of regression equation and linear relationship

待测成分	回归方程	r	线性范围,mg/mL
尿嘧啶	$y=39\ 833x-68\ 023$	0.999 9	0.001~0.01
次黄嘌呤	$y=43\ 194x-43\ 008$	0.999 9	0.001~0.01
尿苷	$y=22\ 490x-22\ 344$	0.999 9	0.001~0.01
肌苷	$y=25\ 888x-25\ 804$	0.999 9	0.001~0.01
鸟苷	$y=22\ 350x-22\ 240$	0.999 9	0.001~0.01

2.4 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。按信噪比10:1、3:1分别计算定量限、检测限。结果,尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷、肌苷、鸟苷的定量限分别为1.489 1、1.927 9、4.880 9、7.884 6、8.092 1 ng,检测限分别为0.446 7、0.578 4、1.464 3、2.365 4、2.427 7 ng。

2.5 精密度试验

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷、肌苷、鸟苷峰面积的RSD分别为0.06%、0.06%、0.08%、0.09%、0.09% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(编号:S6)适量,分别于室温下放置0、2、6、8、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷、肌苷、鸟苷峰面积的RSD分别为0.09%、0.30%、0.21%、

0.18%、0.31% ($n=6$),表明供试品溶液室温放置24 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取药材样品(编号:S6)适量,共6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量。结果,尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷、肌苷、鸟苷含量的RSD分别为0.65%、0.45%、0.72%、1.13%、0.87% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取已知含量药材样品(编号:S6)细粉约0.50 g,共9份,精密称定,加入一定量的各单一对照品溶液,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表3。

表3 加样回收率试验结果($n=9$)

Tab 3 Results of recovery tests($n=9$)

待测成分	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%			
尿嘧啶	0.294 6	0.235 7	0.529 7	99.75	101.21	1.40			
	0.294 5	0.235 7	0.532 6	101.02					
	0.294 6	0.235 7	0.529 9	99.83					
	0.294 5	0.294 5	0.588 1	99.69					
	0.294 3	0.294 5	0.592 9	101.39					
	0.294 6	0.294 5	0.594	101.70					
	0.294 3	0.353 4	0.658 7	103.06					
	0.294 4	0.353 4	0.660 7	103.65					
	0.294 5	0.353 4	0.650 9	100.85					
	次黄嘌呤	0.306 4	0.245 1	0.550 7			99.67	99.98	1.67
	0.306 3	0.245 1	0.551 4	100.00					
	0.306 4	0.245 1	0.559 5	103.26					
	0.306 3	0.306 3	0.608 1	98.53					
	0.306 1	0.306 3	0.616 2	101.24					
	0.306 4	0.306 3	0.610 4	99.25					
	0.306 3	0.367 6	0.665 7	97.77					
	0.306 2	0.367 6	0.670 0	98.97					
	0.306 3	0.367 6	0.678 2	101.17					
尿苷	0.298 7	0.238 9	0.532 4	97.82	99.63	1.12			
	0.298 6	0.238 9	0.534 9	98.91					
	0.298 7	0.238 9	0.536 1	99.37					
	0.298 6	0.298 6	0.596 4	99.73					
	0.298 4	0.298 6	0.602 4	101.81					
	0.298 7	0.298 6	0.598 5	100.40					
	0.298 6	0.358 3	0.656 3	99.83					
	0.298 5	0.358 3	0.656 4	99.89					
	0.298 6	0.358 3	0.652 8	98.86					
	肌苷	0.165 9	0.132 7	0.301 7			102.34	101.01	1.72
		0.165 8	0.132 7	0.304 9			104.82		
		0.165 9	0.132 7	0.300 1			101.13		
		0.165 8	0.165 8	0.331 2			99.76		
		0.165 7	0.165 8	0.332 0			100.30		
		0.165 9	0.165 8	0.332 9			100.72		
		0.165 8	0.199 0	0.363 5			99.35		
		0.165 8	0.199 0	0.367 5			101.36		
		0.165 8	0.199 0	0.363 4			99.30		
鸟苷		0.204 8	0.163 9	0.367 1	99.02	99.25	0.64		
		0.204 8	0.163 9	0.367 9	99.51				
		0.204 8	0.163 9	0.367 6	99.33				
		0.204 8	0.204 8	0.409 7	100.05				
		0.204 7	0.204 8	0.409 9	100.20				
		0.204 8	0.204 8	0.408 2	99.32				
		0.204 8	0.245 7	0.445 9	98.13				
		0.204 7	0.245 7	0.447 8	98.94				
		0.204 8	0.245 7	0.447 5	98.78				

2.9 样品含量测定

取30批药材样品细粉各适量,按“2.2.2”项下方法制

备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,平行

测定3次,记录峰面积并计算样品含量,结果见表4。

表4 样品含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=3, \text{mg/g}$)

Tab 4 Results of content determination of samples ($\bar{x} \pm s, n=3, \text{mg/g}$)

编号	尿嘧啶	次黄嘌呤	尿苷	肌苷	鸟苷	总含量
S1	0.579 5±0.000 3	0.600 7±0.000 2	0.588 3±0.002 4	0.322 2±0.000 3	0.409 6±0.000 6	2.500 3±0.001 7
S2	0.578 9±0.000 7	0.610 4±0.002 3	0.566 3±0.000 8	0.332 3±0.004 1	0.410 0±0.001 9	2.497 9±0.001 8
S3	0.568 4±0.000 9	0.610 7±0.002 5	0.576 9±0.001 6	0.330 4±0.003 8	0.408 9±0.001 3	2.495 3±0.001 6
S4	0.588 6±0.005 3	0.613 2±0.009 3	0.595 3±0.010 5	0.330 7±0.007 8	0.409 7±0.007 9	2.537 5±0.019 3
S5	0.581 6±0.003 5	0.620 4±0.004 2	0.584 2±0.004 5	0.334 3±0.003 2	0.414 3±0.003 9	2.534 7±0.005 9
S6	0.628 7±0.008 8	0.624 1±0.013 5	0.608 0±0.015 0	0.335 8±0.011 0	0.416 6±0.011 8	2.613 2±0.030 8
S7	0.588 8±0.000 2	0.612 3±0.000 2	0.592 6±0.000 9	0.322 1±0.008 0	0.403 9±0.000 4	2.529 7±0.006 9
S8	0.585 0±0.000 1	0.603 1±0.000 8	0.601 9±0.007 3	0.315 7±0.003 8	0.403 7±0.001 3	2.509 3±0.011 8
S9	0.588 9±0.000 2	0.591 1±0.000 6	0.597 7±0.008 2	0.324 0±0.004 2	0.402 9±0.001 8	2.504 7±0.006 7
S10	0.584 6±0.000 4	0.603 9±0.004 4	0.544 7±0.000 9	0.331 1±0.000 6	0.407 9±0.004 1	2.472 2±0.004 7
S11	0.587 6±0.000 6	0.594 1±0.000 1	0.555 5±0.000 4	0.328 3±0.001 1	0.410 3±0.002 0	2.475 7±0.001 3
S12	0.568 4±0.000 3	0.603 4±0.004 3	0.565 2±0.000 5	0.303 7±0.000 5	0.409 1±0.002 1	2.449 8±0.007 8
S13	0.555 2±0.004 1	0.581 0±0.003 3	0.551 3±0.000 3	0.317 5±0.000 2	0.410 0±0.002 2	2.415 0±0.001 3
S14	0.534 7±0.003 9	0.604 9±0.002 8	0.581 0±0.001 1	0.302 6±0.002 2	0.408 7±0.001 4	2.431 9±0.001 5
S15	0.544 1±0.000 3	0.574 7±0.000 5	0.562 0±0.000 8	0.323 1±0.002 3	0.409 5±0.000 8	2.413 5±0.010 9
S16	0.525 0±0.000 4	0.561 1±0.002 1	0.553 9±0.001 8	0.296 2±0.000 1	0.400 5±0.003 6	2.336 8±0.002 6
S17	0.533 1±0.000 4	0.574 0±0.001 8	0.541 4±0.000 5	0.309 3±0.001 3	0.405 6±0.003 6	2.363 3±0.003 3
S18	0.513 5±0.000 1	0.591 5±0.008 1	0.532 1±0.001 2	0.309 1±0.001 2	0.400 5±0.000 4	2.346 7±0.004 7
S19	0.537 8±0.002 1	0.600 0±0.005 5	0.573 8±0.000 5	0.323 3±0.001 9	0.400 1±0.001 1	2.435 9±0.006 9
S20	0.547 7±0.002 1	0.587 8±0.000 4	0.583 1±0.001 2	0.315 1±0.001 8	0.401 1±0.000 6	2.434 9±0.002 0
S21	0.537 0±0.001 1	0.598 4±0.000 9	0.573 8±0.000 5	0.322 2±0.000 4	0.400 3±0.003 5	2.431 8±0.003 0
S22	0.547 5±0.004 4	0.578 4±0.000 3	0.524 6±0.000 5	0.307 8±0.000 1	0.395 3±0.004 2	2.353 6±0.003 2
S23	0.527 3±0.004 3	0.568 8±0.000 5	0.532 7±0.000 6	0.319 9±0.000 4	0.401 3±0.000 6	2.350 1±0.000 6
S24	0.557 0±0.003 0	0.598 1±0.001 6	0.553 3±0.001 3	0.306 8±0.000 1	0.402 1±0.001 8	2.417 3±0.001 1
S25	0.567 6±0.002 1	0.580 3±0.001 3	0.532 9±0.000 4	0.307 2±0.002 3	0.399 3±0.001 3	2.387 4±0.008 1
S26	0.516 6±0.000 6	0.578 5±0.000 6	0.522 8±0.000 3	0.324 1±0.003 1	0.397 6±0.000 6	2.339 7±0.003 9
S27	0.504 8±0.002 3	0.579 4±0.000 3	0.542 0±0.000 1	0.293 4±0.001 1	0.398 4±0.001 1	2.318 0±0.003 8
S28	0.525 7±0.000 4	0.569 8±0.000 1	0.553 1±0.000 6	0.306 4±0.001 4	0.399 9±0.001 1	2.354 8±0.002 4
S29	0.503 4±0.000 8	0.539 6±0.000 3	0.542 5±0.000 8	0.310 7±0.001 1	0.401 5±0.001 2	2.297 7±0.010 5
S30	0.507 5±0.000 6	0.529 2±0.017 1	0.543 7±0.006 2	0.325 9±0.008 4	0.399 8±0.003 1	2.306 2±0.011 3

2.10 聚类分析

采用SPSS 19.0软件对药材样品进行聚类分析。采用离差平方和法,以平方欧式距离为区间进行聚类,结果见图2;各大类样品中5种核苷类成分平均含量见表5。由图2、表5可知,30批药材样品可聚为3大类:S16~S18、S22~S30聚为一类,此类药材样品中5种核苷类成分的含量均小于总体平均值;S8~S15、S19~S21聚为一类,此类药材样品中5种核苷类成分的含量与总体平均值相差不大;S1~S7聚为一类,此类药材样品中尿嘧啶、尿苷含量明显高于总体平均值,其他核苷类成分含量略高于总体平均值。这提示,不同产地的药材样品中5种核苷类成分含量存在差异,其中以S1~S7药材样品中核苷类成分含量最高。

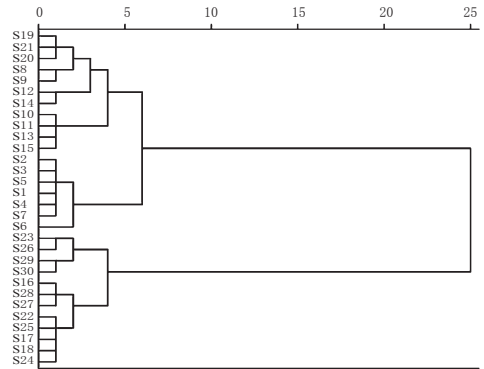


图2 聚类分析树状图

Fig 2 Dendrogram of cluster analysis

表5 各大类样品中5种核苷类成分平均含量($n=3, \text{mg/g}$)

Tab 5 Average content of 5 kinds of nucleosides in different categories of samples ($n=3, \text{mg/g}$)

编号	尿嘧啶	次黄嘌呤	尿苷	肌苷	鸟苷	总含量
S16~S18, S22~S30	0.531 8	0.570 9	0.543 7	0.311 4	0.401 2	2.359 0
S8~S15, S19~S21	0.561 0	0.594 8	0.571 8	0.318 8	0.405 9	2.452 2
S1~S7	0.587 8	0.613 1	0.587 4	0.331 1	0.410 4	2.529 8

3 讨论

在预试验中,笔者通过比较超声、回流、振荡3种提

取方法,发现超声法提取率最高,最终选择以超声法提取样品。通过比较不同溶剂(甲醇、乙醇、水),发现甲

近红外光谱法快速测定肉桂药材的水分^Δ

秦斌^{1*}, 闫研¹, 殷果^{1#}, 庾红萍¹, 王炳志², 王铁杰¹ (1. 深圳市药品检验研究院/深圳药品质量标准研究重点实验室, 广东深圳 518057; 2. 深圳市易瑞生物技术股份有限公司, 广东深圳 518101)

中图分类号 R927.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)14-1949-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.14.18

摘要 目的: 建立快速测定肉桂药材水分的方法。方法: 采用甲苯法测定药材样品含水量(作为参考值)。采用近红外光谱法结合偏最小二乘法建立药材样品水分的定量模型。根据药材样品水分测定参考值, 采集80批药材样品, 以常数偏移消除法预处理光谱, 药材样品水分测定最佳波段范围为7 502.2~6 896.6、5 600.6~4 998.9 cm^{-1} 。结果: 药材样品水分定量模型的内部交叉验证决定系数(R^2)为0.974 9, 交叉验证均方差为0.404; 模型外部验证 R^2 为0.940 4, 预测均方差为0.306。结论: 该方法快速准确, 简便无污染, 可用于肉桂药材水分的快速测定。

关键词 肉桂; 近红外光谱法; 水分; 定量模型

Rapid Determination of Moisture in *Cinnamomum cassia* by Near-infrared Spectroscopy

QIN Bin¹, YAN Yan¹, YIN Guo¹, YU Hongping¹, WANG Bingzhi², WANG Tiejie¹ (1. Shenzhen Institute for Drug Control/Shenzhen Key Lab of Drug Quality Standard Research, Guangdong Shenzhen 518057, China; 2. Shenzhen Bioeasy Technology, Inc., Guangdong Shenzhen 518101, China)

醇、乙醇为溶剂时最大吸收峰峰形欠佳, 故选择以水为提取溶剂。通过比较不同溶剂用量(10、15、20倍), 发现15倍水提取时提取率最高且不再增加, 故选择溶剂用量为15倍水。通过比较不同提取时间(30、45、60 min)、提取次数(2、3、4次), 发现提取时间30 min、提取3次的提取率最高, 故选择提取时间30 min、提取次数3次。

在预试验中, 通过对不同色谱柱 Agilent TC C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent Eclipse Plus C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、岛津 ODS-2 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 进行比较, 发现采用 Agilent Eclipse Plus C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 对5种核苷类成分均可达到良好的分离。通过以甲醇-水、乙腈-水为流动相进行比较, 发现流动相为甲醇-水(4:96, V/V)时次黄嘌呤与尿苷色谱峰不能较好地分离; 又尝试加入不同比例的冰醋酸, 发现加入0.07%冰醋酸后, 峰形得到改善, 可实现5种核苷类成分色谱峰均较好地分离。确定检测波长为254 nm、柱温为28 $^{\circ}\text{C}$ 时, 尝试对不同流速(1.0、0.8、0.5 mL/min)进行比较, 发现当流速为1 mL/min时, 5种核苷类成分能在20 min内快速分离。确定流速1 mL/min、检测波长254 nm时, 尝试对不同柱温(28、30、35 $^{\circ}\text{C}$)进行比较, 发现当柱温为28、35 $^{\circ}\text{C}$ 时, 出峰时间均较快, 故选择柱温28 $^{\circ}\text{C}$ 。

本研究结果显示, 5种核苷类成分含量以吉林地区和黑龙江地区药材样品最高, 其他省(区)药材样品中上述核苷类成分的含量相对较低, 但同一地区的药材样品

中上述核苷类成分含量差别不大。这可能与梅花鹿养殖技术和当地的生态环境有关。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[J]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 323-324.
- [2] 薄士儒, 李庆杰, 王春雨, 等. 鹿茸的化学成分与药理作用的研究概述[J]. 经济动物学报, 2010, 14(3): 243-248.
- [3] 胡太超, 刘玉敏, 陶荣珊, 等. 鹿茸多肽的抗疲劳作用机制研究[J]. 吉林农业大学学报, 2015, 37(4): 469-475.
- [4] 宗颖, 牛晓辉, 王玉, 等. 梅花鹿鹿茸的高效液相色谱的指纹特征分析研究[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(2): 354-356.
- [5] SR LEE, BT JEON, SJ KIM, et al. Effects of antler development stage on fatty acid, vitamin and GAGs contents of velvet antler in spotted deer (*Cervus nippon*) [J]. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2007, 20(10): 1546-1550.
- [6] 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. DOI: 10.1016/j.biocel.2014.07.007.
- [7] 吴菲菲, 金礼吉, 李晓宇, 等. 鹿茸活性成分及其药理功能的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医(科技版), 2012(2): 32-34.
- [8] 杨秀伟. 花鹿茸、马鹿茸碱基成分的 HPLC 定量分析和其 MAO 活性抑制作用[J]. 中草药, 1995, 26(1): 17.
- [9] 张雪梅, 杨丰庆, 夏之宁. 食品中核苷类成分的药理作用研究进展[J]. 食品科学, 2012, 33(9): 277-282.

(收稿日期: 2018-01-31 修回日期: 2018-05-21)

(编辑: 陈宏)

^Δ 基金项目: 国家药品抽验项目(No. 中检监督函[2017]16号-101)

* 副主任药师。研究方向: 药物分析与质量标准。E-mail: dinal29@126.com

通信作者: 主任药师。研究方向: 药品质量控制。E-mail: ayinguoa@126.com