

- 2623-2627.
- [13] 韩曼飞, 张刘强, 李医明. 天然桃叶珊瑚苷及其衍生物的化学结构和药理作用研究进展[J]. 中草药, 2017, 48(19): 4105-4113.
- [14] 张贵君. 中药鉴定研究方法论[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 109-131.
- [15] 彭密军, 周春山, 刘建兰, 等. 杜仲中活性成分分析条件的优化研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2004, 24(12): 1655-1658.
- [16] 刘军海, 裘爱泳. 杜仲叶中桃叶珊瑚苷提取工艺研究[J]. 中成药, 2007, 29(2): 266-268.

## 高效液相色谱指纹图谱结合化学计量方法评价不同生长年限肉桂药材

张永<sup>1</sup>, 丁越<sup>1</sup>, 张彤<sup>1\*</sup>, 王冰<sup>2</sup>, 王新宏<sup>1</sup>, 吴卫刚<sup>3</sup>

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203; 3. 九州通医药集团股份有限公司, 湖北 武汉 430051)

**摘要:** **目的** 建立不同生长年限肉桂药材的指纹图谱研究, 并结合包括主成分分析和聚类分析方法等现代统计学方法对其特征峰进行综合性分析。**方法** 采用超高效液相色谱在 280 nm 下梯度洗脱, 生成不同生长年限肉桂药材指纹图谱。**结果** 在 18 批样品 UPLC 指纹图谱中, 有 9 个特征峰被标定, 其中 6 个特征峰被识别, 分别为香豆素、2-羟基肉桂醛、肉桂醇、肉桂酸、桂皮醛和 2-甲氧基肉桂醛。相似度结果显示, 30 年以上的肉桂药材在主要成分与 30 年以下肉桂药材存在着较大差异。特征峰聚类分析和主成分分析结果显示, 30 年以上肉桂药材与 30 年以下肉桂药材被很好区分, 验证了相似度结果。**结论** 该方法能从不同角度多方面的证实了实验结果的科学性, 可为肉桂的采收年限的确定及资源的可持续发展利用提供参考。

**关键词:** 肉桂; 指纹图谱; UPLC; 主成分分析; 聚类分析

**中图分类号:** R284.1

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2021)02-0543-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.02.051

肉桂别名牡桂、筒桂等, 为我国中药材中的一味重要南药之一, 素有一树养三代的美誉, 为广东和广西地区重要的中药材。肉桂是我国的名贵中药特产之一, 自古药食同源, 其不仅是亚洲地区传统的调味品, 也是常用名贵中药, 功效以引火归元, 温经通脉见长<sup>[1-3]</sup>。肉桂营养丰富, 具有较好的保健作用, 特别是对糖尿病患者有一定调脂降糖的作用。广东、广西为我国肉桂药材的道地产区, 也是国内的主产区, 福建, 云南亦产<sup>[4]</sup>。肉桂全身都是宝, 2020 年药典收录其为樟科植物 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥树皮, 其鲜嫩枝条以桂枝药用, 枝叶亦可提取挥发油, 药用或做食品添加剂。

长期以来, 肉桂以实生林粗放经营为主, 种植后处于半野生状态, 作为药材的肉桂, 其有效成分含量易受种源品种、生长环境、自然环境、采收季节及年限、加工方式

和仓储运输条件等因素的影响。张锡纯<sup>[5]</sup>认为肉桂以完整、外皮细皱、“彩皮”(即灰白色地衣斑)明显、“肉”(内层皮)厚、含油量高、内表面光洁如玉、断面深紫、香气浓烈、甜味重、口嚼渣少者为佳。肉桂作为皮类中药, 根据其含有大量挥发油的特点, 通常以厚度和油润度(挥发油)作为其优劣的判断方法。有文献<sup>[6]</sup>报道肉桂的厚度及挥发油随着树龄的增大而升高。

目前对于肉桂药材的质量控制主要集中在桂皮醛和桂皮酸的含量测定上, 并建立了一系列稳定可靠的含量测定方法。查阅文献可见, 通常采用薄层扫描法<sup>[7]</sup>、导数光谱法<sup>[8]</sup>、气相色谱法<sup>[9]</sup>、高效液相色谱法<sup>[10]</sup>建立肉桂醛和肉桂酸<sup>[11-12]</sup>的含量测定方法。中药指纹图谱是指运用一定综合性的分析方法, 通过特征性色谱图或光谱图, 在整体上对其化学特征进行表征, 是目前被公认为最有效的综合性

**收稿日期:** 2019-06-12

**基金项目:** 国家中药标准化项目—苍术等 3 种中药饮片标准化建设 (ZYBZH-Y-HEB-15)

**作者简介:** 张永 (1989—), 男, 硕士, 实验师, 从事中药质量标准化与药物代谢研究。Tel: (021) 51322332, E-mail: zhangyong\_zhongyao@126.com

\* **通信作者:** 张彤 (1972—), 男, 博士, 教授, 从事中药制药及中药分析技术研究。Tel: (021) 51322318, E-mail: zhangtdmj@hotmail.com

**网络出版日期:** 2019-10-24

**网络出版地址:** <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/31.1368.R.20191024.1008.002.html>

评价中药的整体质量的技术手段之一<sup>[13-14]</sup>。为考察肉桂生长年限与其主要有效成分含量的关系,本研究分别于2017年4月和2017年10月收集了同一地区不同生长年限的肉桂药材,包括2~5、5~7、7~10、11~15、20~30年及30年以上肉桂样品,采用高效液相色谱法进行其指纹图谱研究,并采用主成分和聚类分析法<sup>[14-15]</sup>探究不同生长年限的指纹图谱差异性,为肉桂药材资源的可持续发展提供依据。

## 1 材料

Agilent 1290 Series 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); TDL-50B 离心机(上海安亭科学仪器厂); JP-100S 超声波清洗机(深圳市洁盟清洗设备有限公司); BSA124 分析天平(美国赛多利斯公司)。

桂皮醛对照品(批号 110710-201619,中国食品药品检定研究院); 香豆素(批号 Y2407C2349)、2-甲氧基肉桂酸(批号 T15F8T29343)、2-羟基肉桂醛(批号 B02401101)、肉桂醇(批号 Y04N7C23850)、肉桂酸(批号 AA0807DA14)对照品,均购自上海源叶生物科技有限公司; 2-甲氧基肉桂醛对照品(批号 B02401101,西格玛奥德里奇贸易有限公司); 乙腈(色谱纯,德国 Merck 公司); 甲醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司); 屈臣氏蒸馏水。肉桂样品 S1~S3、S4~S6、S7~S9、S10~S12、S13~S15、S16~S18 分别购自广东省高要县董福行基地种植 2~5、5~7、7~10、11~15、20~30 年及 30 年以上,经上海中医药大学中药学院宋龙博士鉴定为正品。

## 2 方法与结果

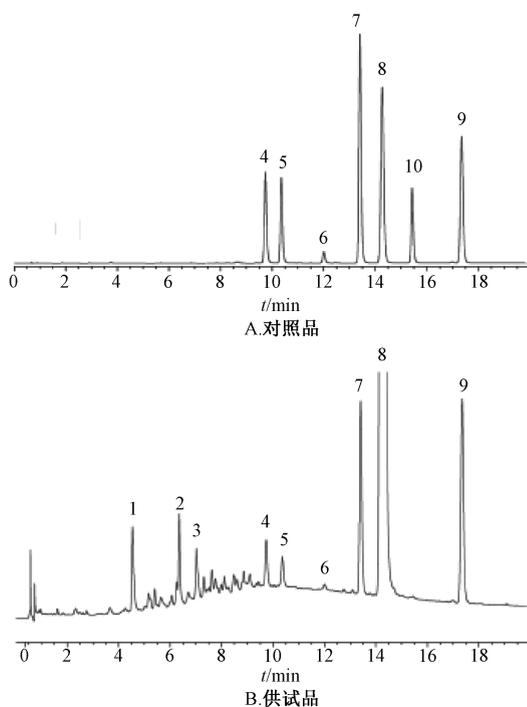
2.1 对照品溶液制备 精密称取香豆素、2-羟基肉桂醛、肉桂醇、肉桂酸、桂皮醛、2-甲氧基肉桂酸、2-甲氧基肉桂醛适量,50%甲醇溶解并定容 10 mL,摇匀,即得分别为 0.1696、0.1018、0.1616、0.2056、0.2660、0.1086、0.2196 g/L 的对照品贮备液。

2.2 供试品溶液制备 取肉桂药材粉碎(过 3 号筛),精密称取粉末 0.5 g,置 50 mL 圆底离心管中,加入 50%甲醇 10 mL,超声(350 W, 35 kHz)处理 30 min,放冷,离心,取上清至 25 mL 量瓶中。加入上述甲醇溶液 10 mL,同法超声处理 1 次,放冷,离心,取上清至同一 25 mL 量瓶中。经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.3 色谱条件和系统适应性 Agilent SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 检测波长 280 nm; 柱温 40 °C; 体积流量 0.4 mL/min; 进样量 2 μL; 流动相 0.025% 甲酸水溶液(A)-乙腈溶液(B),梯度洗脱(0~2 min, 8% B; 2~20 min, 8%~35% B),各对照品与其他成分的色谱峰分离度符合要求,峰形对称。色谱图见图 1。

### 2.4 指纹图谱建立

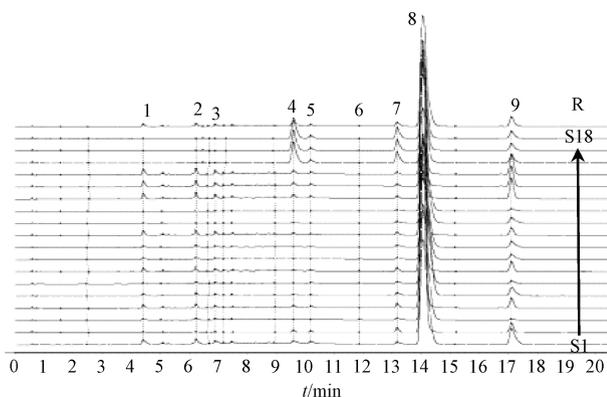
2.4.1 共有峰确定 将不同批肉桂药材的 UPLC 色谱图,分别导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2.0 版),生成对照指纹图谱 R,结果见图 2。在对照指纹图谱上,标定了 9 个特征峰(占总峰面积 95% 以上),能够较全面的



4. 香豆素 5. 2-羟基肉桂醛 6. 肉桂醇 7. 肉桂酸 8. 桂皮醛 9. 2-甲氧基肉桂酸 10. 2-甲氧基肉桂醇

图 1 肉桂 HPLC 色谱图

反映肉桂药材不同生长时期的特征,因此暂定为不同生长年限肉桂药材的活性成分群。通过与对照品比对,在各样品图谱中 6 个特征峰被指认,香豆素(4 号),2-羟基肉桂醛(5 号),肉桂醇(6 号),肉桂酸(7 号),桂皮醛(8 号),2-甲氧基肉桂醛(9 号)。其中,2-甲氧基肉桂醛是除桂皮醛含量最高的成分,分离度良好,具有适宜保留时间,故选为参照峰。



注: S1-S18 为样品色谱图, R 为对照指纹图谱。

图 2 不同生长年限肉桂的指纹图谱

### 2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 分别精密吸取同一供试品溶液,在“2.3”项条件下连续进样 6 次,记录 HPLC 色谱图。以 9 号峰作为参照峰,各特征峰相对峰面积 RSD<3.9%,相对保留时间 RSD<0.4%,表明仪器精密度良好。

2.5.2 重复性试验 取同一批肉桂粉末,平行处理 6 份,

在“2.3”项条件下，分别进样，记录HPLC色谱图。以9号峰为参照峰，各特征峰相对峰面积RSD<4.1%，相对保留时间RSD<0.3%，表明该方法重复性良好。

2.5.3 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液，在“2.3”项条件下，分别于0、2、4、8、12、18、24、48 h进样，记录指纹图谱。以9号峰为参照峰，各特征峰相对峰面积RSD<4.1%，相对保留时间RSD<0.2%，表明供试品溶液在48 h内稳定性良好。

2.6 相似度评价 在未剔除桂皮醛色谱峰前提下，S1~S18指纹图谱相似度均大于0.98，桂皮醛过高的峰面积使得不同年限肉桂药材的相似度没有明显差别。孙如煜等<sup>[15]</sup>通过指纹图谱研究清开灵硬胶囊批次间稳定性实验时，黄芩苷由于峰面积过大导致相似度评价方法对色谱峰的大小变化或缺失不够灵敏，不利于对指纹图谱的综合性评价，故采用剔除对指纹图谱贡献率较大的成分-黄芩苷。而考虑到桂皮醛占总面积的百分比较大，其在指纹图谱权重系数较大，占主导作用，无法准确比较不同生长年限肉桂药材的差异，故需剔除桂皮醛，重新计算，结果见表1。S1~S15与对照谱的相似度均大于0.75且相似度较为接近，为I类；S16~S18与对照谱的相似度均小于0.6且相似度比较接近，为II类，表明在剔除桂皮醛色谱峰后，30年以上与30年以下的肉桂在主要成分存在着明显差异，此可作为名老中医喜用年份久肉桂的一个佐证。通过对共有峰分析，发现II类中峰1、峰2和峰3比I类中的相应色谱峰小，而II类中峰4、峰5和峰7比I类中的相应色谱峰大，这可能是造成其相似度差异的重要原因之一。

表1 18批样品相似度分析结果

批号	相似度	批号	相似度	批号	相似度
S1	0.947	S7	0.957	S13	0.942
S2	1.000	S8	0.955	S14	0.933
S3	0.725	S9	0.965	S15	0.953
S4	0.969	S10	0.875	S16	0.595
S5	0.982	S11	0.979	S17	0.586
S6	0.937	S12	0.987	S18	0.589

2.7 主成分分析与聚类分析 主成分分析是以相互联系的原始数据为基础，寻找几个能够对原有指标性成分保留其主要信息且相互不关联的综合性变量，对其进行综合评价的一种方法<sup>[16]</sup>。将上述18批样品9个特有峰的峰面积导入统计学软件SPSS 20.0进行主成分分析，提取了3个主成分。其中，第一和第二主成分特征值分别为4.8和2.8，累计贡献率为69.6%，说明不同年生长限肉桂药材可用这2个新生成的变量代替原有的9个特征峰进行进一步评价。以第一、二主成分的得分为纵横坐标，绘制得分图，见图3。代表着肉桂酸，香豆素和2-甲氧基肉桂醛的变量权重值在第一主成分中最大，说明这3个色谱峰在区分不同年限的肉桂有一定的决定性作用，分别以肉桂酸，香豆素和2-甲氧基肉桂醛色谱峰峰面积为变量，绘制三维图，见图4。从图3、5可以清晰看到不同年限的肉桂被很好划分为2大类，I类包括S1~S15。为30年以下肉桂药材；II类包括

S16~S18，为30年以上肉桂药材。主成分得分图很好将不同生长年限的肉桂药材样品分为30年以上和30年以下两大类，其结果相似度评价相一致。

聚类分析是一种不将研究对象信息及贡献性删减，以一定分析手段将关系相近的研究对象进行合理的分类的综合性手段之一<sup>[17]</sup>。本研究采用夹角余弦和组间平均数连接法对18批样品的9特征峰进行系统聚类分析，结果见图5。可知，不同生长年限肉桂药材样品可化分为2大类。I类包括S1~S15；II类包括S16~S18。系统聚类分析结果与其他分析结果一致，为评价不同生长年限药材提供一种新的思路。

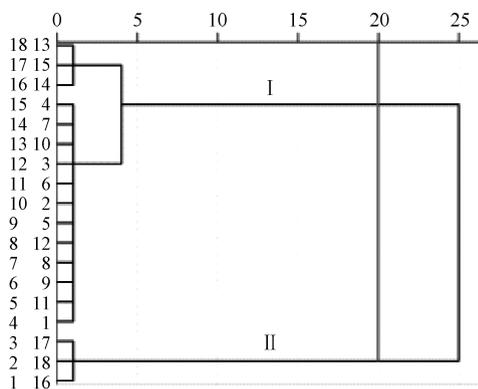
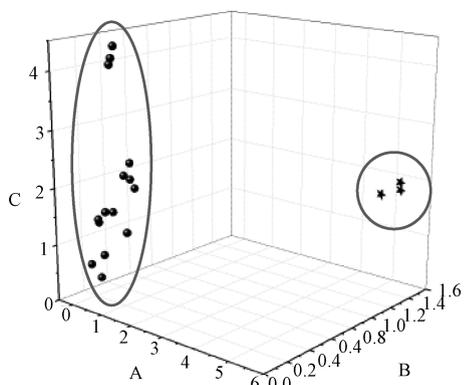


图3 18批样品主成分分析图



注：A为肉桂酸 B为香豆素 C为2-甲氧基肉桂醛。

图4 18批样品主成分分析三维图

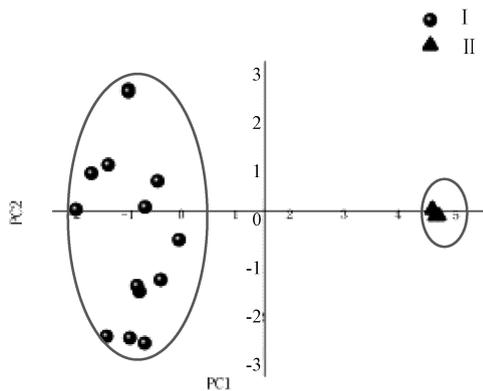


图5 18批样品聚类分析图

### 3 讨论

3.1 指纹图谱 肉桂作为一种中药材,从种植、采收、加工、运输、贮存到出售总共经历数个过程,其中任何一个环节的偏差都可能影响到质量,最终影响到临床疗效。再者,中药材作为多组分复杂体系,其成分一般较为复杂,单靠一种或几种指标成分来判定其质量缺乏一定的说服力。中药指纹图谱是一种可量化的综合性方法,能在整体上对中药指标性成分进行特征性的反映。本研究建立 UPLC 指纹图谱中,9个特征峰被标定,其中的6种成分被识别为香豆素、2-羟基肉桂醛、肉桂醇、肉桂酸、桂皮醛和2-甲氧基肉桂醛。这9个特征峰在不同生长年限肉桂的指纹图谱中均有发现,但各样品中这些特征峰的相对峰面积差异性较大,结合相似度分析的结果可以发现不同生长年限的肉桂在化学组成上存在共性,但也存在一定差异性,此差异性在图谱中主要表现为共有峰的相对峰面积不同。指纹图谱能够在整体上对不同年限肉桂进行综合性评价,是质量控制方法的重要组成部分。

3.2 聚类分析与主成分分析 由于不同生长年限指纹图谱的共有峰的数据繁琐,且其权重系数无法加以确定,对肉桂药材质量评价带来了极大的困难。故本研究采用主成分分析法,在保证原有信息不缺失前提下,将指纹图谱的9个指标成分转换成能充分反映肉桂样品总体信息的指标的2个主成分,且提取出了在不同年限肉桂的指纹图谱中起决定性作用3种有效成分根据聚类分析的结果,将18批不同生长年限的肉桂划分为2类,使得不同年限肉桂药材的质量得到了良好的划分。聚类分析、主成分分析与相似度评价有机结合起来,以期确定肉桂的最佳采收年限及资源可持续发展提供了科学依据。

同时,研究结果表明几种分析方法虽然从不同的侧重角度对实验结果进行分析,但都能得出类似的结论,说明这种综合分析的方法具有一定的可行性。肉桂药材为挥发油成分含量较高的一类中药材,市场上通常选取了最宜量化外观性状厚度作为其主要评价指标,在本研究中也发现不同生长肉桂药材随着年限增加,厚度也逐渐变厚,而其指标性成分并非是某种成分含量普遍高于另一种,如何通过建立外观性状与内在指标成分关联性评价其质量优劣,是今后需要探讨的重点。

#### 参考文献:

[1] 赵凯,姜勇,薛培凤,等. 国产肉桂的化学成分研究

[J]. 中草药, 2013, 44(17): 2358-2363.

[2] 高学敏. 中药学[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 240-241.

[3] 杨继章,刘红森,李艳玲. 肉桂油的研究进展[J]. 中国药房, 2011(27): 2579-2581.

[4] 邱琴,崔兆杰,韦栋梁,等. 肉桂挥发油化学成分的研究[J]. 上海中医药大学学报, 2003, 17(3): 49-51.

[5] 张锡纯. 医学衷中参西录[M]. 石家庄: 河北人民出版社, 1997: 343.

[6] 许勇,丁靖凯. 广西肉桂栽培及精油成分[J]. 香料香精化妆品, 2001(4): 4-9.

[7] 芦金清,朱婷,舒翔,等. 薄层扫描法测定茯苓胶囊中桂皮醛的含量[J]. 湖北中医杂志, 2003, 25(3): 51-52.

[8] 向丽,张贵君,赵保胜,等. 肉桂不同部位及其挥发油的红外光谱宏观表征[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(8): 57-61.

[9] 邓金莲,万东根,周国平. 气相色谱法测定肉桂药材及其制剂中桂皮醛的含量[J]. 中国中医药杂志, 2004, 2(6): 331-332.

[10] 高明森,王晓尧,毕臻臻. 高效液相色谱法测定肉桂中桂皮醛含量的研究[J]. 实用中医内科杂志, 2009, 23(9): 29-31.

[11] 梁国华. 高效液相色谱法测定中国劲酒中桂皮醛的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(8): 3103-3107.

[12] 王连芝,蒋维谦. HPLC法测定桂枝中桂皮醛和肉桂酸的含量[J]. 中医药信息, 2009, 26(4): 19-20.

[13] 王钢力,吕扬,张继,等. 中药材肉桂的X衍射 Fourier 谱分析[J]. 中国中药杂志, 1998, 23(10): 584-587.

[14] 袁鹏飞,尚明英,蔡少青. 桂枝、肉桂化学成分指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(19): 2917-2921.

[15] 孙如煜,李鹏跃,杜守颖,等. 基于中药指纹图谱结合模式识别的清开灵硬胶囊批次间稳定性控制研究[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(10): 4629-4633.

[16] 张煜炯,彭昕,吉庆勇,等. 聚类分析和主成分分析法研究三叶青氯仿部位 HPLC 指纹图谱[J]. 中成药, 2016, 38(3): 607-612.

[17] 王宇卿,庄果,张须学,等. 多元统计分析比较宛艾及31个产地艾叶 HPLC 指纹图谱[J]. 中成药, 2018, 40(3): 653-658.