

根茎类药材丹参精准煮散饮片的质量评价

黄娟¹, 丘小惠¹, 白俊其¹, 宫璐¹, 张鹏², 苏贺¹, 徐江^{2*}, 黄志海^{1*}

(1. 广州中医药大学第二附属医院, 广东省中医药科学院, 中国中医科学院广东分院, 广州 510006;
2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:对丹参精准煮散饮片进行质量评价,为临床用药安全有效提供保障。方法:应用第二内转录间隔区(ITS2)序列作为DNA条形码对丹参进行鉴定,采用化学指纹图谱表征药材化学组成,评价丹参原饮片及精准煮散饮片的相似度,测定指标成分丹酚酸B和迷迭香酸的含量,标定指纹图谱共有峰。采用标准汤剂煎煮法比较原饮片及精准煮散饮片的煎煮效率,对煮散体系进行综合评价。结果:ITS2序列对丹参药材可实现准确鉴定;原饮片及煮散饮片煎出成分基本无变化,指纹图谱相似度均很高,达到0.99以上,但是煮散饮片煎煮效率明显增高。按标准汤剂煎煮法,煮散饮片出膏率增加>30%,迷迭香酸及丹酚酸B的煎出率均约1.7倍,其余化学成分的煎出率为原饮片的1.2~2.2倍;且精准煮散饮片差异明显小于原饮片批间差异。结论:丹参精准煮散饮片能提高原饮片的煎煮效率及均一性,具有较好的推广与应用价值。

[关键词] 精准煮散饮片;丹参;指纹图谱;均一性;DNA条形码;丹酚酸B;迷迭香酸

[中图分类号] R283.6;R282.5;R284.1;R943.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)11-0018-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017110018

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170113.1624.008.html>

[网络出版时间] 2017-01-13 16:24:25

Comparison on Precise Powder Decoction Pieces and Traditional Commercial Slices: A Case Study on *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*

HUANG Juan¹, QIU Xiao-hui¹, BAI Jun-qi¹, GONG Lu¹, ZHANG Peng², SU He¹,
XU Jiang^{2*}, HUANG Zhi-hai^{1*}

(1. *The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangdong Provincial Academy of Chinese Medical Sciences, Guangdong*

Branch of China Academy of Chinese Medical Sciences, Guangzhou 510006, China;

2. *Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)*

[Abstract] **Objective:** To investigate the rationality and superiority of precise powder decoction pieces system, *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* was employed in this study. **Method:** The second internal transcribed spacer (ITS2) sequence was used as a DNA barcode to identify *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*. The chemical composition of the medicinal materials was characterized by HPLC fingerprints, similarity between precise powder decoction pieces and traditional commercial slices were both evaluated. The contents of salvianolic acid B and rosmarinic acid were determined by HPLC, and the characteristic common peaks were identified. In addition, the extraction efficiency was also compared by standard decoction method. **Result:** *Salviae Miltiorrhizae*

[收稿日期] 20161217(001)

[基金项目] 广东省中医院专项(2015KT1817);中国中医科学院中医药健康服务专项(ZZ0908067);广东省中医药强省建设专项医院中药制剂开发项目(2015KT1535)

[第一作者] 黄娟, 硕士, 研究实习员, 从事中药分子鉴定及物质基础研究, Tel:020-39318571, E-mail: juanhuangzi@126.com

[通讯作者] * 徐江, 博士, 助理研究员, 从事中药分子生物学研究, Tel:010-64032658, E-mail: xj8442cn@126.com;

* 黄志海, 硕士, 主任中药师, 从事中药资源与中药鉴定研究, Tel:020-39318571, E-mail: 1925196926@qq.com

Radix et Rhizoma could be accurately identified by ITS2 sequence. HPLC fingerprints were very similarity between precise powder decoction pieces and traditional commercial slices. However, the extraction efficiency of precise powder decoction pieces was significantly improved with >30% increased dry extract yield and approximately 20% -120% increased dissolution of chemical components. Moreover, the relative standard deviation was also decreased between batches. **Conclusion:** Precise powder decoction pieces can improve the extraction efficiency and uniformity of traditional commercial slices.

[Key words] precise powder decoction pieces; *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*; fingerprints; uniformity; DNA barcode; salvianolic acid B; rosmarinic acid

丹参是我国传统医学中常用中药之一,具有活血祛瘀、通经止痛、清心除烦、凉血消痈的作用^[1]。其栽培历史悠久,在全国大部分地区有栽培或者引种。由于栽培历史、地理环境、品种资源、种植基础、采收加工等因素的不同,造成丹参质量参差不齐^[2]。且我国丹参长期采用无性繁殖,品种混杂,造成商品质量和产量极不稳定^[3-4]。这些因素已导致丹参饮片批间甚至批内质量的不均一,极大地影响了临床疗效,也无法形成数据跟踪。据此,课题组提出的“精准煮散饮片”理论体系^[5],旨在提高产品工业化生产的批量规模,改善中药饮片批间、批内质量的均一性,提高临床用药质量的稳定性,不断完善质量溯源跟踪系统,提升中医临床疗效大数据分析的可靠性。

“煮散”一词来源于唐·孙思邈《备急千金药方》,其使用可追溯至先秦时期^[6-8]。古人将药材用重器捣碎、刀具切锉成小碎片或粗颗粒后再进行煎煮,使煎煮时“药力尽出”。中药煮散于唐宋时期盛行,但由于粗粉导致的“辨药之难”,后来逐渐被饮片所代替。随着现代科学技术的发展,DNA 分子鉴定技术和指纹图谱技术已被普遍应用,可实现药品基原、生产加工及市场流通等多领域监管,有效解决传统煮散的“辨药之难”问题。因此,本实验以丹参为例,对中药煮散饮片质量体系进行初步研究,采用化学指纹图谱表征药材化学成分组成,同时结合 DNA 分子鉴定技术对煮散体系的合理性及优越性进行综合评价。

1 材料

2469 型高效液相色谱仪系统(美国 Waters 公司,Empower 色谱工作站),BT125D 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司),HTP-312 型电子天平(上海精宏实验设备有限公司),5430R 型离心机(德国 Eppendorf 公司),2720 ProFlex 型聚合酶链式反应(PCR)核酸扩增仪(美国 Life Technologies 公司),Mini-Sub Cell GT 型水平电泳槽和 GelDoc

XR+型凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司),1-14 小型离心机(德国 Sigma 公司)。

迷迭香酸、丹参素及丹酚酸 B 对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为 20120109,20110704,20110314,纯度均 $\geq 98\%$),原儿茶醛(中国食品药品检定研究院,批号 110810-201608,纯度 99.3%),丹参饮片(康美药业股份有限公司,产地江苏,批号 151203411,160903411,160808621,经广东省中医院黄志海主任中药师鉴定均为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* 的干燥根和根茎),DP305 植物基因组 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司],三羟甲基氨基甲烷(Tris)和 β -巯基乙醇(美国 Sigma 公司),DL 2000 DNA Marker(日本 Takara 公司),Glodview(上海赛百盛基因技术有限公司), $2 \times$ Tap PCR Mix 酶(北京艾德莱生物科技有限公司),引物由上海美吉生物科技有限公司合成,水为超纯水,乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 不同规格饮片的出膏率比较 取丹参饮片(批号 151203411),分别粉碎为 5~10 目,10~24 目,24~65 目不同粒径范围的煮散饮片。称取原饮片及不同粒径范围煮散饮片各 100 g,采用根茎类药材标准汤剂煎煮法^[9]进行提取,分别加 8 倍量水浸泡 30 min,煮沸后保持 30 min,滤过;滤渣加 6 倍量水煎煮 30 min,合并滤液,减压浓缩至 100 mL,得 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 药液。精密量取该药液 25 mL,蒸干,得干浸膏,称重,计算出膏率。采用 SPSS 13.0 软件进行数据分析,采用独立样本 t 检验,见表 1。结果与原饮片比较,粉碎后不同粒径煮散饮片的出膏率均有所增加,且具有显著性差异;但不同粒径煮散饮片间出膏率无显著性差异。

2.2 HPLC 检测方法的建立

2.2.1 色谱条件 采用 ODS-3 C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μm),柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,流动相

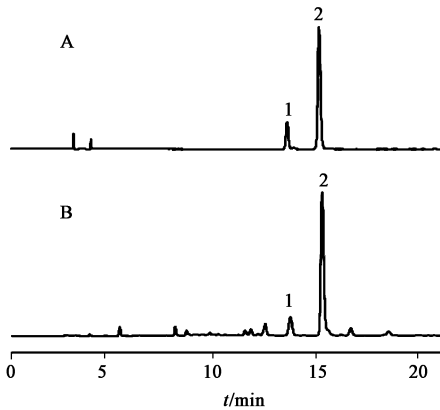
表 1 丹参原市售饮片与精准煮散饮片的出膏率($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Dry extract yield of traditional commercial slices and precise powder decoction pieces of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 饮片 | 出膏率/% | 澄清度 |
|-----------|----------------------------|-----|
| 原饮片 | 30.86 ± 0.85 | 卅 |
| 5~10 目煮散 | 40.21 ± 0.52 ¹⁾ | ++ |
| 10~24 目煮散 | 42.02 ± 0.25 ¹⁾ | ++ |
| 24~65 目煮散 | 43.08 ± 0.45 ¹⁾ | ++ |

注:与原饮片比较¹⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。均未出现糊化现象。

0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 5 min, 88% ~ 75% A, 5 ~ 13 min, 75% ~ 71% A, 13 ~ 20 min, 71% ~ 65% A), 丹酚酸 B 和迷迭香酸的检测波长分别为 286 nm 和 320 nm, 进样量 10 μ L。见图 1, 该色谱条件下丹酚酸 B 和迷迭香酸的色谱峰分离度良好。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 迷迭香酸; 2. 丹酚酸 B

图 1 丹参水提液 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* water extract

2.2.2 线性关系考察 精密称取丹酚酸 B 及迷迭香酸对照品适量, 加水配制成质量浓度为 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 丹酚酸 B 及 20, 40, 80, 160, 320 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 迷迭香酸系列对照品溶液, 按 2.2.1 项下条件测定, 峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 得回归方程 $Y = 6109X - 451203$ ($R^2 = 0.9998$), $Y = 13012X - 71347$ ($R^2 = 0.9998$), 线性范围依次为 250 ~ 4000, 20 ~ 320 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3 指纹图谱比较

2.3.1 样品溶液的制备 饮片共分为 3 组, 其中 A 组 (S1 ~ S3) 为原饮片组, 分别称取 3 批丹参饮片 50 g, 形态见图 2; B 组 (S4 ~ S6) 为混合原饮片组, 取等量的上述 3 批丹参饮片, 充分混合, 均匀摊平, 画格分为 9 份, 随机选取 3 份, 从每份中分别称取

50 g; C 组 (S7 ~ S9) 为煮散饮片组, 取等量的上述 3 批丹参饮片, 混合, 粉碎后过筛, 取 10 ~ 65 目粒径范围煮散饮片, 均匀摊平, 画格分为 9 份, 随机选取 3 份, 从每份中分别称取 50 g, 形态见图 3。上述 9 份样品分别按标准汤剂煎煮法进行提取, 合并提取液, 定容至 500 mL, 得 0.1 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 药液。精密量取各药液适量, 加水稀释 5 倍, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

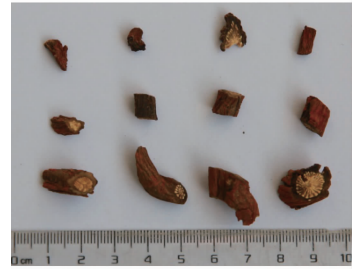


图 2 市售丹参原饮片的形态

Fig. 2 Morphology of traditional commercial slices of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*



图 3 丹参煮散饮片的形态

Fig. 3 Morphology of precise powder decoction pieces of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*

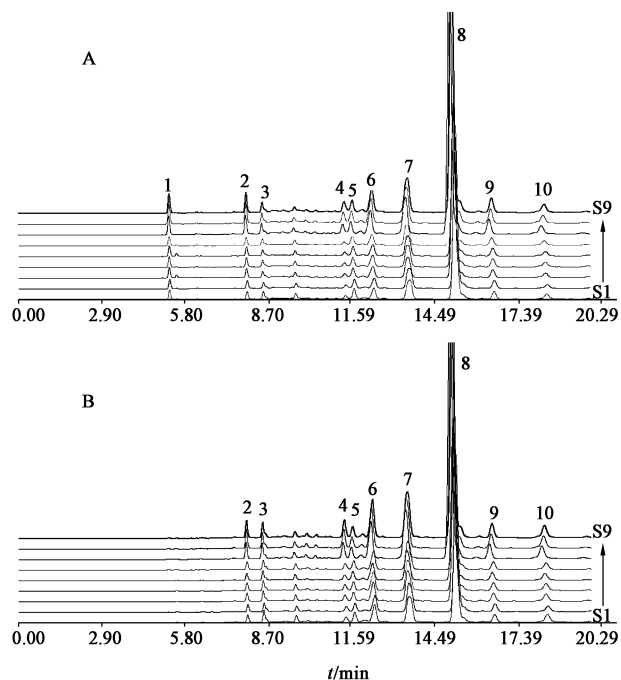
2.3.2 饮片均一性评价 以丹酚酸 B 和迷迭香酸为考察指标, 测定二者在原饮片混合前后及煮散饮片中的含量, 见表 2。结果发现混合制成煮散饮片后指标成分煎出率明显提高, 且其质量分数平均值的 RSD 也明显减小, 表明该饮片的质量均一性有所提高。

表 2 丹参原饮片与精准煮散饮片提取液中迷迭香酸、丹酚酸 B 的含量测定 ($n=3$)

Table 2 Contents of rosmarinic acid and salvianolic acid B in traditional commercial slices and precise powder decoction pieces ($n=3$)

| 组别 | 迷迭香酸 | | 丹酚酸 B | |
|----|---|-----------|---|-----------|
| | 质量分数 ($\bar{x} \pm s$) / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ | RSD /% | 质量分数 ($\bar{x} \pm s$) / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ | RSD /% |
| A | 3.25 ± 0.21 | 6.7 | 32.17 ± 2.50 | 7.8 |
| B | 3.39 ± 0.10 | 3.1 | 33.65 ± 0.70 | 2.1 |
| C | 5.50 ± 0.09 ¹⁾ | 1.7 | 56.33 ± 0.22 ¹⁾ | 0.4 |

2.3.3 指纹图谱相似度评价 HPLC 图谱采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件”(2004A 版)生成指纹图谱共有模式,比较原饮片混合前后及煮散饮片指纹图谱相似度,见图 4。以丹参原饮片(S1)为参照图谱,自动匹配并计算指纹图谱相似度,结果各种饮片间相似度均 >0.99。



A. 286 nm; B. 320 nm

图 4 丹参市售原饮片及精准煮散饮片的 HPLC 指纹谱
Fig. 4 HPLC fingerprints of traditional commercial slices and precise powder decoction pieces

2.3.4 指纹图谱共有峰的标定 本次研究中丹酚酸 B 的含量最高,且是《中国药典》丹参项下含量测定所规定的指标性成分,故确定以丹酚酸 B 为参照峰($t_R = 15.11$ min),其余各色谱峰的峰面积与丹酚酸 B 峰面积比值定义为相对峰面积。经相似度软件匹配后发现除了峰 1 之外,280 nm 和 320 nm 处其余共有峰相同,故仅列出了 280 nm 处数据,见表 3。结果发现 1,2,11 号峰分别为丹参素、原儿茶醛及迷迭香酸;煮散饮片与原饮片比较,共有峰相对峰面积均明显升高。

2.4 DNA 条形码鉴定 取饮片粉末约 40 mg,用液氮进一步磨碎,采用植物 DNA 提取试剂盒提取基因组总 DNA。扩增第二内转录间隔区(ITS2)序列,所采用的引物及扩增程序与文献[10]一致。PCR 扩增产物采用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,将电泳条带清晰、明亮、单一的 PCR 产物送测序公司进行双向测序。所得序列采用 CodonCode Alinger

表 3 丹参市售原饮片及精准煮散饮片在 280 nm 处共有峰的相对峰面积比较

Table 3 Relative peak areas of common peaks in traditional commercial slices and precise powder decoction pieces at 280 nm

| 峰号 | t_R /min | 原饮片组 | 混合原饮片组 | 煮散饮片组 |
|----|------------|---------|---------|---------|
| 1 | 5.26 | 0.031 6 | 0.032 2 | 0.061 3 |
| 2 | 7.94 | 0.028 4 | 0.027 6 | 0.063 4 |
| 3 | 8.51 | 0.025 5 | 0.025 0 | 0.040 7 |
| 4 | 11.36 | 0.017 8 | 0.018 7 | 0.054 3 |
| 5 | 11.65 | 0.047 7 | 0.047 6 | 0.060 4 |
| 6 | 12.34 | 0.067 3 | 0.070 4 | 0.144 7 |
| 7 | 13.56 | 0.164 1 | 0.166 6 | 0.264 8 |
| 8 | 15.11 | 1.000 0 | 1.001 9 | 1.784 8 |
| 9 | 16.51 | 0.048 5 | 0.049 9 | 0.090 1 |
| 10 | 18.36 | 0.030 9 | 0.030 5 | 0.064 0 |

6.02 软件进行校对拼接,去除低质量区并采用基于隐马尔可夫模型的 HMMer 注释方法去除两端 5.8S 和 28S 区段,获得完整的 ITS2 序列。利用 MEGA 6.06 软件比对,分析 ITS2 序列特点^[7]。以条形码附加二维码的方式展示主导单倍型序列特征,并用相似性搜索法 BLAST 对序列鉴定结果进行评价。

分析丹参 3 条 ITS2 序列特征,发现种内存在 1 个变异位点,为 164 位点 A/G 突变。3 条丹参序列长度均为 228 bp;腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤及胸腺嘧啶的碱基平均质量分数分别为 15.50%,35.96%,30.99%,17.54%,胞嘧啶与鸟嘌呤的总质量分数达 65% 以上。以条形码附加二维码的方式展示主导单倍型序列特征,左侧部分为 DNA 序列转换的彩色条形码图片,右侧二维码图片为 QRcode 的编码方式进行编码,扫描可读取序列信息,典型序列特征见图 5。BLAST 搜索结果显示各样品相似性最高的为丹参 *Salvia miltiorrhiza*,与其最相似序列的相似度 100%。

3 讨论

丹参化学成分主要包括脂溶性成分和水溶性成分,其中脂溶性成分主要为丹参酮型的二萜类化合物,水溶性成分主要为酚酸类化合物。本文以水为溶剂进行提取,经检测,迷迭香酸及丹酚酸 B 是丹参水提液含量最多的成分。因此,本实验以这 2 种成分作为含量均一性测定指标成分。本文以常用中药丹参对精准饮片用药形式进行探索。批间具有一定的差异性。经混合处理后,批间差异减少;而经粉碎处理成煮散饮片后,批间差异明显减小。结果证实煮散饮片因粒度较小,能很好地实现均一性。对

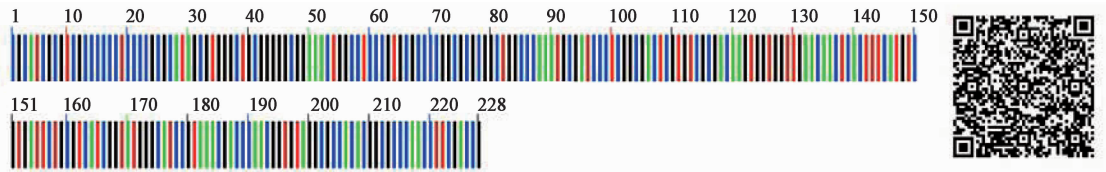


图 5 丹参饮片的 ITS2 序列

Fig. 5 ITS2 sequence of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*

比原饮片及精准煮散饮片指纹图谱,发现煎出成分基本没有变化,指纹图谱相似度很高,但是煮散饮片煎煮效率明显增高。按标准汤剂煎煮法,煮散饮片出膏率增加 >30%,迷迭香酸及丹酚酸的煎出率均约 1.7 倍,其余化学成分的煎出率也为原饮片的 1.2~2.2 倍。

本文采用标准汤剂煮法进行实验,符合临床用药方式,可为中药煮散饮片的推广提供参考。提出精准煮散饮片是适应时代的发展,在中药市场混乱及中药资源匮乏的今天,亟待建立一种有效保证中药质量的市场体系,规范整个过程的质量控制方法。由于饮片规格不同、用药部位不一致,后期应针对中药煮散进行分类研究,同时可利用二维码技术建立中药饮片质量追踪体系,包括有效成分、产地来源、加工方法等所有信息含量^[11-12],为后续临床大数据的挖掘奠定基础。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:76.
[2] 刘庆林. 丹参药对的临床应用[J]. 山西中医,2004, 20(1):51-52.
[3] 赵洪芝. 丹参质量评价方法及不同产地丹参质量研究[D]. 天津:天津大学,2006.

[4] 尉广飞,李翠,李佳,等. 丹参药材质量主要影响因素研究概况[J]. 山东中医药大学学报,2015,39(5): 476-480.
[5] 陈士林,黄志海,丘小惠,等. 中药精准煮散饮片[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2016,18(9): 1430-1440.
[6] 孙思邈. 备急千金要方[M]. 北京:中国医药科技出版社,2011:128-156.
[7] 徐海波. 中药煮散源流考[J]. 河北中医药学报, 1999,14(4):11-13.
[8] 穆兰澄,曹京梅,李冀湘,等. 中药煮散的历史沿革与现代研究概述[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14 (7):74-75.
[9] 陈士林,刘安,李琦,等. 中药饮片标准汤剂研究策略 [J]. 中国中药杂志,2016,41(8):1367-1375.
[10] 陈士林,姚辉,韩建萍,等. 中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则 [J]. 中国中药杂志,2013,38(2): 141-148.
[11] 张鹏,邬兰,李西文,等. 人参饮片标准汤剂的评价及应用探讨[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(7): 2-11.
[12] 全家羽,赵嵘,代云桃,等. 当归标准汤剂质量评价体系的建立[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(7): 18-23.

[责任编辑 刘德文]