

· 工艺与制剂 ·

基于 HPLC 指纹图谱技术对小包装熟地黄饮片的稳定性考察

苏娟, 黄勤挽*, 王瑾, 张玉莉, 李小芳

(成都中医药大学 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

[摘要] **目的:** 探讨不同包装材料、不同存贮状态对熟地黄饮片质量稳定性的影响, 建立熟地黄最佳贮存养护方法。 **方法:** 分别采用 3 种不同包装材料将熟地黄贮存于 3 种不同温度及 2 种密闭环境中, 采用 HPLC 指纹图谱技术, 以熟地黄标志性成分毛蕊花糖苷为评价指标, 评价不同包装材料、不同存贮状态对熟地黄饮片质量稳定性的影响。 **结果:** PTP 铝箔、真空、冷藏条件下毛蕊花糖苷含量最高分别为 $(0.028 \pm 0.011)\%$, $(0.026 \pm 0.016)\%$, $(0.025 \pm 0.014)\%$ 。毛蕊花糖苷含量高低顺序为 PTP 铝箔 > 聚乙烯塑料袋 > 牛皮凝膜纸; 真空状态 > 非真空状态; 冷藏条件 > 阴凉条件 > 常温条件。熟地黄最佳贮存养护条件为 PTP 铝箔包装, 真空冷藏。 **结论:** 该优选条件下, 熟地黄饮片质量稳定, 可为实际生产中贮存熟地黄提供试验依据。

[关键词] 熟地黄; 包装材料; 贮存状态; 指纹图谱; 稳定性

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0016-04

Stability Investigation of Small Package *Rehmannia glutinosa* Pieces based on HPLC Fingerprint Technology

SU Juan, HUANG Qin-wan*, WANG Jin, ZHANG Yu-li, LI Xiao-fang

(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate influence of different packaging materials and different storage state on quality stability of *Rehmannia glutinosa* pieces, and establish the best storage conservation method of *R. glutinosa*. **Method:** Three different packaging materials were used, and *R. glutinosa* were stored at three different temperatures and two kinds of confined environment. With verbascoside as evaluation index, and HPLC fingerprint technology was used to evaluate impact of different packaging materials, different storage on quality stability of *R. glutinosa* pieces. **Result:** On conditions of PTP aluminum foil, vacuum and refrigeration had the highest content of verbascoside, which were $(0.028 \pm 0.011)\%$, $(0.026 \pm 0.016)\%$, $(0.025 \pm 0.014)\%$, respectively. The content of verbascoside in descending order as follows: PTP aluminum foil > polyethylene plastic bag > leather condensate film paper; vacuum > unvacuum; refrigerated > cool conditions > normal temperature. Optimum storage and curing condition was: PTP aluminum foil packaging, vacuum refrigeration. **Conclusion:** In this optimized condition, *R. glutinosa* pieces was stable, it could provide experimental basis for storage in actual production of *R. glutinosa* pieces.

[Key words] *Rehmannia glutinosa*; packaging materials; storage state; fingerprint; stability

[收稿日期] 20120520(002)

[基金项目] 国家中医药行业科研专项(21007011-20); 中国中医科学院中药研究所自主选题(2011ZDXK-02); 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地开放研究基金资助项目

[第一作者] 苏娟, 硕士研究生, 从事中药炮制与制剂研究, E-mail: 670544022@qq.com

[通讯作者] *黄勤挽, 博士, 副教授, 从事中药炮制与制剂研究, Tel: 13982199974, E-mail: 36190587@qq.com

熟地黄性味甘、微温,具有补血滋阴、益精填髓之功效,系临床常中药之一,但其饮片调剂困难且极易发霉变质、质量稳定性差^[1]。中药饮片小包装技术是将加工炮制合格的饮片根据临床常用剂量用一定的包装材料封装,由配方药师直接调配,无须称量的一种饮片包装方式。小包装中药饮片可保持饮片特色、保证剂量准确、易于复核、提高效率、饮片纯净、减少浪费、改善环境等突出优越性^[2]。本研究采用现代中药饮片的小包装技术,联合中药指纹图谱技术,探讨不同包装材料、不同存贮状态对熟地黄饮片质量稳定性的影响,旨在建立熟地黄最佳贮存养护方法。

1 材料

1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),BP211D 型电子天平(德国 Sartorius 公司),Agilent Zorbax Extend C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),熟地黄饮片(四川省新荷花中药饮片公司,批号 1009098,经成都中医药大学卢先明教授鉴定为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的干燥及加工品),毛蕊花糖苷对照品(成都瑞芬思生物科技有限公司,批号 M-011-110622),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 药材处理 采用聚乙烯塑料、PTP 铝箔、牛皮凝膜纸袋 3 种包装材料,对比真空与否 2 种状态,将上述不同包装的饮片分别在冷藏环境(<10 ℃)、阴凉环境(<20 ℃)、常温环境(25 ℃)下进行长期留样考察,本试验在贮藏期为 12 个月时(2012 年 3 月)进行取样研究。熟地黄样品信息见表 1。

表 1 小包装熟地黄饮片样品贮藏信息

No. 样品信息	No. 样品信息
1 牛皮凝膜纸、真空、常温	9 PTP 铝箔、非真空、阴凉
2 牛皮凝膜纸、真空、冷藏	10 聚乙烯塑料袋、真空、常温
3 牛皮凝膜纸、真空、阴凉	11 聚乙烯塑料袋、真空、冷藏
4 PTP 铝箔、真空、常温	12 聚乙烯塑料袋、真空、阴凉
5 PTP 铝箔、真空、冷藏	13 聚乙烯塑料袋、非真空、常温
6 PTP 铝箔、真空、阴凉	14 聚乙烯塑料袋、非真空、冷藏
7 PTP 铝箔、非真空、常温	15 聚乙烯塑料袋、非真空、阴凉
8 PTP 铝箔、非真空、冷藏	16 空白对照

注:空白对照为熟地黄不做任何特殊处理所得样品。

2.2 样品溶液制备^[3] 分别将上述 1~16 号熟地黄样品最粗粉约 2.00 g,精密称定,置圆底烧瓶中,精密加入甲醇 100 mL,称定质量,加热回流 30 min,

放冷,称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 50 mL,减压回收溶剂近干,残渣用流动相溶解,转移至 10 mL 量瓶中,加流动相至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.3 毛蕊花糖苷含量测定

2.3.1 色谱条件 Agilent Zorbax Extend C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温 30 ℃,流动相乙腈(A)-0.1% 乙酸溶液(B)梯度洗脱(0 min, 5% A; 60 min, 25% A; 75 min, 35% A; 85 min, 5% A),检测波长 334 nm^[4]。

2.3.2 线性关系考察 精密吸取 10 mg·L⁻¹ 的毛蕊花糖苷对照品溶液 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 μL,按上述色谱条件测定峰面积,以毛蕊花糖苷进样量为横坐标,峰面积积分为纵坐标,得回归方程 $Y = 11.573X - 5.6247$ ($r = 0.9998$),毛蕊花糖苷在 $8.4 \times 10^{-5} \sim 250 \times 10^{-5} \mu\text{g}$ 与峰面积呈良好线性关系。

2.3.3 精密度试验 取同一份供试样品溶液,24 h 内连续进样 6 次,将所得数据采用国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004 年版进行处理,结果表明各色谱峰相对保留时间和峰面积 RSD 均 ≤ 3%,相似度均 > 95%,符合指纹图谱测定的要求,表明仪器精密度良好。

2.3.4 重复性试验 取供试品 6 份,按供试品溶液方法制备样品,分别进行检测,处理所得数据,结果表明,各色谱峰相对保留时间和峰面积 RSD 均 ≤ 3%,相似度均 > 95%,符合指纹图谱测定要求,表明样品制备方法重复性良好。

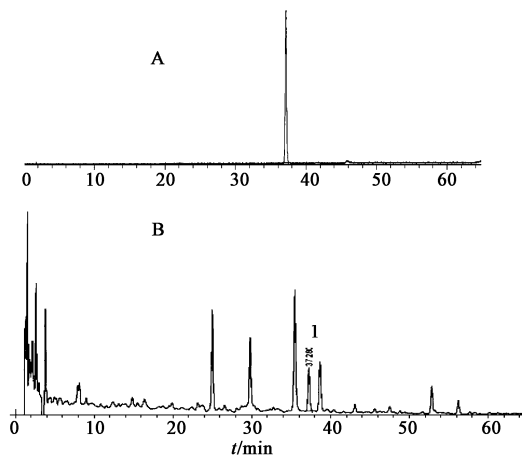
2.3.5 稳定性试验 取同一份供试样品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 12, 24 h 进样测定。结果表明,各色谱峰相对保留时间和峰面积 RSD 均 ≤ 3%,其相似度均 > 0.95,符合指纹图谱测定的要求,表明供试样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.6 回收率试验 精密吸取已知含量的供试品溶液 9 份,分别加入毛蕊花糖苷对照品溶液适量,按供试品溶液的制备方法制备样品溶液,进样 10 μL,测定,计算加样回收率,毛蕊花糖苷平均回收率 99.20%,RSD 1.09%。

2.4 熟地黄指纹图谱的定量研究 将 2.2 项下所得熟地黄供试液按上述色谱条件测定,见图 1。16 种不同包装贮存环境下熟地黄样品指纹图谱定量研究,含量测定结果采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,结果见表 2。

2.5 指纹图谱及其技术参数

2.5.1 指纹图谱的建立及共有指纹峰的标定^[5-7]



A. 对照品; B. 样品; 1. 毛蕊花糖苷

图 1 熟地黄 HPLC

表 2 不同条件下熟地黄样品中毛蕊花糖苷含量测定

贮存条件	条件	样品/个	含量/%
包装材料	牛皮凝胶膜纸	3	0.020 ± 0.012 ¹⁾
	PTP 铝箔	6	0.028 ± 0.011 ²⁾
	聚乙烯塑料袋	6	0.025 ± 0.013 ¹⁾
	空白对照	1	0.015 ± 0.000
贮存温度	常温(25 ℃)	5	0.020 ± 0.012 ¹⁾
	阴凉(20 ℃)	5	0.023 ± 0.019 ¹⁾
	冷藏(10 ℃)	5	0.026 ± 0.016 ²⁾
	空白对照	1	0.015 ± 0.000
密闭状态	真空	9	0.025 ± 0.014 ²⁾
	非真空	6	0.023 ± 0.013 ¹⁾
	空白对照	1	0.015 ± 0.000

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

取上述 1 ~ 16 号饮片的供试品,按 2.2 项下方法制

表 3 16 种不同包装贮藏的熟地黄样品指纹图谱共有峰的相对保留时间

No.	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	S ₈	S ₉	S ₁₀	S ₁₁	S ₁₂	S ₁₃	S ₁₄	S ₁₅	S ₁₆
1	0.041	0.040	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041
2	0.054	0.054	0.055	0.054	0.055	0.055	0.054	0.054	0.054	0.054	0.055	0.055	0.055	0.054	0.055	0.055
3	0.095	0.095	0.095	0.095	0.095	0.096	0.095	0.095	0.095	0.095	0.096	0.095	0.095	0.095	0.095	0.096
4	0.141	0.140	0.140	0.140	0.140	0.141	0.140	0.141	0.141	0.139	0.141	0.141	0.141	0.140	0.141	0.140
5	0.721	0.721	0.720	0.720	0.720	0.721	0.721	0.720	0.720	0.721	0.739	0.721	0.720	0.720	0.721	0.720
6	0.848	0.848	0.848	0.848	0.847	0.847	0.848	0.848	0.847	0.849	0.844	0.849	0.848	0.848	0.848	0.848
7	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
8	0.040	0.040	0.040	0.040	0.040	0.039	0.040	0.040	0.040	0.041	0.040	0.040	0.040	0.041	0.040	0.040
9	1.079	1.079	1.079	1.079	1.079	1.079	1.079	1.079	1.080	1.080	1.078	1.079	1.079	1.080	1.079	1.079

将上述 16 种不同包装贮藏条件的熟地黄指纹图谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系

备供试品溶液,按 2.3.1 项下色谱条件测定,记录各样品 HPLC 图谱。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004 年 A 版进行色谱峰的匹配和相似度计算,将上述 16 号样品图谱导入相似度评价软件,以 S₁ 号样品色谱为参照,采用中位数计算法,通过比较上述 16 个供试品的 HPLC 图谱检测结果,选定其中 9 个共有的色谱峰为共有指纹峰,建立不同包装贮藏环境下的小包装中药饮片熟地黄的 HPLC 指纹图谱的共有模式图(图 2)。以共有模式指纹图谱为参照,各样品指纹图谱与之进行比较,计算各样品指纹图谱相似度值。经对照品定性,7 号色谱峰为毛蕊花糖苷,该峰峰面积大,分离度好,因此选其为参照峰。

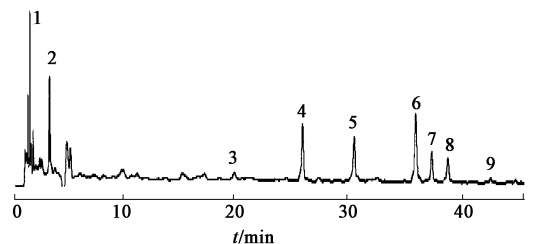


图 2 熟地黄饮片对照指纹图谱(共有模式)

2.5.2 共有峰的相对保留时间与相对峰面积 将各色谱峰保留时间与同一图谱中毛蕊花糖苷的保留时间进行比较,其比值为各色谱峰的相对保留时间;将各色谱峰峰面积与同一图谱中毛蕊花糖苷的峰面积进行比较,其比值为各色谱峰的相对峰面积。16 种不同包装材料与贮藏条件的小包装熟地黄饮片中各共有峰的相对保留时间见表 3,各共有峰的相对峰面积见表 4。

统》2004 年 A 版进行色谱峰的匹配和相似度的计算,各样品相似度分别为 1.000, 0.994, 0.984,

表 4 16 种不同包装贮藏条件熟地黄样品指纹图谱共有峰的相对峰面积

No.	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	S ₈	S ₉	S ₁₀	S ₁₁	S ₁₂	S ₁₃	S ₁₄	S ₁₅	S ₁₆
1	0.384	0.383	0.383	0.383	0.383	0.384	0.384	0.384	0.384	0.383	0.384	0.383	0.384	0.383	0.384	0.383
2	0.164	0.164	0.160	0.160	0.161	0.162	0.164	0.160	0.161	0.163	0.166	0.165	0.167	0.161	0.166	0.161
3	0.803	0.807	0.808	0.803	0.813	0.809	0.805	0.806	0.801	0.811	0.801	0.812	0.802	0.814	0.800	0.809
4	3.617	3.606	3.687	3.599	3.607	3.648	3.609	3.614	3.620	3.614	3.605	3.606	3.613	3.602	3.699	3.606
5	0.838	0.828	0.836	0.860	0.870	0.863	0.834	0.841	0.854	0.852	0.804	0.818	0.839	0.811	0.863	0.859
6	0.495	0.499	0.499	0.490	0.499	0.491	0.499	0.497	0.490	0.495	0.494	0.496	0.497	0.494	0.491	0.494
7	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
8	0.375	0.366	0.372	0.375	0.386	0.378	0.370	0.373	0.380	0.371	0.376	0.377	0.361	0.376	0.377	0.370
9	0.344	0.341	0.342	0.343	0.320	0.341	0.348	0.345	0.346	0.348	0.348	0.342	0.349	0.341	0.348	0.341

0.982, 0.990, 0.993, 0.973, 0.986, 0.978, 0.957, 0.970, 0.970, 0.911, 0.977, 0.929, 0.983。熟地黄 HPLC 指纹图谱见图 3。

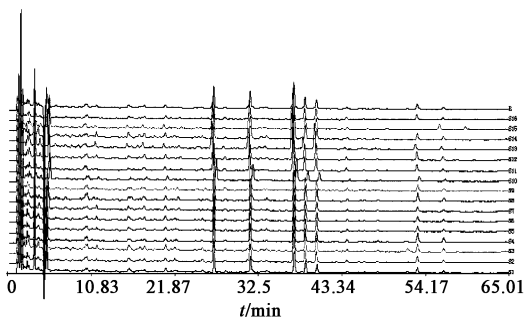


图 3 不同处理熟地黄 HPLC 指纹图谱叠加

3 讨论

由表 2 中数据可知,不同贮存条件对熟地黄变质的对抗作用,PTP 铝箔真空冷藏条件下其指标性成分毛蕊花糖苷含量最高。结果表明 PTP 铝箔优于聚乙烯塑料袋优于牛皮凝膜纸;真空状态优于非真空状态;冷藏条件优于阴凉条件优于常温条件;上述 3 种包装材料均显著优于无特殊处理的空白对照样品。因此熟地黄最佳贮存条件为 PTP 铝箔包装,真空冷藏。

作为药品包装材料的 PTP 铝箔是由纯度 > 99% 的铝材制成,厚度在 0.006 ~ 0.040 mm,具金属外观,可反射光和热,完全阻隔光线,无臭、无味、无毒,在加工过程中除去了所有微生物污染,且不支持细菌和霉菌的生长,对气体有良好阻隔作用,即使有针孔,其防护阻隔效果也优于聚乙烯塑料袋和纸

袋^[8-10]。本试验结果证实了 PTP 铝箔作为药品包装材料的优良特性,正是由于 PTP 铝箔具有上述特性,用于中药饮片的包装贮藏,将有利于提高性质不稳定的中药饮片质量的稳定性。

[参考文献]

- [1] 黄霞. 熟地黄现代研究进展[J]. 内蒙古中医药, 2004, 11(5): 25.
- [2] 张亚莉. 小包装中药饮片分析[J]. 临床合理用药, 2011, 4(4B): 75.
- [3] 中国药典. 一部[S]. 2010: 116.
- [4] 曹建军, 梁宗锁, 杨东风, 等. 应用 HPLC 指纹图谱技术确定熟地黄炮制终点[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(19): 2556.
- [5] 邱建国, 张汝学, 贾正平, 等. 地黄中寡糖含量 HPLC 法测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(8): 8.
- [6] 盛杰, 李茂星, 王娟, 等. HPLC 法测定地黄、不同提取物及熟地黄中的梓醇[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(1): 23.
- [7] 郭东艳, 张丽娟, 王梅, 等. 生地黄止血有效部位 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 90.
- [8] 李建杭. 药用 PTP 包装材料的选择[J]. 塑料包装, 2002, 12(4): 19.
- [9] 廖艳萍, 兰小卫. 纸塑包装材料的临床应用分析[J]. 当代护士: 学术版, 2008, 4(7): 111.
- [10] 杨娟英, 马久太, 郑伶俐, 等. 薄荷饮片不同材料包装稳定性研究[J]. 陕西中医, 2010, 11(31): 1525.

[责任编辑 仝燕]