

• 药剂 •

# 血栓通注射液指纹图谱研究

高增平<sup>1</sup>, 陆蕴如<sup>1</sup>, 孙 伟<sup>2</sup>

(1 北京中医药大学中药学院, 北京 100029;

2 内蒙古康源药业有限公司, 甘旗卡 028100)

**摘要:** 目的: 应用 HPLC 法对血栓通注射液及其原料药制定指纹图谱检测标准。方法: Nova-Pak C<sub>18</sub> 分析柱, 乙腈-水梯度洗脱, 流速 1.0ml/min, 检测波长 210nm。结果和结论: 建立血栓通注射液及其原料药三七总皂苷的指纹图谱检测标准。

**关键词:** 血栓通注射液; 三七总皂苷; HPLC; 指纹图谱

中图分类号: R284.2 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2002)06-0001-03

## The Fingerprint Studies on Xueshuantong Injection

GAO Zeng-ping<sup>1</sup>, LU Yun-ru<sup>1</sup>, SUN Wei<sup>2</sup>

(1 Beijing University of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, Beijing 100029

2 Inner Mongolia Kangyuan Pharmaceutical Company, Ltd. Ganqicha 028100)

**Abstract:** Objective: To establish the fingerprint standard of Xueshuantong Injection and its raw material by HPLC method. Methods: Column: Nova-Pak C<sub>18</sub>, mobile phase: CN<sub>3</sub>CH: H<sub>2</sub>O in gradient mode, flow rate: 1.0ml/min, detecting wavelength: 210nm. Results: The fingerprint standards of total saponins of notoginseng and its injection were established.

**Key words:** Xueshuantong Injection; Total saponins of notoginseng; Fingerprint

血栓通注射液是以三七总皂苷为原料制成的注射剂, 本文首次按国家药品监督管理局 2000 年 8 月关于“中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)的通知”, 分别对 10 批血栓通注射液和 10 批原料药三七总皂苷进行了指纹图谱测定, 分别建立了指纹图谱检测标准, 实验方法的精密度、稳定性、重现性好, 操作简便可行。

## 1 仪器、试剂与样品

Waters 515 泵, Waters 2487 双波长紫外检测器, Millennium<sup>32</sup> 色谱工作站; 乙腈(美国 Fisher 公司)为色谱纯, 甲醇(北京化工厂)为分析纯; 血栓通注射液、三七总皂苷均由内蒙古甘旗卡制药厂提供; 人参皂苷 Rg1、Rb1、Re、三七皂苷 R1 对照品均购自中国药品生物制品检定所。

## 2 实验方法与结果

**2.1 色谱条件** Nova-Pak C<sub>18</sub> 分析柱(150mm × 4.6mm, 4μm), 乙腈-水二元梯度洗脱(17% → 100% 乙腈), 流速 1.0ml/min, 检测波长 210nm。

**2.1.1 检测波长的确定** 在相同的色谱条件下, 对血栓通注射剂的供试品溶液分别在 210nm 和 203nm

检测, 所得指纹图谱完全相同, 因 203nm 比 210nm 更处于末端吸收, 测定过程中容易受溶剂质量影响, 故选择 210nm 作为检测波长。

**2.1.2 对照品峰的确认** 对人参皂苷 Rg1、Rb1、Re、三七皂苷 R1 对照品用甲醇分别制成每 1ml 含对照品 1mg 的对照品溶液, 采用对照品加入法确认注射剂供试品溶液色谱图中各对照品相应的色谱峰, 结果显示以上 4 种对照品的色谱峰均得到基线分离, 故本文采用了上述色谱条件进行指纹图谱测定。

## 2.2 供试品溶液的制备

**2.2.1 注射剂供试品溶液的制备** 精密吸取注射液 10.00ml, 用水饱和的正丁醇 10.0ml 振摇提取一次, 提取液用正丁醇饱和的水 10.0ml 反洗一次, 弃去水层, 提取液减压回收至干, 残渣用甲醇溶解并定容至 5ml 容量瓶中, 摇匀即得。

经实验证明: 用水饱和的正丁醇振摇提取一次, 已基本提取完全(已包含第二次振摇提取液中所有的色谱峰), 因此确定提取方法如上。

**2.2.2 原料药供试品溶液的制备** 取干燥的三七总皂苷, 用甲醇制成每 1ml 含 4mg 的溶液, 摇匀即得。

## 2.3 指纹图谱的测定

**2.3.1 注射剂指纹图谱的测定** 精密吸取注射剂供试品溶液 10 $\mu$ l, 注入液相色谱仪, 记录 60min 的色谱图。以人参皂苷 Rg1 色谱峰(S 峰)的保留时间和峰面积为 1 计算相对保留时间和峰面积比值。

**2.3.2 原料药指纹图谱的测定** 精密吸取三七总皂苷供试品溶液 8 $\mu$ l, 注入液相色谱仪, 记录 60min 的色谱图。以人参皂苷 Rg1 色谱峰(S 峰)的保留时间和峰面积为 1 计算相对保留时间和峰面积比值。

**2.4 实验方法考察**

**2.4.1 精密度实验** 取 1802 批血栓通注射剂, 按 2.2.1 方法制备供试品溶液, 连续进样 5 次, 测定指纹图谱, 结果各峰面积比值的 RSD 在 0.57% ~ 2.51% 之间, 各色谱峰保留时间与人参皂苷 Rg1 色谱峰(S 峰)保留时间比值的 RSD 在 0.87% ~ 2.11% 之间, 符合指纹图谱技术要求。

**2.4.2 稳定性实验** 取 1802 批血栓通注射剂, 按 2.2.1 方法制备供试品溶液, 分别在 0h, 8h, 16h, 20h, 24h 检测指纹图谱, 结果各峰面积比值的 RSD 在 0.53~ 3.50 之间, 仅 24h 测定时 16~ 17 号峰的峰面积比值稍偏高, 使得 RSD 值稍偏大, 各色谱峰保留时间与人参皂苷 Rg1 色谱峰(S 峰)保留时间比值的 RSD 在 0.75% ~ 2.01% 之间, 总体看供试品溶液在 24h 内测定是稳定的, 符合指纹图谱技术要求。

**2.4.3 重现性实验** 取 1802 批血栓通注射剂, 按 2.2.1 方法制备供试品溶液, 平行操作制备 5 份, 分别检测指纹图谱, 结果各峰面积比值的 RSD 在 0.56% ~ 2.95% 之间, 各色谱保留时间与人参皂苷 Rg1 色谱峰(S 峰)保留时间比值的 RSD 在 0.98% ~ 2.38% 之间, 符合指纹图谱技术要求。

**2.5 实验结果**

**2.5.1 注射液指纹图谱**

**2.5.1.1 指纹图谱** 所得注射液指纹图谱, 根据 10 批样品测定结果标定共有指纹峰 24 个, 其中包括作为参照物的人参皂苷 Rg1 色谱峰; 非共有峰面积占总峰面积 1.68% ~ 4.81%, 10 批均未超过 5%。

**2.5.1.2 共有指纹峰的峰号及其相对保留时间 (RT<sub>i</sub>/RT<sub>s</sub>) 如下:**

峰号 (RT<sub>i</sub>/RT<sub>s</sub>) 分别为:  $n = 10$

1(0.898), S(1.000), 2(1.025), 3(1.357), 4(1.388), 5(1.424), 6(1.443), 7(1.482), 8(1.642), 9(1.661), 10(1.671), 11(1.682), 12(1.701), 13(1.722), 14(1.734), 15(1.748), 16(1.861), 17(1.877), 18

(1.969), 19(1.994), 20(2.018), 21(2.085), 22(2.239), 23(2.667)。

**2.5.1.3 峰面积比值 (A<sub>i</sub>/A<sub>s</sub>)** 按照指纹图谱技术要求, 对单峰面积占总峰面积 5% 以上(保留时间在 30min 以内)或 10% 以上(保留时间大于 30min)的色谱峰(1 号 4 号 5 号 7 号 16~ 17 号峰, S 峰为参照物 Rg1 峰)计算了峰面积比值(12 号和 22 号峰的保留时间均大于 30min, 且其峰面积占总峰面积的百分比也均小于 10%, 故不必计算峰面积比值), 结果见表 1。

表 1 注射液指纹图谱峰面积比值

峰号	保留时间	峰面积 %	峰面积比值 (实测比值范围)	准许误差范围
1	< 30min	5~ 10%	0.218 (0.208~ 0.225)	0.153~ 0.283 ( $\pm 30\%$ )
S	< 30min	10~ 20%	1.000	
4	< 30min	10~ 20%	0.695 (0.686~ 0.703)	0.521~ 0.869 ( $\pm 25\%$ )
5	< 30min	5~ 10%	0.237 (0.231~ 0.246)	0.166~ 0.308 ( $\pm 30\%$ )
7	30min	5~ 10%	0.254 (0.242~ 0.266)	0.178~ 0.330 ( $\pm 30\%$ )
16~ 17	< 30min	10~ 20%	0.808 (0.741~ 0.986)	0.606~ 1.010 ( $\pm 25\%$ )

**2.5.2 原料药三七总皂苷指纹图谱**

**2.5.2.1 指纹图谱** 所得原料药指纹图谱, 根据 10 批样品测定结果标定共有指纹峰 22 个, 其中包括作为参照物的人参皂苷 Rg1 色谱峰; 非共有峰面积占总峰面积 2.99% ~ 4.56%, 10 批均未超过 5%。

**2.5.2.2 共有指纹峰的峰号及其相对保留时间 (RT<sub>i</sub>/RT<sub>s</sub>) 如下:**

峰号 (RT<sub>i</sub>/RT<sub>s</sub>) 分别为:  $n = 10$

1(0.908), S(1.000), 2(1.021), 3(1.289), 4(1.299), 5(1.319), 6(1.363), 7(1.412), 8(1.449), 9(1.440), 10(1.561), 11(1.567), 12(1.576), 13(1.596), 14(1.604), 15(1.623), 16(1.753), 17(1.773), 18(1.958), 19(1.969), 20(2.104), 21(2.297)。

**2.5.2.3 峰面积比值 (A<sub>i</sub>/A<sub>s</sub>)** 按照指纹图谱技术要求, 对单峰面积占总峰面积 5% 以上(保留时间在 30min 以内)或 10% 以上(保留时间大于 30min)的色谱峰(1 号 5 号 7 号 20 号峰, S 峰为参照物 Rg1 峰)计算了峰面积比值, 结果见表 2。

表 2 三七总皂苷指纹图谱峰面积比值

峰号	保留时间 min	峰面积 %	峰面积比值 (实测比值范围)	准许误差 范围
1	< 30	5~ 10	0.240 (0.231~ 0.249)	0.168~ 0.312 (±30%)
S	< 30	> 20	1.000	
5	< 30	10~ 20	0.651 (0.572~ 0.713)	0.488~ 0.814 (±25%)
7	< 30	5~ 10	0.220 (0.200~ 0.249)	0.154~ 0.286 (±30%)
20	> 30	10~ 20	0.430 (0.387~ 0.518)	0.322~ 0.538 (±25%)

### 3 讨论

**3.1** 本文用梯度洗脱法使血栓通注射液及其原料三七总皂苷得到较好分离,所有组分 60min 内出完(记录了 120min 的色谱图),并进行了方法考察实验,选择含量较高的人参皂苷 Rg1 作为参照物,计算结果均符合指纹图谱研究的技术要求,证明该方法准确可靠,可用于指纹图谱测定。

**3.2** 经过对 10 批注射液和 10 批总皂苷进行测定,制定了其指纹图谱检测标准及相应的技术参数(10 批平均值),非共有峰占总峰面积的百分比均小于 5%,为血栓通注射液的质量控制提供了科学依据。

**3.3** 注射液指纹图谱和原料三七总皂苷指纹图谱

均含有人参皂苷 Rg1 Rb1 Re 三七皂苷 R1 色谱峰,而且原料总皂苷指纹图谱中的色谱峰在注射液指纹图谱中的均有相对应的色谱峰,二者相关性较好。由于注射液是由总皂苷加工制得,经高温灭菌处理,因此二者指纹图谱中峰的比例有所改变。

**3.4** 三七药材的指纹图谱研究也已完成,但由于内容较多(包括药材粉碎粒度、提取时间、净化柱洗脱量考查,实验方法的精密度、稳定性、重现性考查及 10 批药材的指纹图谱测定等),本文篇幅有限,故将另文发表。

**3.5** 另有文献报道<sup>[1]</sup>三七药材及其制剂指纹图谱的研究工作,但文中无完整的方法学考察,也未给出测定 10 批样品后所得的指纹图谱检测标准及相应的技术参数(共有峰、峰面积比值、相对保留时间等),本文按药监局的“中药注射剂指纹图谱研究的技术要求”对血栓通注射液进行了方法学考察实验,并通过 10 批注射液及其原料的指纹图谱测定,制定了指纹图谱检测标准及其相应的技术参数。

#### 参考文献:

- [1] 周玉新,袁永生,高霞,等.三七药材及其制剂指纹图谱研究[J].中国中药杂志,2001,26(2):122-123.