

结果表明: 本方法回收率良好。

2.6 样品测定

取 3 批供试品溶液, 用高氯酸滴定液($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 滴定, 用电位法指示终点, 并将滴定的结果用空白试验校正, 测试结果见表 5。

表 5 3 批卡巴胆碱含量测定结果

批号	含量 / %
06090403	99.9
06090904	99.7
06091405	99.7

3 讨论

3.1 醋酐的使用量 我们分别加入醋酐为 0、5、20、40、60、80 mL 进行了试验, 结果表明: 当不加醋酐时, 滴定突跃点无法辨认, 且溶解样品所需要的时间较长。使用醋酸-醋酸酐混合溶剂能改善样品的溶解性, 并且随着醋酐量的增大滴定突跃明显增大, 当醋酐的量超过 40 mL 时, 滴定突跃变化不明显, 故

采用醋酐量为 40 mL。

3.2 分别取卡巴胆碱样品 3 批, 用电位滴定法与标准^[1] 收载的方法进行比较, 测试结果见表 6。

表 6 两种测定方法测试结果比较

序号	批号	含量 / % (电位滴定法)	含量 / % (原方法)
1	06090403	99.9	99.5
2	06090904	99.7	99.3
3	06091405	99.7	99.4

结果表明, 电位滴定法能准确的对卡巴胆碱原料中卡巴胆碱的含量进行测定, 与原方法比较, 结果一致。

3.3 该方法有效的革除了汞盐的使用, 大大降低了对人体的危害和对环境的污染, 试验证明, 该方法重复性好, 稳定性强, 准确度高。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 《中国药典》. 2005 年版. 二部 [S]. 2005: 104.

牛黄清宫丸质量标准的研究

李方¹, 张清波¹, 曹阳² (1. 黑龙江省药品检验所, 哈尔滨 150001; 2. 大庆市药品检验所, 大庆 163316)

摘要 目的: 建立牛黄清宫丸质量标准。方法: 采用 TLC 法对方中大黄、栀子、金银花进行了定性鉴别, 并用 HPLC 法对方中黄芩进行了含量测定, 采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱, 以甲醇-水-磷酸(46: 54: 0.2) 为流动相, 流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长为 280 nm。结果: 薄层色谱斑点清晰, 易于识别, 专属性强; 黄芩苷线性范围为 $0.1175 \sim 1.175 \mu\text{g}$ ($r = 1.0000$), 平均加样回收率为 99.5%, RSD 为 1.6%。结论: 本方法操作简便, 快速、准确、灵敏度高, 重复性好, 提高后的质量标准更有效的控制该制剂的质量。

关键词: 牛黄清宫丸; 薄层色谱; 黄芩苷; 高效液相色谱

中图分类号: R927 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-3656(2011) -2-131-5

Studies on Quality Standard of Niu Huang Qing Gong Pills

Li Fang¹, Zhang Qing-bo¹, Cao Yang² (1. Heilongjiang Provincial Institute for Drug Control Harbin 150001; 2. Daqing Institute for Drug Control, Daqing 163316)

Abstract Objective: To determine the quality standard of Niu Huang Qing Gong Pills. **Methods:** Radix Et Rhizoma Rhei, Fructus Gardeniae, Flos Lonicerae Japonicae in Niu Huang Qing Gong Pills were identified by TLC. The content of Baicalin was determined by HPLC. Using ODS column, Methanol-Water-Phosphoric acid (46: 54: 0.2) as the mobile phase at flow rate of $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, wavelength of the detection was 280 nm. **Results:** The qualitative identification with TLC were specific. The liner range of Baicalin was $0.1175 \sim 1.175 \mu\text{g}$ ($r = 1.0000$); the recovery was 99.5% (RSD = 1.6%). **Conclusion:** This method is simple, rapid, accurate,

作者简介: 李方, 女, 主任药师。学科及研究方向: 中药学。联系电话: 13895775667。

highly sensitive and well reproducible. This method can be used for the quality control of Niu Huang Qing Gong Pills.

Key Words: Niu Huang Qing Gong Pills; Quality control; TLC; Baicalin; HPLC

牛黄清宫丸由人工牛黄、麦冬、黄芩、大黄、栀子、金银花等十八味药组成的中药复方制剂,具有清热解毒,镇惊安神,止渴除烦。用于身热烦躁,昏迷不醒,舌赤唇干,谵语狂躁,头痛眩晕,惊悸不安,小儿急热惊风之功效。原标准收载于《卫生部药品标准》中药成方制剂第 6 册,仅收载显微鉴别^[1],为了更好地控制该制剂的质量,本研究增订了大黄、栀子、金银花的薄层色谱鉴别;同时采用高效液相色谱法测定处方中黄芩的黄芩苷含量,提高后的质量标准,薄层鉴别方法专属性强,含量测定方法操作简便、结果准确,适合作为法定质量标准。

1 仪器及试剂

高效液相色谱仪(紫外检测器,美国 Waters 公司);CAMAG PEPROSTAR 3 薄层色谱成像系统(瑞士卡马公司)。黄芩苷对照品(中国药品生物制品检定所提供,批号 110715-200514,供含量测定用);牛黄清宫丸样品(生产厂家 A 提供,批号 0812032、0812691;生产厂家 B 提供,批号 080101、080102、080103)。所用溶剂均为分析纯;流动相配制用色谱纯溶剂。

2 方法与结果

2.1 大黄 TLC 鉴别

取本品 3 g,剪碎,加硅藻土 2 g,研匀,加甲醇 20 mL,超声处理 20 min,滤过,取滤液 5 mL,蒸干,残渣加水 10 mL 使溶解,再加盐酸 1 mL,加热回流 30 min,立即冷却,用乙醚振摇提取 2 次,每次 20 mL,合并乙醚液,蒸干,残渣加三氯甲烷 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取大黄对照药材 0.1 g,同法制成对照药材溶液。再取大黄素对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 0.1 mg 的溶液,作为对照品溶液。另取缺大黄的阴性样品,同供试品溶液的制备方法制成阴性对照液。照薄层色谱法《中国药典》2005 年版一部附录 VI B) 试验,吸取上述三种溶液各 4 μ L,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上,以石油醚(30~60 $^{\circ}$ C)-甲酸乙酯-甲酸(15:5:1)的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光主斑点;在与对照品色谱相应的位置上,显相同的橙黄色荧光斑点,置氨蒸气中熏后,斑点变为红色,阴性无干扰(图 1,2)。

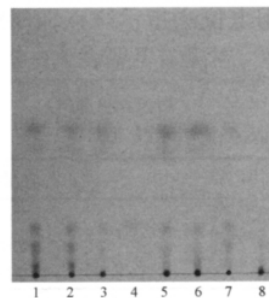


图 1 大黄薄层色谱图(日光)

1~3,5~6. 供试品;4. 大黄素对照品;7. 大黄对照药材;8. 阴性对照

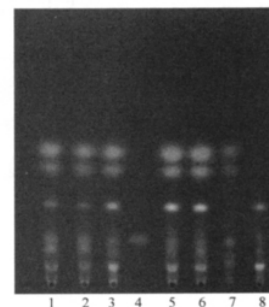


图 2 大黄薄层色谱图(UV365 nm)

1~3,5~6. 供试品;4. 大黄素对照品;7. 大黄对照药材;8. 阴性对照

2.2 栀子 TLC 鉴别

取本品 6 g,剪碎,加硅藻土 4 g,研匀,加石油醚(60~90 $^{\circ}$ C) 30 mL,加热回流 30 min,弃去石油醚液,药渣挥尽石油醚,加无水乙醇 30 mL,加热回流 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加无水乙醇 2 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取栀子苷对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液,作为对照品溶液。另取缺栀子的阴性样品,同供试品溶液的制备方法制成阴性对照液。照薄层色谱法《中国药典》2005 年版一部附录 VI B) 试验,吸取上述两种溶液各 10 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-甲醇(3:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以硫酸乙醇溶液(1 $\rightarrow$ 10),在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,阴性无干扰(图 3)。

2.3 金银花 TLC 鉴别

取本品 3 g,剪碎,加硅藻土 2 g,研匀,加甲醇 10 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液作为供试品溶液。另取绿原酸对照品,加甲醇制成每 1 mL 含

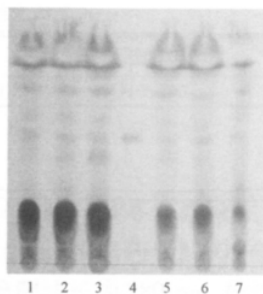


图3 栀子薄层色谱图

1~3, 5~6. 供试品; 4. 栀子苷对照品; 7. 阴性对照

0.5 mg 的溶液, 作为对照品溶液。另取缺金银花的阴性样品, 同供试品溶液的制备方法制成阴性对照液。照薄层色谱法《中国药典》2005 年版一部附录 VI B) 试验, 吸取供试品溶液 10 μL 、对照品溶液 5 μL , 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上, 以乙酸丁酯-甲酸-水 (7:2.5:2.5) 的上层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯 (365 nm) 下检视。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点, 阴性无干扰 (图 4)。

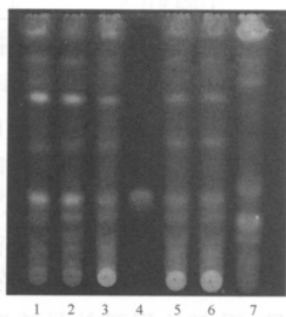


图4 金银花薄层色谱图 (UV365 nm)

1~3, 5~6. 供试品; 4. 绿原酸对照品; 7. 阴性对照

2.4 含量测定

2.4.1 对照品溶液的制备 精密称取减压干燥 12 h 的黄芩苷对照品适量, 加 50% 甲醇制成每 1 mL 含

60 μg 的溶液。

2.4.2 供试品溶液的制备 取重量差异项下的本品适量, 剪碎, 混匀, 精密称定, 精密加入等量硅藻土, 研匀。取约 2 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 50 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定重量, 用 50% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液。

2.4.3 阴性对照液的制备 取缺黄芩样品, 称取相当于供试品的量, 按供试品溶液的制备方法制成阴性对照液。

2.4.4 色谱条件 Diamonsil C_{18} 色谱柱 (4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μm); 以甲醇为流动相 A, 以甲醇-水-磷酸 (46:54:0.2) 为流动相 B, 按下表中的规定进行梯度洗脱; 检测波长为 280 nm; 进样量: 10 μL ; 流速 1 mL $\cdot$ min $^{-1}$ 。在上述色谱条件下, 样品中黄芩苷与其他组分分离较好, 见图 5~7。

表1 梯度洗脱条件

时间/min	流动相 A	流动相 B
0~18	0	100
18.01~28	100	0
28.01~40	0	100

2.4.5 线性关系考察 分别精密称取减压干燥 12 h 以上的黄芩苷对照品 11.75 mg, 置 100 mL 量瓶中, 用 50% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀。精密吸取 5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。分别精密吸取上述溶液 2.5、10、15、20 μL , 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 以浓度对峰面积求回归, 结果见表 2。

回归方程为: $y = 3\,542\,115.654x - 34\,315.854$, 线性范围为 0.117 5~1.175 μg , 相关系数 $r = 1.000\,0$ 。

2.4.6 精密度试验 取 0.058 75 mg $\cdot$ mL $^{-1}$ 的黄芩苷对照品溶液, 精密吸取 10 μL 进样, 连续测定 5 次, 以峰面积积分值计算, RSD = 0.2%。

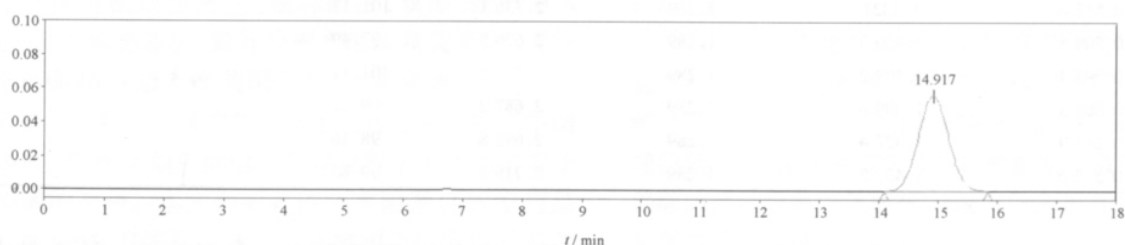


图5 对照品溶液 HPLC 色谱图

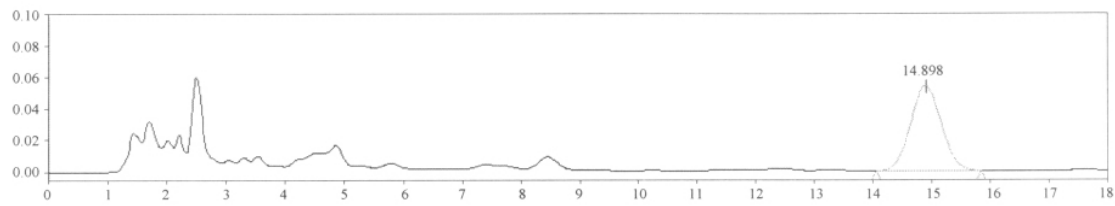


图 6 供试品溶液色谱图

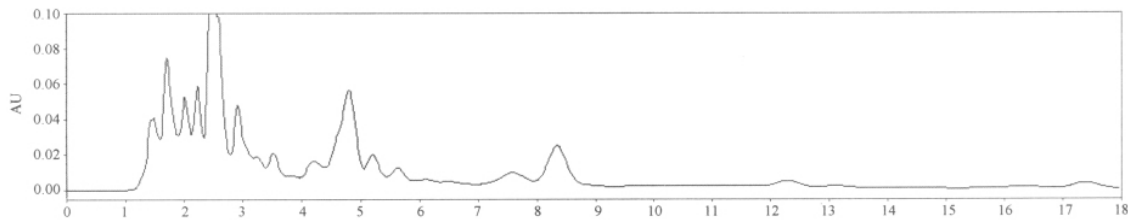


图 7 阴性对照色谱图

表 1 标准曲线测定结果

进样量/ μg	0.117 5	0.293 75	0.587 50	0.881 25	1.175 0
积分面积	395 378.5	996 806.0	2 037 566	3 084 931.5	4 134 899.0

2.4.7 稳定性试验 取批号为 8012691 供试品溶液,按含量测定方法,分别在 0、1、2、3、4、5、6、7、8、24 h 进行测定,结果表明:供试品溶液 24 h 内基本稳定。所得黄芩苷的峰面积 RSD 为 1.5% ($n=10$)。

2.4.8 重复性试验 取同一批号样品(批号为 8012691) 6 份,按供试品溶液制备方法制备,分别测定,以供试品含量计算, $RDS=1.0\%$,证明此方法重现性良好。

2.4.9 回收率试验 取已知含量的同一批号(批号为 8012691,含量 $2.788\,49\,\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) 的样品 6 份,精密称定,加入等量硅藻土,然后精密加入 $0.051\,56\,\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的黄芩苷对照品溶液 25 mL,放置 2 h 后,研匀,精密加入 50% 甲醇溶液 25 mL, 密塞,称定重量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz) 30 min,放冷,再称定重量,用 50% 甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液。即为加样回收溶液,分别测定,计算回收率。结果见表 2。

表 2 回收率试验结果

供试品取样量 /g	供试品含量 /mg	加入对照品量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.513 6	1.4321	1.289	2.736 1	101.17	99.5	1.6
0.509 3	1.420 2	1.289	2.676 8	97.49		
0.505 4	1.409 2	1.289	2.713 2	101.17		
0.505 5	1.409 6	1.289	2.687 2	99.11		
0.511 9	1.427 4	1.289	2.692 8	98.16		
0.513 6	1.432 2	1.289	2.719 2	99.85		

表 2 结果显示,该方法回收率良好。

2.4.10 样品含量测定 按规定方法制备 5 批样

品溶液及对照品溶液,分别测定,测定结果见表 3。

表 3 样品的测定结果

批号	0812032	0812691	080101	080102	080103
含量(mg/丸)	7.796	6.079	6.178	6.335	6.405

3 讨论

3.1 通过紫外扫描,黄芩苷溶液在 277 nm 波长处有最大吸收,参照《中国药典》2005 年版一部黄芩含量测定项下检测波长为 280 nm,最终确定检测波长为 280 nm。

3.2 采用二极管阵列检测器对被测成份黄芩苷的纯度进行验证,结果与对照品光谱图基本一致,说明被测峰基本为单一物质。

3.3 甲醇提取时间考察:取本品适量,剪碎,加等量硅藻土,研匀,精密称取样品 2 g,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,密塞,称定重量,超声提取 20、30、40 min,放冷,照质量标准含量测定项下供试品溶液的制备方法制备,考察甲醇提取时间对测定结果的影响。结果以甲醇超声提取 30 min,即可将样

品中黄芩苷提取完全。

3.4 在本实验的研究中,供试品溶液在黄芩苷出峰后,由于其所含其他成分较多,故实际试验中已采用梯度洗脱,冲出其他成分的峰,以防止与下一针的色谱峰重叠。

在日常分析检验中,类似的情况经常发生,由于实验中所用色谱柱的种类不同,杂质峰的出峰时间也不同,故梯度洗脱条件中时间一项可以做相应的调整。

参考文献

- [1] 《卫生部药品标准》. 中药成方制剂 [S]. 第六册.
- [2] 国家药典委员会.《中国药典》. 2005 年版. 一部 [S]. 2005: 附录 114.

蛋白质含量测定方法的规范化研究

邵泓,吕晶,陈钢(上海市食品药品检验所,上海 201203)

中图分类号:R927 文献标识码:A 文章编号:1009-3656(2011)-2-135-4

Study on Standardization of Protein Assay

Shao Hong, Lv Jing, Chen Gang(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203)

组成蛋白质的基本单位是氨基酸,氨基酸通过脱水缩合形成肽链。蛋白质是由一条或多条多肽链组成的生物大分子,其含量测定是生化药品研究中最常用、最基本的分析方法之一。目前其常用的测定方法有凯氏定氮法、福林酚法、双缩脲法、BCA 法、考马斯亮蓝法、紫外分光光度法及荧光法。《欧洲药典》6.0 版^[1]、《英国药典》2009 年版^[2]与《美国药典》32 版^[3]附录中均收载了上述七种方法,《中国药典》2005 年版三部附录^[4]仅收载了上述测定方法中的前三种。本文参照各国药典附录、《国家药品标准》地标升国标^[5]各相关品种项下的方法及有关

文献,综合考察各方法的可操作性,对蛋白质含量测定方法进行了规范化研究并拟定了六种含量测定方法,增订于《中国药典》2010 年版二部附录中。

1 凯氏定氮法

1.1 方法

本法系依据蛋白质为含氮的有机化合物,当与硫酸和硫酸铜、硫酸钾一同加热消化时使蛋白质分解,分解的氮与硫酸结合生成硫酸铵。然后碱化蒸馏使氮游离,用硼酸液吸收后以硫酸滴定液滴定,根据酸的消耗量乘以氮转化为蛋白质的换算系数,即为蛋白质的含量。

作者简介:邵泓,女,副主任药师。学科及研究方向:药物分析。联系电话:13917956617。