

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810097488.9

[51] Int. Cl.

A61K 36/56 (2006.01)

A61P 19/08 (2006.01)

G01N 30/26 (2006.01)

G01N 30/90 (2006.01)

G01N 27/447 (2006.01)

A61K 31/045 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 10 月 8 日

[11] 公开号 CN 101278976A

[51] Int. Cl. (续)

A61K 33/26 (2006.01)

A61K 33/28 (2006.01)

A61K 35/32 (2006.01)

A61K 35/56 (2006.01)

A61K 35/64 (2006.01)

[22] 申请日 2008.5.30

[21] 申请号 200810097488.9

[71] 申请人 大连美罗中药厂有限公司

地址 116023 辽宁省大连市高新园区敬贤街
18 号

[72] 发明人 张成海 罗国良 周文波 陈 心
李晓艳 李延成 姜 伟

权利要求书 7 页 说明书 21 页 附图 2 页

[54] 发明名称

一种伤科接骨药物的质量控制方法

[57] 摘要

本发明公开了一种伤科接骨药物的质量控制方法。该方法用薄层色谱法对三七、冰片、红花、马钱子粉进行定性鉴别，用电泳法对海星进行定性鉴别，并分别用高效液相色谱法和气相色谱法对土的宁和冰片进行定量检测，用化学滴定法对硫化汞进行定量检测，扩大了该伤科接骨药物的质量控制范围。本发明质量控制方法简单易行，具有较强的专属性，定量检测方法精密度高、重现性好，确保了该复方药物质量的“均一、稳定、有效、可控”。

1、一种伤科接骨药物的质量控制方法，所述伤科接骨药物是由红花、土鳖虫、朱砂、马钱子粉、炙没药、三七、炙海星、炙鸡骨、冰片、煅自然铜、炙乳香、甜瓜子十二味药组成，其特征在于包括如下鉴别方法中的一种或几种：性状鉴别、显微鉴别、薄层色谱鉴别、电泳鉴别；对本发明药物的一种或几种成分进行含量测定，其方法包括气相色谱、高效液相色谱及化学滴定。

2、根据权利要求 1 所述的质量控制方法，所述药物的制剂为胶囊剂、片剂和丸剂。

3、根据要求 2 所述的质量控制方法，所述性状鉴别和显微鉴别包括如下内容：

性状鉴别：所述伤科接骨药物为片剂时，其片芯为灰褐色至棕褐色；味苦，腥；所述伤科接骨药物为胶囊剂时，其内容物为浅褐色至褐色；味苦，腥；所述伤科接骨药物为丸剂时，丸芯为浅褐色至褐色；味苦，腥；

显微鉴别：取本发明药物，置显微镜下观察：花粉粒类圆形或椭圆形，直径 $43-66\mu\text{m}$ ，外壁有齿状突起，具有 3 个萌发孔；树脂道碎片含棕黄色分泌物；体壁碎片棕色或棕红色，有圆形毛窝，直径 $8-24\mu\text{m}$ ，有的具长短不一的刚毛；不规则细小颗粒暗红棕色，有光泽，边缘暗黑色；非腺毛单细胞，多碎断，壁极厚，木化，基部膨大似石细胞；不规则形碎片，无色，有光泽，完整者表面有圆形窝孔，多数碎块边缘呈半圆环状，有突起；

或者，取本发明药物，置显微镜下观察：树脂道碎片含棕黄色分泌物；体壁碎片棕色或棕红色，有圆形毛窝，直径 $8-24\mu\text{m}$ ，有的具长短不一的刚毛；不规则细小颗粒暗红棕色，有光泽，边缘暗黑色；非腺毛单细胞，多碎断，壁极厚，木化，基部膨大似石细胞；不规则形碎片，无色，有光泽，完整者表面有圆形窝孔，多数碎块边缘呈半圆环状，有突起。

4、根据权利要求 3 所述的质量控制方法，其特征在于还包括对本发明药物中

三七、红花、冰片和/或马钱子粉的薄层色谱鉴别。

5、 根据权利要求 4 所述的质量控制方法，其特征在于薄层色谱鉴别包括如下内容：

其中对三七的鉴别是采用三七对照药材作为阳性对照；

和对红花的鉴别是采用红花对照药材作为阳性对照；

和对冰片的鉴别是采用冰片对照品作为阳性对照；

和/或对马钱子粉的鉴别是采用土的宁和马钱子碱对照品作为阳性对照。

6、 根据权利要求 5 所述的质量控制方法，其特征在于薄层色谱鉴别方法包括如下步骤：

三七的鉴别：取本发明药物粉末 1.5-3.0g，加甲醇 10ml，超声处理 10-30 分钟，滤过，滤液作为供试品溶液；另取三七对照药材粉末 1g，同法制成对照药材溶液；照中国药典 2005 版一部附录 VI B 中薄层色谱法试验，吸取上述两种溶液各 4-8 μ l，分别点于同一以羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 G 薄层板上，以 4-6：2-4：1-2：1-2 的乙酸乙酯-丁酮-甲酸-水为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 1% 香草醛硫酸溶液，在 95-110℃加热至斑点显色清晰；供试品色谱中，在与对照药材色谱相应的位置上，显相同颜色的斑点；

红花的鉴别：取本发明药物粉末 3.0-5.0g，加 80% 丙酮溶液 10ml，密塞，超声处理 15 分钟，滤过，滤液作为供试品溶液；另取红花对照药材 0.5g，同法制成对照药材溶液；照中国药典 2005 版一部附录 VI B 中薄层色谱法试验，吸取上述两种溶液各 10 μ l，分别点于同一以羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 H 薄层板上，以 7：2：3：0.4 的乙酸乙酯-甲酸-水-甲醇为展开剂，展开，取出，晾干；供试品色谱中，在与对照药材相应的位置上，显相同颜色的斑点；

冰片的鉴别：取本发明药物粉末 2.0-4.0g，加三氯甲烷 15ml，振摇，浸渍 2 小时，滤过，滤液作为供试品溶液；另取冰片对照品，加三氯甲烷每 1ml 约含 2mg 的溶液，作为对照品溶液；照中国药典 2005 版一部附录 VI B 中薄层色谱法试验，吸取上述两种溶液各 3 μ l，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以 9:1 的苯-丙酮为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 5% 香草醛硫酸溶液，在 105℃ 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；

或者，取本发明药物粉末 2.0-4.0g，加三氯甲烷 15ml，振摇，超声处理 15-30 分钟，滤过，滤液作为供试品溶液；另取冰片对照品，加无水乙醇制成每 1ml 约含 1mg 的溶液，作为对照品溶液；照中国药典 2005 版一部附录 VI B 中薄层色谱法试验，吸取供试品溶液 4-8 μ l，对照品溶液 2 μ l，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以 15-20: 2-5 的环己烷-乙酸乙酯为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 5% 香草醛硫酸溶液，在 95-110℃ 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；

马钱子粉的鉴别：取本发明药物粉末 3.0-5.0g，加 9-11: 1 的三氯甲烷-乙醇混合液 15ml 与浓氨水试液 1.5ml，密塞，超声处理 10-30 分钟，滤过，滤液作为供试品溶液；另取土的宁和马钱子碱对照品，加三氯甲烷制成每 1ml 各含 2mg 的混合溶液，作为对照品溶液；照中国药典 2005 版一部附录 VI B 中薄层色谱法试验，吸取上述供试品溶液 10-20 μ l、对照品溶液 3-7 μ l，分别点于同一以羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 G 薄层板上，以 3-5: 4-6: 0.5-0.7: 0.3-0.5 的甲苯-丙酮-乙醇-浓氨试液为展开剂，展开，取出，晾干，喷以稀碘化铋钾试液；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。

7、 根据权利要求 6 所述的质量控制方法，其特征在于对三七、冰片和马钱子

粉的鉴别方法包括如下步骤:

三七的鉴别: 取本发明药物粉末 2.0g, 加甲醇 10ml, 超声处理 20 分钟, 滤过, 滤液作为供试品溶液; 另取三七对照药材粉末 1g, 同法制成对照药材溶液; 照中国药典 2005 版一部附录 VI B 中薄层色谱法试验, 吸取上述两种溶液各 5 μ l, 分别点于以同一羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 G 薄层板上, 以 5: 3: 1: 1 的乙酸乙酯-丁酮-甲酸-水为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 1% 香草醛硫酸溶液, 在 105℃ 加热至斑点显色清晰; 供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点;

冰片的鉴别 取本发明药物粉末 3.0g, 加三氯甲烷 15ml, 振摇, 超声处理 20 分钟, 滤过, 滤液作为供试品溶液; 另取冰片对照品, 加无水乙醇制成每 1ml 约含 1mg 的溶液, 作为对照品溶液; 照中国药典 2005 版一部附录 VI B 中薄层色谱法试验, 吸取供试品溶液 5 μ l, 对照品溶液 2 μ l, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以 17: 3 的环己烷-乙酸乙酯为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 5% 香草醛硫酸溶液, 在 105℃ 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;

马钱子粉的鉴别: 取本发明药物粉末 4.0g, 加 10: 1 的三氯甲烷-乙醇混合液 15ml 与浓氨水试液 1.5ml, 密塞, 超声处理 20 分钟, 滤过, 滤液作为供试品溶液; 另取土的宁和马钱子碱对照品, 加三氯甲烷制成每 1ml 各含 2mg 的混合溶液, 作为对照品溶液; 照中国药典 2005 版一部附录 VI B 中薄层色谱法试验, 吸取上述供试品溶液 15 μ l、对照品溶液 5 μ l, 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 G 薄层板上, 以 4: 5: 0.6: 0.4 的甲苯-丙酮-乙醇-浓氨水为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以稀碘化铋钾试液; 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。

8、 根据权利要求 4 所述的质量控制方法，还包括对海星进行电泳鉴别。

9、 根据权利要求 8 所述的质量控制方法，其特征在于对海星电泳鉴别包括如下步骤：

提取方法：取本发明药物粉末 1.5-3.0 g 和海星对照药材 0.2-1.0g，分别加入 6 ml 热水，盖上保鲜膜，100℃煮 20-40 min，放冷后 4000 rpm 离心 20 分钟，取上清液各 5-15 μ l；照电泳法（中国药典 2005 版三部，附录 IV C）试验，按下述电泳条件进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，即得；供试品与对照药材在相应的位置上显相同的蛋白条带；

其中所述的电泳条件：分离胶：9-14%；浓缩胶：4-6%；恒电流：30 mA；电压：200 V；电泳时间：2-3 小时；用考马斯亮蓝 R250 染色 3-5h，摇床脱色。

10、 根据权利要求 9 所述的质量控制方法，其特征在于对海星电泳鉴别包括如下步骤：

提取方法：取本发明药物粉末 2.0g 和海星对照药材 0.5g，分别加入 6 ml 热水，盖上保鲜膜，100℃煮 30 min，放冷后 4000 rpm 离心 20 分钟，取上清液 10 μ l；照电泳法（中国药典 2005 版三部，附录 IV C）试验，按下述电泳条件进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，即得；供试品与对照药材在相应的位置上显相同的蛋白条带；

其中所述的电泳条件：分离胶：12.5%；浓缩胶：5%；恒电流：30 mA；电压：200 V；电泳时间：2 小时；用考马斯亮蓝 R250 染色 4h，摇床脱色。

11、 根据权利要求 4 和 8 所述的质量控制方法，其特征在于还包括如下马钱子粉和/或朱砂和/或冰片中主要成分的含量测定方法：

1) 马钱子粉中土的宁的含量测定：

色谱条件与系统适用性试验 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以 21: 79

的乙腈-0.01mol/L庚烷磺酸钠与0.02mol/L磷酸二氢钾等量混合溶液为流动相，检测波长为260nm，理论板数按土的宁峰计算应不低于5000；

对照品溶液的制备 精密称取土的宁对照品10mg，置25ml量瓶中，加三氯甲烷适量使溶解并稀释至刻度，摇匀；精密量取1ml，置25ml量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，即得，每1ml含土的宁16 μ g；

供试品溶液的制备 取本发明药物粉末0.5-1.5g，精密称定，置具塞锥形瓶中，加氢氧化钠试液3ml，混匀，放置30分钟，精密加三氯甲烷20ml，密塞，称定重量，置水浴中回流提取2小时，放冷，再称定重量，用三氯甲烷补足减失的重量，摇匀，分取三氯甲烷提取液，用铺有少量硫酸钠的滤纸滤过，弃去初滤液，精密量取5ml，置10ml量瓶中，用甲醇稀释至刻度；

测定法 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各10 μ l，注入液相色谱仪，测定，即得；

2) 朱砂中硫化汞的含量测定

取本发明药物粉末2.0-3.0g，精密称定，置250ml烧瓶中，加硫酸20ml与硝酸钾2.5g，加热使呈黄白色，放冷，加水50ml，滴加1%高锰酸钾溶液至显粉红色，超声处理5分钟，若粉红色消失，继续滴加高锰酸钾溶液显粉红色至2分钟不消失，再滴加2%硫酸亚铁溶液至红色消失，加硫酸铁铵指示液2ml，用0.1mol/L硫氰酸铵滴定液滴定，即得；

3) 冰片的含量测定

色谱条件与系统适用性试验 聚乙二醇(PEG)-20M毛细管柱(柱长30m，内径0.32mm，膜厚度0.5 μ m)，柱温140 $^{\circ}$ C。理论板数按龙脑峰计算应不低于8000；

校正因子测定 取水杨酸甲酯适量，精密称定，加乙醇制成每1ml含0.25

mg 的溶液，作为内标溶液；另取冰片对照品 15 mg，精密称定，置 50 ml 量瓶中，加内标溶液溶解并稀释至刻度，摇匀，吸取 0.5 μ l，注入气相色谱仪，测定，计算校正因子；

测定法 取本发明药物粉末 0.5-2.0g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入内标溶液 10 ml，混匀，密塞，称定重量，超声处理 10-30 分钟，放至室温，再称定重量，用内标溶液补足减失的重量，摇匀，离心 10-30 分钟，吸取上清液 0.5 μ l，注入气相色谱仪，测定，以龙脑、异龙脑峰面积之和计算，即得。

12、 根据权利要求 11 所述的质量控制方法，其特征在于每单位制剂含马钱子粉以土的宁 ($C_{21}H_{22}N_2O_2$) 计，应为 0.10-0.20mg，含朱砂以硫化汞 (HgS) 计，应为 7.00-12.00 mg；含冰片 ($C_{10}H_{18}O$) 应不少于 0.60 mg。

一种伤科接骨药物的质量控制方法

技术领域

本发明涉及一种中药制剂的质量控制方法，具体涉及中药伤科接骨药物的质量控制方法。

背景技术

药品应具有安全性、有效性、稳定性及可控性。完善的质量控制标准能够保证药品质量的可靠性和均一性。本发明药物由红花、土鳖虫、朱砂、马钱子粉、炙没药、三七、炙海星、炙鸡骨、冰片、煅自然铜、炙乳香、甜瓜子十二味药组成，具有活血化瘀、消肿止痛、舒筋壮骨功效。用于跌打损伤，闪腰岔气，伤筋动骨，瘀血肿痛，损伤红肿等症，具有较好的治疗效果。

在公开号为 CN1709463A 的中国专利申请文件中公开了一种伤科接骨药物，由上述十二味药组成，但没有公开其质量控制方法。在公开号为 CN1806820A 的中国专利申请文件中也公开了一种伤科接骨药物，也是由上述十二味药组成，并公开了其质量控制方法。该质量控制方法中除了具有显微鉴别项外，还增加了三七药材中人参皂苷 Rg1、三七皂苷 R1 和乳香药材的薄层色谱鉴别及马钱子中土的宁和朱砂中硫化汞的含量测定。但该质量控制方法中存在一些不足，如：

(1) 在三七薄层色谱鉴别中，样品取样量大；且采用人参皂苷 Rg1、三七皂苷 R1 作为三七药材薄层鉴别的对照品，按照其公开的方法实验，结果：三七阴性对照溶液的色谱中，在与人参皂苷 Rg1 对应的位置上存在干扰；且样品色谱中，在与三七皂苷 R1 对应的位置上，存在未分开的多个斑点，无法判定是否有对应斑点，故不适宜用于三七的定性鉴别，见附图 2；(2) 乳香为进口药材，不同品

种的乳香成份是有差异的，故所对应的鉴别方法也不相同，从而对该药味在制剂中的鉴别方法也不应相同。根据该公开文件中所公开的内容无法确定对照药材所使用的乳香品种，所以无法选用相应的对照药材进行鉴别试验。另外，该方法中样品的提取是采用乙醚超声处理 20 分钟，污染太大，无法操作（因乙醚沸点低易挥发）；（3）马钱子中土的宁含量测定方法设计有缺陷，如：对照品取量不合适，远超出其所制定的样品含量上限，会增加测定误差；样品前处理后，残渣用流动相无法完全溶解，故不能定量转移进行含量测定；（4）朱砂中硫化汞含量测定方法存在检出灵敏度低，检验周期长，样品化学反应不完全，易造成检验误差等缺陷，如①样品取样量 10g，硫酸仅用了 50ml，中药粉末具有质轻体积大的特点，样品取样量偏大，浸润不完全，会导致测定结果偏低；②该方法中采用凯氏烧瓶作为容器，并且自始至终未转移至其它合适的容器，该容器不适合化学滴定操作；③按其检验方法“加硫酸 50ml 与硝酸钾 5g，加热使溶解……”，实际无法达到所述的溶解状态，不具备可操作性。因而无法保证含量测定的准确性。众所周知，马钱子和朱砂均具有毒性，因此精确控制二者的用量极其重要。

发明内容

本发明在公开号为 CN1709463A 的中国专利申请文件药物制剂的基础上，提供了上述发明药物的质量控制方法，通过此方法可以控制该发明药物及含相同组分伤科接骨药物的质量。

本发明所述的伤科接骨药物的中药原料药是由红花、土鳖虫、朱砂、马钱子粉、炙没药、三七、炙海星、炙鸡骨、冰片、煅自然铜、炙乳香、甜瓜子十二味药组成，其制剂可为胶囊剂、片剂或丸剂等。该药物的中药原料药的重量份配比为：

红花	4-15 份	土鳖虫	13-50 份	朱砂	3-15 份
马钱子粉	6-30 份	炙没药	1-6 份	三七	26-100 份
炙海星	13-30 份	炙鸡骨	13-60 份	冰片	0.5-3 份
煅自然铜	6-30 份	炙乳香	1-5 份	甜瓜子	1-5 份

优选的，各原料药的重量配比：

红花	4-9 份	土鳖虫	13-30 份	朱砂	3-7.5 份
马钱子粉	6-15 份	炙没药	1-3 份	三七	26-60 份
炙海星	13-30 份	炙鸡骨	13-30 份	冰片	0.5-1.5 份
煅自然铜	6-15 份	炙乳香	1-3 份	甜瓜子	1-3 份

比较优选的，各原料药的重量配比：

红花	12 份	土鳖虫	40 份	朱砂	10 份
马钱子粉	20 份	炙没药	4 份	三七	80 份
炙海星	20 份	炙鸡骨	40 份	冰片	2 份
煅自然铜	20 份	炙乳香	4 份	甜瓜子	4 份

更优选的，各原料药的重量配比：

红花	6 份	土鳖虫	20 份	朱砂	5 份
马钱子粉	10 份	炙没药	2 份	三七	40 份
炙海星	20 份	炙鸡骨	20 份	冰片	1 份
煅自然铜	10 份	炙乳香	2 份	甜瓜子	2 份

以上组成是按照重量份作为配比的，在生产时可按照相应比例增大或减少，如大规模生产时可以有公斤为单位，或以吨为单位。

本发明药物可通过文献公开的方法制得，也可采用以下方法得到，如将上述配方的原料经过提取或其他加工方式加工，制成药物活性物质，随后，以该物

质为原料，需要时加入药物可接受的载体，按照制剂学的常规技术制成胶囊、片剂、口服液、颗粒剂、丸剂等。所述的活性物质可以通过选自以下方法得到，如：粉碎、压榨、煅烧、研磨、过筛、渗漉、萃取、水提、醇提、酮提、层析等方法得到，这些活性物质可以是浸膏形式的物质，也可以是干浸膏或者流浸膏，还可以是高纯度提取物，根据制剂的不同需要决定制成不同的浓度。

优选的，本发明药物的制备方法，包括如下步骤：

- (1) 称取所述重量配比的原料药备用；
- (2) 将除朱砂和冰片外的原料药粉碎，过 100-250 目筛；
- (3) 将朱砂制成朱砂极细粉，将冰片研细，都兑入过筛后的上述原料药药粉中混合均匀，即制得本发明药物。

优选的，本发明药物的另一制备方法，包括如下步骤：

- (1) 称取所述重量配比的原料药备用；
- (2) 将除红花、朱砂和冰片外的原料药粉碎，过 100-250 目筛；
- (3) 将红花加 6-10 倍水煎煮两次，每次 1-2 小时，合并煎液，过滤，将滤液浓缩至相对密度为 1.05-1.35 (40-85℃) 的浸膏；
- (4) 将上述浸膏及步骤 (2) 所制得的药粉混合，干燥成细粉；
- (5) 将朱砂制成朱砂极细粉，将冰片研细，然后都兑入步骤 (4) 所制得的细粉中，混合均匀，即制得本发明药物。

优选胶囊剂的制备方法：以上十二味药，除朱砂、冰片外，其余红花等十味粉碎，过筛成细粉；朱砂水飞成极细粉，兑入过筛后的细粉中，过筛，混匀；冰片研细，与上述粉末配研，混匀，装入胶囊，即得。

本发明所述可接受的载体包括淀粉、蔗糖、乳糖、糖粉、葡萄糖、甘露醇、木糖醇、聚乙二醇、异丙醇、土温-80、甘油、丙二醇、微晶纤维素钠、糊精、

环糊精、氯化钠、维生素 C、半胱氨酸、柠檬酸、硫代硫酸钠、亚硫酸钠、硬脂酸盐和明胶等常规辅料，制剂的后期制备工艺均属制药领域的常规技术，本发明对此不作限定，故在此不予详述。

为了有效控制所述的伤科接骨药物的质量，本发明人制定了如下所述质量控制方法的技术方案。所述的质量控制方法适用于本发明十二味药组成的组合物，也适用于包括各种制剂辅料在内的药物制剂，具体可包括胶囊剂、片剂和丸剂等。该质量控制方法的特征在于包括如下鉴别方法中的一种、至少两种、至少三种：性状鉴别、显微鉴别、薄层色谱鉴别、电泳鉴别；对本发明药物的一种或几种成分进行含量测定，其方法包括气相色谱、高效液相色谱及化学滴定。

其中所述性状鉴别包括如下内容：

性状鉴别：所述伤科接骨药物为片剂时，其片芯为灰褐色至棕褐色；味苦，腥；所述伤科接骨药物为胶囊剂时，其内容物为浅褐色至褐色；味苦，腥；所述伤科接骨药物为丸剂时，其丸芯为浅褐色至褐色；味苦，腥。

显微鉴别：取本发明药物，置显微镜下观察：花粉粒类圆形或椭圆形，直径 43-66 μm ，外壁有齿状突起，具有 3 个萌发孔；树脂道碎片含棕黄色分泌物；体壁碎片棕色或棕红色，有圆形毛窝，直径 8-24 μm ，有的具长短不一的刚毛；不规则细小颗粒暗红棕色，有光泽，边缘暗黑色。非腺毛单细胞，多碎断，壁极厚，木化，基部膨大似石细胞；不规则形碎片，无色，有光泽，完整者表面有圆形窝孔，多数碎块边缘呈半圆环状，有突起；

或者，取本发明药物，置显微镜下观察：树脂道碎片含棕黄色分泌物；体壁碎片棕色或棕红色，有圆形毛窝，直径 8-24 μm ，有的具长短不一的刚毛；不规则细小颗粒暗红棕色，有光泽，边缘暗黑色。非腺毛单细胞，多碎断，壁极厚，木化，基部膨大似石细胞；不规则形碎片，无色，有光泽，完整者表面有圆形

窝孔，多数碎块边缘呈半圆环状，有突起。

本发明所述的质量控制方法，其特征在于还包括对药物中三七、红花、冰片和/或马钱子粉的薄层色谱鉴别，包括如下内容，

其中对三七的鉴别是采用三七对照药材作为阳性对照；

对红花的鉴别是采用红花对照药材作为阳性对照；

对冰片的鉴别是采用冰片对照品作为阳性对照；

对马钱子粉的鉴别是采用土的宁和马钱子碱对照品作为阳性对照。

具体薄层色谱鉴别方法包括如下步骤：

三七的鉴别：取本发明药物粉末 1.5-3.0g，加甲醇 10ml，超声处理 10-30 分钟（160w、50kHz），滤过，滤液作为供试品溶液；另取三七对照药材粉末 1g，同法制成对照药材溶液；照薄层色谱法（中国药典 2005 版一部，附录 VI B）试验，吸取上述两种溶液各 4-8 μ l，分别点于同一以羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 G 薄层板上，以 4-6：2-4：1-2：1-2 的乙酸乙酯-丁酮-甲酸-水为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 1% 香草醛硫酸溶液，在 95℃-110℃ 加热至斑点显色清晰；供试品色谱中，在与对照药材色谱相应的位置上，显相同颜色的斑点；

优选的三七的鉴别：取本发明药物粉末 2.0g，加甲醇 10ml，超声处理 20 分钟（160w、50kHz），滤过，滤液作为供试品溶液；另取三七对照药材粉末 1g，同法制成对照药材溶液；照薄层色谱法（中国药典 2005 版一部，附录 VI B）试验，吸取上述两种溶液各 5 μ l，分别点于同一以羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 G 薄层板上，以 5：3：1：1 的乙酸乙酯-丁酮-甲酸-水为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 1% 香草醛硫酸溶液，在 105℃ 加热至斑点显色清晰；供试品色谱中，在与对照药材色谱相应的位置上，显相同颜色的斑点；

红花的鉴别：取本发明药物粉末 3.0-5.0g，加 80% 丙酮溶液 10ml，密塞，超声处理 15 分钟（160w、50kHz），滤过，滤液作为供试品溶液；另取红花对照药材 0.5g，同法制成对照药材溶液；照薄层色谱法（中国药典 2005 版一部，附录 VI B）试验，吸取上述两种溶液各 10 μ l，分别点于同一以羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 H 薄层板上，以 7: 2: 3: 0.4 的乙酸乙酯-甲酸-水-甲醇为展开剂，展开，取出，晾干；供试品色谱中，在与对照药材相应的位置上，显相同颜色的斑点；

优选的红花鉴别：取本发明药物粉末 4.0g，加 80% 丙酮溶液 10ml，密塞，超声处理 15 分钟（160w、50kHz），滤过，滤液作为供试品溶液；另取红花对照药材 0.5g，同法制成对照药材溶液；照薄层色谱法（中国药典 2005 版一部，附录 VI B）试验，吸取上述两种溶液各 10 μ l，分别点于同一以羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 H 薄层板上，以 7: 2: 3: 0.4 的乙酸乙酯-甲酸-水-甲醇为展开剂，展开，取出，晾干；供试品色谱中，在与对照药材相应的位置上，显相同颜色的斑点；

冰片的鉴别：取本发明药物粉末 2.0-4.0g，加三氯甲烷 15ml，振摇，浸渍 2 小时，滤过，滤液作为供试品溶液；另取冰片对照品，加三氯甲烷每 1ml 约含 2mg 的溶液，作为对照品溶液；照薄层色谱法（中国药典 2005 版一部，附录 VI B）试验，吸取上述两种溶液各 3 μ l，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以 9: 1 的苯-丙酮为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 5% 香草醛硫酸溶液，在 105℃ 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；

或者，取本发明药物粉末 2.0-4.0g，加三氯甲烷 15ml，振摇，超声处理 15-30 分钟，滤过，滤液作为供试品溶液；另取冰片对照品，加无水乙醇制成每 1ml

约含 1mg 的溶液，作为对照品溶液；照薄层色谱法（中国药典 2005 版一部，附录 VI B）试验，吸取供试品溶液 4-8 μ l，对照品溶液 2 μ l，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以 15-20: 2-5 的环己烷-乙酸乙酯为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 5% 香草醛硫酸溶液，在 95-110℃ 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；

优选的冰片的鉴别 取本发明药物粉末 3.0g，加三氯甲烷 15ml，振摇，超声处理 20 分钟，滤过，滤液作为供试品溶液；另取冰片对照品，加无水乙醇制成每 1ml 约含 1mg 的溶液，作为对照品溶液；照薄层色谱法（中国药典 2005 版一部，附录 VI B）试验，吸取供试品溶液 5 μ l，对照品溶液 2 μ l，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以 17: 3 的环己烷-乙酸乙酯为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 5% 香草醛硫酸溶液，在 105℃ 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；

马钱子粉的鉴别：取本发明药物粉末 3.0-5.0g，加 9-11: 1 的三氯甲烷-乙醇混合液 15ml 与浓氨水试液 1.5ml，密塞，超声处理 10-30 分钟（160w、50kHz），滤过，滤液作为供试品溶液；另取土的宁和马钱子碱对照品，加三氯甲烷制成每 1ml 各含 2mg 的混合溶液，作为对照品溶液；照薄层色谱法（中国药典 2005 版一部，附录 VI B）试验，吸取上述供试品溶液 10-20 μ l、对照品溶液 5 μ l，分别点于同一以羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 G 薄层板上，以 3-5: 4-6: 0.5-0.7: 0.3-0.5 的甲苯-丙酮-乙醇-浓氨试液为展开剂，展开，取出，晾干，喷以稀碘化铋钾试液；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。

优选的马钱子粉的鉴别：取本发明药物粉末 4.0g，加 10: 1 的三氯甲烷-乙醇混合液 15ml 与浓氨水试液 1.5ml，密塞，超声处理 20 分钟（160w、50kHz），

滤过，滤液作为供试品溶液；另取土的宁和马钱子碱对照品，加三氯甲烷制成每 1ml 各含 2mg 的混合溶液，作为对照品溶液；照薄层色谱法（中国药典 2005 版一部，附录 VI B）试验，吸取上述供试品溶液 15 μ l、对照品溶液 5 μ l，分别点于同一以羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 G 薄层板上，以 4: 5: 0.6: 0.4 的甲苯-丙酮-乙醇-浓氨水为展开剂，展开，取出，晾干，喷以稀碘化铋钾试液；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。

本发明所述的质量控制方法，还包括对海星的鉴别，主要为电泳鉴别，包括如下步骤：

提取方法：取本发明药物粉末 1.5-3.0g 和海星对照药材 0.2-1.0 g，分别加入 6 ml 热水，盖上保鲜膜，100℃煮 20-40 min，放冷后 4000 rpm 离心 20 分钟，取上清液各 5-15 μ l；照电泳法（中国药典 2005 版三部，附录 IV C）试验，按下述电泳条件进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，即得；供试品与对照药材在相应的位置上显相同的蛋白条带；

其中所述的电泳条件：分离胶：9-14%；浓缩胶：4-6%；恒电流：30 mA；电压：200 V；电泳时间：2-3 小时；用考马斯亮蓝 R250 染色 3-5h，摇床脱色。

优选的海星电泳鉴别：

提取方法：取本发明药物粉末 2.0g 和海星对照药材 0.5g，分别加入 6 ml 热水，盖上保鲜膜，100℃煮 30 min，放冷后 4000 rpm 离心 20 分钟，取上清液各 10 μ l；照电泳法（中国药典 2005 版三部，附录 IV C）试验，按下述电泳条件进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，即得；供试品与对照药材在相应的位置上显相同的蛋白条带；

其中所述的电泳条件：分离胶：12.5%；浓缩胶：5%；恒电流：30 mA；电压：200 V；电泳时间：2 小时；用考马斯亮蓝 R250 染色 4h，摇床脱色。

本发明伤科接骨药物的质量控制方法中的检查项应符合中国药典胶囊剂、片剂和丸剂等项下有关的各项规定。

本发明所述的质量控制方法，其特征在于还包括对马钱子粉和/或朱砂和/或冰片中主要成分进行含量测定，具体包括如下内容：

马钱子粉中士的宁的含量测定：

色谱条件与系统适用性试验 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；乙腈-0.01mol/L 庚烷磺酸钠与 0.02mol/L 磷酸二氢钾等量混合溶液（用 10% 磷酸调节 pH 值 2.8）（21：79）为流动相，检测波长为 260nm，理论板数按士的宁峰计算应不低于 5000；

对照品溶液的制备 精密称取士的宁对照品 10mg，置 25ml 量瓶中，加三氯甲烷适量使溶解并稀释至刻度，摇匀；精密量取 1ml，置 25ml 量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，即得，每 1ml 含有士的宁 16 μ g；

供试品溶液的制备 取本发明药物粉末 0.5-1.5g，精密称定，置具塞锥形瓶中，加氢氧化钠试液 3ml，混匀，放置 30 分钟，精密加三氯甲烷 20ml，密塞，称定重量，置水浴中回流提取 2 小时，放冷，再称定重量，用三氯甲烷补足减少的重量，摇匀，分取三氯甲烷提取液，用铺有少量硫酸钠的滤纸滤过，弃去初滤液，精密量取 5ml，置 10ml 量瓶中，用甲醇稀释至刻度；

测定法 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μ l，注入液相色谱仪，测定，即得；

朱砂中硫化汞的含量测定：

取本发明药物粉末 2.0-3.0g，精密称定，置 250ml 烧瓶中，加硫酸 20ml 与硝酸钾 2.5g，加热使呈黄白色，放冷，加水 50ml，滴加 1% 高锰酸钾溶液至显粉红色，超声处理 5 分钟，若粉红色消失，继续滴加高锰酸钾溶液显粉红色至 2

分钟不消失，再滴加 2% 硫酸亚铁溶液至红色消失，加硫酸铁铵指示液 2ml，用 0.1mol/L 硫氰酸铵滴定液滴定，即得；

冰片的含量测定：

色谱条件与系统适用性试验 聚乙二醇（PEG）-20M 毛细管柱（柱长 30 m，内径 0.32 mm，膜厚度 0.5 μ m），柱温 140 $^{\circ}$ C。理论板数按龙脑峰计算应不低于 8000；

校正因子测定 取水杨酸甲酯适量，精密称定，加乙醇制成每 1 ml 含 0.25 mg 的溶液，作为内标溶液；另取冰片对照品 15 mg，精密称定，置 50 ml 量瓶中，加内标溶液溶解并稀释至刻度，摇匀，吸取 0.5 μ l，注入气相色谱仪，测定，计算校正因子；

测定法 取本发明药物粉末 0.5-2.0g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入内标溶液 10 ml，混匀，密塞，称定重量，超声处理 10-30 分钟，放至室温，再称定重量，用内标溶液补足减失的重量，摇匀，离心 10-30 分钟，吸取上清液 0.5 μ l，注入气相色谱仪，测定，以龙脑、异龙脑峰面积之和计算，即得；

优选的，冰片的含量测定：

色谱条件与系统适用性试验 聚乙二醇（PEG）-20M 毛细管柱（柱长 30 m，内径 0.32 mm，膜厚度 0.5 μ m），柱温 140 $^{\circ}$ C。理论板数按龙脑峰计算应不低于 8000；

校正因子测定 取水杨酸甲酯适量，精密称定，加乙醇制成每 1 ml 含 0.25 mg 的溶液，作为内标溶液；另取冰片对照品 15 mg，精密称定，置 50 ml 量瓶中，加内标溶液溶解并稀释至刻度，摇匀，吸取 0.5 μ l，注入气相色谱仪，测定，计算校正因子；

测定法 取本发明药物粉末 1.0g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入

内标溶液 10 ml，混匀，密塞，称定重量，超声处理 20 分钟，放至室温，再称定重量，用内标溶液补足减失的重量，摇匀，离心 20 分钟，吸取上清液 0.5 μ l，注入气相色谱仪，测定，以龙脑、异龙脑峰面积之和计算，即得。

本发明所述的质量控制方法，其特征在于每单位制剂含马钱子以士的宁 ($C_{21}H_{22}N_2O_2$) 计，应为 0.10 - 0.20mg，含朱砂以硫化汞 (HgS) 计，应为 7.00 - 12.00mg；含冰片 ($C_{10}H_{18}O$) 应不少于 0.60 mg。

本发明质量控制方法中包含了对组方中三七、海星等君药的定性鉴别，以及对贵重药材红花和易挥发药物冰片及有毒药材马钱子的定性鉴别，更大程度保证该组方药物质量的稳定；同时因为组方中含有马钱子和朱砂两味有毒药材，因此增加了对这两种药味的含量测定项目，以确保本发明的用药既有效又安全；此外，还增加了对药物中易挥发成分冰片的含量测定。相对于现已公开的文献，本发明质量控制的范围更大，方法更简便可靠，易于操作，灵敏度、精密度及重现性好，体现在产品质量效果上表现为各种成分的检出稳定可靠，可有效地防止造假行为的发生，更好地保证疗效及用药安全。例如，马钱子中所含的士的宁既是有效成分也是有毒成分，因而建立其可靠的含量测定标准，对保证用药安全性及有效性非常重要，可确保产品质量的“安全、均一、稳定、有效、可控”。

同公开文献（公开号为 CN1806820A）相比，本发明的优点，在对三七的薄层色谱鉴别中采用三七对照药材作为对照品，能够检出三七中特征性成分；另展开系统中无三氯甲烷，展开剂为乙酸乙酯-丁酮-甲酸-水（5:3:1:1），可即刻使用，方法快速、简便易行。而在该公开文献中，所用展开剂为三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-水（15:40:22:10）需放置 12 小时后分取下层，步骤繁琐，液体还需分离，当天无法检测，还使用了毒性较大的三氯甲烷。综合对比结果，本

发明样品用量少(最高取样量为 3.0g),提取试剂甲醇用量少(为 10ml),检验周期短,结果重现性好,检出结果灵敏度高,参见图 1。而在该对比公开文献,按照样品取样量为 8-12g;提取甲醇用量为 30ml;超声时间 30 分钟;展开剂为三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-水(15:40:22:10),放置 12 小时后分取下层;对照品为人参皂苷 Rg1 和三七皂苷 R1;点样量为样品 10 μ l,对照品 5 μ l 的条件进行薄层鉴别。该方法检出灵敏度低、样品取样量大、提取试剂甲醇用量多,按此条件复核结果还发现同板比较,三七阴性对照溶液的色谱中,在与人参皂苷 Rg1 对应的位置上存在干扰(Rf 值 0.45);且样品色谱中,在与三七皂苷 R1 对应的位置上,存在未分开的多个斑点,无法判定是否有对应斑点(Rf 值 0.31),参见附图 2。

此外,增加了对马钱子粉、冰片、红花的薄层色谱鉴别,增加了对海星的电泳鉴别,增加了对冰片的含量测定;检测范围大,控制指标多。同时在对马钱子粉和朱砂的定量检测方法中克服了该公开文献中存在的缺陷。

通过本方法制备得到的伤科接骨药物,具有治疗跌打损伤、闪腰岔气、伤筋动骨、瘀血肿痛、损伤红肿等作用,可用于治疗伤科疾病。同时,本发明所述的伤科接骨药物的半数致死量 $LD_{50} = 3.9066 \pm 0.2518\text{g/kg}$,相当于人临床用量的 56 倍,临床人用量为: 0.07g/kg。

附图说明

图 1 本发明三七的薄层色谱鉴别图,其中:

- 1: 本发明供试品溶液
- 2: 三七对照药材溶液
- 3: 三七阴性对照溶液

图 2 公开文献(公开号 CN1806820A)中三七的薄层色谱鉴别图,其中:

- 1: 三七阴性对照溶液
- 2: 对比文献供试品溶液
- 3: 人参皂苷 Rg1 和三七皂苷 R1 对照品混合溶液
- 4: 对比文献供试品溶液
- 5: 人参皂苷 Rg1 和三七皂苷 R1 对照品混合溶液

图 3 本发明对照品士的宁高效液相色谱图

图 4 本发明供试品高效液相色谱图

具体实施方式

以下通过实施例来进一步阐述本发明所述药物的质量控制方法，但并不作为对本发明的限制。

实施例 1 伤科接骨药物的质量控制方法

所述伤科接骨药物中各原料药的重量配比：

红花	6 份	土鳖虫	20 份	朱砂	5 份
马钱子粉	10 份	炙没药	2 份	三七	40 份
炙海星	20 份	炙鸡骨	20 份	冰片	1 份
煅自然铜	10 份	炙乳香	2 份	甜瓜子	2 份

性状鉴别：对于片剂：产品片芯为灰褐色至棕褐色；味苦，腥；对于胶囊剂：产品内容物为浅褐色至褐色；味苦，腥；对于丸剂：产品丸芯为浅褐色至褐色；味苦，腥。

显微鉴别：取本发明药物，置显微镜下观察：花粉粒类圆形或椭圆形，直径 43-66 μm ，外壁有齿状突起，具有 3 个萌发孔；树脂道碎片含棕黄色分泌物。体壁碎片棕色或棕红色，有圆形毛窝，直径 8-24 μm ，有的具长短不一的刚毛；

不规则细小颗粒暗红棕色，有光泽，边缘暗黑色；非腺毛单细胞，多碎断，壁极厚，木化，基部膨大似石细胞；不规则形碎片，无色，有光泽，完整者表面有圆形窝孔，多数碎块边缘呈半圆环状，有突起；

或者，取本发明药物，置显微镜下观察：树脂道碎片含棕黄色分泌物；体壁碎片棕色或棕红色，有圆形毛窝，直径 8-24 μm ，有的具长短不一的刚毛；不规则细小颗粒暗红棕色，有光泽，边缘暗黑色；非腺毛单细胞，多碎断，壁极厚，木化，基部膨大似石细胞；不规则形碎片，无色，有光泽，完整者表面有圆形窝孔，多数碎块边缘呈半圆环状，有突起；

三七的薄层色谱鉴别 取本发明药物粉末 2.0g，加甲醇 10ml，超声处理 20 分钟（160w、50kHz），滤过，滤液作为供试品溶液；另取三七对照药材粉末 1g，同法制成对照药材溶液；照薄层色谱法（中国药典 2005 版一部，附录 VI B）试验，吸取上述两种溶液各 5 μl ，分别点于同一以羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 G 薄层板上，以 5: 3: 1: 1 的乙酸乙酯-丁酮-甲酸-水为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 1% 香草醛硫酸溶液，在 105℃ 加热至斑点显色清晰；供试品色谱中，在与对照药材色谱相应的位置上，显相同颜色的斑点；参见附图 1；

冰片的薄层色谱鉴别：取本发明药物粉末 2.0-4.0g，加三氯甲烷 15ml，振摇，浸渍 2 小时，滤过，滤液作为供试品溶液；另取冰片对照品，加三氯甲烷每 1ml 约含 2mg 的溶液，作为对照品溶液；照薄层色谱法（中国药典 2005 版一部，附录 VI B）试验，吸取上述两种溶液各 3 μl ，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以 9: 1 的苯-丙酮为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 5% 香草醛硫酸溶液，在 105℃ 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；

红花的薄层色谱鉴别：取本发明药物粉末 4.0g，加 80% 丙酮溶液 10ml，密

塞，超声处理 15 分钟（160w、50kHz），滤过，滤液作为供试品溶液；另取红花对照药材 0.5g，同法制成对照药材溶液；照薄层色谱法（中国药典 2005 版一部，附录 VI B）试验，吸取上述两种溶液各 10 μ l，分别点于同一以羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 H 薄层板上，以 7: 2: 3: 0.4 的乙酸乙酯-甲酸-水-甲醇为展开剂，展开，取出，晾干；供试品色谱中，在与对照药材相应的位置上，显相同颜色的斑点；

检查：符合中国药典胶囊剂、片剂和丸剂等项下有关的各项规定。

马钱子粉中士的宁的含量测定：

色谱条件与系统适用性试验 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；乙腈-0.01mol/L 庚烷磺酸钠与 0.02mol/L 磷酸二氢钾等量混合溶液（用 10% 磷酸调节 pH 值 2.8）（21: 79）为流动相，检测波长为 260nm，理论板数按士的宁峰计算应不低于 5000；

对照品溶液的制备 精密称取士的宁对照品 10mg，置 25ml 量瓶中，加三氯甲烷适量使溶解并稀释至刻度，摇匀；精密量取 1ml，置 25ml 量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，即得，每 1ml 含士的宁 16 μ g；

供试品溶液的制备 取本发明药物粉末 1.0g，精密称定，置具塞锥形瓶中，加氢氧化钠试液 3ml，混匀，放置 30 分钟，精密加三氯甲烷 20ml，密塞，称定重量，置水浴中回流提取 2 小时，放冷，再称定重量，用三氯甲烷补足减失的重量，摇匀，分取三氯甲烷提取液，用铺有少量硫酸钠的滤纸滤过，弃去初滤液，精密量取 5ml，置 10ml 量瓶中，用甲醇稀释至刻度；

测定法 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μ l，注入液相色谱仪，测定，即得；结果每片中含马钱子粉以士的宁计，为 0.15mg；每粒胶囊含马钱子粉以士的宁计，为 0.16mg；每丸含马钱子粉以士的宁计，为 0.15mg。对

照品色谱图和供试品色谱图参见附图 3 和附图 4。

实施例 2 伤科接骨药物的质量控制方法

除了上述实施例 1 中所述的内容外，还包括如下内容：

马钱子粉的鉴别

取本发明药物粉末 4.0g，加 10: 1 的三氯甲烷-乙醇混合液 15ml 与浓氨水试液 1.5ml，密塞，超声处理 20 分钟（160w、50kHz），滤过，滤液作为供试品溶液；另取土的宁和马钱子碱对照品，加三氯甲烷制成每 1ml 各含 2mg 的混合溶液，作为对照品溶液；照薄层色谱法（中国药典 2005 版一部，附录 VI B）试验，吸取上述供试品溶液 15 μ l、对照品溶液 5 μ l，分别点于同一以羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 G 薄层板上，以 4: 5: 0.6: 0.4 的甲苯-丙酮-乙醇-浓氨水为展开剂，展开，取出，晾干，喷以稀碘化铋钾试液；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。

朱砂中硫化汞的含量测定

取本发明药物粉末 2.5g，精密称定，置 250ml 烧瓶中，加硫酸 20ml 与硝酸钾 2.5g，加热使呈黄白色，放冷，加水 50ml，滴加 1% 高锰酸钾溶液至显粉红色，超声处理 5 分钟，若粉红色消失，继续滴加高锰酸钾溶液显粉红色至 2 分钟不消失，再滴加 2% 硫酸亚铁溶液至红色消失，加硫酸铁铵指示液 2ml，用 0.1mol/L 硫氰酸铵滴定液滴定，即得；每片含朱砂以硫化汞计，为 9.00mg；每粒胶囊含朱砂以硫化汞计，为 9.02mg；每丸含朱砂以硫化汞计，为 8.78mg。

实施例 3 伤科接骨药物的质量控制方法

除了实施例 2 中所述的内容外，还包括海星的鉴别，具体如下：

提取方法：取本发明药物粉末 2.0g 和海星对照药材 0.5g，分别加入 6 ml 热水，盖上保鲜膜，100℃煮 30 min，放冷后 4000 rpm 离心 20 分钟，取上清液

各 10 μ l；照电泳法（中国药典 2005 版三部，附录 IV C）试验，按下述电泳条件进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，即得；供试品与对照药材在相应的位置上显相同的蛋白条带；

其中所述的电泳条件：分离胶：12.5%；浓缩胶：5%；恒电流：30 mA；电压：200 V；电泳时间：2 小时；用考马斯亮蓝 R250 染色 4h，摇床脱色。

实施例 4 伤科接骨药物的质量控制方法

除了实施例 3 中所述的内容外，还包括对冰片的含量测定，具体如下：

色谱条件与系统适用性试验 聚乙二醇（PEG）-20M 毛细管柱（柱长 30 m，内径 0.32 mm，膜厚度 0.5 μ m），柱温 140 $^{\circ}$ C。理论板数按龙脑峰计算应不低于 8000；

校正因子测定 取水杨酸甲酯适量，精密称定，加乙醇制成每 1 ml 含 0.25 mg 的溶液，作为内标溶液；另取冰片对照品 15 mg，精密称定，置 50 ml 容量瓶中，加内标溶液溶解并稀释至刻度，摇匀，吸取 0.5 μ l，注入气相色谱仪，测定，计算校正因子；

测定法 取本发明药物粉末 1.0g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入内标溶液 10 ml，混匀，密塞，称定重量，超声处理 20 分钟，放至室温，再称定重量，用内标溶液补足减失的重量，摇匀，离心 20 分钟，吸取上清液 0.5 μ l，注入气相色谱仪，测定，以龙脑、异龙脑峰面积之和计算，即得；每片含冰片为 1.0mg；每粒胶囊含冰片为 1.2mg；每丸含冰片为 0.9mg。

实施例 5 伤科接骨药物的质量控制方法

实施例 1-4 中所述的质量控制方法，其中冰片的鉴别方法可按照如下方法进行鉴别：

冰片的鉴别 取本发明药物粉末 3.0g，加三氯甲烷 15ml，振摇，超声处理 20 分钟，滤过，滤液作为供试品溶液；另取冰片对照品，加无水乙醇制成每 1ml 约含 1mg 的溶液，作为对照品溶液；照薄层色谱法（中国药典 2005 版一部，附录 VI B）试验，吸取供试品溶液 5 μ l，对照品溶液 2 μ l，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以 17: 3 的环己烷-乙酸乙酯为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 5 % 香草醛硫酸溶液，在 105℃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；

实施例 6 伤科接骨药物的质量控制方法

实施例 1 中所述的内容，其中：

对三七的薄层色谱鉴别中，可取本发明药物粉末 3.0g，加甲醇 10ml，超声处理 30 分钟，其它条件同实施例 1，结果供试品色谱中，在与对照药材色谱相应的位置上，显相同颜色的斑点；

对冰片的薄层色谱鉴别中，可取本发明药物粉末 4.0g，其它内容同实施例 1，结果供试品色谱中，在与对照品色谱相应的位置上，显相同颜色的斑点；

对马钱子粉中士的宁的含量测定方法中，取另外批号的胶囊剂、片剂或丸剂 1.5g，按照实施例 1 所述的方法进行测定，结果每片含马钱子粉以士的宁计，为 0.18mg；每粒胶囊含马钱子粉以士的宁计，为 0.18mg；每丸含马钱子粉以士的宁计，为 0.16mg。

实施例 7 伤科接骨药物的质量控制方法

同实施例 1 中所述的内容，除了：

对三七的薄层色谱鉴别中，可取本发明药物粉末 1.5g，加甲醇 10ml，超声处理 10 分钟，其它条件同实施例 1，结果供试品色谱中，在与对照药材色谱相应的位置上，显相同颜色的斑点；

对冰片的薄层色谱鉴别中，可取本发明药物粉末 2.0g，其它内容同实施例 1，结果供试品色谱中，在与对照品色谱相应的位置上，显相同颜色的斑点；

对马钱子粉中士的宁的含量测定方法中，取另外批号的胶囊剂、片剂或丸剂 0.5g，按照实施例 1 所述的方法进行测定，结果每片中含马钱子粉以士的宁计，为 0.14mg；每粒胶囊含马钱子粉以士的宁计，为 0.15mg；每丸含马钱子粉以士的宁计，为 0.15mg。

实施例 8 伤科接骨药物的质量控制方法

同实施例 2 中所述的内容，除了朱砂中硫化汞的含量测定项中取本发明药物粉末 3.0g 外，结果每片含朱砂以硫化汞计，为 9.11mg；每粒胶囊中含朱砂以硫化汞计，应为 9.40mg；每丸中含有朱砂以硫化汞计，为 9.25mg。

实施例 9 伤科接骨药物的质量控制方法

同实施例 3 中的内容，除了取本发明药物粉末 3.0g 和海星对照药材 1.0g，分别加入 6 ml 热水，盖上保鲜膜，100℃煮 40 min，放冷后 4000rpm 离心 20 分钟，取上清液各 5 μl；照电泳法（中国药典 2005 版三部，附录 IV C）试验，按下述电泳条件进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，即得；供试品与对照药材在相应的位置上显相同的蛋白条带；其中所述的电泳条件：分离胶：14.0%、浓缩胶：6%；恒电流：30 mA，电压：200 V；电泳时间：2 小时；用考马斯亮蓝 R250 染色 6h，摇床脱色。

实施例 10 伤科接骨药物的质量控制方法

同实施例 3 中的内容，海星的鉴别方法如下：除了取本发明药物粉末 1.5g 和海星对照药材 0.2g，分别加入 6 ml 热水，盖上保鲜膜，100℃煮 20 min，放冷后 4000 rpm 离心 20 分钟，取上清液各 15 μl；照电泳法（中国药典 2005 版三部，附录 IV C）试验，按下述电泳条件进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，即得；

供试品与对照药材在相应的位置上显相同的蛋白条带；其中所述的电泳条件：分离胶：9.0%、浓缩胶：4%；恒电流：30 mA，电压：200 V；电泳时间：2 小时；用考马斯亮蓝 R250 染色 3h，摇床脱色。

实施例 11 伤科接骨药物的质量控制方法

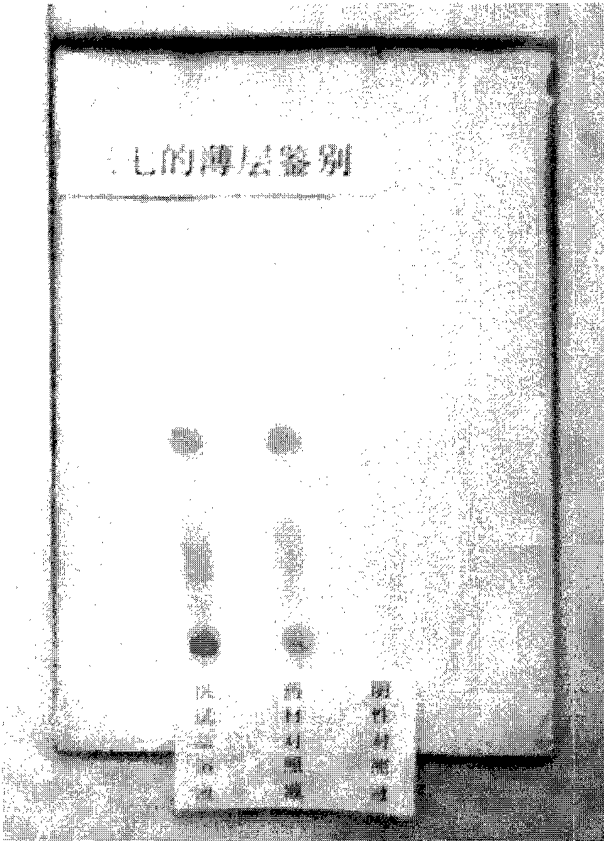
同实施例 5 中的内容，冰片的鉴别方法如下：

取本发明药物粉末 4.0g，加三氯甲烷 15ml，振摇，超声处理 30 分钟，滤过，滤液作为供试品溶液；另取冰片对照品，加无水乙醇制成每 1ml 约含 1mg 的溶液，作为对照品溶液；照薄层色谱法（中国药典 2005 版一部，附录 VI B）试验，吸取供试品溶液 8 μ l，对照品溶液 2 μ l，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以 20: 5 的环己烷-乙酸乙酯为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 5% 香草醛硫酸溶液，在 110℃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。

实施例 12 伤科接骨药物的质量控制方法

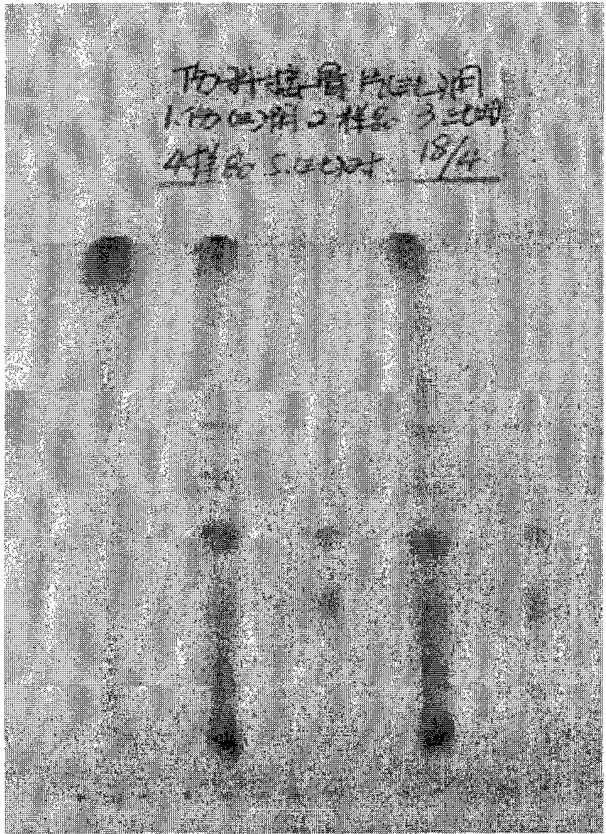
同实施例 5 中的内容，冰片的鉴别方法如下：

取本发明药物粉末 2.0g，加三氯甲烷 15ml，振摇，超声处理 15 分钟，滤过，滤液作为供试品溶液；另取冰片对照品，加无水乙醇制成每 1ml 约含 1mg 的溶液，作为对照品溶液；照薄层色谱法（中国药典 2005 版一部，附录 VI B）试验，吸取供试品溶液 4 μ l，对照品溶液 2 μ l，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以 15: 2 的环己烷-乙酸乙酯为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 5% 香草醛硫酸溶液，在 95℃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。



1 2 3

图 1



1 2 3 4 5

图 2

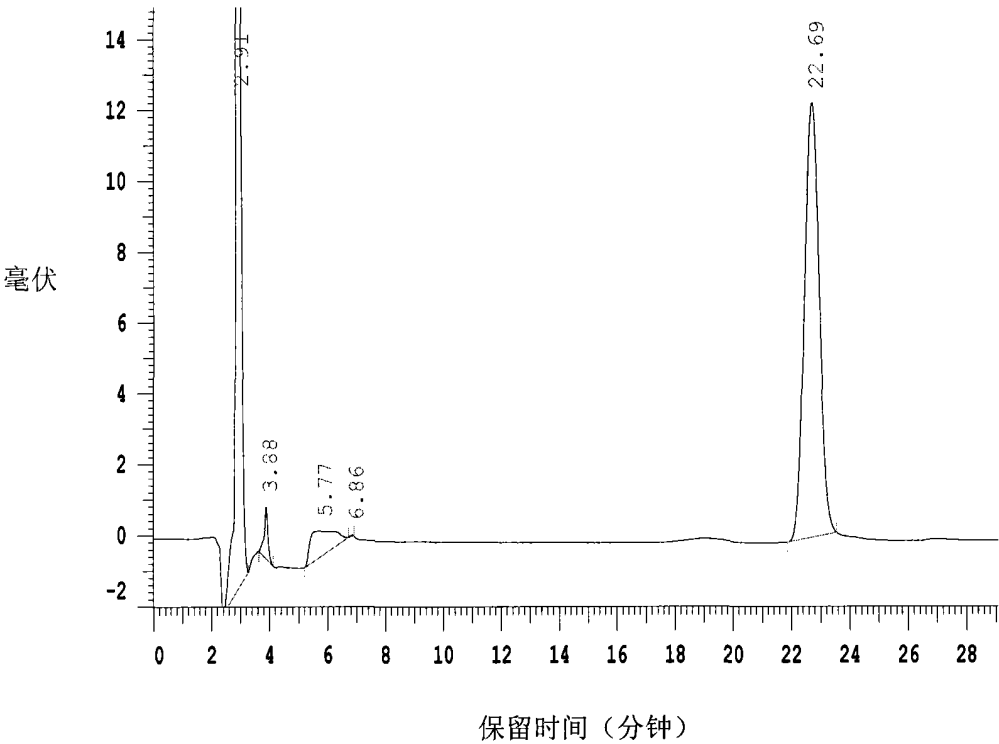


图 3

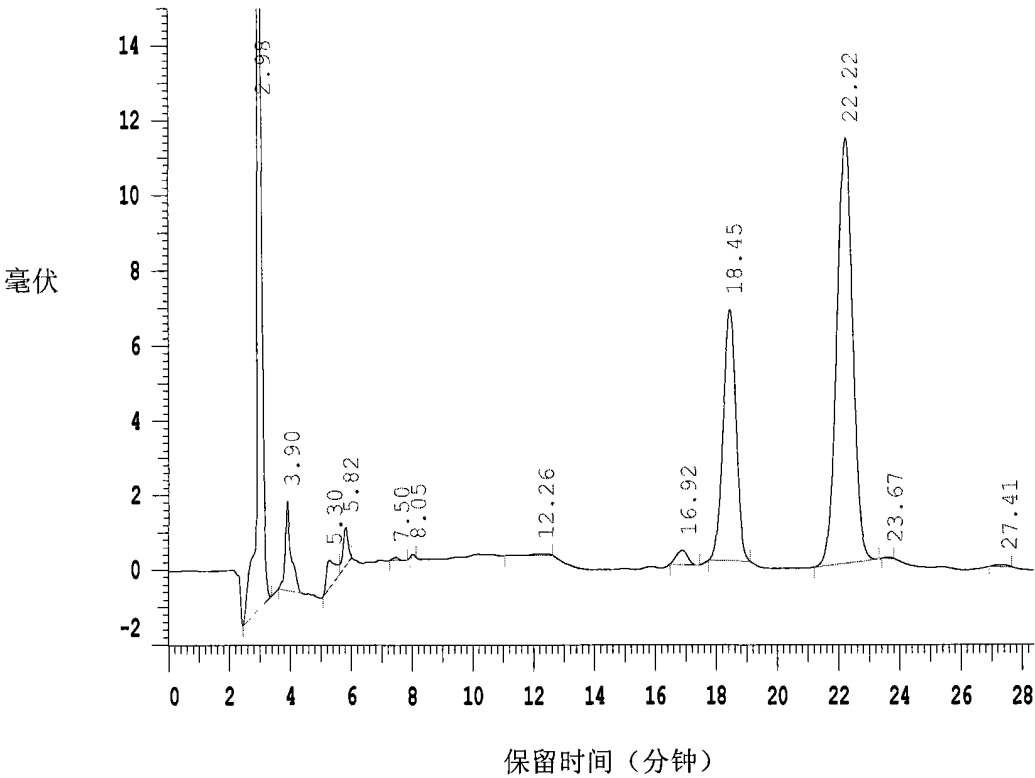


图 4