

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510200534. X

[51] Int. Cl.

A61K 36/744 (2006.01)

A61K 35/32 (2006.01)

A61K 31/575 (2006.01)

A61P 11/04 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 3 月 1 日

[11] 公开号 CN 1739655A

[51] Int. Cl. (续)

G01N 30/02 (2006.01)

G01N 33/15 (2006.01)

[22] 申请日 2005.9.14

[21] 申请号 200510200534. X

[71] 申请人 贵州益佰制药股份有限公司

地址 550008 贵州省贵阳市白云大道 220 - 1 号

[72] 发明人 叶湘武 汤 琼 张 梅

[74] 专利代理机构 贵阳中新专利商标事务所

代理人 郭 防

权利要求书 5 页 说明书 20 页

[54] 发明名称

清开灵注射制剂的质量控制方法

[57] 摘要

本发明提供了一种清开灵注射制剂的质量控制方法,包括性状、鉴别、检查、含量测定,其中,栀子苷的鉴别方法采用硅胶 G 薄层板,以醋酸乙酯-丙酮-甲酸-水作为展开剂;在栀子苷的含量测定方法中,栀子苷对照品采用甲醇溶解;胆酸和猪去氧胆酸的含量测定方法中采用高效液相色谱法,使用蒸发光散色检测器,其检测结果准确;本发明还对清开灵制剂中所含氮气及不溶性微粒等项目进行检查,避免不良反应产生;采用本发明方法控制清开灵制剂的质量,不仅鉴别方法专属性强,含量测定方法重现性好;同时,本发明检查方法全面,能有效避免药物不良反应产生,含量测定项目能确保药物的疗效,达到了有效控制药物质量的发明目的。

【权利要求1】一种清开灵注射制剂的质量控制方法，所述注射制剂包括冻干粉、注射液和大输液，其特征在于：所述质量控制方法包括性状、鉴别、检查、含量测定；其中鉴别包括：糠醛反应、以栀子苷为对照品的薄层鉴别的部分或全部；检查包括：不溶性微粒、PH值、蛋白质、鞣质、树脂、草酸盐、重金属、砷盐、钾离子、异常毒性、溶血与凝聚、钡离子、炽灼残渣检查、水分以及其他应符合注射剂项下的各项规定中的部分或全部；含量测定包括：以栀子苷对照品、黄芩苷对照品、绿原酸对照品、胆酸对照品、猪去氧胆酸对照品作为该制剂含量测定方法的检测指标，以及含氮量测定的部分或全部。

【权利要求2】按照权利要求1所述清开灵注射制剂的质量控制方法，其特征在于：含量测定方法包括以下项目的部分或全部：

栀子苷 采用高效液相色谱法，色谱柱为C18或C4或C8柱，以甲醇或乙腈：水=20~40:80~60为流动相，流速为0.6-1.2ml/min，柱温：20-50℃，检测波长为205~350nm；精密称取栀子苷对照品，加甲醇溶解，摇匀，即得对照品溶液；取清开灵冻干粉用甲醇-水溶液溶解，滤膜滤过，即得供试品溶液，或取清开灵注射液或清开灵大输液，先置水浴上蒸干，放冷，残渣用甲醇-水溶液溶解，滤膜滤过，或以氯仿提取，放冷，提取液蒸干，残渣加甲醇-水溶解，滤膜滤过，即得供试品溶液；精密吸取对照品溶液与供试品溶液，注入液相色谱仪测定含量，该清开灵制剂中，冻干粉中栀子苷含量应不得少于0.8%、注射液中栀子苷含量应不得少于0.4mg/ml、大输液中栀子苷含量应不得少于0.04mg/ml；

黄芩苷 照高效液相色谱法测定，色谱柱为C18或C4或C8柱，以乙腈或甲醇：0.3~0.5%磷酸=10~40:90~60 为流动相，流速为0.6-1.2ml/min，柱温：20-50℃，检测波长为205~350nm；精密称取黄芩苷对照品，加甲醇溶解，摇匀，即得对照品溶液；取清开灵冻干粉用甲醇-水溶液溶解，滤膜滤过，即得供试品溶液，或取清开灵注射液或清开灵大输液，先置水浴上蒸干，放冷，残渣用甲醇-水溶液溶解，滤膜滤过，或以乙酸乙酯和甲醇的混合溶液提取，放冷，提取液蒸干，残渣加甲醇-水溶解，滤膜滤过，即得供试品溶液；精密吸取对照品溶液与供试品溶液，注入液相色谱仪测定含量，该清开灵制剂中，冻干粉中黄芩苷

含量应为5%~17.5%、注射液中黄芩苷含量应为2~7mg/ml、大输液中黄芩苷含量应为0.24~2.1mg/ml;

绿原酸 照高效液相色谱法测定, 色谱柱为C18或C4或C8柱, 以乙腈或甲醇: 0.2~0.7%磷酸=5~25: 95~75为流动相, 流速为0.6~1.2ml/min, 柱温: 20~50℃, 检测波长为245~600nm; 精密称取绿原酸对照品, 加甲醇-水溶解, 摇匀, 即得对照品溶液; 取清开灵冻干粉, 用甲醇-水溶液溶解, 滤膜滤过, 即得供试品溶液, 或取清开灵注射液或大输液, 先置水浴上蒸干, 放冷, 残渣用甲醇-水溶液溶解, 滤膜滤过, 即得供试品溶液; 精密吸取对照品溶液与供试品溶液, 注入液相色谱仪测定含量, 该清开灵制剂中, 冻干粉中绿原酸含量应不得少于0.4%、注射液中绿原酸含量应不得少于0.15mg/ml、大输液中绿原酸含量应不得少于0.018mg/ml;

胆酸 照高效液相色谱法测定, 色谱柱为C18或C4或C8柱, 流动相为: 甲醇或乙腈: 水=40-85: 60-15, 或为甲醇或乙腈: 水: 冰醋酸=40-85: 60-15: 0.01-0.99, 或为甲醇或乙腈: 水: 甲酸=40-85: 60-15: 0.01-0.5, 流动相流速为0.6~1.2ml/min, 柱温: 20~50℃, 蒸发光散射检测器漂移管温度为25~115℃, 雾化气体为空气或氮气, 气体流速为1.0~4.0L/min; 取胆酸对照品, 加甲醇溶解, 摇匀, 即得对照品溶液; 取清开灵冻干粉, 加甲醇-水溶液超声处理5~30分钟, 放冷, 加甲醇-水溶液溶解, 摇匀, 滤膜滤过, 即得供试品溶液, 或取清开灵注射液或大输液, 以甲醇-水溶液超声处理5~30分钟, 放冷, 加甲醇-水溶液溶解, 摇匀, 滤膜滤过, 即得供试品溶液; 精密吸取对照品溶液与供试品溶液, 注入液相色谱仪测定, 按外标两点法对数方程计算含量, 该清开灵制剂中, 冻干粉中胆酸含量应为2.5%~10%、注射液中胆酸含量应为1~4mg/ml、大输液中胆酸含量应为0.12~1.2mg/ml;

猪去氧胆酸 照高效液相色谱法测定, 色谱柱为C18或C4或C8柱, 流动相为: 甲醇或乙腈: 水=40-85: 60-15, 或为甲醇或乙腈: 水: 冰醋酸=40-85: 60-15: 0.01-0.99, 或为甲醇或乙腈: 水: 甲酸=40-85: 60-15: 0.01-0.5, 流动相流速为0.6~1.2ml/min, 柱温: 20~50℃, 蒸发光散射检测器漂移管温度为25~115℃, 雾化气体为空气或氮气, 气体流速为1.0~4.0L/min; 取猪去氧胆酸对照品, 加甲醇溶解, 摇匀, 即得对照品溶液; 取清开灵冻干粉, 加甲醇-水溶液超声处理5~30分钟, 放冷, 加甲醇-水溶液溶解, 摇匀, 滤膜滤过, 即得供试品溶液, 或取清开灵注射液或大输液, 以甲醇-水溶液超声处理5~30分钟, 放冷, 加甲醇-水溶液溶解, 摇匀, 滤膜滤过, 即得供试品溶液; 精密吸取对照品溶液与供试品溶液, 注入液相色谱仪测定, 按外标两点法对数方程计算含量, 该清开灵制剂中, 冻干粉中猪去氧胆酸含量应为2.5%~10%、注射液中猪去氧胆酸含量应为1~4mg/ml、大输液中猪去氧胆酸含量

应为0.12-1.2mg/ml;

含氮量 取清开灵制剂,照中国药典氮测定法测定,其中冻干粉含氮量为4%-10%、注射液含氮量为1.6-4mg/ml、大输液含氮量为0.18-1.2mg/ml。

【权利要求3】按照权利要求1所述清开灵注射制剂的质量控制方法,其特征在于:鉴别方法包括以下项目的部分或全部:

(1)分别取清开灵冻干粉、注射液或大输液,冻干粉用水溶解,加入糠醛溶液与硫酸溶液混匀,水浴加热,溶液显灰紫色;

(2)取清开灵冻干粉、注射液或大输液,其中冻干粉供试品溶液的制备方法为:取冻干粉的内容物,加乙醇溶解,取上清液即得;注射液或大输液供试品溶液的制备方法为:取注射液5-20ml或大输液50-200ml,置水浴上蒸干,放冷,残渣加乙醇使溶解,取上清液即得;另取栀子苷对照品,加乙醇溶解,作为对照品溶液;将对照品溶液和供试品溶液分别点于同一硅胶G薄层板上,以醋酸乙酯或磷酸:丙酮:甲酸:水=2-10:2-10:0.5-2:0.5-2为展开剂,以10%硫酸乙醇溶液为显色剂,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。

【权利要求4】按照权利要求1所述清开灵注射制剂的质量控制方法,其特征在于:所述性状为:冻干粉:产品为浅黄色至棕黄色疏松块状物;注射液:产品为棕黄色或棕红色的澄明液体;大输液制剂:产品为黄色至棕黄色的澄明液体。

【权利要求5】按照权利要求1所述清开灵注射制剂的质量控制方法,其特征在于:检查方法包括以下项目的部分或全部:

不溶性微粒 取清开灵冻干粉、注射液或大输液,其中冻干粉200mg加净化水50-100ml使溶解,用净化水做空白,照中国药典2005年版一部附录“不溶性微粒检查法”第一法测定,应符合规定;

PH值 取清开灵冻干粉、注射液或大输液,其中冻干粉200mg加水1-10ml使溶解,分别测其PH值,其PH值均应为5-9;

蛋白质 取清开灵冻干粉、注射液或大输液,其中冻干粉200mg加水1-10ml使溶解,分别取1ml置试管中,滴加鞣酸试液1-5滴,不得产生浑浊;

鞣质 取清开灵冻干粉、注射液或大输液,其中冻干粉200mg加水1-10ml使溶解,取1ml,加新配制的含1-5%鸡蛋清的生理盐水1-10ml,放置5-20分钟,不得出现浑浊或沉淀;

树脂 取清开灵冻干粉、注射液或大输液,其中冻干粉200mg加水1-10ml使溶解,分别取上述溶液5ml,置分液漏斗中,加氯仿5-20ml振摇提取,分取氯仿液,蒸干,残渣加冰醋

酸1-5ml使溶解, 置具塞试管中, 加水1-5ml, 混匀, 放置20-50分钟, 应无絮状物析出;

草酸盐 取清开灵冻干粉、注射液或大输液, 其中冻干粉200mg加水1-10ml使溶解, 分别取上述溶液5ml, 用稀盐酸调节PH值至1~3, 30-70℃保温5-20分钟, 保温滤去沉淀, 调节PH值至4~7, 取1-5ml, 加1-5%氯化钙溶液1~5滴, 放置5-20分钟, 不得出现浑浊或沉淀;

重金属 取清开灵冻干粉、注射液或大输液, 其中冻干粉200mg加水1-10ml使溶解, 分别吸取1-2ml, 蒸干, 缓缓烘至约完全灰化, 放冷, 对照管取标准铅溶液1ml, 照中国药典2005年版一部附录“重金属检查法”第二法测定, 1ml水溶液中含重金属不得过百万分之十

;

砷盐 取清开灵冻干粉、注射液或大输液, 其中冻干粉200mg加水1-10ml使溶解, 分别吸取1ml, 蒸干, 加1-5%硝酸镁乙醇溶液1-5ml, 点燃, 燃尽后, 先用小火炽灼使炭化, 再在500~600℃炽灼至完全灰化, 放冷, 加盐酸1-10ml与水10-30ml使溶解, 照中国药典2005年版一部附录“砷盐检查法”第一法测定, 1ml水溶液中含砷量不得过百万分之二;

钾离子 取清开灵冻干粉、注射液或大输液, 其中冻干粉200mg加水1-10ml使溶解, 分别吸取1-5ml, 蒸干, 照中国药典2005年版一部附录“注射剂有关物质检查法”测定, 应符合规定;

异常毒性 取清开灵冻干粉、注射液或大输液, 其中冻干粉加氯化钠注射液制成每1ml中含30-50mg的溶液, 照中国药典2005年版二部附录“异常毒性检查法”检查, 按静脉注射法给药, 应符合规定;

溶血与凝聚 2%红细胞混悬液的制备 取兔血或羊血, 放入盛有玻璃珠的锥形瓶中, 振摇5-20分钟, 除去纤维蛋白原, 使成脱纤血, 加5-20倍量的生理氯化钠溶液洗涤1-5次, 至上清液不显红色为止, 将所得红细胞用生理氯化钠溶液配成2%的混悬液, 即得;

试管编号1、2%红血球混悬液2.5ml, 生理氯化钠溶液2.0ml, 药液0.5ml;

编号2、2%红血球混悬液2.5ml, 生理氯化钠溶液2.1ml, 药液0.4ml;

编号3、2%红血球混悬液2.5ml, 生理氯化钠溶液2.2ml, 药液0.3ml;

编号4、2%红血球混悬液2.5ml, 生理氯化钠溶液2.3ml, 药液0.2ml;

编号5、2%红血球混悬液2.5ml, 生理氯化钠溶液2.4ml, 药液0.1ml;

编号6、2%红血球混悬液2.5ml, 生理氯化钠溶液2.5ml, 药液0ml;

试验方法 取试管6支, 按上述配比量依次加入2%红细胞混悬液和生理氯化钠溶液, 混匀后, 于37℃恒温箱中放置10-60分钟, 分别加入不同量的药液, 其中冻干粉取200mg, 用生理氯化钠溶液溶解并稀释成5-40ml, 编号6的第6管为对照管; 摇匀后, 置37℃恒温箱中, 开

始每隔15分钟观察1次，1小时后，每隔1小时观察1次，共观察2小时；

按上法检查，以编号3的第3管为准，本品在2小时内不得出现溶血和红细胞凝聚；

钡离子 取铂丝，用盐酸湿润后，蘸取清开灵冻干粉、注射液或大输液，在无色火焰中燃烧，火焰未显黄绿色，通过绿色玻璃透视，火焰未显蓝色；

取清开灵冻干粉、注射液或大输液，其中冻干粉200mg用注射用水1-10ml注射用水溶解，分别取药液，滴加1-50滴0.01-0.2%的CaCl₂溶液或Ca(OH)₂溶液，不得出现混浊或沉淀；

炽灼残渣检查 取清开灵冻干粉、注射液或大输液，其中冻干粉200mg用1-10ml注射用水溶解，分别取药液1-5ml，照中国药典灼残渣检查法检查，应小于2%；

水分 取冻干粉，照中国药典2005年版一部附录“水分测定法”第三法测定，不得过5.0%；

其他 应符合中国药典2005年版一部附录注射剂项下有关的各项规定。

【权利要求6】按照权利要求5所述清开灵注射制剂的质量控制方法，其特征在于：钡离子的检查方法为：取清开灵冻干粉、注射液或大输液，其中冻干粉200mg用注射用水1-5ml溶解，分别取药液，滴加稀硫酸，即生成白色沉淀，分离，沉淀在盐酸或硝酸中均溶解。

清开灵注射制剂的质量控制方法

技术领域：本发明涉及一种清开灵注射制剂的质量控制方法，属于对药品进行质量控制的技术领域。

技术背景：清开灵制剂由我国传统名贵中成药“安宫牛黄丸”的改剂而得，由胆酸、珍珠母、猪去氧胆酸、栀子、水牛角、板蓝根、黄芩苷和金银花组成；具有清热解毒、避秽通窍、镇静安神的功能，主治热邪内陷、神昏谵语、身热烦躁、抽搐惊厥及小儿急惊风等症；现代医学主要用于治疗上呼吸道感染、多种热病和急性病等，其疗效显著；于文勇于2003年4月10日申请了专利名称为：清开灵注射液或注射粉针剂的制备方法及其质量控制方法，申请号为：03109422.8的专利，该专利公开了清开灵注射液或注射用粉针剂中黄芩苷、胆酸、猪去氧胆酸、栀子苷、绿原酸的含量测定方法，以及清开灵注射液或注射用粉针剂的鉴别方法。虽然该专利公开的质量控制方法对清开灵制剂的质量控制起到一定作用，但在我们的研究过程中发现，用以上方法控制清开灵制剂的质量，仍然存在一定的问题。具体表现为：该专利申请在鉴别栀子的方法中，采用GF254预制板，同时以乙酸乙酯—无水乙醇—冰醋酸作为展开剂，以香夹兰醛—浓硫酸溶液作显色剂；我们研究发现，用该方法的鉴别出来的结果专属性不够强，斑点显色不够好；且一般情况下使用GF254荧光板，是指在紫外光灯，254nm条件下观察结果，而该专利申请却未对此进行清楚的说明，故该专利申请中栀子苷的鉴别方法还具有不清楚的地方；另外在栀子苷的含量测定方法中，栀子苷对照品采用甲醇—水溶解，使得栀子苷溶解效果不够好，且所得栀子苷对照品溶液不易保存；另外在该专利申请中，胆酸和猪去氧胆酸的含量测定方法中采用高效液相色谱法，使用紫外检测器，由于胆酸和猪去氧胆酸仅有紫外末端吸收，使得测定结果不够准确。

发明内容：本发明的目的在于：提供一种清开灵注射制剂的质量控制方法。

该注射制剂包括冻干粉、注射液和大输液制剂。

本发明中，栀子苷的鉴别方法中，我们采用硅胶G薄层板，以醋酸乙酯—丙酮—甲酸—水作为展开剂，用该方法鉴别的结果专属性强，斑点显色好，肉眼容易观察；在栀子苷的含量测定方法中，栀子苷对照品采用甲醇溶解，其溶解效果好，且所得栀子苷对照品溶液容易保存；本发明中，胆酸和猪去氧胆酸的含量测定方法中采用高效液相色谱法，使用蒸发光散射检测器，其检测结果准确，因为胆酸和猪去氧胆酸仅有紫外末端吸收，使用紫外检测器，其测定结果不够准确，而蒸发光散射检测器对于无紫外吸收或仅有紫外末端吸收的大分子有

机化合物具有极大的优越性；在产品研究过程中，我们发现：胆酸和猪去氧胆酸采用高效液相色谱法，使用蒸发光散色检测器是目前测定胆酸和猪去氧胆酸较先进的检测方法；由于清开灵制剂中含有有效成分氨基酸，故本发明还对清开灵制剂中所含氮气进行含量测定，作为控制清开灵制剂中氨基酸含量的指标，这是现有技术中不曾有的，另外在产品研究过程中我们发现，本发明所用含量测定方法还具有重现性好的优点。

本发明中所述清开灵注射制剂均为市售产品，包括：冻干粉、注射液和大输液制剂。

所述质量控制方法主要包括性状、鉴别、检查、含量测定等项目的部分或全部；其中鉴别包括糠醛反应、以栀子苷为对照品的薄层鉴别的部分或全部；检查包括不溶性微粒、PH值、蛋白质、鞣质、树脂、草酸盐、重金属、砷盐、钾离子、异常毒性、溶血与凝聚、钡离子、炽灼残渣检查、水分以及其他应符合注射剂项下的各项规定中的部分或全部；含量测定包括以栀子苷对照品、黄芩苷对照品、绿原酸对照品、胆酸对照品、猪去氧胆酸对照品作为该制剂含量测定方法的检测指标，以及含氮量测定的部分或全部。

所述质量控制方法为：

性状：

对于冻干粉：产品为浅黄色至棕黄色疏松块状物。

对于注射液：产品为棕黄色或棕红色的澄明液体。

对于大输液：产品为黄色至棕黄色的澄明液体。

鉴别：

(1) 分别取清开灵冻干粉、注射液或大输液，冻干粉用水溶解，加入糠醛溶液与硫酸溶液混匀，水浴加热，溶液显灰紫色。

(2) 取清开灵冻干粉、注射液或大输液，其中冻干粉供试品溶液的制备方法为：取冻干粉的内容物，加乙醇溶解，取上清液即得；注射液或大输液供试品溶液的制备方法为：取注射液5-20ml或大输液50-200ml，置水浴上蒸干，放冷，残渣加乙醇使溶解，取上清液即得。另取栀子苷对照品，加乙醇溶解，作为对照品溶液。将对照品溶液和供试品溶液分别点于同一硅胶G薄层板上，以醋酸乙酯或磷酸：丙酮：甲酸：水=2-10：2-10：0.5-2：0.5-2为展开剂，以10%硫酸乙醇溶液为显色剂，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。

检查：

不溶性微粒 取清开灵冻干粉、注射液或大输液，冻干粉200mg加净化水50-100ml使溶解，用净化水做空白，照中国药典2005年版一部附录“不溶性微粒检查法”第一法测定，应

符合规定。

PH值 取清开灵冻干粉、注射液或大输液，冻干粉200mg加水1-10ml使溶解，分别测其PH值，其PH值均应为5-9。

蛋白质 取清开灵冻干粉、注射液或大输液，冻干粉200mg加水1-10ml使溶解，分别取1ml置试管中，滴加鞣酸试液1-5滴，不得产生浑浊。

鞣质 取清开灵冻干粉、注射液或大输液，冻干粉200mg加水1-10ml使溶解，取1ml，加新配制的含1-5%鸡蛋清的生理盐水1-10ml，放置5-20分钟，不得出现浑浊或沉淀。

树脂 取清开灵冻干粉、注射液或大输液，冻干粉200mg加水1-10ml使溶解，分别取上述溶液5ml，置分液漏斗中，加氯仿5-20ml振摇提取，分取氯仿液，蒸干，残渣加冰醋酸1-5ml使溶解，置具塞试管中，加水1-5ml，混匀，放置20-50分钟，应无絮状物析出。

草酸盐 取清开灵冻干粉、注射液或大输液，冻干粉200mg加水1-10ml使溶解，分别取上述溶液5ml，用稀盐酸调节PH值至1~3，30-70℃保温5-20分钟，保温滤去沉淀，调节PH值至4~7，取1-5ml，加1-5%氯化钙溶液1~5滴，放置5-20分钟，不得出现浑浊或沉淀。

重金属 取清开灵冻干粉、注射液或大输液，冻干粉200mg加水1-10ml使溶解，分别吸取1-2ml，蒸干，缓缓烘至约完全灰化，放冷，对照管取标准铅溶液1ml，照中国药典2005年版一部附录“重金属检查法”第二法测定，1ml水溶液中含重金属不得过百万分之十。

砷盐 取清开灵冻干粉、注射液或大输液，冻干粉200mg加水1-10ml使溶解，分别吸取1ml，蒸干，加1-5%硝酸镁乙醇溶液1-5ml，点燃，燃尽后，先用小火炽灼使炭化，再在500~600℃炽灼至完全灰化，放冷，加盐酸1-10ml与水10-30ml使溶解，照中国药典2005年版一部附录“砷盐检查法”第一法测定，1ml水溶液中含砷量不得过百万分之二。

钾离子 取清开灵冻干粉、注射液或大输液，冻干粉200mg加水1-10ml使溶解，分别吸取1-5ml，蒸干，照中国药典2005年版一部附录“注射剂有关物质检查法”测定，应符合规定。

异常毒性 取清开灵冻干粉、注射液或大输液，冻干粉加氯化钠注射液制成每1ml中含30-50mg的溶液，照中国药典2005年版二部附录“异常毒性检查法”检查，按静脉注射法给药，应符合规定。

溶血与凝聚 2%红细胞混悬液的制备 取兔血或羊血，放入盛有玻璃珠的锥形瓶中，振摇5-20分钟，除去纤维蛋白原，使成脱纤血，加5-20倍量的生理氯化钠溶液洗涤1-5次，至上清液不显红色为止，将所得红细胞用生理氯化钠溶液配成2%的混悬液，即得。

试 管 编 号	1	2	3	4	5	6
2%红细胞混悬液/ml	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
生理氯化钠溶液/ml	2.0	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5
药液/ml	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.0

试验方法 取试管6支，按上表中配比量依次加入2%红细胞混悬液和生理氯化钠溶液，混匀后，于37℃恒温箱中放置10-60分钟，分别加入不同量的药液，其中冻干粉取200mg，用生理氯化钠溶液溶解并稀释成5-40ml，以编号为6的第6管为对照管；摇匀后，置37℃恒温箱中，开始每隔15分钟观察1次，1小时后，每隔1小时观察1次，共观察2小时。

试验方法 取试管6支，按上表中配比量依次加入2%红细胞混悬液和生理氯化钠溶液，混匀后，于37℃恒温箱中放置10-60分钟，分别加入不同量的药液，其中冻干粉取200mg，用生理氯化钠溶液溶解并稀释成5-40ml，以编号为6的第6管为对照管；摇匀后，置37℃恒温箱中，开始每隔15分钟观察1次，1小时后，每隔1小时观察1次，共观察2小时。

按上法检查，以编号为3的第3管为准，本品在2小时内不得出现溶血和红细胞凝聚。

由于钡离子对人体有害，本发明检查项目中还对钡离子进行检查，避免其进入人体，钡离子的检查方法为：

钡离子 方法1：取铂丝，用盐酸湿润后，蘸取清开灵冻干粉、注射液或大输液，在无色火焰中燃烧，火焰未显黄绿色，通过绿色玻璃透视，火焰未显蓝色。

方法2：取清开灵冻干粉、注射液或大输液，冻干粉200mg用注射用水1-5ml溶解，分别取药液，滴加稀硫酸，即生成白色沉淀，分离，沉淀在盐酸或硝酸中均溶解。

本发明为避免清开灵注射制剂与血浆中钙离子发生反应而导致不良反应产生，还可检查以下项目：

取清开灵冻干粉、注射液或大输液，冻干粉200mg用注射用水1-10ml注射用水溶解，分别取药液，滴加1-50滴0.01-0.2%的CaCl₂溶液或Ca(OH)₂溶液，不得出现混浊或沉淀。

本发明为了对清开灵制剂中无机物杂质含量进行控制，还对炽灼残渣进行检查，其检查方法为：

炽灼残渣检查 取清开灵冻干粉、注射液或大输液，冻干粉200mg用1-10ml注射用水溶解，分别取药液1-5ml，照中国药典灼残渣检查法检查，应小于2%。

另外本发明针对冻干粉还进行水分检查，其检测方法为：

水分 取冻干粉，照中国药典2005年版一部附录“水分测定法”第三法测定，不得过5.0%。

其他 应符合中国药典2005年版一部附录注射剂项下有关的各项规定

含量测定:

梔子苷 采用高效液相色谱法, 色谱柱为C18或C4或C8柱, 以甲醇或乙腈: 水=20~40:80~60为流动相, 流速为0.6~1.2ml/min, 柱温: 20~50℃, 检测波长为205~350nm; 精密称取梔子苷对照品, 加甲醇溶解, 摇匀, 即得对照品溶液; 取清开灵冻干粉用甲醇-水溶液溶解, 滤膜滤过, 即得供试品溶液, 或取清开灵注射液或清开灵大输液, 先置水浴上蒸干, 放冷, 残渣用甲醇-水溶液溶解, 滤膜滤过, 或以氯仿提取, 放冷, 提取液蒸干, 残渣加甲醇-水溶解, 滤膜滤过, 即得供试品溶液; 精密吸取对照品溶液与供试品溶液, 注入液相色谱仪测定含量, 该清开灵制剂中, 冻干粉中梔子苷含量应不得少于0.8%、注射液中梔子苷含量应不得少于0.4mg/ml、大输液中梔子苷含量应不得少于0.04mg/ml。

黄芩苷 照高效液相色谱法测定, 色谱柱为C18或C4或C8柱, 以乙腈或甲醇: 0.3~0.5%磷酸=10~40:90~60 为流动相, 流速为0.6~1.2ml/min, 柱温: 20~50℃, 检测波长为205~350nm; 精密称取黄芩苷对照品, 加甲醇溶解, 摇匀, 即得对照品溶液; 取清开灵冻干粉用甲醇-水溶液溶解, 滤膜滤过, 即得供试品溶液, 或取清开灵注射液或清开灵大输液, 先置水浴上蒸干, 放冷, 残渣用甲醇-水溶液溶解, 滤膜滤过, 或以乙酸乙酯和甲醇的混合溶液提取, 放冷, 提取液蒸干, 残渣加甲醇-水溶解, 滤膜滤过, 即得供试品溶液; 精密吸取对照品溶液与供试品溶液, 注入液相色谱仪测定含量, 该清开灵制剂中, 冻干粉中黄芩苷含量应为5%~17.5%、注射液中黄芩苷含量应为2~7mg/ml、大输液中黄芩苷含量应为0.24~2.1mg/ml。

绿原酸 照高效液相色谱法测定, 色谱柱为C18或C4或C8柱, 以乙腈或甲醇: 0.2~0.7%磷酸=5~25: 95~75为流动相, 流速为0.6~1.2ml/min, 柱温: 20~50℃, 检测波长为245~600nm; 精密称取绿原酸对照品, 加甲醇-水溶解, 摇匀, 即得对照品溶液; 取清开灵冻干粉, 用甲醇-水溶液溶解, 滤膜滤过, 即得供试品溶液, 或取清开灵注射液或大输液, 先置水浴上蒸干, 放冷, 残渣用甲醇-水溶液溶解, 滤膜滤过, 即得供试品溶液; 精密吸取对照品溶液与供试品溶液, 注入液相色谱仪测定含量, 该清开灵制剂中, 冻干粉中绿原酸含量应不得少于0.4%、注射液中绿原酸含量应不得少于0.15mg/ml、大输液中绿原酸含量应不得少于0.018mg/ml。

胆酸 照高效液相色谱法测定, 色谱柱为C18或C4或C8柱, 流动相为: 甲醇或乙腈: 水=40-85: 60-15, 或为甲醇或乙腈: 水: 冰醋酸=40-85: 60-15: 0.01-0.99, 或为甲醇或乙腈: 水: 甲酸=40-85:60-15:0.01-0.5, 流动相流速为0.6~1.2ml/min, 柱温: 20~50℃, 蒸发

光散射检测器漂移管温度为25-115℃，雾化气体为空气或氮气，气体流速为1.0-4.0L/min；取胆酸对照品，加甲醇溶解，摇匀，即得对照品溶液；取清开灵冻干粉，加甲醇-水溶液超声处理5-30分钟，放冷，加甲醇-水溶液溶解，摇匀，滤膜滤过，即得供试品溶液，或取清开灵注射液或大输液，以甲醇-水溶液超声处理5-30分钟，放冷，加甲醇-水溶液溶解，摇匀，滤膜滤过，即得供试品溶液；精密吸取对照品溶液与供试品溶液，注入液相色谱仪测定，按外标两点法对数方程计算含量，该清开灵制剂中，冻干粉中胆酸含量应为2.5%-10%、注射液中胆酸含量应为1-4mg/ml、大输液中胆酸含量应为0.12-1.2mg/ml。

猪去氧胆酸 照高效液相色谱法测定，色谱柱为C18或C4或C8柱，流动相为：甲醇或乙腈：水=40-85：60-15，或为甲醇或乙腈：水：冰醋酸=40-85：60-15：0.01-0.99，或为甲醇或乙腈：水：甲酸=40-85：60-15：0.01-0.5，流动相流速为0.6-1.2ml/min，柱温：20-50℃，蒸发光散射检测器漂移管温度为25-115℃，雾化气体为空气或氮气，气体流速为1.0-4.0L/min；取猪去氧胆酸对照品，加甲醇溶解，摇匀，即得对照品溶液；取清开灵冻干粉，加甲醇-水溶液超声处理5-30分钟，放冷，加甲醇-水溶液溶解，摇匀，滤膜滤过，即得供试品溶液，或取清开灵注射液或大输液，以甲醇-水溶液超声处理5-30分钟，放冷，加甲醇-水溶液溶解，摇匀，滤膜滤过，即得供试品溶液；精密吸取对照品溶液与供试品溶液，注入液相色谱仪测定，按外标两点法对数方程计算含量，该清开灵制剂中，冻干粉中猪去氧胆酸含量应为2.5%-10%、注射液中猪去氧胆酸含量应为1-4mg/ml、大输液中猪去氧胆酸含量应为0.12-1.2mg/ml。

含氮量 取清开灵制剂，照中国药典氮测定法测定，其中冻干粉含氮量为4%-10%、注射液含氮量为1.6-4mg/ml、大输液含氮量为0.18-1.2mg/ml。

与现有技术比较，本发明中，栀子苷的鉴别方法中，我们采用硅胶G薄层板，以醋酸乙酯-丙酮-甲酸-水作为展开剂，其鉴别结果专属性强，斑点显色好，肉眼容易观察；在栀子苷的含量测定方法中，栀子苷对照品采用甲醇溶解，溶解效果好，且所得栀子苷对照品溶液容易保存；另外在产品研究过程中发现，蒸发光散色检测器对于胆酸和猪去氧胆酸的检测具有极大的优越性，是目前检测胆酸和猪去氧胆酸较先进的检测方法，所以本发明中胆酸和猪去氧胆酸的含量测定方法中采用高效液相色谱法，使用蒸发光散色检测器，其检测结果准确；本发明还对清开灵制剂中所含氮气进行含量测定，作为控制清开灵制剂中氨基酸含量的指标；同时，本发明还对清开灵注射制剂的不溶性微粒、PH值、蛋白质、鞣质、树脂、草酸盐、重金属、砷盐、钾离子、异常毒性、溶血与凝聚、钡离子、炽灼残渣检查、水分等项目进行检查，有效控制清开灵中制剂中杂质的含量，避免不良反应产生，故用本发明方法控制

清开灵制剂的质量，不仅鉴别方法专属性强，含量测定方法重现性好；同时，本发明检查方法全面，能有效避免药物不良反应产生，含量测定项目能确保药物的疗效，达到了有效控制药物的质量的发明目的。

具体实施例：

本发明实施例1：本发明所述冻干粉的质量控制方法为：

性状：产品为浅黄色至棕黄色疏松块状物。

鉴别：取市售清开灵冻干粉200mg加水10ml溶解，取1ml加新制的糠醛溶液（1→100）2ml与硫酸溶液（取硫酸50ml，加水50ml，混合）10ml，混匀，在60℃水浴中加热，溶液显灰紫色。

检查：

不溶性微粒 取清开灵冻干粉200mg加净化水50ml使溶解，用净化水做空白，照中国药典2005年版一部附录“不溶性微粒检查法”第一法测定，应符合规定。

PH值 取清开灵冻干粉200mg加水10ml使溶解，测其PH值，其PH值应为5.0～8.0。

蛋白质 取清开灵冻干粉200mg加水10ml使溶解，取1ml置试管中，滴加鞣酸试液2-5滴，不得产生浑浊。

鞣质 取清开灵冻干粉200mg加水1ml使溶解，取1ml，加新配制的含5%鸡蛋清的生理盐水1ml，放置5分钟，不得出现浑浊或沉淀。

树脂 取清开灵冻干粉200mg加水1ml使溶解，取上述溶液5ml，置分液漏斗中，加氯仿5ml振摇提取，分取氯仿液，蒸干，残渣加冰醋酸1ml使溶解，置具塞试管中，加水1ml，混匀，放置20分钟，应无絮状物析出。

草酸盐 取清开灵冻干粉200mg加水10ml使溶解，取上述溶液5ml，用稀盐酸调节PH值至1～3，30℃保温20分钟，保温滤去沉淀，调节PH值至4～6，取5ml，加5%氯化钙溶液1～3滴，放置20分钟，不得出现浑浊或沉淀。

重金属 取清开灵冻干粉200mg加水1ml使溶解，吸取1ml，蒸干，缓缓烘至约完全灰化，放冷，对照管取标准铅溶液1ml，照中国药典2005年版一部附录“重金属检查法”第二法测定，1ml水溶液中含重金属不得过百万分之十。

砷盐 取清开灵冻干粉200mg加水10ml使溶解，分别吸取1ml，蒸干，加1%硝酸镁乙醇溶液5ml，点燃，燃尽后，先用小火炽灼使炭化，再在500～600℃炽灼至完全灰化，放冷，加盐酸10ml与水30ml使溶解，照中国药典2005年版一部附录“砷盐检查法”第一法测定，1ml水溶液中含砷量不得过百万分之二。

异常毒性 取清开灵冻干粉加氯化钠注射液制成每1ml中含50mg的溶液，照中国药典2005年版二部附录“异常毒性检查法”检查，按静脉注射法给药，应符合规定。

取清开灵冻干粉200mg用注射用水10ml注射用水溶解，滴加30-50滴0.01%的CaCl₂溶液，不得出现混浊或沉淀。

水分 取冻干粉，照中国药典2005年版一部附录“水分测定法”第三法测定，不得过5.0%。

其他 应符合中国药典2005年版一部附录注射剂项下有关的各项规定。

含量测定：

栀子苷 照高效液相色谱法测定。

色谱条件和系统适用性试验 色谱柱为C₄柱，以乙腈：水=20:80为流动相，流速为0.6ml/min，柱温：20℃，检测波长为350nm；理论塔板数按栀子苷峰计算应不低于1500。

对照品溶液的制备 精密称取栀子苷对照品，加甲醇溶解制成每1ml含30 μg的对照品溶液，摇匀，即得。

供试品溶液的制备 取清开灵冻干粉30mg，加80%甲醇溶解并稀释至5ml，摇匀，用0.45 μm滤膜滤过，即得。

测定法 精密吸取对照品溶液与供试品溶液各10 μl，注入液相色谱仪，测定，清开灵冻干粉中栀子苷含量应不得少于0.8%。

绿原酸 照高效液相色谱法测定。

色谱条件与系统适用性试验 色谱柱为C₈柱，以甲醇：0.2%磷酸=5：95为流动相，流速为0.6ml/min，柱温：50℃，检测波长为245nm；理论塔板数按绿原酸峰计算应不低于1000。

对照品溶液的制备 精密称取绿原酸对照品，加20%甲醇溶解制成每1ml含绿原酸10 μg的溶液，摇匀，即得。

供试品溶液的制备 取清开灵冻干粉200mg，加20%甲醇溶解并稀释至5ml，摇匀，0.45 μm滤膜滤过，即得。

测定法 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各5 μl，注入液相色谱仪，测定，清开灵冻干粉中绿原酸含量应不得少于0.4%。

黄芩苷 照高效液相色谱法测定。

色谱条件与系统适用性试验 色谱柱为C₄柱，以甲醇：0.4%磷酸=30:70为流动相，流速为0.8ml/min，柱温：35℃，检测波长为285nm；理论塔板数按黄芩苷峰计算应不低于2500。

对照品溶液的制备 精密称取黄芩苷对照品，加甲醇溶解制成每1ml含黄芩苷100 μg的

溶液，摇匀，即得。

供试品溶液的制备 取清开灵冻干粉15mg，用60%甲醇溶液溶解并稀释至20ml，摇匀，0.45 μm滤膜滤过，即得供试品溶液。

测定法 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各5 μl，注入液相色谱仪测定，清开灵冻干粉中黄芩苷含量应为5%~17.5%。

胆酸 照高效液相色谱法测定。

色谱条件与系统适用性试验 色谱柱为C4柱，乙腈：水：冰醋酸=85：15：0.99为流动相；流速为0.8ml/min，柱温：40℃，蒸发光散射检测器漂移管温度为75℃，雾化气体为氮气，气体流速为3.0L/min，理论塔板数按胆酸峰计算应不低于2000。

对照品溶液的制备 取胆酸对照品，加甲醇溶解制成每1ml含0.2mg的对照品溶液，摇匀，即得。

供试品溶液的制备 取清开灵冻干粉20mg，加10%甲醇溶液5ml超声处理20分钟，放冷，加70%甲醇稀释至5ml，摇匀，0.45 μm滤膜滤过，即得供试品溶液。

测定法 分别精密吸取对照品溶液10 μl、20 μl与供试品溶液10 μl，注入液相色谱仪，测定，按外标两点法对数方程计算含量，清开灵冻干粉中胆酸含量应为2.5%-10%。

含氮量 取清开灵冻干粉，照中国药典2005年版一部附录“含氮量”第二法测定，冻干粉含氮量为4%-10%。

所述清开灵冻干粉为贵州益佰制药股份有限公司生产。

本发明实施例2：本发明所述注射液的质量控制方法为：

性状：产品为棕黄色或棕红色的澄明液体；

鉴别：取清开灵注射液1ml，加新制的糠醛溶液（1→100）1ml与硫酸溶液（取硫酸10ml，加水15ml，混合）10ml，混匀，在50℃水浴中加热，溶液显灰紫色。

检查：

PH值 取清开灵注射液，测其PH值，其PH值应为6.0~9.0。

蛋白质 取清开灵注射液1ml置试管中，滴加鞣酸试液1-3滴，不得产生浑浊。

鞣质 取清开灵注射液1ml，加新配制的含3%鸡蛋清的生理盐水7ml，放置15分钟，不得出现浑浊或沉淀。

草酸盐 取清开灵注射液5ml，用稀盐酸调节PH值至2~3，70℃保温5分钟，保温滤去沉淀，调节PH值至5~7，取1ml，加1%氯化钙溶液3~5滴，放置5分钟，不得出现浑浊或沉淀。

钾离子 取清开灵注射液1ml，蒸干，照中国药典2005年版一部附录“注射剂有关物质

检查法”测定，应符合规定。

异常毒性 取清开灵注射液，照中国药典2005年版二部附录“异常毒性检查法”检查，按静脉注射法给药，应符合规定。

取清开灵注射液1ml，滴加1-10滴0.2%的Ca(OH)₂溶液，不得出现混浊或沉淀。

炽灼残渣检查 取清开灵注射液1ml，照中国药典2005年版一部附录“炽灼残渣检查法”测定，应小于2%。

其他 应符合中国药典2005年版一部附录注射剂项下有关的各项规定。

含量测定：

栀子苷 照高效液相色谱法测定。

色谱条件和系统适用性试验 色谱柱为C18柱，以乙腈：水=40:60为流动相，流速为1.2ml/min，柱温：50℃，检测波长为350nm；理论塔板数按栀子苷峰计算应不低于1500。

对照品溶液的制备 精密称取栀子苷对照品，加甲醇溶解制成每1ml含100 μg的对照品溶液，摇匀，即得。

供试品溶液的制备 取清开灵注射液20ml，置分液漏斗中，用氯仿提取三次，每次20ml，合并氯仿提取液，置水浴上蒸干，放冷，残渣加20%甲醇溶解并稀释至10ml，摇匀，用0.45 μm滤膜滤过，即得。

测定法 精密吸取对照品溶液与供试品溶液各5 μl，注入液相色谱仪，测定，清开灵注射液中栀子苷含量应不得少于0.4mg/ml。

黄芩苷 照高效液相色谱法测定。

色谱条件与系统适用性试验 色谱柱为C4柱，以甲醇：0.3%磷酸=10:90为流动相，流速为0.6ml/min，柱温：20℃，检测波长为205nm；理论塔板数按黄芩苷峰计算应不低于2500。

对照品溶液的制备 精密称取黄芩苷对照品，加甲醇溶解制成每1ml含黄芩苷40 μg的溶液，摇匀，即得。

供试品溶液的制备 取清开灵注射液20ml，以乙酸乙酯20ml和甲醇5ml的混合溶液超声处理10分钟，提取液蒸干，残渣加20%甲醇溶液溶解，0.45 μm滤膜滤过，即得供试品溶液；

测定法 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各10 μl，注入液相色谱仪测定，清开灵注射液中黄芩苷含量应为2~7mg/ml。

绿原酸 照高效液相色谱法测定。

色谱条件与系统适用性试验 色谱柱为C4柱，以乙腈：0.5%磷酸=25:75为流动相，流速为1.2ml/min，柱温：20℃，检测波长为600nm；理论塔板数按绿原酸峰计算应不低于

1500。

对照品溶液的制备 精密称取绿原酸对照品，加70%甲醇溶解制成每1ml含绿原酸30 μ g的溶液，摇匀，即得。

供试品溶液的制备 取清开灵注射液5ml，先置水浴上蒸干，放冷，残渣加70%甲醇溶解并稀释至5ml，摇匀，0.45 μ m滤膜滤过，即得。

测定法 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各5 μ l，注入液相色谱仪，测定，清开灵注射液中绿原酸含量应不得少于0.15mg/ml。

胆酸 照高效液相色谱法测定。

色谱条件与系统适用性试验 色谱柱为C4柱，甲醇：水=75：25为流动相；流速为0.6ml/min，柱温：20℃，蒸发光散射检测器漂移管温度为25℃，雾化气体为氮气，气体流速为1.0L/min，理论塔板数按胆酸峰计算应不低于2000。

对照品溶液的制备 取胆酸对照品，加甲醇溶解制成每1ml含1mg的对照品溶液，摇匀，即得。

供试品溶液的制备 取清开灵注射液5ml，加20%甲醇溶液5ml超声处理15分钟，放冷，加80%甲醇稀释至10ml，摇匀，0.45 μ m滤膜滤过，即得供试品溶液。

测定法 分别精密吸取对照品溶液5 μ l、10 μ l与供试品溶液5 μ l，注入液相色谱仪，测定，按外标两点法对数方程计算含量，清开灵注射液中胆酸含量应为1-4mg/ml。

猪去氧胆酸 照高效液相色谱法测定。

色谱条件与系统适用性试验 色谱柱为C4柱，乙腈：水=85：15为流动相；流速为0.6ml/min，柱温：20℃，蒸发光散射检测器漂移管温度为25℃，雾化气体为空气，气体流速为4.0L/min，理论塔板数按胆酸峰计算应不低于2000。

对照品溶液的制备 取猪去氧胆酸对照品，加甲醇溶解制成每1ml含2mg的对照品溶液，摇匀，即得。

供试品溶液的制备 取清开灵注射液2ml，加10%甲醇溶液5ml超声处理15分钟，放冷，加70%甲醇稀释至5ml，摇匀，0.45 μ m滤膜滤过，即得供试品溶液。

测定法 分别精密吸取对照品溶液5 μ l、10 μ l与供试品溶液5 μ l，注入液相色谱仪，测定，按外标两点法对数方程计算含量，清开灵注射液中猪去氧胆酸含量应为1-4mg/ml。

所述清开灵注射液为石家庄神威药业生产。

本发明实施例3：本发明所述大输液的质量控制方法为：

性状：产品为黄色至棕黄色的澄明液体。

鉴别：取大输液200ml，置水浴上蒸干，放冷，残渣加乙醇2.5ml使溶解，取上清液即得供试品溶液；另取栀子苷对照品，加乙醇制成每1ml含10mg的溶液，作为对照品溶液；吸取对照品溶液和供试品溶液各10 μ l，分别点于同一硅胶G薄层板上，以磷酸—丙酮—甲酸—水=10：2：0.5：2为展开剂，展开，取出，晾干，喷以10%硫酸乙醇溶液，在105℃烘约15分钟。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。

检查：

不溶性微粒 取大输液，照中国药典2005年版一部附录“不溶性微粒检查法”第一法测定，应符合规定。

树脂 取清开灵大输液5ml，置分液漏斗中，加氯仿10ml振摇提取，分取氯仿液，蒸干，残渣加冰醋酸3ml使溶解，置具塞试管中，加水4ml，混匀，放置40分钟，应无絮状物析出。

草酸盐 取清开灵大输液5ml，用稀盐酸调节PH值至1~2，50℃保温10分钟，保温滤去沉淀，调节PH值至5~6，取2ml，加3%氯化钙溶液2~3滴，放置10分钟，不得出现浑浊或沉淀。

重金属 取清开灵大输液2ml，蒸干，缓缓烘至约完全灰化，放冷，对照管取标准铅溶液1ml，照中国药典2005年版一部附录“重金属检查法”第二法测定，1ml水溶液中含重金属不得过百万分之十。

砷盐 取清开灵大输液1ml，蒸干，加5%硝酸镁乙醇溶液1ml，点燃，燃尽后，先用小火炽灼使炭化，再在500~600℃炽灼至完全灰化，放冷，加盐酸1ml与水10ml使溶解，照中国药典2005年版一部附录“砷盐检查法”第一法测定，1ml水溶液中含砷量不得过百万分之二。

溶血与凝聚 2%红细胞混悬液的制备 取兔血或羊血数毫升，放入盛有玻璃珠的锥形瓶中，振摇5分钟，除去纤维蛋白原，使成脱纤血，加5倍量的生理氯化钠溶液洗涤1~3次，至上清液不显红色为止，将所得红细胞用生理氯化钠溶液配成2%的混悬液，即得。

试 管 编 号	1	2	3	4	5	6
2%红血球混悬液/ml	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
生理氯化钠溶液/ml	2.0	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5
药液/ml	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.0

试验方法 取试管6支，按上表中配比量依次加入2%红细胞混悬液和生理氯化钠溶液，混匀后，于37℃恒温箱中放置10分钟，分别加入不同量的药液，第6管为对照管；摇匀后，置

37℃恒温箱中，开始每隔15分钟观察1次，1小时后，每隔1小时观察1次，共观察2小时。

按上法检查，以第3管为准，本品在2小时内不得出现溶血和红细胞凝聚。

钡离子 取铂丝，用盐酸湿润后，蘸取清开灵大输液，在无色火焰中燃烧，火焰未显黄绿色，通过绿色玻璃透视，火焰未显蓝色。

取清开灵大输液10ml，滴加10-30滴0.15%的CaCl₂溶液，不得出现混浊或沉淀。

其他 应符合中国药典2005年版一部附录注射剂项下有关的各项规定。

含量测定：

绿原酸 照高效液相色谱法测定。

色谱条件与系统适用性试验 色谱柱为C18柱，以甲醇：0.7%磷酸=20：80为流动相，流速为1.0ml/min，柱温：40℃，检测波长为500nm；理论塔板数按绿原酸峰计算应不低于1000。

对照品溶液的制备 精密称取绿原酸对照品，加85%甲醇溶解制成每1ml含绿原酸50 μg的溶液，摇匀，即得。

供试品溶液的制备 取清开灵大输液20ml，先置水浴上蒸干，放冷，残渣加50%甲醇溶解并稀释至5ml，摇匀，0.45 μm滤膜滤过，即得。

测定法 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各20 μl，注入液相色谱仪，测定，清开灵大输液中绿原酸含量应不得少于0.018mg/ml。

猪去氧胆酸 照高效液相色谱法测定。

色谱条件与系统适用性试验 色谱柱为C8柱，甲醇：水：甲酸=40：60：0.01为流动相；流速为1.2ml/min，柱温：50℃，蒸发光散射检测器漂移管温度为115℃，雾化气体为氮气，气体流速为1.0L/min，理论塔板数按胆酸峰计算应不低于2000。

对照品溶液的制备 取猪去氧胆酸对照品，加甲醇溶解制成每1ml含1mg的对照品溶液，摇匀，即得。

供试品溶液的制备 取清开灵大输液20ml，加3%甲醇溶液10ml超声处理5分钟，放冷，加20%甲醇稀释至10ml，摇匀，0.45 μm滤膜滤过，即得供试品溶液。

测定法 分别精密吸取对照品溶液5 μl、10 μl与供试品溶液5 μl，注入液相色谱仪，测定，按外标两点法对数方程计算含量，清开灵大输液中猪去氧胆酸含量应为0.12-1.2mg/ml。

含氮量 取清开灵大输液，照中国药典2005年版一部附录“含氮量”第二法测定，大输液含氮量为0.18-1.2mg/ml。

所述清开灵大输液按照已经申请的专利，名称为：清开灵冻干粉制剂的制备方法，申请号：200510003126.5 所述方法制备。

本发明实施例4：本发明所述冻干粉的质量控制方法为：

性状：产品为浅黄色至棕黄色疏松块状物。

鉴别：取冻干粉的内容物200mg，加乙醇5ml使溶解，取上清液即得供试品溶液；另取栀子苷对照品，加乙醇制成每1ml含1mg的溶液，作为对照品溶液。吸取对照品溶液和供试品溶液各10 μ l，分别点于同一硅胶G薄层板上，以醋酸乙酯—丙酮—甲酸—水=2：10：1：0.5为展开剂，展开，取出，晾干，喷以10%硫酸乙醇溶液，在105℃烘约10分钟。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。

检查：

不溶性微粒 取清开灵冻干粉200mg加净化水100ml使溶解，用净化水做空白，照中国药典2005年版一部附录“不溶性微粒检查法”第一法测定，应符合规定。

蛋白质 取清开灵冻干粉200mg加水1ml使溶解，取1ml置试管中，滴加鞣酸试液1-5滴，不得产生浑浊。

鞣质 取清开灵冻干粉200mg加水10ml使溶解，取1ml，加新配制的含2%鸡蛋清的生理盐水10ml，放置20分钟，不得出现浑浊或沉淀。

树脂 取清开灵冻干粉200mg加水10ml使溶解，分别取上述溶液5ml，置分液漏斗中，加氯仿20ml振摇提取，分取氯仿液，蒸干，残渣加冰醋酸5ml使溶解，置具塞试管中，加水5ml，混匀，放置50分钟，应无絮状物析出。

重金属 取清开灵冻干粉200mg加水10ml使溶解，分别吸取1ml，蒸干，缓缓烘至约完全灰化，放冷，对照管取标准铅溶液1ml，照中国药典2005年版一部附录“重金属检查法”第二法测定，1ml水溶液中含重金属不得过百万分之十。

钾离子 取清开灵冻干粉200mg加水10ml使溶解，分别吸取5ml，蒸干，照中国药典2005年版一部附录“注射剂有关物质检查法”测定，应符合规定。

溶血与凝聚 2%红细胞混悬液的制备 取兔血或羊血数毫升，放入盛有玻璃珠的锥形瓶中，振摇20分钟，除去纤维蛋白原，使成脱纤血，加20倍量的生理氯化钠溶液洗涤3~5次，至上清液不显红色为止，将所得红细胞用生理氯化钠溶液配成2%的混悬液，即得。

试 管 编 号	1	2	3	4	5	6
2%红血球混悬液/ml	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
生理氯化钠溶液/ml	2.0	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5
药液/ml	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.0

试验方法 取试管6支,按上表中配比量依次加入2%红细胞混悬液和生理氯化钠溶液,混匀后,于37℃恒温箱中放置60分钟,分别加入不同量的药液,其中冻干粉取200mg,用生理氯化钠溶液溶解并稀释成40ml,第6管为对照管;摇匀后,置37℃恒温箱中,开始每隔15分钟观察1次,1小时后,每隔1小时观察1次,共观察2小时。

按上法检查,以第3管为准,本品在2小时内不得出现溶血和红细胞凝聚。

钡离子 取清开灵冻干粉200mg用注射用水1ml溶解,取药液,滴加稀硫酸,即生成白色沉淀,分离,沉淀在盐酸或硝酸中均溶解。

炽灼残渣检查 取清开灵冻干粉200mg用10ml注射用水溶解,分别取药液5ml,照中国药典2005年版一部附录“炽灼残渣检查法”测定,应小于2%。

水分 取冻干粉,照中国药典2005年版一部附录“水分测定法”第三法测定,不得过5.0%。

其他 应符合中国药典2005年版一部附录注射剂项下有关的各项规定。

含量测定:

栀子苷 照高效液相色谱法测定。

色谱条件和系统适用性试验 色谱柱为C8柱,以甲醇:水=25:75为流动相,流速为0.8ml/min,柱温:30℃,检测波长为300nm;理论塔板数按栀子苷峰计算应不低于1500。

对照品溶液的制备 精密称取栀子苷对照品,加甲醇溶解制成每1ml含80 μg的对照品溶液,摇匀,即得。

供试品溶液的制备 取清开灵冻干粉50mg,加40%甲醇溶解并稀释至5ml,摇匀,用0.45 μm滤膜滤过,即得。

测定法 精密吸取对照品溶液与供试品溶液各10 μl,注入液相色谱仪,测定,清开灵冻干粉中栀子苷含量应不得少于0.8%。

黄芩苷 照高效液相色谱法测定。

色谱条件与系统适用性试验 色谱柱为C8柱,以甲醇:0.5%磷酸=40:60为流动相,流速为1.2ml/min,柱温:50℃,检测波长为350nm;理论塔板数按黄芩苷峰计算应不低于2500。

对照品溶液的制备 精密称取黄芩苷对照品,加甲醇溶解制成每1ml含黄芩苷100 μg的

溶液，摇匀，即得。

供试品溶液的制备 取清开灵冻干粉50mg，用80%甲醇溶液溶解并稀释至50ml，摇匀，0.45 μm滤膜滤过，即得供试品溶液。

测定法 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各10 μl，注入液相色谱仪测定，清开灵冻干粉中黄芩苷含量应为5%~17.5%。

胆酸 照高效液相色谱法测定。

色谱条件与系统适用性试验 色谱柱为C8柱，甲醇：水：甲酸=75：25：0.01为流动相；流速为1.2ml/min，柱温：50℃，蒸发光散射检测器漂移管温度为115℃，雾化气体为空气，气体流速为4.0L/min，理论塔板数按胆酸峰计算应不低于2000。

对照品溶液的制备 取胆酸对照品，加甲醇溶解制成每1ml含0.3mg的对照品溶液，摇匀，即得。

供试品溶液的制备 取清开灵冻干粉100mg，加50%甲醇溶液10ml超声处理5min，放冷，加50%甲醇稀释至5ml，摇匀，0.45 μm滤膜滤过，即得供试品溶液。

测定法 分别精密吸取对照品溶液5 μl、10 μl与供试品溶液5 μl，注入液相色谱仪，测定，按外标两点法对数方程计算含量，清开灵冻干粉中胆酸含量应为2.5%~10%。

所述清开灵冻干粉按照已经申请的专利，名称为：清开灵冻干粉制剂的制备方法，申请号：200510003126.5 所述方法生产。

本发明实施例5：所述清开灵注射制剂的质量控制方法为：

性状：

对于冻干粉：产品为浅黄色至棕黄色疏松块状物。

对于注射液：产品为棕黄色或棕红色的澄明液体。

对于大输液：产品为黄色至棕黄色的澄明液体。

鉴别：

(1) 分别取清开灵冻干粉、注射液或大输液，冻干粉200mg加水5ml溶解，取0.5ml加新制的糠醛溶液（1→100）1ml与硫酸溶液（取硫酸50ml，加水65ml，混合）10ml，混匀，在70℃水浴中加热，溶液显灰紫色。

(2) 取清开灵冻干粉、注射液或大输液，其中冻干粉供试品溶液的制备方法为：取冻干粉的内容物400mg，加乙醇2.5ml使溶解，取上清液即得；注射液或大输液供试品溶液的制备方法为：取注射液5ml或大输液50ml，置水浴上蒸干，放冷，残渣加乙醇1.25ml使溶解，取上清液即得。另取栀子苷对照品，加乙醇制成每1ml含4mg的溶液，作为对照品溶液。吸取

对照品溶液和供试品溶液各5 μ l, 分别点于同一硅胶G薄层板上, 以醋酸乙酯-丙酮-甲酸-水=5: 5: 1: 1为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以10%硫酸乙醇溶液, 在105℃烘约10分钟。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。

检查:

不溶性微粒 取清开灵冻干粉、注射液或大输液, 冻干粉200mg加净化水80ml使溶解, 用净化水做空白, 照中国药典2005年版一部附录“不溶性微粒检查法”第一法测定, 应符合规定。

PH值 取清开灵冻干粉、注射液或大输液, 冻干粉200mg加水5ml使溶解, 分别测其PH值, 其PH值均应为6.5~8.0。

蛋白质 取清开灵冻干粉、注射液或大输液, 冻干粉200mg加水5ml使溶解, 分别取1ml置试管中, 滴加鞣酸试液1-3滴, 不得产生浑浊。

鞣质 取清开灵冻干粉、注射液或大输液, 冻干粉200mg加水5ml使溶解, 取1ml, 加新配制的含1%鸡蛋清的生理盐水5ml, 放置10分钟, 不得出现浑浊或沉淀。

树脂 取清开灵冻干粉、注射液或大输液, 冻干粉200mg加水5ml使溶解, 分别取上述溶液5ml, 置分液漏斗中, 加氯仿10ml振摇提取, 分取氯仿液, 蒸干, 残渣加冰醋酸2ml使溶解, 置具塞试管中, 加水3ml, 混匀, 放置30分钟, 应无絮状物析出。

草酸盐 取清开灵冻干粉、注射液或大输液, 冻干粉200mg加水5ml使溶解, 分别取上述溶液5ml, 用稀盐酸调节PH值至1~2, 50℃保温10分钟, 保温滤去沉淀, 调节PH值至5~6, 取2ml, 加3%氯化钙溶液2~3滴, 放置10分钟, 不得出现浑浊或沉淀。

重金属 取清开灵冻干粉、注射液或大输液, 冻干粉200mg加水5ml使溶解, 分别吸取1ml, 蒸干, 缓缓烘至约完全灰化, 放冷, 对照管取标准铅溶液1ml, 照中国药典2005年版一部附录“重金属检查法”第二法测定, 1ml水溶液中含重金属不得过百万分之十。

砷盐 取清开灵冻干粉、注射液或大输液, 冻干粉200mg加水5ml使溶解, 分别吸取1ml, 蒸干, 加2%硝酸镁乙醇溶液3ml, 点燃, 燃尽后, 先用小火炽灼使炭化, 再在500~600℃炽灼至完全灰化, 放冷, 加盐酸5ml与水21ml使溶解, 照中国药典2005年版一部附录“砷盐检查法”第一法测定, 1ml水溶液中含砷量不得过百万分之二。

钾离子 取清开灵冻干粉、注射液或大输液, 冻干粉200mg加水5ml使溶解, 分别吸取2ml, 蒸干, 照中国药典2005年版一部附录“注射剂有关物质检查法”测定, 应符合规定。

异常毒性 取清开灵冻干粉、注射液或大输液, 冻干粉加氯化钠注射液制成每1ml中含40mg的溶液, 照中国药典2005年版二部附录“异常毒性检查法”检查, 按静脉注射法给药,

应符合规定。

溶血与凝聚 2%红细胞混悬液的制备 取兔血或羊血数毫升，放入盛有玻璃珠的锥形瓶中，振摇10分钟，除去纤维蛋白原，使成脱纤血，加约10倍量的生理氯化钠溶液洗涤2~3次，至上清液不显红色为止，将所得红细胞用生理氯化钠溶液配成2%的混悬液，即得。

试 管 编 号	1	2	3	4	5	6
2%红血球混悬液/ml	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
生理氯化钠溶液/ml	2.0	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5
药液/ml	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.0

试验方法 取试管6支，按上表中配比量依次加入2%红细胞混悬液和生理氯化钠溶液，混匀后，于37℃恒温箱中放置30分钟，分别加入不同量的药液，其中冻干粉取200mg，用生理氯化钠溶液溶解并稀释成20ml，第6管为对照管；摇匀后，置37℃恒温箱中，开始每隔15分钟观察1次，1小时后，每隔1小时观察1次，共观察2小时。

按上法检查，以第3管为准，本品在2小时内不得出现溶血和红细胞凝聚。

钡离子 取铂丝，用盐酸湿润后，蘸取清开灵冻干粉、注射液或大输液，在无色火焰中燃烧，火焰未显黄绿色，通过绿色玻璃透视，火焰未显蓝色。

取清开灵冻干粉、注射液或大输液，冻干粉200mg用注射用水5ml注射用水溶解，分别取药液，滴加5~10滴0.1%的CaCl₂溶液或Ca(OH)₂溶液，不得出现混浊或沉淀。

炽灼残渣检查 取清开灵冻干粉、注射液或大输液，冻干粉200mg用5ml注射用水溶解，分别取药液2ml，照中国药典2005年版一部附录“炽灼残渣检查法”测定，应小于2%。

水分 取冻干粉，照中国药典2005年版一部附录“水分测定法”第三法测定，不得过5.0%。

其他 应符合中国药典2005年版一部附录注射剂项下有关的各项规定。

含量测定：

栀子苷 照高效液相色谱法测定。

色谱条件和系统适用性试验 色谱柱为C18柱，以甲醇：水=30:70为流动相，流速为1ml/min，柱温：40℃，检测波长为237nm；理论塔板数按栀子苷峰计算应不低于1500。

对照品溶液的制备 精密称取栀子苷对照品，加甲醇溶解制成每1ml含60μg的对照品溶液，摇匀，即得。

供试品溶液的制备 取清开灵冻干粉30mg，加50%甲醇溶解并稀释至5ml，摇匀，用0.45μm滤膜滤过，即得；或取清开灵注射液0.75ml或清开灵大输液2.5ml，先置水浴上蒸干

，放冷，残渣加50%甲醇溶解并稀释至5ml，摇匀，用0.45 μm滤膜滤过，即得。

测定法 精密吸取对照品溶液与供试品溶液各10 μl，注入液相色谱仪，测定，该清开灵制剂中，冻干粉中栀子苷含量应不得少于0.8%、注射液中栀子苷含量应不得少于0.4mg/ml、大输液中栀子苷含量应不得少于0.04mg/ml。

黄芩苷 照高效液相色谱法测定。

色谱条件与系统适用性试验 色谱柱为C18柱，以乙腈：0.4%磷酸=26:74 为流动相，流速为1ml/min，柱温：40℃，检测波长为277nm；理论塔板数按黄芩苷峰计算应不低于2500。

对照品溶液的制备 精密称取黄芩苷对照品，加甲醇溶解制成每1ml含黄芩苷60 μg的溶液，摇匀，即得。

供试品溶液的制备 取清开灵冻干粉12.5mg，用50%甲醇溶液溶解并稀释至25ml，摇匀，0.45 μm滤膜滤过，即得供试品溶液；或取清开灵注射液1.25ml或清开灵大输液4ml，先置水浴上蒸干，放冷，残渣用50%甲醇溶液溶解并稀释至100ml，摇匀，0.45 μm滤膜滤过，即得。

测定法 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各5 μl，注入液相色谱仪测定，该清开灵制剂中，冻干粉中黄芩苷含量应为5%~17.5%、注射液中黄芩苷含量应为2~7mg/ml、大输液中黄芩苷含量应为0.24~2.1mg/ml。

绿原酸 照高效液相色谱法测定。

色谱条件与系统适用性试验 色谱柱为C18柱，以乙腈：0.4%磷酸=10：90为流动相，流速为1.0ml/min，柱温：40℃，检测波长为327nm；理论塔板数按绿原酸峰计算应不低于1000。

对照品溶液的制备 精密称取绿原酸对照品，加50%甲醇溶解制成每1ml含绿原酸20 μg的溶液，摇匀，即得。

供试品溶液的制备 取清开灵冻干粉150mg，加50%甲醇溶解并稀释至5ml，摇匀，0.45 μm滤膜滤过，即得；或取清开灵注射液3.75ml或大输液12.5ml，先置水浴上蒸干，放冷，残渣加50%甲醇溶解并稀释至5ml，摇匀，0.45 μm滤膜滤过，即得。

测定法 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各10 μl，注入液相色谱仪，测定，该清开灵制剂中，冻干粉中绿原酸含量应不得少于0.4%、注射液中绿原酸含量应不得少于0.15mg/ml、大输液中绿原酸含量应不得少于0.018mg/ml。

胆酸 照高效液相色谱法测定。

色谱条件与系统适用性试验 色谱柱为C18柱，甲醇：水：冰醋酸=80：20：0.01为流动

相；流速为1.0ml/min，柱温：40℃，蒸发光散射检测器漂移管温度为105℃，雾化气体为空气，气体流速为2.2L/min，理论塔板数按胆酸峰计算应不低于2000。

对照品溶液的制备 取胆酸对照品，加甲醇溶解制成每1ml含0.5mg的对照品溶液，摇匀，即得。

供试品溶液的制备 取清开灵冻干粉50mg，加5%甲醇溶液3ml超声处理10分钟，放冷，加50%甲醇稀释至5ml，摇匀，0.45 μm滤膜滤过，即得供试品溶液；或取清开灵注射液1.25ml或大输液10ml，加5%甲醇溶液3ml超声处理10分钟，放冷，加50%甲醇稀释至5ml，摇匀，0.45 μm滤膜滤过，即得供试品溶液。

测定法 分别精密吸取对照品溶液5 μl、10 μl与供试品溶液5 μl，注入液相色谱仪，测定，按外标两点法对数方程计算含量，该清开灵制剂中，冻干粉中胆酸含量应为2.5%-10%、注射液中胆酸含量应为1-4mg/ml、大输液中胆酸含量应为0.12-1.2mg/ml。

猪去氧胆酸 照高效液相色谱法测定。

色谱条件与系统适用性试验 色谱柱为C18柱，甲醇：水：冰醋酸=80：20：0.01为流动相；流速为1.0ml/min，柱温：40℃，蒸发光散射检测器漂移管温度为105℃，雾化气体为空气，气体流速为2.2L/min，理论塔板数按胆酸峰计算应不低于2000。

对照品溶液的制备 取猪去氧胆酸对照品，加甲醇溶解制成每1ml含0.5mg的对照品溶液，摇匀，即得。

供试品溶液的制备 取清开灵冻干粉50mg，加5%甲醇溶液3ml超声处理10分钟，放冷，加50%甲醇稀释至5ml，摇匀，0.45 μm滤膜滤过，即得供试品溶液；或取清开灵注射液1.25ml或大输液10ml，加5%甲醇溶液3ml超声处理10分钟，放冷，加50%甲醇稀释至5ml，摇匀，0.45 μm滤膜滤过，即得供试品溶液。

测定法 分别精密吸取对照品溶液5 μl、10 μl与供试品溶液5 μl，注入液相色谱仪，测定，按外标两点法对数方程计算含量，该清开灵制剂中，冻干粉中猪去氧胆酸含量应为2.5%-10%、注射液中猪去氧胆酸含量应为1-4mg/ml、大输液中猪去氧胆酸含量应为0.12-1.2mg/ml。

含氮量 取清开灵冻干粉、注射液或大输液，照中国药典2005年版一部附录“含氮量”第二法测定，其中冻干粉含氮量为4%-10%、注射液含氮量为1.6-4mg/ml、大输液含氮量为0.18-1.2mg/ml。

所述清开灵制剂按照已经申请的专利，名称为：清开灵冻干粉制剂的制备方法，申请号：200510003126.5 所述方法制备。