

## 醋鳖甲配方颗粒

### Cubieja Peifangkeli

【来源】 本品为鳖科动物鳖 *Trionyx sinensis* Wiegmann 的背甲经炮制并按标准汤剂的主要质量指标加工制成的配方颗粒。

【制法】 取醋鳖甲饮片 6000g，加水煎煮，滤过，滤液浓缩成清膏（干浸膏出膏率为 8.5%~14.0%），加入辅料适量，干燥（或干燥，粉碎），再加入辅料适量，混匀，制粒，制成 1000g，即得。

【性状】 本品为黄白色至浅黄色的颗粒；气微腥，味微咸。

【鉴别】 （1）取本品 1g，研细，加甲醇 20ml，超声处理 30 分钟，滤过，滤液蒸干，残渣加甲醇 2ml 使溶解，作为供试品溶液。另取鳖甲对照药材 3g，加水 50ml，煮沸 30 分钟，滤过，滤液蒸干，残渣加甲醇 20ml，同法制成对照药材溶液。照薄层色谱法（中国药典 2020 年版通则 0502）试验，吸取上述两种溶液各 3 $\mu$ l，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以正丁醇-冰醋酸-水（3:1:1）为展开剂，展开，取出，晾干，喷以茚三酮试液，在 105 $^{\circ}$ C 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。

（2）取本品 0.1g，研细，加 1%碳酸氢铵溶液 50ml，超声处理 30 分钟，用微孔滤膜滤过，取续滤液 1ml，置进样瓶中，加胰蛋白酶溶液 50 $\mu$ l（取序列分析用胰蛋白酶，加 1%碳酸氢铵溶液制成每 1ml 中含 1mg 的溶液，临用时配制），摇匀，37 $^{\circ}$ C 恒温酶解 12 小时，作为供试品溶液。另取醋鳖甲对照饮片 0.1g，同法制成对照饮片溶液。再取鳖源多肽 I 对照品、鳖源多肽 II 对照品适量，精密称定，加 1%碳酸氢铵溶液制成每 1ml 含鳖源多肽 I 3 $\mu$ g、鳖源多肽 II 6 $\mu$ g 的混合溶液，作为对照品溶液。照高效液相色谱-质谱法（中国药典 2020 年版通则 0512 和通则 0431），以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂（柱长为 100mm，内径为 2.1mm，粒径为 1.7 $\mu$ m）；以乙腈为流动相 A，以 0.05%甲酸溶液为流动相 B，按下表中的规定进行梯度洗脱，流速为每分钟 0.35ml；柱温为 40 $^{\circ}$ C。采用质谱检测器，电喷雾正离子模式（ESI $^{+}$ ），进行多反应监测（MRM），选择质荷比（m/z）784.90（双电荷） $\rightarrow$ 872.46 和 m/z 784.90（双电荷） $\rightarrow$ 1028.55；m/z 834.09（三电荷） $\rightarrow$ 743.38 和 m/z 834.09（三电荷） $\rightarrow$ 953.52 作为检测离子对。取对照饮片溶液和对照品溶液，进样 2 $\mu$ l，按上述检测离子对测定的 MRM 色谱峰的信噪比均应大于 3:1。

时间(分钟)	流动相A(%)	流动相B(%)
0~2	8→9	92→91
2~14	9→10	91→90
14~25	10→17	90→83
25~26	17→80	83→20
26~28	80	20

吸取供试品溶液 2 $\mu$ l, 注入高效液相色谱-质谱联用仪, 测定。以质荷比 ( $m/z$ ) 784.90 (双电荷)  $\rightarrow$ 872.46 和  $m/z$  784.90 (双电荷)  $\rightarrow$ 1028.55 离子对提取的供试品离子流色谱中, 应同时呈现与对照饮片色谱保留时间一致的 3 个色谱峰, 其中一个峰应与对照品色谱保留时间一致; 以质荷比  $m/z$  834.09 (三电荷)  $\rightarrow$ 743.38 和  $m/z$  834.09 (三电荷)  $\rightarrow$ 953.52 离子对提取的供试品离子流色谱中, 应同时呈现与对照饮片及对照品色谱保留时间一致的色谱峰。

**【特征图谱】** 照高效液相色谱法(中国药典 2020 年版通则 0512)测定。

**色谱条件与系统适用性试验** 同(含量测定)项。

**参照物溶液的制备** 取鳖甲对照药材 0.1g, 置具塞水解管中, 加 9mol/L 盐酸溶液 10ml, 密塞, 150 $^{\circ}$ C 水解 3 小时, 放冷, 摇匀, 滤过, 取续滤液 5ml, 蒸干, 残渣加 0.1mol/L 盐酸溶液溶解, 转移至 25ml 量瓶中, 加 0.1mol/L 盐酸溶液至刻度, 摇匀, 作为对照药材参照物溶液。另取(含量测定)项下对照品溶液, 作为对照品参照物溶液。

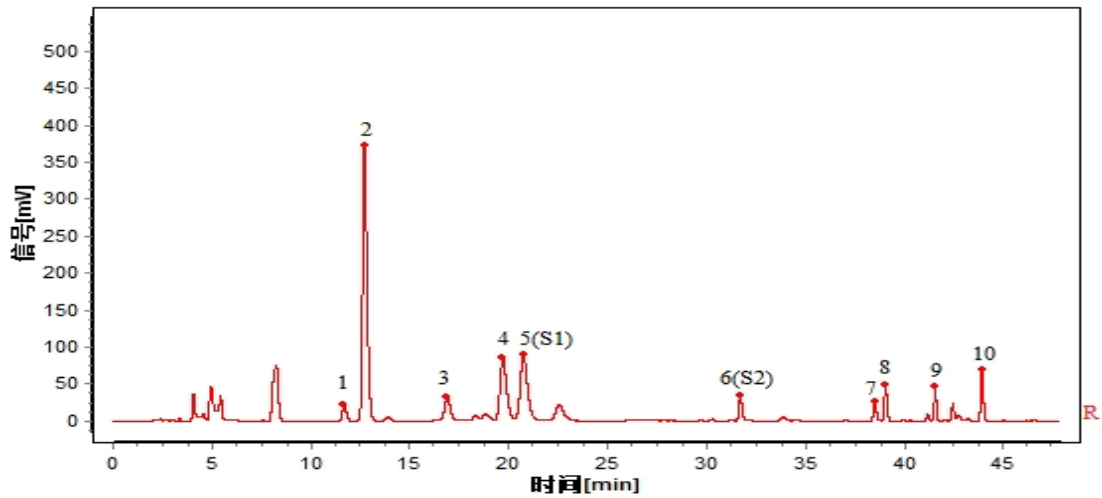
**供试品溶液的制备** 同(含量测定)项。

精密量取上述参照物溶液和供试品溶液各 5ml, 分别置 25ml 量瓶中, 各加 0.1mol/L 异硫氰酸苯酯(PITC)的乙腈溶液 2.5ml, 1mol/L 三乙胺的乙腈溶液 2.5ml, 摇匀, 室温放置 1 小时后, 加 50%乙腈至刻度, 摇匀。取 10ml, 加正己烷 10ml, 振摇, 放置 10 分钟, 取下层溶液, 滤过, 取续滤液, 即得。

**测定法** 分别精密吸取衍生化后的参照物溶液与供试品溶液各 5 $\mu$ l, 注入液相色谱仪, 测定, 即得。

供试品色谱中应呈现 10 个特征峰, 应与对照药材参照物色谱中的 10 个特征峰的保留时间相对应, 其中峰 2、峰 5、峰 6 应分别与相应的对照品参照物峰保留时间相对应, 与脯氨酸对照品参照物峰相对应的峰为 S1 峰, 计算峰 1、峰 3、峰 4 与 S1 峰的相对保留时间; 与缬氨酸对照品参照物峰相对应的峰为 S2 峰, 计算峰 7~10 与 S2 峰的相对保留时间。其相对保留时间应在规定值的 $\pm$ 10%范围之内(必要时采用对照品对照), 规定值为: 0.57(峰 1)、0.81(峰 3)、0.95(峰 4)、1.22(峰 7)、1.24(峰 8)、1.32(峰 9)、1.39(峰 10)。

分别计算峰 3、峰 4 与 S1 峰的相对峰面积，峰 10 与 S2 峰的相对峰面积，其相对峰面积均应在规定的范围之内，规定值为：不得小于 0.18（峰 3）、0.60（峰 4）、1.1（峰 10）。



#### 对照特征图谱

峰 1: 丝氨酸; 峰 2: 甘氨酸; 峰 3: 精氨酸; 峰 4: 丙氨酸; 峰 5 (S1): 脯氨酸;  
峰 6 (S2): 缬氨酸; 峰 7: L-异亮氨酸; 峰 8: 亮氨酸; 峰 9: 苯丙氨酸; 峰 10: L-赖氨酸

色谱柱: Kromasil 100-5 C18, 4.6mm×250mm, 5 $\mu$ m

**【检查】 真菌毒素** 照真菌毒素测定法（中国药典 2020 年版通则 2351）测定。本品每 1000g 含黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 不得过 5 $\mu$ g，含黄曲霉毒素 G<sub>2</sub>、黄曲霉毒素 G<sub>1</sub>、黄曲霉毒素 B<sub>2</sub> 和黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的总量不得过 10 $\mu$ g，赭曲霉毒素 A 不得检出（检出限为 1 $\mu$ g/kg），含伏马毒素 B<sub>1</sub>、伏马毒素 B<sub>2</sub> 总量不得过 200 $\mu$ g。

**土霉素、恩诺沙星** 照高效液相色谱-质谱法（中国药典 2020 年版通则 0512 和通则 0431）测定。

色谱、质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，以含 0.1%甲酸的甲醇-乙腈（2：8）混合溶液为流动相 A，以 0.1%甲酸溶液为流动相 B，按下表中的规定进行梯度洗脱，流速为每分钟 0.3ml，柱温为 35 $^{\circ}$ C。

时间（分钟）	流动相A(%)	流动相B(%)
0~2	5→15	95→85
2~5	15→40	85→60
5~7	40→95	60→5

采用三重四级杆质谱检测器，电喷雾离子化（ESI）正离子模式下多反应监测（MRM），各监测离子对见下表：

编号	中文名称	母离子	子离子	检出限 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	定量限 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
		m/z	m/z		
1	土霉素	461.1	426.2 (定量)	2	10
			443.2 (定性)		
2	恩诺沙星	360.2	316.1 (定量)	2	10
			245.0 (定性)		

**对照品溶液的制备** 取土霉素对照品适量，精密称定，加甲醇制成每 1ml 含 1mg 的溶液，作为土霉素贮备溶液；另取恩诺沙星对照品适量，精密称定，分别加 0.03mol/L 氢氧化钠溶液制成每 1ml 含 1mg 的溶液，作为恩诺沙星贮备溶液。再取上述土霉素、恩诺沙星贮备溶液适量，用甲醇稀释成每 1ml 各含 2ng、10ng、50ng、100ng、250ng、500ng 的系列混合对照品溶液，即得（可根据样品实际情况，制备基质混合对照品溶液）。

**供试品溶液的制备** 取本品适量，研细，取约 1g，精密称定，加 McIlvaine- $\text{Na}_2\text{EDTA}$  缓冲液（取柠檬酸 11.8g、磷酸氢二钠 3.7g、乙二胺四乙酸二钠 35.4g，加水 900ml，用 1mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 至 5，用水稀释至 1000ml）8ml，涡旋 1 分钟，超声处理 20 分钟，离心（转速为每分钟 10000 转）5 分钟，收集上清液。残渣中加磷酸盐缓冲液（取 0.05mol/L 磷酸二氢钠溶液 190ml，用 0.05mol/L 磷酸氢二钠溶液稀释至 1000ml）8ml，重复提取 1 次，合并 2 次提取液，摇匀。取上述溶液，缓慢通过已处理好的 HLB 固相萃取柱[规格：6ml（200mg），依次用甲醇和水各 5ml 洗脱]，依次用水 5ml 和 20% 甲醇水溶液 5ml 淋洗，抽干，用洗脱液（取甲醇 150ml，加乙酸乙酯 150ml、浓氨水 6ml，混匀）10ml 洗脱，收集洗脱液，45℃ 水浴氮气吹干。加入复溶液[取水 40ml，加甲醇 5ml、乙腈 5ml、甲酸 0.05ml，混匀] 1ml，涡旋 1 分钟溶解残余物，离心（转速为每分钟 14000 转）5 分钟，用微孔滤膜（0.22 $\mu\text{m}$ ）滤过，取续滤液，即得。

**测定法** 分别精密吸取上述系列混合对照品溶液各 10 $\mu\text{l}$ ，注入高效液相色谱-质谱仪，测定峰面积，以峰面积为纵坐标，进样浓度为横坐标，绘制标准曲线。另精密吸取上述供试品溶液 10 $\mu\text{l}$ ，注入高效液相色谱-质谱仪，测定峰面积，从标准曲线上读出供试品中相当于土霉素、恩诺沙星的浓度，计算，即得。

本品每 1000g 含土霉素不得过 200 $\mu\text{g}$ ，含恩诺沙星不得过 20 $\mu\text{g}$ 。

**诺氟沙星** 取诺氟沙星对照品适量，精密称定，加 0.03mol/L 氢氧化钠溶液制成每 1ml 含 1mg 的贮备溶液，用甲醇稀释成每 1ml 含 2ng 的溶液，作为对照品溶液。照（检查）土

霉素、恩诺沙星项下色谱、质谱条件，选择质荷比 ( $m/z$ ) 320.1→302.0 和  $m/z$  320.1→233.0 作为检测离子对。分别吸取(检查)土霉素、恩诺沙星项下供试品溶液和上述对照品溶液各 10 $\mu$ l，注入高效液相色谱质谱仪。供试品色谱中，不得检出与对照品色谱保留时间相同的色谱峰，如有检出应小于对照品参照物色谱峰面积。

**其他** 应符合颗粒剂项下有关的各项规定（中国药典 2020 年版通则 0104）。

**【浸出物】** 取本品适量，研细，取约 2g，精密称定，精密加入乙醇 100ml，照醇溶性浸出物测定法（中国药典 2020 年版通则 2201）项下的热浸法测定，不得少于 7.0%。

**【含量测定】** 照高效液相色谱法（中国药典 2020 年版通则 0512）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（柱长为 250mm，内径为 4.6mm，粒径为 5 $\mu$ m）；以乙腈-水（4:1）为流动相 A，以 0.1mol/L 醋酸钠溶液（用醋酸调节 pH 值至 6.5）-乙腈（93:7）为流动相 B，按下表中的规定进行梯度洗脱，流速为每分钟 1.0ml；柱温为 30 $^{\circ}$ C；检测波长为 254nm。理论板数按脯氨酸峰计算应不低于 4000。

时间（分钟）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0~9	0→3	100→97
9~22	3	97
22~23	3→17	97→83
23~32	17→18	83→82
32~38	18→30	82→70
38~45	30→34	70→66
45~47	34→100	66→0

**对照品溶液的制备** 取甘氨酸对照品、脯氨酸对照品、缬氨酸对照品适量，精密称定，加 0.1mol/L 盐酸溶液制成每 1ml 含甘氨酸 540 $\mu$ g、脯氨酸 320 $\mu$ g、缬氨酸 70 $\mu$ g 的混合溶液，即得。

**供试品溶液的制备** 取本品适量，研细，取约 0.2g，精密称定，置具塞水解管中，精密加入 9mol/L 盐酸溶液 10ml，称定重量，密塞，150 $^{\circ}$ C 水解 3 小时，放冷，再称定重量，用 9mol/L 盐酸溶液补足减失重量，摇匀，滤过，精密吸取续滤液 5ml 至蒸发皿中，蒸干，残渣加 0.1mol/L 盐酸溶液溶解，转移至 25ml 量瓶中，加 0.1mol/L 盐酸溶液至刻度，摇匀，即得。

精密量取上述对照品溶液和供试品溶液各 5ml，分别置 25ml 量瓶中，各加 0.1mol/L 异硫氰酸苯酯（PITC）的乙腈溶液 2.5ml，1mol/L 三乙胺的乙腈溶液 2.5ml，摇匀，室温放置 1

小时后，加 50%乙腈至刻度，摇匀。取 10ml，加正己烷 10ml，振摇，放置 10 分钟，取下层溶液，滤过，取续滤液，即得。

**测定法** 分别精密吸取衍生化后的对照品溶液与供试品溶液各 5 $\mu$ l，注入液相色谱仪，测定，即得。

本品每 1g 含甘氨酸（ $C_2H_5NO_2$ ）应为 110.0mg~190.0mg，含脯氨酸（ $C_5H_9NO_2$ ）应为 56.0mg~100.0mg，含缬氨酸（ $C_5H_{11}NO_2$ ）应为 10.0mg~23.5mg。

**【规格】** 每 1g 配方颗粒相当于饮片 6g

**【贮藏】** 密封。

饮片标准