

酒乌梢蛇配方颗粒

Jiuwushaoshe Peifangkeli

【来源】 本品为游蛇科动物乌梢蛇 *Zaocys dhumnades* (Cantor) 的干燥体经炮制加工并按标准汤剂的主要质量指标加工制成的配方颗粒。

【制法】 取酒乌梢蛇饮片 3500g，加水煎煮，滤过，滤液浓缩成清膏（干浸膏出膏率为 14.5%~23%），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】 本品为浅黄色至棕黄色的颗粒；气腥，味淡。

【鉴别】 （1）取本品 0.5g，研细，加甲醇 10ml，超声处理 30 分钟，滤过，作为供试品溶液。取乌梢蛇对照药材 1.0g，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，吸取供试品溶液 2 μ l、对照药材溶液 8 μ l，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以正丁醇-乙醇-冰醋酸-水（4:1:1:0.2）为展开剂，展开，取出，晾干，喷以茚三酮试液，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。

（2）聚合酶链式反应法。

模板 DNA 提取 取本品 1g，充分研磨使成粉末，取 100mg，置 2.0ml 离心管中，加入 CTAB 沉淀液[2%十六烷基三甲基溴化铵，100mmol/l Tris-盐酸 pH=8.0，20mmol/l 乙二胺四乙酸二钠 pH=8.0]1.2ml，涡旋震荡，65℃水浴加热 1 小时（中间震荡混匀 2~3 次），离心（转速为每分钟 12000 转）5 分钟，弃去上清液；再加入 CTAB 沉淀液 1.2ml，涡旋震荡，65℃水浴加热 30 分钟（中间震荡混匀 2~3 次），离心（转速为每分钟 12000 转）5 分钟，弃去上清液，加入 CTAB 提取液[2%十六烷基三甲基溴化铵，100mmol/l Tris-盐酸 pH=8.0，20mmol/l 乙二胺四乙酸二钠 pH=8.0，2.5mol/l 氯化钠，2%PVP40]1.2ml、蛋白酶 K（20mg/ml）10 μ l 和 β -巯基乙醇 10 μ l，涡旋震荡混匀，56℃水浴加热过夜（中间翻转混匀 3~5 次），取出，离心（转速为每分钟 12000 转）10 分钟，吸取上清液置另一 2.0ml 离心管中，加入三氯甲烷-异戊醇（体积比 24：1）溶液（约 800 μ l），充分混匀，4℃离心（转速为每分钟 12000 转）10 分钟；吸取上清液置另一 2.0ml 离心管中，加入等体积的三氯甲烷-异戊醇（体积比 24：1）溶液（约 900 μ l），充分混匀，4℃离心（转速为每分钟 12000 转）10 分钟；吸取上清液，加入等体积的三氯甲烷-异戊醇（体积比 24：1）溶液（约 800 μ l），充分混匀，4℃离心（转速为每分钟 12000 转）10 分钟；吸取上清液置另一 1.5ml 离心管中，加入等体积异丙醇（约

500μl), 在零下 20℃静置 60~90 分钟; 离心(转速为每分钟 12000 转) 5 分钟, 弃上清液; 沉淀用 75%乙醇 700μl 震荡 1 分钟, 离心(转速为每分钟 12000 转) 3 分钟, 弃上清液; 再同法操作两次; 沉淀再用无水乙醇 700μl 震荡 1 分钟, 离心(转速为每分钟 12000 转) 3 分钟, 弃上清液; 置 37℃下金属浴挥干溶剂, 加灭菌水 50μl 使溶解, 作为供试品溶液, 置 4℃保存或置零下 20℃长期保存。

另取乌梢蛇对照药材适量, 充分研磨使成细粉, 取 100mg, 置 2.0ml 离心管中, 加入消化液[细胞核裂解液 200μl, 0.5mol/l 乙二胺四醋酸二钠溶液 50μl, 蛋白酶 K (20mg/ml) 20μl, RNA 酶溶液 5μl]275μl, 在 56℃水浴加热 2 小时, 加入裂解缓冲液 250μl, 混匀, 加到 DNA 纯化柱中, 离心(转速为每分钟 10000 转) 3 分钟; 弃去过滤液, 加入洗脱液[5mol/l 醋酸钾溶液 26μl, 1mol/l Tris-盐酸溶液 (pH=7.5) 18μl, 0.5mol/l 乙二胺四醋酸二钠溶液 (pH=8.0) 3μl, 无水乙醇 480μl, 灭菌双蒸水 273μl]800μl, 离心(转速为每分钟 10000 转) 1 分钟; 弃去过滤液, 用上述洗脱液反复洗脱 3 次, 每次离心(转速为每分钟 10000 转) 1 分钟; 弃去过滤液, 再离心(转速为每分钟 10000 转) 2 分钟, 将 DNA 纯化柱转移入另一离心管中, 加入无菌双蒸水 50μl, 室温放置 2 分钟后, 离心(转速为每分钟 10000 转) 2 分钟, 取上清液, 作为供试品溶液, 置零下 20℃保存备用。

PCR 反应 鉴别引物: 上游 5'-GCGAAAGCTCGACCTAGCAAGGGGACCACA-3' 和下游 5'-CAGGCTCCTCTAGGTTGTTATGGGGTACCG-3'。PCR 反应体系: 在 100μl 离心管中进行, 反应总体积为 25μl, 反应体系包括 10×Fast Buffer (Mg²⁺+plus) 2.5μl, dNTP(2.5mmol/l) 2μl, 鉴别引物 (10μmol/l) 各 0.3μl, SpeedSTAR DNA 聚合酶 0.3μl, 模板 (100~400ng) 1μl, 灭菌水 18.6μl。将离心管置 PCR 仪上, PCR 反应参数: 95℃预变性 5 分钟; 循环反应 30 次 (95℃ 30 秒, 63℃ 45 秒), 72℃延伸 5 分钟。另取无菌超纯水同上述 PCR 反应法操作, 作为空白对照。

电泳检测 照琼脂糖凝胶电泳法 (中国药典 2020 年版通则 0541), 胶浓度为 1.5%, 胶中加入核酸凝胶染色剂 GelRed; 供试品与对照药材 PCR 反应溶液的上样量分别为 6μl, DNA 分子量标记上样量为 6μl (0.09μg/μl)。电泳结束后, 取凝胶片在凝胶成像仪上或紫外透射仪上检视。供试品凝胶电泳图谱中, 在与对照药材凝胶电泳图谱相应的位置上, 在 300~400bp 应有单一 DNA 条带。

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

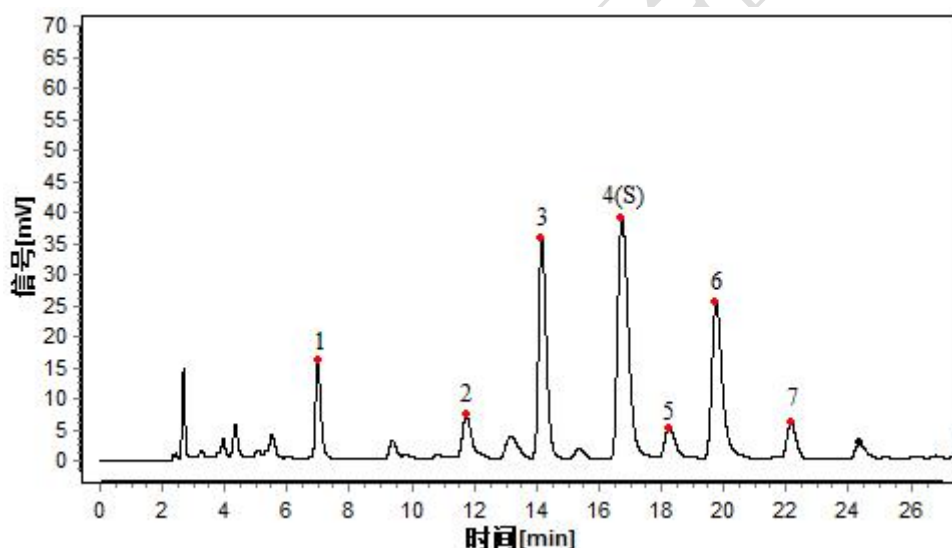
色谱条件与系统适用性试验 同[含量测定]项。

参照物溶液的制备 取乌梢蛇对照药材约 1g，加 10%甲醇 25ml，超声处理（功率 250W，频率 40kHz）30 分钟，摇匀，滤过，取续滤液，作为对照药材参照物溶液。另取[含量测定]项下的对照品溶液，作为对照品参照物溶液。再取尿嘧啶对照品、鸟嘌呤对照品、黄嘌呤对照品、肌苷对照品、鸟苷对照品适量，精密称定，加 10%甲醇溶液制成每 1ml 各含 10 μ g 的混合溶液，作为对照品参照物溶液。

供试品溶液的制备 同[含量测定]项。

测定法 分别精密吸取参照物溶液与供试品溶液各 10 μ l，注入液相色谱仪，测定，即得。

供试品色谱中应呈现 7 个特征峰，并与对照药材参照物色谱中的 7 个特征峰保留时间相对应，其中峰 1、峰 3~峰 7 分别与相应对照品参照物峰的保留时间相对应；与次黄嘌呤参照物峰相对应的峰为 S 峰，计算峰 2 与 S 峰的相对保留时间，其相对保留时间应该在规定值的 $\pm 10\%$ 范围之内，规定值为：0.69（峰 2）。



峰 1：尿嘧啶；峰 3：鸟嘌呤；峰 4(S)：次黄嘌呤；峰 5：黄嘌呤；峰 6：肌苷；峰 7：鸟苷

图 7-1 酒乌梢蛇配方颗粒对照特征图谱

参考色谱柱：Agilent ZORBAX SB-Aq；4.5mm $\times$ 250mm，5 μ m

【检查】 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 10.0%。

【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 μ m）；以乙腈为流动相 A，以 0.3%乙酸为流动相 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 25 $^{\circ}$ C；检测波长为 254nm。理论板数按次黄嘌呤

峰计算应不低于 5000。

表 7-1 梯度洗脱表

时间（分钟）	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0~9	0	100
9~22	0→3	100→97
22~26	3→7	97→93
26~30	7→13	93→87
30~35	13→20	87→80

对照品溶液的制备 取次黄嘌呤对照品适量，精密称定，加 10%甲醇溶液制成每 1ml 含 50 μ g 的溶液，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，置于具塞锥形瓶中，精密加入 10%甲醇溶液 25ml，称定重量，超声处理（功率 300W，频率 40kHz）30 分钟，放冷，再称定重量，用 10%甲醇溶液补足损失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

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

本品每 1g 含次黄嘌呤（ $C_5H_4N_4O$ ）含量应为 0.9mg~6.5mg。

【规格】 每 1g 配方颗粒相当于饮片 3.5g。

【贮藏】 密封。