

乌梢蛇配方颗粒

Wushaoshe Peifangkeli

【来源】 本品为游蛇科动物乌梢蛇 *Zaocys dhumnades* (Cantor) 的干燥体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%~21.0%),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】 本品为浅黄色至棕黄色的颗粒;气腥,味淡。

【鉴别】 (1)取本品适量,研细,取0.5g,加甲醇10ml,超声处理30分钟,滤过,滤液作为供试品溶液。另取乌梢蛇对照药材1g,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1 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的提取 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]900 μ l、蛋白酶K(20mg/ml)10 μ l 和 β -巯基乙醇10 μ l,涡旋

江西省中药配方颗粒标准

震荡混匀, 65℃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, 加入等体积三氯甲烷-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500 μ l), 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700 μ l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700 μ l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50 μ l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200 μ l,0.5mol/L乙二胺四醋酸二钠溶液50 μ l,蛋白酶K(20mg/ml)20 μ l,RNA 酶溶液5 μ l]275 μ l,在55℃水浴加热1小时,加入裂解缓冲液250 μ l,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26 μ l,1mol/L Tris-盐酸溶液(pH=7.5)18 μ l,0.5mol/L乙二胺四醋酸二钠溶液(pH=8.0)3 μ l,无水乙醇 480 μ l,灭菌双蒸水273 μ l]800 μ l,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2分钟,将DNA纯化柱转移入另一离心管中,加入无菌双蒸水 50 μ l,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100 μ l

江西省中药配方颗粒标准

离心管中进行，反应总体积为25 μ l，反应体系包括10 \times PCR缓冲液2.5 μ l，dNTP（2.5mmol/L）2.0 μ l，鉴别引物（10 μ mol/L）各0.3 μ l，高保真Taq DNA聚合酶（5U/ μ l）0.3 μ l，模板（100~400ng）1.0 μ l，无菌双蒸水18.6 μ l。将离心管置PCR仪上，PCR反应参数：95 $^{\circ}$ C预变性5分钟；循环反应30次（95 $^{\circ}$ C 30秒，63 $^{\circ}$ C 45秒），72 $^{\circ}$ C延伸5分钟。另取无菌双蒸水同上述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6 μ l，DNA分子量标记上样量为6 μ l（90ng/ μ l）。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。

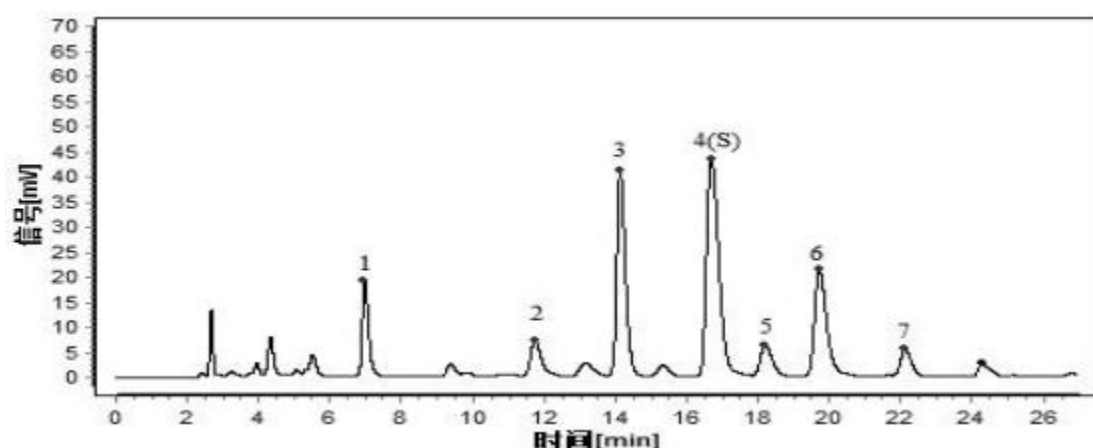
色谱条件与系统适用性试验 同〔含量测定〕项。

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。再取鸟嘌呤对照品、黄嘌呤对照品、肌苷对照品、鸟苷对照品适量，加10%甲醇制成每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，并应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应分别与相应对照品参照物峰保留时间相对应；与次黄嘌呤对照品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，其相对保留时间应在规定值的 $\pm 10\%$ 范围之内，规定值为：0.69（峰2）。



对照特征图谱

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

参考色谱柱：SB-Aq；4.6mm×250mm，5μm

【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8.0%。

【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5μm）；以乙腈为流动相A，以0.3%醋酸溶液为流动相B，按下表中的规定进行梯度洗脱；流速为每分钟1.0ml；柱温为25℃；检测波长为254nm。理论板数按次黄嘌呤峰计算应不低于5000。

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 取尿嘧啶、次黄嘌呤对照品适量，精密称定，加10%甲醇制成每1ml含50μg的溶液，即得。

江西省中药配方颗粒标准

供试品溶液的制备 取本品适量，研细，取约0.2g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入10%甲醇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%甲醇补足减失的重量，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含尿嘧啶($C_4H_4N_2O_2$)应为0.1mg~2.0mg,次黄嘌呤($C_5H_4N_4O$)应为1.5mg~5.0mg。

【规格】 每1g配方颗粒相当于饮片3.5g

【贮藏】 密封。

起草单位：江西一方天江药业有限公司

复核单位：广东省药品检验所、黑龙江省药品检验研究院

参与单位： /