

## 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%~23.0%），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 0.5g，研细，加甲醇 10ml，超声处理 30 分钟，滤过，取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 2025 年版通则 0502）试验，吸取供试品溶液 2 $\mu$ l、对照药材溶液 8 $\mu$ 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；再加入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 $\mu$ l和 $\beta$ -巯基乙醇10 $\mu$ 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，加入等体积的三氯甲烷-异戊醇（24:1）溶液（约800 $\mu$ 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（24:1）溶液（约900 $\mu$ 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（24:1）混合溶液（约800 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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/LTris-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×FastBuffer(Mg<sup>2++</sup> 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 2025 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2025年版通则0512）测定。

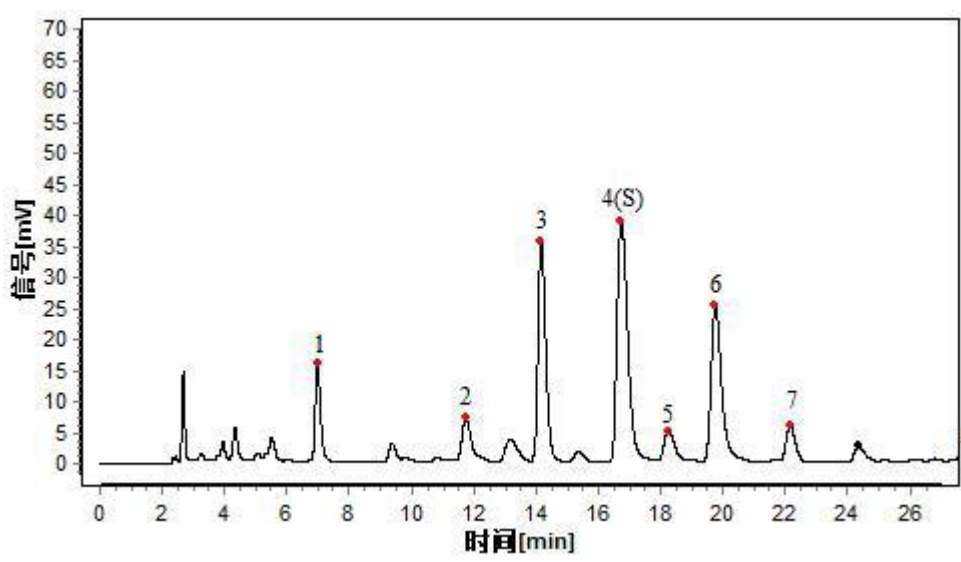
**色谱条件与系统适用性试验** 同〔含量测定〕项。

**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，作为次黄嘌呤对照品参照物溶液。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%甲醇制成每1ml各含10μg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10μl，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, 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的保留时间相对应。与次黄嘌呤参照物峰相应的峰为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: ZORBAX SB-Aq, 4.6mm×250mm, 5 $\mu$ m

【检查】应符合颗粒剂项下有关的各项规定（中国药典2025年版通则0104）。

【浸出物】照醇溶性浸出物测定法（中国药典 2025 年版通则 2201）项下的热浸法测定, 用乙醇作溶剂, 不得少于 10.0%。

【含量测定】照高效液相色谱法（中国药典2025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）; 以乙腈为流动相A, 以0.3%乙酸溶液为流动相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** 取次黄嘌呤对照品适量，精密称定，加10%甲醇制成每1ml含50 $\mu$ 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 $\mu$ l，注入液相色谱仪，测定，即得。  
本品每1g含次黄嘌呤（ $C_5H_4N_4O$ ）应为1.5mg~5.5mg。

**【规格】** 每 1g 配方颗粒相当于饮片 3.5g。

**【贮藏】** 密封。

上海市中药配方颗粒质量标准公示稿