

广西壮族自治区 中药配方颗粒质量标准

DYB45-PFKLxxxx-2024

酒乌梢蛇配方颗粒（公示稿）

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 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 $^{\circ}$ 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）聚合酶链式反应法。

模板 DNA 提取 取本品 1.0g，充分研磨使成粉末，取粉末 100mg 置 1.5ml 离心管中，加入消化液 275 μ l[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]，在 55 $^{\circ}$ C 水浴保温 1 小时，加入裂解缓冲液 250 μ l，混匀，离心（转速为每分钟 10000 转）3 分钟，取上清液加到 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 800 μ l[5mol/L 醋酸钾溶液 26 μ l，1mol/L Tris-盐酸溶液(pH7.5)18 μ l，0.5mol/L 乙二胺四醋酸二钠溶液（pH8.0）3 μ l，无水乙醇 480 μ l，灭菌双蒸水 273 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 $^{\circ}$ C 保存备用。另取乌梢蛇对照药材适量，充分研磨使成细粉，取粉末 100mg，同法制成对照药材模板 DNA 溶液，置 4 $^{\circ}$ C 保存或置零下 20 $^{\circ}$ C 长期保存。

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 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（各 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）

广西壮族自治区中药配方颗粒质量标准

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。

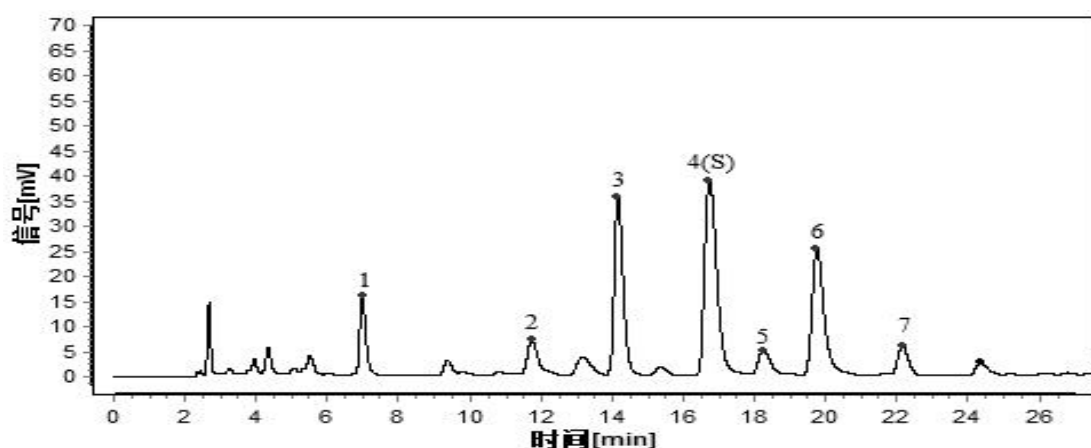
色谱条件与系统适用性试验 同 (含量测定) 项。

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, 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。再取 (含量测定) 项下的对照品溶液, 作为对照品参照物溶液。

供试品溶液的制备 同 (含量测定) 项。

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 \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)。

广西壮族自治区中药配方颗粒质量标准

【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；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；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 50μg 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 10μl，注入液相色谱仪，测定，即得。

本品每 1g 含次黄嘌呤（C₅H₄N₄O）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。