

新疆维吾尔自治区药品监督管理局

中药配方颗粒标准

新 PF00082024

乌梢蛇配方颗粒（试行）

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，喷以茛三酮试液，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/LTris-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）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。

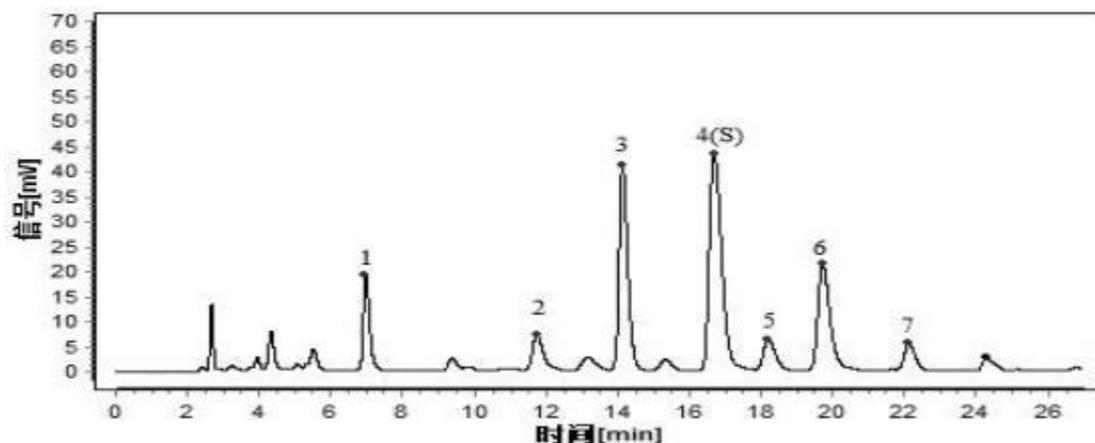
参照物溶液的制备 取乌梢蛇对照药材1g，加10%甲醇25ml，超声处理（功率250W，频率40kHz）30分钟，摇匀，滤过，取续滤液，作为对照药材参照物溶液。另取[含量测定]项下的对照品溶液，作为对照品参照物溶液。再取尿嘧啶对照品、鸟嘌呤对照品、黄嘌呤对照品、肌苷对照品、鸟苷对照品适量，加10%甲醇制成每1ml各含10 μ g的混合溶液，作为对照品参照物溶液。

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±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（ $C_5H_4N_4O$ ）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。