

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，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 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 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 乙二醇二乙酸二钠 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 乙二醇二乙酸二钠 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 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 56℃水浴加热 2 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（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 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 离心管中进行，反应总体积为 25 μ l，反应体系包括 10 $\times$ Fast Buffer (Mg^{2+} +plus) 2.5 μ l，dNTP(2.5mmol/l) 2 μ l，鉴别引物（10 μ mol/l）各 0.3 μ l，SpeedSTAR DNA 聚合酶 0.3 μ l，模板（100~400 ng）1 μ l，灭菌水 18.6 μ l。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 6 μ l，DNA 分子量标记上样量为 6 μ l（0.09 μ g/ 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。

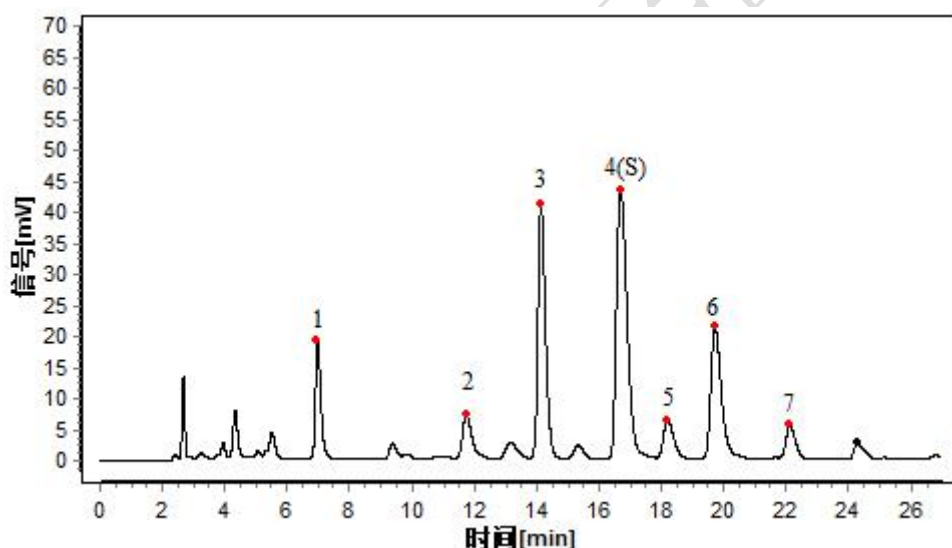
色谱条件与系统适用性试验 同[含量测定]项。

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[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 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 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 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

岭峰计算应不低于 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 0.6mg~6.0mg。

【规格】 每 1g 配方颗粒相当于饮片 3.5g。

【贮藏】 密封。