

## 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，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 1 $\mu$ 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，取粉末100mg置1.5ml离心管中，加入消化液275 $\mu$ l [细胞核裂解液200 $\mu$ l，0.5mol/L 乙二胺四醋酸二钠溶液50 $\mu$ l，蛋白酶K(20mg/ml)20 $\mu$ l，RNA酶溶液5 $\mu$ l]，在55℃水浴保温1小时，加入裂解缓冲液250 $\mu$ 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 $\mu$ l [5mol/L醋酸钾溶液26 $\mu$ l，1mol/LTris-盐酸溶液（pH7.5）18 $\mu$ l，0.5mol/L乙二胺四醋酸二钠溶液（pH8.0）3 $\mu$ l，无水乙醇480 $\mu$ l，灭菌双蒸水273 $\mu$ 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 $\mu$ 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。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℃保存或置零下20℃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 $\mu$ l离心管中进行，反应总体积为25 $\mu$ l，反应体系包括10 $\times$ PCR缓冲液2.5 $\mu$ l，dNTP（2.5mmol/L）2 $\mu$ l，鉴别引物

(10 $\mu$ mol/L) 各0.3 $\mu$ l, 高保真Taq DNA聚合酶 (5U/ $\mu$ l) 0.3 $\mu$ l, 模板 (100~400ng) 1 $\mu$ l, 无菌双蒸水18.6 $\mu$ 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6 $\mu$ l, DNA分子量标记上样量为6 $\mu$ l (90ng/ $\mu$ 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。

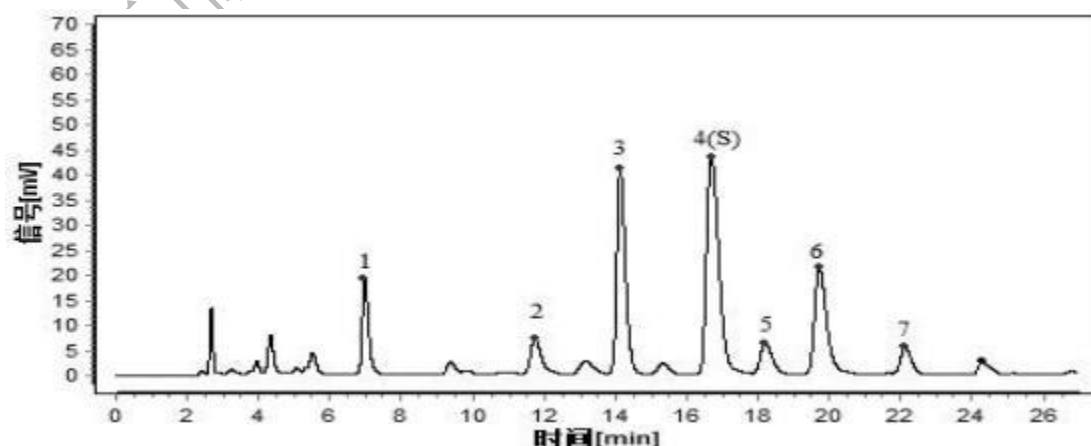
**色谱条件与系统适用性试验** 同(含量测定)项。

**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10 $\mu$ 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 $\mu$ 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：ZORBAX 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2025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 2025 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10μl，注入液相色谱仪，测定，即得。

本品每1g含次黄嘌呤（C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O）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。