

附件 8：乌梢蛇配方颗粒新疆中药配方颗粒标准制定草案公示稿

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，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/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℃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100μl离心管中进行, 反应总体积为25μl, 反应体系包括10×PCR缓冲液2.5μl, dNTP (各2.5mmol/L) 2.0μl, 鉴别引物 (10μmol/L) 各0.3μl, 高保真Taq DNA聚合酶 (5U/μl) 0.3μl, 模板 (100~400ng) 1.0μl, 无菌双蒸水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6μl, DNA分子量标记上样量为6μl (90ng/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。

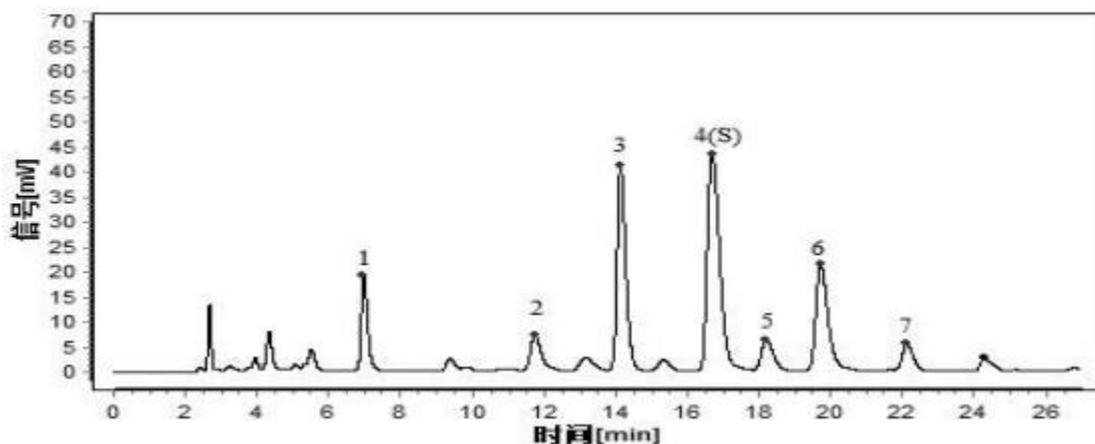
色谱条件与系统适用性试验 同【含量测定】项。

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, 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, 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%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 $^{\circ}$ C;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 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（C₅H₄N₄O）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。

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 18.0%。

【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 100mm，内径为 2.1mm，粒径为 1.8 μ m）；以乙腈-0.1%磷酸溶液（15:85）为流动相；流速为每分钟 0.3ml；柱温为 30 $^{\circ}$ C；检测波长为 360nm。理论板数按金丝桃苷峰计算应不低于 8000。

对照品溶液的制备 取金丝桃苷对照品适量，精密称定，加 75%甲醇制成每 1ml 含 40 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，置具塞锥形瓶中，精密加 75%甲醇 15ml，称定重量，超声处理（功率 300W，频率 40kHz）40 分钟，放冷，再称定重量，用 75%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 1 μ l，注入液相色谱仪，测定，即得。

本品每 1g 含金丝桃苷（C₂₁H₂₀O₁₂）应为 0.30mg~3.00mg。

【规格】 每 1g 配方颗粒相当于饮片 5g。

【贮藏】 密封。