

# 大防风汤颗粒剂质量控制的初步研究

王连荣<sup>1</sup>, 刘筱蔼<sup>1</sup>, 吴伟康<sup>1</sup>, 郑若虹<sup>2</sup>, 杨健文<sup>2</sup>, 刘旺培<sup>2</sup>, 王翠颜<sup>2</sup>, 王海<sup>2</sup>

(1 中山大学 中山医学院 中西医结合研究所, 广东 广州 510089; 2 广东药学院, 广东 广州 510240)

**摘要:** 研究目的是确定大防风汤颗粒剂的质量控制方法。采用 TLC 法对研制的大防风汤颗粒剂和国外的大防风汤颗粒剂中黄芪、苍术、白芍及牛膝进行定性鉴定, 利用 RP-HPLC 法测定颗粒剂中乌头碱的含量。结果: 乌头碱在 0.2~1.5 $\mu$ g 范围内具有良好的线性关系, 回收率平均值为 97.92%, RSD 为 1.88%。结论: 研制的大防风汤颗粒剂的质量控制方法简便、可靠, 重现性良好, 可有效地控制颗粒剂的质量, 而国外的大防风汤颗粒剂不适用于此方法进行质量控制。

**关键词:** 大防风汤; 薄层色谱; 高效液相色谱

中图分类号: R284.4 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2002)03-0004-04

## Study on Quality Control of Da-Fang-Feng-Tang Granule

WANG Lian-rong<sup>1</sup>, LIU Xiao-ai<sup>1</sup>, WU Wei-kang<sup>1</sup>, ZHENG Ruo-hong<sup>2</sup>,  
YANG Jian-wen<sup>2</sup>, LIU Wang-pei<sup>2</sup>, WANG Cui-yan<sup>2</sup>, WANG Hai<sup>2</sup>

(1. Institute for Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Zhongshan University, Guangzhou 510089, China;  
2. Guangdong Pharmaceutical Collage, Guangzhou 510240, China)

**Abstract:** Objective: To establish the quality standard of *Da-fang-feng-tang* granule. Methods: Qualitative identification of four ingredients (astragalus root, atractylodes lanceae rhizome, paeonia lactiflora root and achyranthes bidentata root) were used by TLC methods. The quantitative analysis of aconitine was determined by RP-HPLC method. Results: Aconitine had a good linear relationship in range of 2.0~1.5 $\mu$ g, and the average recovery and RSD were 97.92% and 1.88% respectively. Conclusion: This method was simple, reliable and repetitive.

**Key words:** *Da-fang-feng-tang* granule; TLC identification; HPLC

祖国医学的许多经典验方已被研制成颗粒剂, 广泛应用于临床。本研究选择治疗类风湿性关节炎的传统验方大防风汤<sup>[1,2]</sup>, 进行颗粒剂质量控制方法的研究。大防风汤是《和剂局方》中治疗风寒湿痹症的验方, 具有舒筋活络, 祛风除湿, 活血止痛的作用, 能够治疗关节肿大、麻痹、慢性关节炎、痛风、运动机能障碍等症。类风湿性关节炎被认为是一种自身免疫性疾病, 现代研究证明大防风汤中黄芪、苍术、白芍、牛膝和附子具有调节免疫功能的作用<sup>[3,4,5,6,7]</sup>, 因此, 我们采用 TLC 法对大防风汤颗粒剂中黄芪、苍术、白芍和牛膝进行色谱鉴别, 并采用 RP-HPLC 对颗粒剂中附子的主要毒性成分乌头碱进行含量测定, 同时与国外的大防风汤颗粒剂进行比较试验。

## 1 仪器与试药

研制的大防风汤颗粒剂由中山大学中西医结合

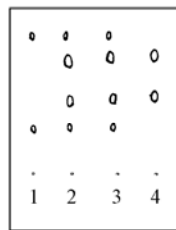
研究所提供, 国外的大防风汤颗粒剂购于日本 Tsumura 汉方制药公司; 黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fish.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 产于山西、苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. 产于江苏、白芍 *Paeonia lactiflora* Pall. 产于浙江和牛膝 *Achyranthes bidentata* Bl. 产于河南的对照药材及乌头碱对照品均购于中国药品生物制品检定所; 硅胶 G 为青岛海洋化工厂生产; 乙腈、甲醇为色谱纯, 其余试剂为分析纯; 高效液相色谱仪为 Agilent 1100。

## 2 薄层鉴别试验<sup>[8,9,10]</sup>

**2.1 黄芪的薄层鉴别** 取研制的颗粒剂 5g, 加水 20ml, 加热至溶解, 移至分液漏斗, 加正丁醇提取 2 次, 每次 20ml, 合并正丁醇提取液, 用蒸馏水洗涤两次, 每次 10ml, 弃去水液, 正丁醇液置水浴上浓缩至 1ml, 加 5g 100 目的中性氧化铝在水浴上拌匀干燥, 装入内径为 10~15mm 中性氧化铝柱的顶部, 以醋酸乙酯-甲醇 (1:1) 60ml 分次洗脱, 再用 40% 甲醇 40ml 分次洗脱, 收集洗脱液, 置水浴上蒸干, 残渣加

甲醇 1 ml 使溶解, 为供试品液。国外颗粒剂供试品液以同样方法制备。另取对照药材 0.5g 按上法制得对照药材溶液。按处方比例制成缺黄芪的大防风汤颗粒, 同供试液制备方法制得阴性对照溶液。吸取上述四种溶液各 5 $\mu$ l, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以氯仿-甲醇-水(65: 35: 10) 为展开剂展开, 晾干后喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 105  $^{\circ}$ C 烘数分钟至斑点显色清晰。结果: 两种颗粒剂供试品在与对照药材色谱相应的位置上, 紫外灯光(365nm) 下显相同的橙黄色荧光斑点, 阴性无干扰。见图 1。

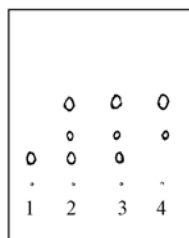
**2.2 苍术的薄层鉴别** 取研制的颗粒剂 5g, 加乙醚 15ml, 加热回流 30min, 滤过, 滤液低温挥干, 残渣加乙酸乙酯 1ml 使溶解, 作为供试品液。国外颗粒剂供试品液以同样方法制备。另取对照药材 0.5g 按上法制得对照药材溶液。按处方比例制成缺苍术的大防风汤颗粒剂, 同供试液制备方法制得阴性对照溶液。吸取上述四种溶液各 5 $\mu$ l, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上,



1. 缺黄芪阴性对照  
2. 研制颗粒剂  
3. 国外颗粒剂  
4. 黄芪对照药材  
图 1 黄芪的薄层色谱

以石油醚(60~ 90  $^{\circ}$ C)-醋酸乙酯(20: 1) 为展开剂展开, 晾干后喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 105  $^{\circ}$ C 烘数分钟至斑点显色清晰。结果: 两种颗粒剂供试品在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点, 阴性无干扰。见图 2。

**2.3 白芍的薄层鉴别** 取研制的颗粒 5g, 加水 10ml 溶解, 用水饱和的正丁醇提取两次, 每次 20ml, 合并正丁醇液, 用水洗两次, 每次 10ml, 弃去水液, 正丁醇液置水浴上浓缩至 1ml, 加 5g 100 目的中性氧化铝在水浴上搅拌, 干燥, 装入内径为 10~ 15mm 中性氧化铝柱, 以醋酸乙酯-甲醇(1: 1) 40ml 洗脱, 洗脱液蒸干, 加乙醇 1ml 溶解, 作为供试品液。国外颗粒剂供试品

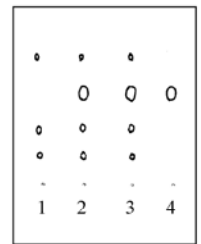


1. 缺苍术阴性对照  
2. 研制颗粒剂  
3. 国外颗粒剂  
4. 苍术对照药材  
图 2 苍术的薄层色谱

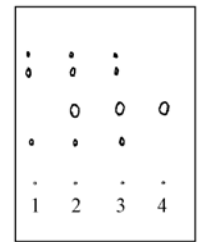
液以同样方法制备。另取对照药材 0.5g 按上法制得对照药材溶液。按处方比例制成缺白芍的大防风汤颗粒剂, 同供试液制备方法制得阴性对照溶液。吸取上述四种溶液各 5 $\mu$ l, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以氯仿-醋酸乙酯-甲醇-甲酸(40: 5: 10: 0.2) 为展开剂展开, 以 5% 香草醛硫酸为显色剂, 加热至斑

点现色清晰。结果: 两种颗粒剂供试品在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同蓝紫色斑点, 阴性无干扰。见图 3。

**2.4 牛膝的薄层鉴别** 取研制的颗粒剂 5g, 加乙醇 20ml, 加热回流 40min, 放置, 取上清液, 加盐酸 1ml, 加热回流 1h, 浓缩至约 5ml, 加水 10ml, 用石油醚(60~ 90  $^{\circ}$ C) 20ml 提取, 提取液蒸干, 残渣加乙醇 2ml 溶解, 作为供试液。国外颗粒剂供试品液以同样方法制备。另取对照药材 0.5g, 按上法制得对照药材溶液。按处方比例制成缺牛膝的大防风汤颗粒剂, 同供试液制备方法制得阴性对照溶液。吸取上述四种溶液各 5 $\mu$ l, 分别点于同一羧甲基纤维素钠硅胶 G 薄层板上, 以氯仿-甲醇(40: 1) 为展开剂展开, 显色剂为磷钼酸试液, 110  $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。两种颗粒剂供试品在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同蓝色斑点, 阴性无干扰。见图 4。



1. 缺白芍阴性对照  
2. 研制颗粒剂  
3. 国外颗粒剂  
4. 白芍对照药材  
图 3 白芍的薄层色谱



1. 缺牛膝阴性对照  
2. 研制颗粒剂  
3. 国外颗粒剂  
4. 牛膝对照药材  
图 4 牛膝的薄层色谱

### 3 大防风汤颗粒剂中乌头碱的含量测定<sup>[1]</sup>

**3.1 色谱条件** Hypersil BDS C<sub>18</sub> 柱(4.6  $\times$  250mm, 5 $\mu$ m); 流动相: 甲醇-水-三乙胺(75: 25: 0.2); 流速 1.0ml/min; 检测波长: 240nm; 柱温: 20  $^{\circ}$ C; 灵敏度: 0.01AUFS。

**3.2 供试品溶液的制备** 取研制的大防风汤颗粒剂 20g, 加水 50ml 使其溶解后, 加乙醇 200ml, 搅拌后滤过, 滤液减压回收至干, 残渣加 0.1mol/L 稀盐酸 10ml, 超声处理 10min, 滤于分液漏斗中。残渣再用稀盐酸洗涤 3 次, 每次 5ml, 超声处理 5min, 滤过, 滤液合并于分液漏斗中, 用 NaOH 调 pH10~ 11 后, 等量氯仿萃取 3 次, 合并氯仿液, 回收至干, 残渣加流动相溶解, 定容于 5ml 量瓶中。0.45 $\mu$ m 滤膜滤过, 作为供试品液。日本产颗粒剂供试品液以同样方法制备。

**3.3 对照品液的制备** 精密称取乌头碱对照品 2mg, 用流动相溶解并定容于 20ml 量瓶中, 制成对照品溶液。

**3.4 阴性对照液的制备** 按大防风汤处方和制备

工艺制备缺附子的阴性对照颗粒剂, 再按上述供试品液的制备方法制备阴性对照液。

**3.5 线性关系考察** 依次吸取上述乌头碱对照品溶液 2.0、3.0、5.0、8.0、10.0、12.0 和 15.0 $\mu\text{L}$  分别进样按上述色谱条件测定峰面积。以乌头碱进样量  $x$  ( $\mu\text{g}$ ) 对峰面积积分值  $A$  作直线回归, 得回归方程:  $A = 434.30x + 4.21$ ,  $r = 0.9995$ 。结果表明: 乌头碱进样量在 0.2 $\mu\text{g}$ ~ 1.5 $\mu\text{g}$  范围内与峰面积呈良好的线性关系。

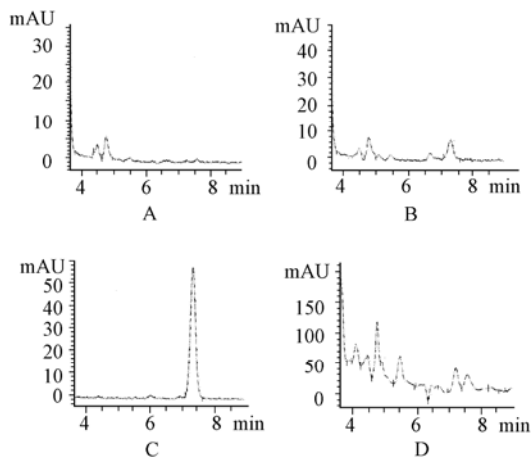
**3.6 精密度考察** 精密吸取样品溶液, 重复进样 6 次, 所得峰面积的  $RSD$  为 1.18%。

**3.7 重复性考察** 取同一批号的样品, 分别精密称取 5 份制备供试品液, 各进样 10 $\mu\text{L}$ , 峰面积换算成含量 ( $\mu\text{g/g}$ ), 所得 5 个数据的  $RSD$  为 2.45%。

**3.8 稳定性试验** 取供试品溶液进样 10 $\mu\text{L}$ , 每隔 2h 进样一次, 共进样 7 次, 所得 7 个数据的  $RSD$  为 1.9%。

**3.9 空白干扰试验** 取阴性对照液 10 $\mu\text{L}$ , 按上述色谱条件测定, 在原乌头碱出峰位置无吸收峰, 表明颗粒剂中的其它组分不干扰乌头碱的测定。

**3.10 样品测定** 分别取 5 批自制颗粒剂和 5 批日本的颗粒剂各 20g, 按供试品溶液制备法处理, 照上述色谱条件测定。结果: 自制颗粒剂乌头碱峰和其它相关峰都能达到基线分离(测定结果见表 1), 而日本颗粒剂的乌头碱没有得到很好的分离。结果见图 5。



A 阴性对照液; B 研制的颗粒剂样品液; C 乌头碱对照品液; D 国外的颗粒剂样品液

图5 HPLC 色谱图

**3.11 回收率试验** 精密称取已知含量的大防风汤颗粒剂适量, 按供试品液制备法处理, 精密加入已知含量的乌头碱对照品, 按样品测定项下方法测定, 结果平均回收率为 97.92%,  $RSD = 1.88\%$ 。结果见表 2。

表1 研制的颗粒剂样品乌头碱含量测定结果( $n = 5$ )

批号	含量( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )	$RSD$ (%)
20010821	0.024	1.46
20010830	0.020	1.40
20010920	0.023	1.80
20011117	0.025	1.35
20020210	0.019	1.93

表2 大防风汤颗粒剂样品回收率试验结果( $n = 5$ )

样品	样品中乌头碱量 ( $\mu\text{g}$ )	加入乌头碱量 ( $\mu\text{g}$ )	测定总量 ( $\mu\text{g}$ )	回收率 (%)	$RSD$ (%)
20010821	0.492	1.0	1.475	96.5	
20010830	0.418	1.0	1.420	100.5	
20010921	0.475	1.0	1.472	99.3	1.88
20011117	0.500	1.0	1.481	96.2	
20020210	0.497	1.0	1.483	97.1	

#### 4 讨论

本研究初步探讨了大防风汤颗粒剂的质量控制方法。采用 TLC 法鉴定颗粒剂中黄芪、苍术、白芍和牛膝, 采用  $R_p$ -HPLC 法测定颗粒剂中附子的主要毒性成分乌头碱的含量, 作为控制颗粒剂质量的指标, 同时对研制的和国外的大防风汤颗粒剂进行了比较试验。结果表明, 两种颗粒剂含有四种主要中药的相同成分, 高效液相法显示研制的大防风汤颗粒剂可采用乌头碱定量的方法进行质量控制, 此方法简便、可靠, 重现性良好, 可有效地控制颗粒剂的质量, 而国外大防风汤颗粒剂中的乌头碱没有得到很好的分离, 不适用于此质量控制方法。

#### 参考文献:

- [1] 李天庆. 大防风汤治疗类风湿性关节炎的经验[J]. 国外医学·中医中药分册, 1998, 20(1): 2.
- [2] 戴天红, 计惠民. 大防风汤治疗类风湿性关节炎的经验[J]. 国外医学·中医中药分册, 1995, 6(3): 28.
- [3] Yoshida Y, Wang MQ and Liu JN. Immunomodulating activity of Chinese medicinal herbs and Oldenlandia diffusa in particular[J]. International Journal of immunopharmacology, 1997, 19(7): 359-370.
- [4] Cyong JC. New BRM from kampor herbal medicine[J]. Nippon Yakurigaku Zasshi, 1997, 110(Suppl 1): 87-89.
- [5] Li FC, Zhou XL, Mao HL. A study of paeonin injection on immune functions in rats[J]. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi, 1994, 14(1): 37-38.

- [ 6 ] Yu S. and Zhang Y. Effect of *Achyranthes bidentata* polysaccharides( ABP) on antitumor activity and immune function of S180-bearing mice [ J ]. *Chung Hua Chung Liu Tsa Chih*, 1995, 17( 4 ) : 275-278.
- [ 7 ] Chang JY, Yang TY and Chang CP. The effect of “ *chi han*( hot nature)” Chinese herbs on the secretion of IL-1 beta and TNF- alpha by mononuclear cells[ J ]. *Kao Hsiung I Hsueh Ko Hsueh Tsa Chih*, 1996, 12( 1 ) : 18-24.
- [ 8 ] LianRong Wang, Naoki Ishiguro and Eiji Yamada. The Effect of *Da Fang Feng Tong* on Treatment of Type II Collagen induced Arthritis in DBA/1 Mice[ J ]. *American Journal of Chinese Medicine*, 1999, 27( 2 ) : 205-215.
- [ 9 ] 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 中华人民共和国药典[ S ]. 北京: 化学工业出版社, 2000. 127, 249.
- [ 10 ] 吕武清, 龙新化. 中成药中的药材薄层色谱鉴别[ M ]. 北京: 人民卫生出版社, 1996. 148, 469.
- [ 11 ] 孙毓庆. 现代色谱法及其在医药中的应用[ M ]. 北京: 人民卫生出版社, 1998. 140.