

## 紫外光谱检测掺入四物汤的西药成分( II )

莫志江\*, 郑俊

(广西壮族自治区人民医院药剂科, 南宁 530021)

**[摘要]** 目的: 利用紫外(UV)吸收光谱检测掺入中药制剂四物汤中的西药成分。方法: 在四物汤溶液中分别掺入 9 种西药成分, 使用加权相关分析法分析掺入前后的 UV 光谱变化。结果: 6 种西药成分掺入四物汤后可以引起 UV 光谱的明显变化, Spearman's $\rho < 0.94$ ; 另外 3 种对 UV 光谱的影响甚微, Spearman's $\rho > 0.95$ 。结论: UV 光谱可以作为一种快速过筛试验用于鉴别中药制剂的西药成分。

**[关键词]** 中药制剂; 四物汤; 紫外吸收光谱; 西药成分; 掺入

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0141-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013130141

## Examination of Chemicals Mixed into Siwu Decoction ( II )

MO Zhi-jiang\*, ZHENG Jun

(Pharmacy Department, People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China)

**[Abstract]** **Objective:** To examine incorporation of Western medicine into vegetable drugs (traditional Chinese medicine) by using UV absorption spectrum. **Method:** Nine chemicals were respectively mixed into Siwu decoction (made from Prepared Rehmannia Root, White Peony Alba, Chinese Angelica Root and Chuanxiong Rhizome). Using weighted correlation analysis (based on the correlation, with larger weighted value around peaks and valleys of UV absorption spectrum) to analyze the variation on spectrum between before and after the mixing. **Result:** Six chemicals influenced UV absorption spectrum significantly after they were respectively mixed into Siwu decoction, the similarity between before and after mixing was low with Spearman's $\rho < 0.94$ , but the other 3 chemicals was not, with Spearman's $\rho > 0.95$ . **Conclusion:** UV absorption spectra can be used for identifying the chemicals mixed illegally into decoction of traditional Chinese medicine.

**[Key words]** traditional Chinese medicine preparation; Siwu decoction; UV absorption spectrum; weighted correlate; mixing

目前基本上都使用色谱法(高效液相色谱、气相色谱等)检测中药制剂中的非法西药成分<sup>[1-4]</sup>, 有少部分使用荧光偏振免疫法<sup>[5-7]</sup>和红外光谱法<sup>[8-9]</sup>。色谱法需要对每个可能掺入的西药成分进行逐一排查, 通常每排查一种西药成分需要摸索一次分离条件, 而中药制剂成分复杂, 有时甚至难以分离, 故分析一个样品需要消耗大量时间和精力。本文以四物

汤为例, 分别掺入 9 种西药成分, 检测和分析掺入前后的 UV 光谱变化规律, 推出一个快速过筛试验, 期为色谱法缩窄目标范围, 以及用于预防厂商瞒报西药成分。

### 1 材料

**1.1 仪器** 惠普 HP8453 紫外-可见光分光光度计(美国)。

**1.2 试药** 熟地黄(批号 0504006)、当归(0501031)、白芍(0501102)和川芎(0501103)4 种配方颗粒(江阴天江药业有限公司); 地高辛片(批号 060304, 上海医药有限公司信谊制药总厂), 螺内酯片(批号 051016, 江苏正大丰海制药有限公司),

**[收稿日期]** 20121203(025)

**[基金项目]** 广西壮族自治区卫生厅课题(桂卫 Z2010256)

**[通讯作者]** \* 莫志江, 主任中药师, 从事中药化学和统计学研究, Tel: 0771-2186108, E-mail: mozhijiang89@163.com

葡醛内酯片(批号 20051005,湖北华中药业有限公司),氢氯噻嗪片(批号 0504291,常州制药有限公司),复合维生素 B 片(批号 050501,广西南宁百会药业集团有限公司,每片含维生素 B<sub>1</sub> 3 mg, B<sub>2</sub> 1.5 mg, B<sub>6</sub> 0.2 mg,烟酰胺 10 mg,泛酸钙 1 mg);利福平胶囊(批号 060101)、吡嗪酰胺片(批号 060102)、醋酸泼尼松片(批号 051004)和异烟肼片(批号 051101)均为广东华南药业有限公司生产。

**1.3 数据处理** SPSS 13.0 for Windows 的相关分析(correlate)。

**2 方法与结果**

**2.1 药材溶液的制备** 分别将 1 包熟地黄、当归和白芍配方颗粒(每包相当于生药材 10 g)各溶于约 400 mL 蒸馏水中,将 1 包川芎配方颗粒(相当于生药材 6 g)溶于约 240 mL 蒸馏水中。加热搅拌助溶,放冷,制成约 0.025 g·mL<sup>-1</sup>的药材溶液,过滤备用。

**2.2 光谱峰和谷的确定** 扫描前在工作站内将 UV 光谱峰和谷的数目分别设定为 3。

**2.3 四物汤实测(UV)光谱的测定** 分别吸取 4 种药材溶液各 1 mL 共置于 100 mL 的量瓶中,加蒸馏水稀释至刻度,摇匀即得四物汤溶液,扫描取它的实测光谱数据和光谱图(图 1)。光谱主峰(205 nm 以内的末端吸收峰除外)的吸光度(A)需位于 0.4 ~ 0.7,否则需稀释直至符合要求。

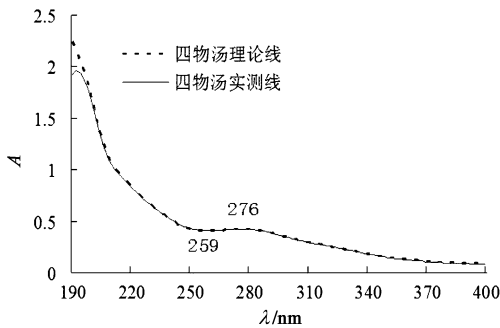


图 1 四物汤的理论和实测 UV 光谱

**2.4 四物汤理论(UV)光谱的计算** 各取 1 mL 药材溶液,分别置于 100 mL 的量瓶中,加蒸馏水稀释至刻度,摇匀,扫描取得单味药材在 190 ~ 400 nm 每个波长点的 UV 吸收光谱,则有

$$A_{\text{四物汤理论光谱}}^{\lambda} = A_{\text{当归}}^{\lambda} + A_{\text{白芍}}^{\lambda} + A_{\text{川芎}}^{\lambda} \quad (1)$$

将各味药材溶液在 190 ~ 400 nm 每个波长点的吸收度代入公式 1 即可计算出四物汤每个波长点的理论吸收度,也就是四物汤的理论光谱数据,可以将这些数据绘成理论光谱图,见图 1。

**2.5 西药溶液的制备** 取 1.2 项中 9 种西药,各取

1 粒(如为胶囊仅取内容物)分别溶于 400 mL 蒸馏水中,加热搅拌助溶,放冷,过滤备用。

**2.6 掺药实测(UV)光谱** 分别吸取 4 种药材溶液和 1 种西药溶液各 1 mL,共置于 100 mL 量瓶中,加蒸馏水稀释至刻度,摇匀,扫描取得四物汤掺入西药成分后的 UV 光谱,称为掺药实测光谱。

四物汤的实测光谱相当于它掺入西药前的 UV 光谱,而掺药实测光谱相当于掺有西药成分的四物汤 UV 光谱。以前者为权重参考,在 190 ~ 400 nm 的范围内设置权重(表 1),使用加权相关分析法<sup>[9-10]</sup>计算两者之间的相似度,这个相似度反映了四物汤掺入西药成分前后的 UV 光谱实际变化,见表 2。

表 1 各波长段对应的权重设置

波长/nm	权重	波长/nm	权重
190 ~ 254	1	272	10
255	10	273	20
256	20	274	30
257	30	275	40
258	40	276(峰)	50
259(谷)	50	277	40
260	40	278	30
261	30	279	20
262	20	280	10
263	10	281 ~ 400	1
264 ~ 271	1		

在实际工作中,不可能取得四物汤的实测光谱,但四物汤原药材的 UV 光谱是可以得到的(厂商自报,送检或抽检等),依照公式 1 可以计算出四物汤的理论光谱。以四物汤的理论光谱为权重参考,计算掺药实测光谱的相似度,这个相似度反映了四物汤掺入西药成分前后 UV 光谱理论变化,见表 2。

表 2 的两个相似度十分接近,可以使用四物汤的理论光谱替代四物汤的实测光谱作为权重参考,计算掺药实测光谱的相似度。

**2.7 西药成分 UV 光谱的测定** 各取以上 9 种西药溶液 1 mL,分别置于 100 mL 量瓶中,加蒸馏水稀释至刻度,摇匀,扫描取得各个西药成分的 UV 光谱。

**2.8 AUC(area of under curve)比例的计算** 按本文的光谱合成方法,在四物汤中掺入某一西药成分后,四物汤的掺药光谱等于四物汤光谱与西药光谱的加权平均值。使用四物汤的理论光谱代替实测光谱,则有

$$A_{\text{掺药}}^{\lambda} = A_{\text{理论}}^{\lambda} + A_{\text{西药}}^{\lambda} = A_{\text{熟地黄}}^{\lambda} + A_{\text{当归}}^{\lambda} + A_{\text{白芍}}^{\lambda} + A_{\text{川芎}}^{\lambda} + A_{\text{西药}}^{\lambda} \quad (2)$$

表2 四物汤掺药实测光谱的相似度(Spearman'sp值)和各成分的AUC比例

掺入物	掺入量/mg	每日最低用量 /mg	权重参考		AUC	AUC比例/%
			四物汤实测光谱	四物汤理论光谱		
地高辛	0.25(1片)	0.125	0.995 41	0.993 56	0.308	0.320
利福平	150(1粒)	450	0.291 90	0.251 92	17.107	15.125
螺内酯	20(1片)	40	0.934 52	0.907 53	0.360	0.374
吡嗪酰胺	250(1片)	750	0.749 25	0.746 69	117.639	55.066
泼尼松	5(1片)	10	0.991 95	0.989 85	0.317	0.329
葡萄糖内酯	100(1片)	300	0.988 58	0.995 71	0.133	0.139
氢氯噻嗪	25(1片)	25	0.891 51	0.889 50	2.155	2.195
复合维生素B	1片	3	0.916 97	0.911 12	1.563	1.602
异烟肼	100(1片)	300	0.321 63	0.314 29	9.227	8.770
四物汤实测光谱			1	0.986 25	94.430	
四物汤理论光谱			0.986 25	1	95.993	
熟地黄					22.381	
当归					27.282	
白芍					17.678	
川芎					28.652	

公式2中各成分UV光谱AUC的大小反映了该成分在整个UV波段下的吸收强度,其比例的大小反映了该成分在总光谱(四物汤掺药光谱)中所占的份额。西药成分要对四物汤的UV光谱产生明显的影响,必须要在总光谱中占有一定的份额,故需计算西药成分的AUC比例。

AUC的计算使用梯形面积法,因UV扫描每隔1nm有一个吸收度值,故有

$$AUC_{190 \rightarrow 400 \text{ nm}} = \int_{90}^{400} A d\lambda = \frac{1}{2}(A^{190} + A^{400}) + A^{191} + A^{192} + \dots + A^{398} + A^{399} \quad (3)$$

按公式3分别计算熟地黄、当归、白芍、川芎和各西药成分的AUC后,有:

$$AUC_{190 \rightarrow 400}^{\text{理论}} = AUC_{190 \rightarrow 400}^{\text{熟地黄}} + AUC_{190 \rightarrow 400}^{\text{当归}} + AUC_{190 \rightarrow 400}^{\text{白芍}} + AUC_{190 \rightarrow 400}^{\text{川芎}} \quad (4)$$

以地高辛掺入四物汤为例(余此类推),则有:

$$\text{地高辛 AUC} = \frac{AUC_{190 \rightarrow 400}^{\text{地高辛}}}{AUC_{190 \rightarrow 400}^{\text{四物汤理论光谱}} + AUC_{190 \rightarrow 400}^{\text{地高辛}}} \times 100\% \quad (5)$$

分别计算以上9种西药成分的AUC和AUC比例,结果见表2。

**2.9 精密度试验** 重复扫描四物汤溶液5次。与第1次相比,后4次的Spearman'sp分别为0.996 03, 0.994 45, 0.997 64, 0.994 77, RSD 0.15% ( $n=4$ )。

**2.10 稳定性试验** 每隔30min扫描四物汤溶液1次,共5次。与第1次相比,后4次的Spearman'sp分别为0.980 80, 0.966 52, 0.973 61, 0.973 56, RSD 0.60% ( $n=4$ )。

**2.11 重复性试验** 重复制备四物汤溶液10次并扫描UV光谱。与第1次相比,后9次的Spearman'sp分别为0.991 58, 1.000 00, 0.982 58,

0.998 05, 0.988 73, 0.988 40, 0.994 86, 0.989 05, 0.992 55, RSD 0.54%。

### 3 讨论

**3.1 鉴别原理** 待检中药制剂的实测UV光谱按公式2的形式构成,若无西药成分掺入则公式2的西药成分项不存在,转为公式1,也就是理论UV光谱;一旦掺入西药,则公式2存在西药成分项。因此,若待检中药制剂不含西药成分,则实测光谱与理论光谱的相似度应十分接近1,否则将偏离1,偏离的幅度取决于西药成分的化学结构以及掺入剂量。本文使用UV光谱的加权相关分析计算四物汤实测光谱与理论光谱的相似度,并据此判断是否含有西药成分以及含何种西药成分。

**3.2 掺入临界点** 纯中药制剂理论光谱与实测光谱必须有接近1的相似度,不应小于某个特定的数值,此数值称为掺入临界点。本文参考精密度试验、稳定性试验和重复性试验的数据,将掺入临界点定为约0.95,低于掺入临界点则可能掺入西药成分,完全值得进一步检测分析;大于掺入临界点则不含西药成分。

在实际工作中,掺入临界点的确定还要考虑各批次产品光谱相似度之间的正常波动。根据笔者对4个不同厂家复方丹参片、滴丸的分析结果,不同批次产品之间的UV光谱相似度极高, Spearman'sp > 0.953,因此估计批次差异应该不会明显影响降低掺入临界点。

**3.3 鉴别** 在中药制剂中掺入西药是为了提高疗效,因此必然只能是具有类似治疗作用的廉价西药品种,这就排除了许多有类似UV光谱但无类似治

疗作用的西药成分,可以将目标缩窄至几个至几十个西药品种。假设本文的 9 种西药就是所有可能掺入四物汤的西药成分,根据表 2 可以鉴别中药制剂的西药成分。若四物汤实测光谱与其理论光谱的相似度  $> 0.95$ ,只需使用色谱法检查是否存在地高辛、泼尼松和葡醛内酯即可作出结论,不必再检查其他西药成分;若相似度为 0.73,参考表 2,可以推测很可能是掺入吡嗪酰胺,可以使用色谱法首先检查是否存在吡嗪酰胺,余此类推;若不能在表 2 中找到相近的结果,应考虑不止掺入 1 种西药成分的可能,可以在公式 2 中再添加 1,2 项西药光谱重新模拟比对。

值得注意的是,当可掺入的西药品种较多时,各种可能的掺入组合较多,造成相似度的改变难以轻易确定。以本文的 9 个西药品种为例,使用 Excel 软件的组合公式计算可知,理论上共有  $COMBIN(9, 1) + COMBIN(9, 2) + COMBIN(9, 3) + COMBIN(9, 4) + COMBIN(9, 5) + COMBIN(9, 6) + COMBIN(9, 7) + COMBIN(9, 8) + COMBIN(9, 9) = 511$  个掺入组合,使用穷举法计算出每个组合的相似度和 AUC 比例需要耗费大量时间,除非使用计算机编程进行自动计算。因此,如果 UV 法发现掺入西药成分,但又对不上表 2 的数据,这种情况下直接上 HPLC 有可能更为简单。另外,编写可掺入的西药品种目录时,不应产生遗漏,否则对应的相似度不能在表 2 中找到,UV 法也就不能指示这些遗漏的西药品种。

因此,使用 UV 光谱法可以大大缩窄目标范围,节省了盲目使用色谱法逐一进行排查所需消耗的大量时间和精力。

**3.4 预测假阴性** 虽然不含西药成分的纯中药制剂其理论光谱与实测光谱必须有很高的相似度(大于掺入临界点),但理论光谱与实测光谱有很高相似度的中药制剂未必不含西药成分。如果掺入的西药成分对中药制剂的 UV 光谱没有产生足够的影响,则两者的相似度可以大于掺入临界点,出现假阴性。如表 2,地高辛、泼尼松和葡醛内酯均大于掺入临界点 0.95,故阴性结果不能排除这 3 个药物的存在。究其原因,地高辛和泼尼松虽然都有共轭双键,但治疗所需的剂量不大,无需掺入太多(分别为 0.25, 5 mg),AUC 比例仅分别为 0.32%, 0.33%,故出现假阴性;葡醛内酯无共轭双键,UV 吸收微弱,尽管掺入剂量较大(100 mg),但 AUC 比例仅为 0.14%,仍会出现假阴性。根据表 2,当掺入的西药成分的 AUC 比例  $> 1.5\%$  时,将会造成四物汤 UV

光谱的明显改变,否则将有可能出现假阴性。

通过参考表 2,可以全盘总览西药成分造成的 UV 光谱变化,提前预测假阴性的发生,填补了 UV 分析的漏洞。

**3.5 预防掺入** 药监部门可以要求厂商上报与其市售产品相符的成品实测光谱数据,以及按成品的生产条件制备的各原药材光谱数据。依照处方,一味药材一组数据,西药数据无法上报,一旦成品中掺入西药,则理论光谱与实测光谱的相似度极有可能小于掺入临界点。需检测厂商送检的原药材光谱,核实上报的光谱数据,防止西药光谱数据以原药材的名义调包上报。经核实的成品光谱数据存档备案,且要求厂商在生产过程中记录并保存每个批次产品与备案光谱的相似度,必须大于掺入临界点才算合格。否则,需重新上报光谱数据,经药监部门核实并重新备案后方可投入市场。通过以上措施,将有可能使很大一部分西药成分难以被掺入,只需要使用色谱法监测可以造成假阴性的西药品种。

综上所述,UV 光谱可以用于筛查中药制剂的西药成分以及预防非法掺入。

#### [参考文献]

- [1] 冯维希,陈坚,陈乃江,等. HPLC 测定复方关节炎胶囊中维生素 B<sub>1</sub>、吡罗昔康和醋酸泼尼松[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(9):87.
- [2] 赵斐. HPLC 法测定清热化毒丸中盐酸小檗碱的含量[J]. 齐鲁药事,2011,30(11):646.
- [3] 丁大勇,张妍妍,高菲,等. 蛇柏妇炎栓提取及制备工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,23(17):25.
- [4] 黄凤婷,梁福尧,卢雪明,等. 高效液相色谱法测定痛风舒片中盐酸小檗碱的含量[J]. 江西中医药,2011,42(9):68.
- [5] 张莉,潘超. 高效液相色谱法同时测定二妙丸中盐酸小檗碱和黄柏碱的含量[J]. 中国新药杂志,2011,22(20):2262.
- [6] 蒋媛媛,戴秋香,彭余开,等. HPLC 法测定跌打酒中盐酸小檗碱的含量[J]. 卫生职业教育,2004,14(22):108.
- [7] 田雁钰. HPLC 法同时测定小儿肺热平胶囊中两组分含量[J]. 中国药师,2010,9(13):1350.
- [8] 莫志江,张丽娟. 不同复方丹参片(滴丸)紫外吸收光谱的相关分析[J]. 中国中药杂志,2005,30(7):507.
- [9] 莫志江. 紫外吸收光谱加权相关分析法对若干中成药的鉴别价值[J]. 中国中药杂志,2007,32(2):116.

[责任编辑 邹晓翠]