

## 半夏炮制品相对毒性标示模型的探究

李蒙恩<sup>1</sup>, 陈天朝<sup>1,2\*</sup>, 马彦江<sup>2\*</sup>, 宋晨鸽<sup>1</sup>, 位玉蝶<sup>1</sup>

1. 河南中医药大学, 河南 郑州 450008

2. 河南中医药大学第一附属医院, 河南 郑州 450000

**摘要:** **目的** 以生品半夏 *Pinellia ternata* 毒性大小为标准, 寻找标示半夏炮制品相对毒性大小的方法及相对毒性大小与指标成分间的关系。**方法** 按照《中国药典》2020年版一部方法对半夏生品进行质量检查; 将影响半夏炮制品毒性的4个因素(白矾用量、生姜用量、蒸煮时间、蒸煮温度)进行混合均匀设计, 建立正棱锥降维模型; 将上述4个因素降维成用以表征半夏炮制品相对毒性大小的单一因素  $S_{\text{面}}$ , 建立其与4个因素之间的回归方程; 将得到的  $S_{\text{面}}$  与德尔菲评价法得出的相对毒性大小表征值进行相关性分析; 采用薄层扫描仪、MATLAB 软件测量物性分析指标色度 ( $H$ 、 $S$ 、 $I$ ), pH 测量仪测定 pH 值, HPLC 法测量半夏有机酸, 将测得的以上指标成分与  $S_{\text{面}}$  进行回归分析。**结果**  $S_{\text{面}}$  与4个影响因素间的回归模型为  $S_{\text{面}} = 1 - 0.0119X_{\text{白矾}} - 0.0058X_{\text{生姜}} - 0.0006X_{\text{时间}} - 0.0043X_{\text{温度}}$ ,  $r^2 = 0.9838$ ,  $P < 0.001$ ; 模型得到的  $S_{\text{面}}$  与德尔菲评价法得到表征值均有显著相关性,  $r = 0.9852$ ,  $P < 0.001$ ;  $S_{\text{面}}$  与 pH、 $H$ 、 $S$ 、 $I$  间的逐步回归模型为  $S_{\text{面}} = 0.165X_{\text{pH}} + 2.393X_{\text{H}} - 0.533X_{\text{S}} + 0.372X_{\text{I}} - 0.631$ ,  $r^2 = 0.9988$ ,  $P < 0.001$ 。 $S_{\text{面}}$  与 pH 值、有机酸间的逐步回归模型为  $S_{\text{面}} = 0.185X_{\text{pH}} + 0.163X_{\text{L-苹果酸}} + 0.186X_{\text{草酸}} - 0.508$ ,  $r^2 = 0.9955$ ,  $P < 0.001$ 。**结论** 毒性标示模型具有有效性, 能够模拟出毒性影响因素与毒性大小间的量化关系, 同时也能模拟出物性参数、化学指标与毒性大小的量化关系, 对半夏炮制品的炮制方法的确定提供数据支持, 为研究确定半夏炮制品毒性大小提供新思路。

**关键词:** 半夏; 毒性成分; 回归模型; 色度; pH; 有机酸; 混合均匀设计; 德尔菲评价法

**中图分类号:** R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)06-1751-10

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.06.017

## Research on relative toxicity marking model of *Pinellia ternata* processed products

LI Meng-en<sup>1</sup>, CHEN Tian-chao<sup>1,2</sup>, MA Yan-jiang<sup>2</sup>, SONG Chen-ge<sup>1</sup>, WEI Yu-die<sup>1</sup>

1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China

2. The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China

**Abstract: Objective** Taking the toxicity of raw Banxia (*Pinellia ternata*) as the standard, search for methods to indicate the relative toxicity of processed *P. ternata* and the relationship between relative toxicity and index components. **Methods** According to the first part of the *Chinese Pharmacopoeia* of the 2020 edition, the quality inspection of *P. ternata* raw products was carried out. The four factors (alum, ginger, steaming time, steaming temperature) that affect the toxicity of *P. ternata* processed products were mixed and uniformly designed. By establishing a regular pyramid dimensionality reduction model, the dimensions of the above four factors were reduced to a single factor  $S_{\text{plane}}$  which was used to characterize the relative toxicity of *P. ternata* processed products, and a regression equation between it and the four factors was established. Correlation analysis was carried out on the characterization value of relative toxicity; TLC scanner and MATLAB software were used to measure the chromaticity ( $H$ ,  $S$ ,  $I$ ) of physical property analysis indicators, pH meter was used to measure pH, HPLC was used to measure organic acid of *P. ternata*, and the above will be measured. Regression analysis was performed between index components and  $S_{\text{plane}}$ . **Results** The regression model between  $S_{\text{surface}}$  and four influencing

收稿日期: 2021-09-17

**基金项目:** 国家中医药管理局中药炮制技术传承基地项目(国中医药规财发(2015)21号); 河南省中医药管理局国家中医临床研究基地科研专项(2017JDZX007); 河南省中医药管理局国家中医临床研究基地科研专项(2019JDZX078); 河南省中医药科学研究专项课题(2018ZY1006)

**作者简介:** 李蒙恩(1995—), 男, 汉族, 硕士研究生, 主要从事中药学研究工作。E-mail: lme18614982559@163.com

**\*通信作者:** 陈天朝(1962—), 男, 汉族, 硕士生导师, 教授, 主任药师, 主要从事中药学研究工作。E-mail: ctc661111@163.com

马彦江(1983—), 男, 汉族, 主管中药师, 硕士, 研究方向为中药制剂与中药炮制技术。E-mail: mayjstudy@163.com

factors was:  $S_{\text{surface}} = 1 - 0.0119 X_{\text{alum}} - 0.0058 X_{\text{ginger}} - 0.0006 X_{\text{time}} - 0.0043 X_{\text{temperature}}$ ,  $r^2 = 0.9838$ ,  $P < 0.001$ ; The  $S_{\text{surface}}$  obtained by the model had a significant correlation with the representative value obtained by the Delphi evaluation method,  $r = 0.9852$ ,  $P < 0.001$ ; The stepwise regression model between the  $S_{\text{surface}}$  and pH,  $H$ ,  $S$ ,  $I$  was:  $S_{\text{surface}} = 0.165 X_{\text{pH}} + 2.393 X_H - 0.533 X_S + 0.372 X_I - 0.631$ ,  $r^2 = 0.9988$ ,  $P < 0.001$ . The stepwise regression model between  $S_{\text{surface}}$ , pH and organic acid was:  $S_{\text{surface}} = 0.185 X_{\text{pH}} + 0.163 X_{L\text{-malic acid}} + 0.186 X_{\text{oxalic acid}} - 0.508$ ,  $r^2 = 0.9955$ ,  $P < 0.001$ . **Conclusion** The toxicity labeling model is effective and can simulate the quantitative relationship between toxicity influencing factors and toxicity, as well as the quantitative relationship between physical parameters, chemical indicators and toxicity, providing data support for the determination of the processing method of *P. ternata* processed products and provide new ideas for research to determine the toxicity of processed products of *P. ternata*.

**Key words:** *Pinellia ternate* (Thunb.) Breit.; toxic components; regression model; chromaticity; pH; organic acid; mixed uniform design; Delphi evaluation method

半夏为天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎。夏、秋二季采挖,洗净,除去外皮和须根,晒干<sup>[1]</sup>。半夏具有大毒,生品大多不能入药,多使用其炮制品。半夏性温,味辛,有毒,归脾、胃、肺经。具有燥湿化痰、降逆止呕、消痞散结的功效。国家在“七五”“八五”“九五”期间也有专题对半夏进行了研究,但对其炮制减毒的机制研究进展缓慢,瓶颈是刺激性成分和产生辛辣味的成分尚没有明确<sup>[2]</sup>。在毒性成分未明确的情况下怎样确定半夏的毒性大小更是鲜有研究,半夏在炮制过程中通过眼观其内无白芯,口尝其无麻舌感即可认为该炮制品毒性较低。但此方法受主观因素影响较大,多为经验性判断,且口尝毒性药材存在一定安全隐患。因此,需要通过一定途径寻找用以表征半夏炮制品毒性大小的方法,其具有十分重要的现实意义。

目前《中国药典》2020年版将收录的半夏分为清半夏、姜半夏及法半夏。其中清半夏炮制方法为取净半夏,大小分开,用8%白矾溶液浸泡或煮至内无干心,口常微有麻舌感,取出,洗净,切厚片,干燥。姜半夏炮制方法为取净半夏,大小分开,用水浸泡至内无干心时,取出;另取生姜切片煎汤,加白矾与半夏共煮透,取出,晾干,或晾至半干,干燥或切薄片,干燥。其中,影响半夏毒性大小的因素有生姜、白矾的用量,炮制时间及温度的大小。生姜畏半夏的炮制理念已有数百年的历史,姜制半夏最早记载于南北朝时期《刘涓子鬼遗方》:“汤洗七遍,生姜浸一宿,熬过”<sup>[3]</sup>。今有研究指出,生姜对半夏的解毒成分主要为姜辣素,姜辣素对半夏毒针晶和凝集素蛋白刺激巨噬细胞导致的炎症因子释放有明显的抑制作用<sup>[4]</sup>。

白矾本身为矿物药,其主要成分为十二水合硫酸铝钾  $[KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O]$ ,味酸,涩,性寒。《圣

济总录》中款冬花汤中半夏采用白矾水浸7d焙干;《太平惠民和剂局方》记载的牛黄生犀丸中半夏也注明为“白矾制”。今有研究指出,白矾对生姜的解毒机制为白矾溶液中的  $Al^{3+}$  可络合毒针晶草酸钙中的草酸形成单配体络合物,使草酸钙溶解,针晶的刚性结构破坏;同时白矾溶液可使针晶中凝集素蛋白溶解并降解在浸泡的溶液中,在破坏其特殊的针晶晶型的同时降低了化学刺激,毒性显著降低<sup>[5]</sup>。药典规定,半夏药材浸泡时要浸泡至内无干心,这是时间积累的过程,明代《本草纲目》中记载:“用大半夏,汤洗七次,每两用白矾一两半,温水化浸五日,焙干”<sup>[6]</sup>。可见随着炮制时间的增长,也能发挥出一定的解毒作用。随着炮制温度的增加,能够加速反应进程,加速毒性成分的分解,起到物理辅助降毒的作用。本实验通过一种新的数据浓缩方法将以上4种影响毒性大小的因素(白矾用量、生姜用量、蒸煮时间、蒸煮温度)浓缩为1个指标  $S_{\text{面}}$ ,表征半夏炮制品相对毒性大小,并建立  $S_{\text{面}}$  与炮制条件、物性参数、化学成分间的回归方程,以期验证该毒性标示方法的有效性并获得毒性大小与炮制条件、物性参数、化学成分间的量化关系。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

YX-24LDJ 型手提式压力蒸汽灭菌器,江阴滨江医疗设备有限公司;DT-300 型电子天平,上海医用激光仪器厂常熟分厂;JW-2018H 型高速离心机,安徽嘉文仪器装备有限公司;TLC VISUALIZER2 型薄层成像仪,瑞士卡玛公司;pH S-3pH 计,上海·创益仪器仪表有限公司;UliMate3000 高效液相色谱仪,赛默飞公司;HK250 型科导台式超声波清洗仪器,250 W,50 kHz,上海汉克科学仪器有限公司;色谱柱为 Zorbax SB-Aq (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 柱;0.45 μm 针式微孔滤膜,郑州市金水区润华化玻

仪器供应站。

## 1.2 材料

半夏对照药材,批号 121272-201806,中国食品药品检定研究院;半夏(S0),批号 190601,购于河南省青山药业股份有限公司,经河南中医药大学陈天朝教授鉴定,为天南星科半夏属植物半夏 *P. ternata* (Thunb.) Breit.的干燥块茎;生姜,市售,经河南中医药大学陈天朝教授鉴定,为姜科姜属植物姜 *Zingiber officinale* Rosc.的新鲜根茎。对照品琥珀酸(批号 Z18D6H7816, HPLC 质量分数 $\geq 98\%$ )、草酸(批号 Z15S9Y70497, HPLC 质量分数 $\geq 98\%$ )、苹果酸(批号 Z29O10H101559, HPLC 质量分数 $\geq 98\%$ )、柠檬酸(批号 SM0425GA14, HPLC 质量分数 $\geq 98\%$ )、精氨酸(批号 140685-201707, HPLC 质量分数 $\geq 98\%$ )、丙氨酸(批号 140680-202005, HPLC 质量分数 $\geq 98\%$ )、缬氨酸(批号 140681-201703, HPLC 质量分数 $\geq 98\%$ )、亮氨酸(批号 140687-201905, HPLC 质量分数 $\geq 98\%$ )、上海源叶生物科技有限公司。十二水合硫酸铝钾,批号 180607,郑州派尼化学试剂厂;甲醇, Sigma 试剂有限公司,

色谱纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 半夏药材的质量检测

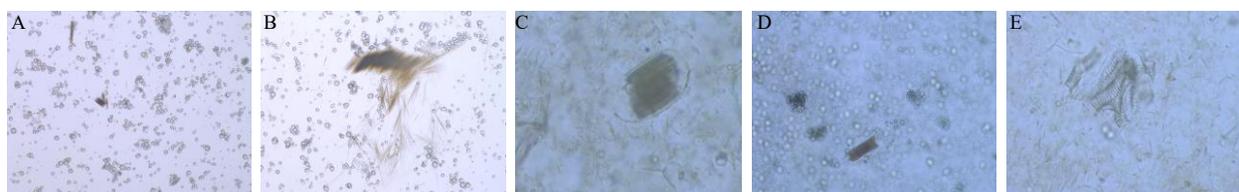
本实验参考《中国药典》2020年版一部半夏的性状、鉴别、检查、浸出物、含量测定等对药材进行质量检测<sup>[1]</sup>。

**2.1.1 半夏药材性状鉴定** 经观察与测量,半夏符合《中国药典》2020年版一部项下性状鉴别的特征描述:呈类球形,有的稍偏,直径 0.7~1.6 cm,表面白色或浅黄色,顶端有凹陷的茎痕,周围密布麻点状根痕,下方钝圆,较光滑,质坚实,断面洁白,富粉性,味辛辣、麻舌而刺喉<sup>[1]</sup>。

#### 2.1.2 半夏药材显微鉴定

(1) 水装片:取半夏粉末少量,加稀甘油制成水装片,置显微镜下观察淀粉粒,结果见图 1-A、B。

(2) 水合氯醛透化片:取过五号筛半夏粉末少量,置于载玻片中央,滴加 2~3 滴水合氯醛在酒精灯下边加热边搅拌,稍冷后,滴加稀甘油 1 滴,盖上盖玻片,置于显微镜下观察(100 $\times$ 1.25 倍),结果如图 1-C~E 所示。



A-半夏淀粉粒显微图 B-半夏散在草酸钙针晶显微图 C、D-半夏黏液细胞中草酸钙针晶显微图 E-半夏螺纹导管显微图  
A-micrograph of *P. ternata* starch grains B-micrograph of *P. ternata* powder in calcium oxalate needle crystals C, D-micrograph of calcium oxalate needle crystals in *P. ternata* mucous cells E-micrograph of *P. ternata* threaded catheter

图 1 半夏药材(S0)显微鉴定(100 $\times$ 1.25倍)

Fig. 1 Microscopic identification diagram of *P. ternata* (S0) (100  $\times$  1.25)

**2.1.3 半夏药材薄层鉴定** 参考《中国药典》2020年版一部方法进行半夏药材的薄层鉴定<sup>[1]</sup>。

(1) 供试品溶液的制备:取半夏粉末 1 g,加甲醇 10 mL,加热回流 30 min,滤过,滤液挥至 0.5 mL,作为供试品溶液。

(2) 对照药材溶液的制备:取对照药材粉末 1 g,加甲醇 10 mL,加热回流 30 min,滤过,滤液挥至 0.5 mL,作为对照药材溶液。

(3) 混合对照品溶液的制备:另取精氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸对照品,加 70%甲醇制成各含 1 mg/mL 的混合溶液,作为对照品溶液。

(4) 薄层鉴定板的制备:精确吸取供试品溶液 5  $\mu$ L、对照品溶液 1  $\mu$ L,分别点于同一硅胶 G 薄层

板上,以正丁醇-冰醋酸-水(8:3:1)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。结果如图 2 所示。

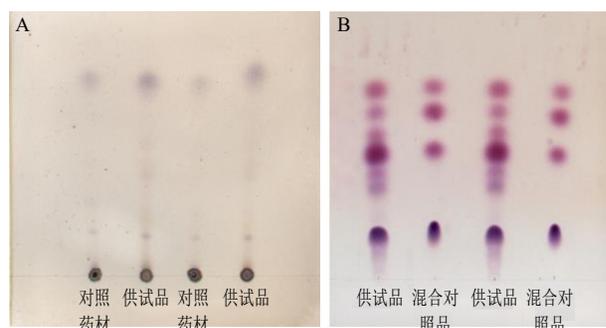
**2.1.4 半夏药材水分、总灰分、浸出物鉴定** 半夏药材水分、总灰分、浸出物鉴定依次按照《中国药典》2020年版四部通则 0832 项下烘干法、通则 2302、通则 2201 项下冷浸法进行鉴定<sup>[7]</sup>,结果见表 1。

### 2.2 正棱锥降维法建立毒性表征模型

**2.2.1 半夏相对毒性的标示** 以半夏生品(S0)为标准,其在底部投影面积为 1,认为毒性大小为 100%,采用公式计算各炮制品相对毒性大小。

相对毒性 = 各炮制品底部投影面积/生品底部投影面积

**2.2.2 德尔菲优选法验证模型有效性及筛选饮片毒**



A-半夏对照药材与供试品薄层鉴定图 B-混合对照品(精氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸)与供试品薄层鉴定图

A-*P. ternata* reference material and test product TLC identification diagram B-mixed reference products (arginine, alanine, valine, leucine) and test product TLC identification diagram

图2 半夏药材(S0)薄层鉴定

Fig. 2 Thin-layer identification diagram of *P. ternata* (S0)

表1 半夏药材水分、总灰分、浸出物鉴定结果

Table 1 Appraisal results of water content, total ash content and extract of *P. ternata*

指标	质量分数/ %	《中国药典》规定 质量分数/%	是否符合 要求
水分	10.00	≤13.0	是
总灰分	3.99	≤4.0	是
浸出物	21.33	≥7.0	是

性限度 德尔菲法(Delphi)是1950年由美国研发的一种系统的、分层的结构化通信技术或方法,具有匿名性、一致性、反馈性和统计行性的特点。其目的是在一个领域内能够匿名征询专家意见,通过反复多次的交流和修正,最终达成趋于一致的结论<sup>[8]</sup>。基于该法研究,邀请陈天朝主任药师(河南中医药大学第一附属医院药学部)、施钧瀚副主任药师(河南中医药大学第一附属医院药学部)、王宏贤副主任药师(河南中一经营有限公司)、沈启良副主任药师

表2 正棱锥降维模型建立结果

Table 2 Establishment of regular pyramid dimensionality reduction model

编号	炮制方法				因素标准化处理结果				投影面积	相对 毒性/%	评分	票数
	白矾用量/g	生姜用量/g	时间/min	温度/℃	白矾(Aa)	生姜(Bb)	时间(Cc)	温度(Dd)				
S1	0	5	75	115	0.000 0	0.142 9	0.428 6	0.666 7	0.467 1	46.71	18	0
S2	3	15	135	105	0.142 9	0.428 6	1.000 0	0.000 0	0.336 5	33.65	15	0
S3	6	25	60	115	0.285 7	0.714 3	0.285 7	0.666 7	0.220 8	22.08	9	1
S4	9	35	120	105	0.428 6	1.000 0	0.857 1	0.000 0	0.178 6	17.86	6	5
S5	12	0	45	120	0.571 4	0.000 0	0.142 9	1.000 0	0.321 6	32.16	12	0
S6	15	10	105	110	0.714 3	0.285 7	0.714 3	0.333 3	0.197 4	19.74	7	2
S7	18	20	30	120	0.857 1	0.571 4	0.000 0	1.000 0	0.122 6	12.26	3	0
S8	21	30	90	110	1.000 0	0.857 1	0.571 4	0.333 3	0.086 9	8.69	1	0

(河南中一经营有限公司)等专家组成专家咨询组,采用专家背靠背“盲法”评价和“集中会评”相结合2种方式,对各方案炮制品进行评分。评价方法为①眼观无白芯,口尝味淡、无麻舌感(0~5分);②眼观微有白芯,口尝味稍有辛辣、麻舌感(5~15分);③眼观白芯明显,口尝有明显辛辣、麻舌感(15~20);④4位专家每人投票选出2组可作为半夏入药毒性限度标准的组别。

2.2.3 半夏炮制品的制备 通过查阅文献资料,根据《中国药典》2020年版及各地方炮制规范规定,基于此参考下,以白矾用量、生姜用量、蒸煮时间、蒸煮温度作为考察因素,依据前期预试验结果,各因素水平对应不一致,因而选取混合均匀设计法设计实验,实验操作见表2[生品(S0)各因素水平均为0,表2未列出]。

取生半夏大小分档后,药材使用无菌水洗净,于20℃恒温条件下,以不同白矾用量浸泡至无干心,浸泡时使用无菌水量为药材量4倍,再加不同用量生姜(捣碎),用高压锅蒸汽灭菌锅蒸制一段时间后取出,低温干燥,即得样品。实验中所用白矾、生姜用量及炮制时间、温度如表2炮制方法所示。取适量半夏各组炮制品分别置于干净透明的培养皿上,均匀平铺,然后将培养皿放入薄层扫描仪中,选择反射光照射,采集图像,结果如图3所示。

2.2.4 正棱锥降维模型的构建 采用min-max标准化方法对4个因素均匀设计方案数据进行标准化处理,结果如表2所示。

以底边边长为1,斜边棱长为1,构建金字塔型的正四棱锥体,底边4个顶点分别以A、B、C、D表示白矾、生姜、时间、温度,棱长由底边顶点到椎体顶点刻度为0→1;将每组4因素标准化后的数

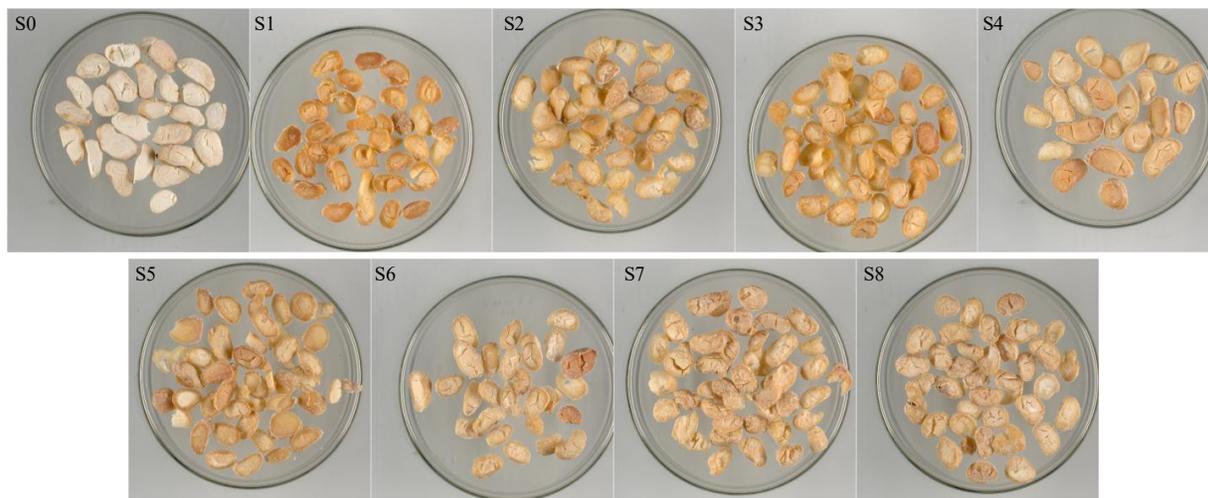


图3 半夏各组炮制品饮片图

Fig. 3 Pictures of decoction pieces of processed *P. ternata*

据标示在相对应的棱长上, 分别以点 a、b、c、d 表示, 将点 a、b、c、d 在底部的投影点用 a'、b'、c'、d' 表示, 连接 a'、b'、c'、d' 组成 4 边形 a'b'c'd', 求其面积并用  $S_{\text{面}}$  表示。半夏生品 (S0) 的 4 因素水平均为 0, 因此在底部投影的 4 边形为底面正方形 ABCD, 其面积为 1, 以  $S_{\text{面}}$  标示半夏炮制品相对毒性大小 (以生品为标准)。

以  $S_{\text{面}}$  为因变量, 4 个因素 9 组原始数据 (含生品) 为自变量  $X_{\text{白矾}}$ 、 $X_{\text{生姜}}$ 、 $X_{\text{时间}}$ 、 $X_{\text{温度}}$  建立回归方程。用 SPSS 软件分析得  $S_{\text{面}} = 1 - 0.0119 X_{\text{白矾}} - 0.0058 X_{\text{生姜}} - 0.0006 X_{\text{时间}} - 0.0043 X_{\text{温度}}$ ,  $r^2 = 0.9843$ ,  $P < 0.001$ , 方程的拟合效果较好。表 2 数据经 SPSS 软件分析可知, 模型计算出的相对毒性与专家评审得分的相关性为  $r = 0.9852$ ,  $P < 0.001$ , 2 者具有显著相关性, 表明模型得出的结论符合传统经验性毒

性评价标准, 模型效果较好; 经专家评审得编号 4 方案票数最高, 编号 6 其次, 因此, 可将相对毒性 17.86%~19.74% 作为半夏入药毒性限度标准。

采用 geogebra 绘图软件绘制半夏各组炮制品正棱锥模型 3D 图及平面俯视图, 结果如图 4、5。

### 2.3 色度值的测定

**2.3.1 图像的采集** 取不同炮制品饮片, 分别置于干净透明的培养皿上, 均匀平铺, 然后将培养皿放入薄层扫描仪中, 选择反射光照射, 采集图像。

**2.3.2 RGB 数据采集及 HSI 数值转换** 打开 MATLAB R2016 软件, 将采集好的图像依次通过程序代码分析, 生成各自的 RGB (红绿蓝) 图像, 从每个样品 RGB 图像中均匀选取 30 个 (R, G, B) 点, 取平均值, 得到  $(\bar{R}, \bar{G}, \bar{B})$ , 然后将平均值  $(\bar{R}, \bar{G}, \bar{B})$  进行 HSI 转换, 得到 (H, S, I) 数

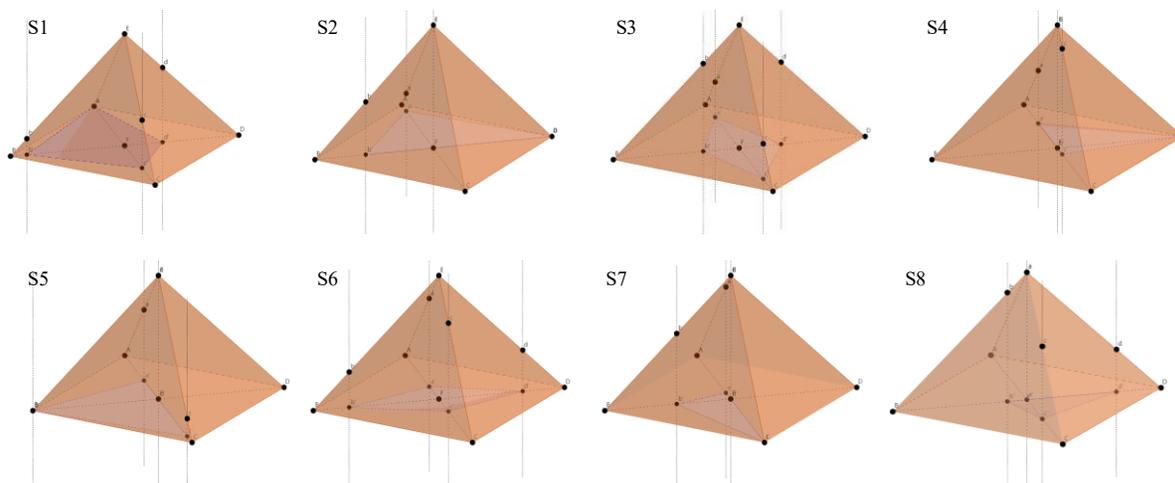


图4 半夏各组炮制品正棱锥模型 3D 图

Fig. 4 3D diagram of right pyramid model of each group of *P. ternata* processed products

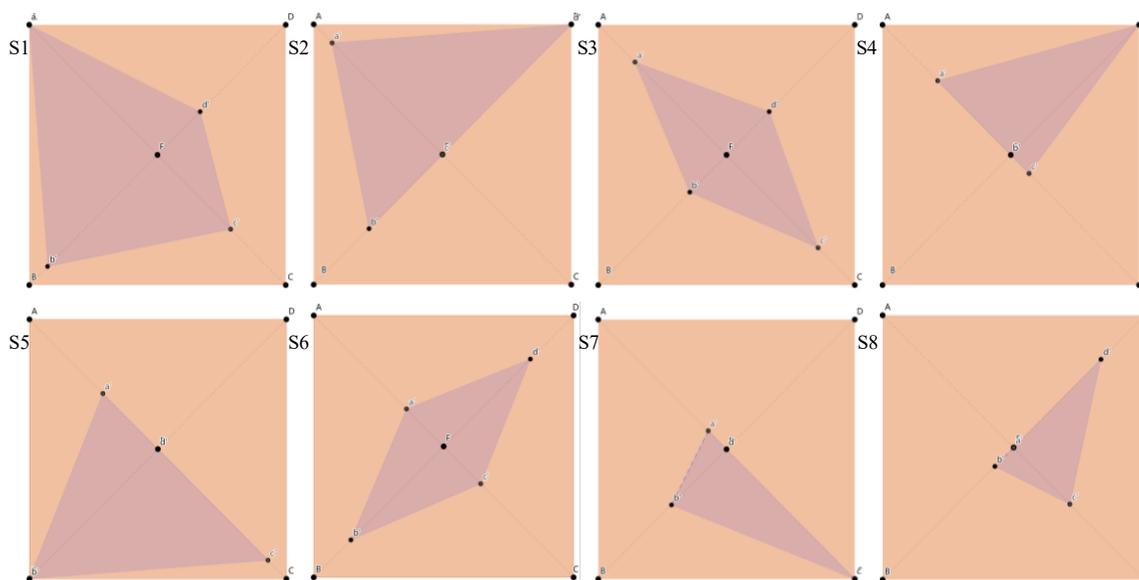


图5 半夏各组炮制品正棱锥模型平面俯视图

Fig. 5 Plan view of regular pyramid model of each group of *P. ternata* processed products

据，即（色调，饱和度，亮度）数据。HSI 与 RGB 转换公式如下。色度值测定结果见表 3。

$$H = \theta (B \leq G) \text{ 或 } 2\pi - \theta (B > G)$$

$$\theta = \arccos\{0.5[(R-G) + (R-B)] / [(R-G)^2 + (R-B)(G-B)]^{1/2}\}$$

$$I = 1/3(R+G+B)$$

### 2.4 pH 值的测定

称取 5.0 g 饮片，准确称取，放入 50 mL 纯化水中浸泡 12 h，滤过，滤液摇匀，平行测定 3 次，求平均值，即为饮片 pH 值。pH 值测定结果见表 3。

### 2.5 有机酸的测定

**2.5.1 对照品溶液的制备** 分别精密称取琥珀酸 17.60 mg、草酸 16.03 mg、苹果酸 15.09 mg、柠檬酸 15.66 mg 适量，用 NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 2) 定容至 5

L 量瓶中，摇匀，即得对照品溶液。

**2.5.2 供试品溶液的制备** 取过四号筛的 S1~S8 样品粉末 0.5 g，加水 50 mL，超声 60 min，放冷，用水补足减失的质量，摇匀，取续滤液 5 mL，加磷酸溶液 0.5 mL，摇匀，用醋酸乙酯萃取 5 次，每次 25 mL，合并醋酸乙酯层，减压浓缩至干，残渣加 0.1% 磷酸溶液溶解，转移至 5 mL 量瓶中，加 0.1% 磷酸溶液至刻度，过 0.45 μm 针式微孔滤膜，即得供试品溶液。

**2.5.3 色谱条件** 色谱柱为 Zorbax SB-Aq 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相为 0.03 mol/L 磷酸二氢铵水溶液 (pH 2.0)-甲醇 (97:3)；体积流量 0.8 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 210 nm；进样量 10 μL。色谱图见图 6、7。

表 3 半夏生品及各组炮制品 pH、色度值和 5 种有机酸含量测定结果

Table 3 Determination of pH, color values and five organic acid content of raw and processed products of *P. ternata*

编号	取样量/g	pH 值	H	S	I	质量分数/(mg·g <sup>-1</sup> )				
						草酸	柠檬酸	琥珀酸	D-苹果酸	L-苹果酸
S0	0.500 4	6.60	0.115 9	0.104 0	0.874 0	0.247 9	1.035 6	0.336 2	1.327 2	1.487 9
S1	0.501 1	4.87	0.094 8	0.267 0	0.606 0	0.264 2	0.146 2	0.787 0	0.090 4	0.131 6
S2	0.500 4	4.19	0.087 5	0.302 0	0.604 0	0.276 9	0.500 9	0.789 2	0.279 3	0.146 5
S3	0.500 8	3.46	0.087 9	0.270 0	0.609 0	0.301 7	0.689 2	0.209 0	0.097 4	0.138 4
S4	0.500 9	3.15	0.089 8	0.300 0	0.646 0	0.494 0	0.716 1	0.176 7	0.236 5	0.130 0
S5	0.501 1	3.70	0.089 7	0.180 0	0.594 0	0.705 6	0.321 5	0.503 2	0.163 2	0.139 3
S6	0.500 9	2.66	0.106 5	0.211 0	0.660 0	0.917 7	0.425 9	0.000 0	0.133 0	0.142 3
S7	0.500 6	2.50	0.092 5	0.208 0	0.644 0	0.707 9	0.265 1	0.000 0	0.199 7	0.131 0
S8	0.501 6	2.47	0.093 3	0.231 0	0.596 0	0.782 0	0.318 1	0.086 1	0.124 1	0.132 6

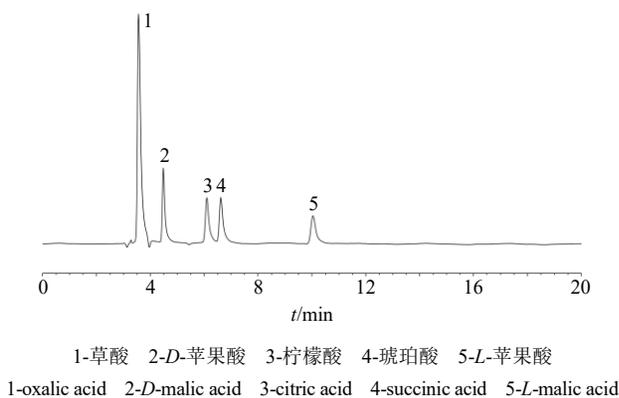


图6 5种有机酸混合对照品 HPLC 图谱

Fig. 6 HPLC spectrum of five organic acid mixed reference substances

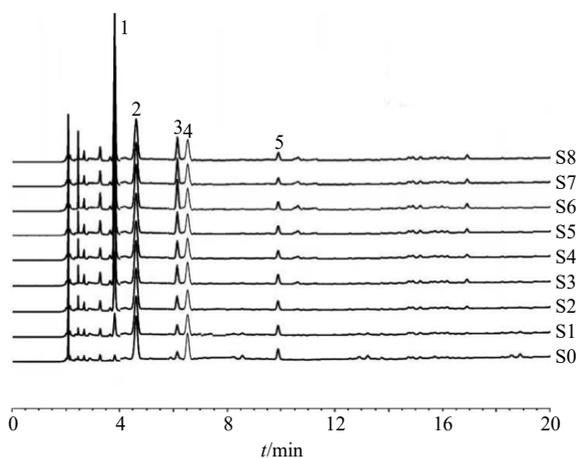


图7 半夏9组供试品叠加 HPLC 图谱

Fig. 7 Superimposed HPLC spectra of nine samples of *P. ternata* group

**2.5.4 线性关系考察** 取混合对照品溶液，制备成一系列质量浓度的溶液，按照“2.5.3”项下色谱条件进行测定，以对照品质量浓度为横坐标 ( $X$ )，样品峰面积为纵坐标 ( $Y$ )，绘制标准曲线进行线性回归，得回归方程分别为草酸  $Y=104.370X+1.0414$ ， $R^2=0.9999$ ，线性范围  $0.0052\sim 0.5129\text{ mg}$ ；琥珀酸  $Y=7.726X-0.0835$ ， $R^2=0.9998$ ，线性范围  $0.0144\sim 1.4080\text{ mg}$ ；D-苹果酸  $Y=11.008X-0.1236$ ， $R^2=0.9999$ ，线性范围  $0.0123\sim 1.2072\text{ mg}$ ；L-苹果酸  $Y=7.971X-0.1611$ ， $R^2=0.9995$ ，线性范围  $0.0754\sim 13.1935\text{ mg}$ ；柠檬酸  $Y=12.015X+0.0074$ ， $R^2=0.9999$ ，线性范围  $0.0128\sim 1.2528\text{ mg}$ 。

**2.5.5 精密度考察** 精密吸取混合对照品溶液，按照“2.5.3”项下方法连续进样6次，每次  $10\ \mu\text{L}$ ，记录峰面积。计算 RSD 值。测得的草酸、琥珀酸、苹果酸、柠檬酸 RSD 值均小于 2%，说明此仪器的精

密度良好。

**2.5.6 重复性考察** 精密称取 S4 方案下样品粉末6份，按照“2.5.2”项下制备得供试品溶液，并按照“2.5.3”项下方法连续测定，记录峰面积。计算 RSD 值。测定时草酸、琥珀酸、苹果酸、柠檬酸 RSD 值均小于 5%，表明该方法重复性良好。

**2.5.7 稳定性考察** 精密吸取 S4 方案下样品溶液，分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 按照“2.5.3”项下方法连续测定，记录峰面积。计算 RSD 值。测得的草酸、琥珀酸、苹果酸、柠檬酸 RSD 值均小于 5%，说明该样品在 24 h 内稳定性良好。

**2.5.8 加样回收率考察** 精密称取  $0.5\text{ g}$  S4 方案下样品粉末6份，精密加入对照品适量，按照“2.5.2”项下供试品溶液制备方法，并按照“2.5.3”项下色谱条件进行测定。所测得有机酸类成分的加样回收率在  $95\%\sim 105\%$ ，RSD 值均小于 5%，表明此方法具有可行性。

**2.5.9 有机酸含量测定** 按“2.5.2”项方法制备 S0~S8 样品的供试品溶液，按照“2.5.3”项测定 S0~S8 样品的5种有机酸含量。所得结果见表3。

## 2.6 $S_{\text{面}}$ 与 pH 值、 $H$ 、 $S$ 、 $I$ 相关性分析和线性回归模型的建立

采用 SPSS 软件分析  $S_{\text{面}}$ 与 pH、 $H$ 、 $S$ 、 $I$  间的相关性，结果如表4。从表4中可知， $S_{\text{面}}$ 与 pH、 $I$  在 0.01 水平（双侧）具有显著相关性；与  $H$  在 0.05 水平（双侧）具有显著相关性；与  $S$  存在负相关性，但不具显著性。

采用 SPSS 软件建立  $S_{\text{面}}$ 与 pH、 $H$ 、 $S$ 、 $I$  间的回归模型： $S_{\text{面}}=0.165X_{\text{pH}}+2.393X_{\text{H}}-0.533X_{\text{S}}+0.372X_{\text{I}}-0.631$ ， $r^2=0.9988$ ， $P<0.001$ 。回归模型的参数如表5，由表5可知模型的拟合效果较好。由方程可知当 pH、 $H$ 、 $I$  越大时， $S_{\text{面}}$ 越大，即饮片的酸性越小，色调越大（饮片颜色越偏蓝色、冷色），亮度越大，饱和度越低，饮片的相对毒性就越强。

表4  $S_{\text{面}}$ 与 pH、 $H$ 、 $S$ 、 $I$  相关性分析

Table 4 Correlation analysis of  $S_{\text{surface}}$  and pH,  $H$ ,  $S$ ,  $I$

指标	统计量	$H$	$S$	$I$	pH
$S_{\text{面}}$	Pearson 相关性	0.697*	-0.611	0.826**	0.970**
	显著性（双侧）	0.037	0.081	0.006	0.000
	$N$	9	9	9	9

\*、\*\*表示分别在 0.05、0.01 水平（双侧）显著相关，表6同

\*, \*\* Indicates significant correlation at the 0.05, 0.01 level (two-sided), respectively, same as table 6

### 2.7 $S_{\text{面}}$ 与 pH 值、有机酸相关性分析和逐步回归模型

采用 SPSS 软件分析  $S_{\text{面}}$ 与 pH、有机酸间的相关性,结果如表 6。从表 6 中可知,  $S_{\text{面}}$ 与 pH、D-苹果酸、L-苹果酸在 0.01 水平(双侧)具有显著相关性;与柠檬酸、琥珀酸具有正相关性,不具显著性;

与草酸存在负相关性,不具显著性。

采用 SPSS 软件建立  $S_{\text{面}}$ 与 pH、H、S、I 间的回归模型:  $S_{\text{面}}=0.185 X_{\text{pH}}+0.163 X_{\text{L-苹果酸}}+0.186 X_{\text{草酸}}-0.508$ ,  $r^2=0.995 5$ ,  $P<0.001$ 。回归模型的参数如表 7 所示,可知模型的拟合效果较好。由方程可知当草酸、苹果酸含量越大、酸性越小,  $S_{\text{面}}$ 越大,饮

表 5  $S_{\text{面}}$ 与 pH、H、S、I 线性回归模型参数

Table 5 Linear regression model parameter of  $S_{\text{surface}}$  and pH, H, S, I

指标	统计量						拟合效果		
	变量	变量系数	标准误差	标准系数	t 值	P 值	$r^2$ 值	F 值	P 值
$S_{\text{面}}$	pH	0.165	0.004	0.792	46.357	0.000	0.999 8	1 704.976	<0.001
	H	2.393	0.776	0.082	3.083	0.037			
	S	-0.553	0.084	-0.126	-6.573	0.003			
	I	0.372	0.094	0.118	3.968	0.017			
	常量	-0.631	0.068	-	-9.220	0.001			

表 6  $S_{\text{面}}$ 与 pH 值、有机酸相关性分析

Table 6 Correlation analysis of  $S_{\text{surface}}$ , pH and organic acid

指标	统计量	pH 值	草酸	柠檬酸	琥珀酸	D-苹果酸	L-苹果酸
$S_{\text{面}}$	Pearson 相关性	0.970**	-0.599	0.581	0.400	0.888**	0.908**
	显著性(双侧)	0.000	0.089	0.101	0.286	0.001	0.001
	N	9	9	9	9	9	9

表 7  $S_{\text{面}}$ 与 pH、有机酸逐步回归模型参数

Table 7 Stepwise regression model parameter of  $S_{\text{surface}}$ , pH, and organic acid

指标	统计量						拟合效果		
	变量	变量系数	标准误差	标准系数	t 值	P 值	$r^2$ 值	F 值	P 值
$S_{\text{面}}$	pH	0.185	0.014	0.889	13.581	0.000	0.995 3	586.981	<0.001
	L-苹果酸	0.163	0.029	0.263	5.587	0.003			
	草酸	0.186	0.045	0.174	4.085	0.009			
	常量	-0.508	0.065	-	-7.791	0.001			

片的相对毒性就越强。

## 3 讨论

### 3.1 毒性标示模型建立的意义

通过对文献的查阅和半夏炮制历史的探究<sup>[9-11]</sup>,可发现当下常用的半夏炮制方法有生半夏、清半夏、姜半夏和法半夏 4 种炮制方法,对此 4 种炮制方法炮制条件进行分析,提取出 4 个影响炮制品毒性的因素,分别为白矾、生姜的用量,炮制的时间和温度,此 4 种影响因素单因素作用均为正向减毒,即白矾、生姜用量越大( $Al^{3+}$ 限度范围内),炮制时间越长,炮制温度越高,半夏炮制品毒性就越低。同样的在这 4 种影响因素相互作用下,炮制品毒性也

会降低,但其相互作用怎样影响着毒性的变化值得探究。因 4 种因素均为正向减毒作用,故而可考虑采用某种方法将其表达信息浓缩为 1 个指标,既能用此指标表征减毒作用的变化规律,又能表征毒性大小。经课题组探究,尝试建立新的浓缩因素信息的方法,即正棱锥体降维模型。众所周知,一个对角线相互垂直的四边形,其面积为两对角线乘积的一半,两对角线越短,面积越小。在正棱锥降维模型中,随着 4 种因素水平的增大,炮制品毒性降低,其在正棱锥底部投影围成的四边形的对角线越短,面积越小。因此可用 4 因素在底部投影所围成的面积表征炮制品毒性的大小。以生品毒性为标准,其

所对应的面积为 1, 其他炮制品根据因素水平在底部投影的面积与生品作比, 得相对毒性大小。此法可将 4 种因素浓缩为 1 个指标, 既能又来表征毒性大小, 又能建立与 4 种因素间的回归关系, 从而发现 4 种因素相互作用下的减毒规律。由此法得  $S_{\text{面}} = 1 - 0.0119 X_{\text{白矾}} - 0.0058 X_{\text{生姜}} - 0.0006 X_{\text{时间}} - 0.0043 X_{\text{温度}}$ ,  $r^2 = 0.9838$ ,  $P < 0.001$ 。由回归方程中可得 4 因素减毒能力依次为白矾 > 生姜 > 温度 > 时间, 符合客观经验规律。不仅如此, 在后续研究中, 根据半夏可入药的毒性限度, 由上述回归关系可确定相应的炮制工艺, 在不明确毒性成分的条件下为半夏的炮制和安全用药提供新思路。

### 3.2 炮制品 $S_{\text{面}}$ 与 pH、色度值的关系

炮制品的 pH、色度值均为炮制品的物性参数, 物性参数表征炮制品的物理性质, 测量方法较简单, 易获得各水平下的数据, 通常对炮制品饮片经验性判断标准的最直接来源就是其色泽<sup>[12]</sup>。通过分析可知  $S_{\text{面}} = 0.165 X_{\text{pH}} + 2.393 X_{\text{H}} - 0.533 X_{\text{S}} + 0.372 X_{\text{I}} - 0.631$ ,  $r^2 = 0.9988$ ,  $P < 0.001$ 。当 pH、H、I 越大, S 越小时,  $S_{\text{面}}$  越大, 即饮片的酸性越小, 色调越大 (饮片颜色越偏蓝色、冷色), 亮度越大, 饱和度越小, 饮片的毒性就越强, 饮片偏“冷白色”, 如生品对应的饮片颜色 (可参考图 3)。当饮片入药毒性限度明确后 (根据表 4 中专家评审结果可将 17.86%~19.74% 作为标准), 可通过炮制品的 pH 和色度来判断半夏炮制品毒性大小是否合格, 为今后判断半夏炮制品毒性是否达到标准提供新思路。

### 3.3 炮制品 $S_{\text{面}}$ 与 pH 值、有机酸间的关系

近年来随着对半夏有机酸组的研究逐渐深入, 发现半夏有机酸组是半夏有效成分之一, 具有祛痰、止咳、体外抑制肿瘤细胞的作用<sup>[13-15]</sup>。此外, 对于半夏毒性成分的猜测现阶段有研究认为是草酸钙针晶, 认为其晶型结构是造成麻舌感和辛辣感的主要原因<sup>[16]</sup>。草酸对照品相对分子质量是 126, 草酸钙针晶的相对分子质量是 146, 可得草酸钙针晶与草酸的换算关系为草酸钙含量 = 草酸含量 × 146/126<sup>[17]</sup>。草酸属于弱酸, 2 者在相互转化的反应体系, 受到  $H^+$  浓度的影响。因此无论从有机酸组是半夏有效成分的角度还是其对酸性环境的影响角度, 都有必要探究其与  $S_{\text{面}}$  间的关系。因半夏有机酸组中含有较多有机酸种类, 但是哪种有机酸对  $S_{\text{面}}$  的解释具有较优的线性关系, 需要进一步的筛选剔除。故而本模块采用逐步回归法进行分析, 逐步回

归分析方法的基本思路是自动从大量可供选择的变量中选取最重要的变量, 建立回归分析的预测或者解释模型。其基本思想是, 将自变量逐个引入, 引入的条件是其偏回归平方和经检验后是显著的。它的实质是建立“最优”的多元线性回归方程<sup>[18]</sup>。本研究经逐步回归分析得:  $S_{\text{面}} = 0.185 X_{\text{pH}} + 0.163 X_{\text{L-苹果酸}} + 0.186 X_{\text{草酸}} - 0.508$ ,  $r^2 = 0.9955$ ,  $P < 0.001$ 。经过逐步回归分析得, 通过 pH 值、苹果酸、草酸来模拟有机酸组与  $S_{\text{面}}$  的关系具有较优得线性回归方程。由方程可知饮片中  $H^+$  的浓度越低, 苹果酸、草酸的含量越大, 饮片的相对毒性就越大, 可通过测定 pH 值、苹果酸、草酸含量表征相对毒性大小。

### 3.4 总结

本实验期望建立一种模型表征半夏炮制品的相对毒性大小, 通过正棱锥降维法建立的相对毒性表征模型与德尔菲法得出的结果具有显著相关性, 表明模型建立成功。通过模型, 建立了相对毒性与炮制因素、物性参数、化学成分间的线性方程, 以此表征上述指标与相对毒性间的线性关系, 由此关系可通过测定相应的成分含量确定半夏炮制品的相对毒性大小。但通过方程, 无法确定这些指标是否是半夏炮制品毒性大小的决定因素, 如虽有研究猜测草酸钙晶体是毒性成分, 通过测定有机酸组与  $S_{\text{面}}$  的关系得  $S_{\text{面}} = 0.185 X_{\text{pH}} + 0.163 X_{\text{L-苹果酸}} + 0.186 X_{\text{草酸}} - 0.508$ ,  $r^2 = 0.9955$ ,  $P < 0.001$ 。通过以上方程发现, pH 值、苹果酸、草酸具有相近的回归系数, 仅由回归关系可得 pH 值、苹果酸、草酸综合作用下与  $S_{\text{面}}$  具有正向相关性, 能为草酸钙晶体是毒性成分的猜测提供佐证, 但仍不能完全证明上述猜测是否正确, 以及 pH 值、苹果酸是否也是决定因素。本实验仅能为半夏毒性表征方法提供新思路, 但决定半夏毒性大小的因素仍有待进一步探究。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 123.
- [2] 钟凌云, 吴皓, 张琳, 等. 半夏毒性成分和炮制机理研究现状 [J]. 上海中医药杂志, 2007, 41(2): 72-74.
- [3] 南齐·龚庆宣. 刘涓子鬼遗方: 五卷 [M]. 影印本. 北京: 人民卫生出版社, 1956: DI.83.
- [4] 金羊平. 生姜中姜辣素类成分对半夏、掌叶半夏毒性的解毒机制研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2016.
- [5] 朱法根. 半夏、掌叶半夏中凝集素蛋白促炎作用及矾制解毒机理研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2012.
- [6] 马小鑫, 李宇航. 半夏在经方中的应用 [J]. 中华中医

- 药杂志, 2012, 27(4): 832-835.
- [7] 中国药典 [S]. 四部. 2020: 114, 232-234.
- [8] 屈会丽, 王盛均, 吴雨晨, 等. 近 10 年德尔菲法在护理领域应用的可视化分析 [J]. 现代临床护理, 2021, 20(4): 72-78.
- [9] 王艳, 胡素敏, 李盼飞, 等. 解读半夏炮制减毒 [J]. 吉林中医药, 2019, 39(10): 1264-1267.
- [10] Zhai X Y, Zhang L, Li B T, *et al.* Discrimination of toxic ingredient between raw and processed *Pinellia ternata* by UPLC/Q-TOF-MS/MS with principal component analysis and *t*-test [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(2): 200-208.
- [11] Xia X C, Ma Y H, Wang F A, *et al.* Effects of extracts from Chuanwu (*Aconitum carmichaelii*) and Banxia (*Rhizoma Pinelliae*) on excisional wound healing in a rat's model [J]. *J Tradit Chin Med*, 2019, 39(1): 65-73.
- [12] 于梦婷, 童黄锦, 毛春芹, 等. 基于色泽量化与主要成分含量的不同基原莪术饮片质量识别研究 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(6): 1393-1400.
- [13] 杨冰月, 李敏, 任敏, 等. 基于灰色关联度分析法对半夏及其炮制品总有机酸止咳作用的谱-效关系研究 [J]. 中草药, 2016, 47(13): 2301-2307.
- [14] 张科卫, 吴皓, 沈绣红. 半夏中总游离有机酸的作用研究 [J]. 南京中医药大学学报: 自然科学版, 2001, 17(3): 159-161.
- [15] 曾颂, 李书渊, 吴志坚, 等. 半夏镇咳祛痰的成分-效应关系研究 [J]. 中国现代中药, 2013, 15(6): 452-455.
- [16] 袁海建, 贾晓斌, 印文静, 等. 炮制对半夏毒性成分影响及解毒机制研究报道分析 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(23): 4462-4468.
- [17] 梁君, 张振凌, 王桁杰, 等. 不同半夏炮制品麻辣毒性与草酸钙针晶含量关系的研究 [J]. 中医学报, 2016, 31(10): 1563-1565.
- [18] 余继峰. 数学地质方法与应用/高等教育“十三五”规划教材 [M]. 徐州: 中国矿业大学出版社, 2019: 43.

[责任编辑 郑礼胜]