

综合加权评分法优选姜半夏炮制工艺

张琳*,陈晓群(南通市第三人民医院药剂科,江苏南通 226006)

中图分类号 R283;R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)01-0115-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.01.37

摘要 目的:优选姜半夏最佳炮制工艺。方法:选择生姜用量、白矾用量、炮制时间3个因素,以姜半夏中有效成分总有机酸、炮制辅料生姜中6-姜醇的含量以及白矾残留量为考察指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,以多指标综合加权评分方法优选姜半夏炮制工艺,并与《中国药典》方法(生姜25g,白矾12.5g)比较及进行验证试验。结果:优选出姜半夏炮制工艺为每100g净半夏加生姜25g、白矾8g,共炮制4h;所得样品3次验证试验结果相似。结论:优选的炮制工艺与药典法比较确定了炮制时间,减少了白矾用量,既使姜半夏有效组分保持较高的含量,同时又降低了白矾残留量。

关键词 姜半夏;综合加权评分法;正交设计;炮制工艺

Optimization of Processing Technology for Pinelliae Rhizoma Preparatum Cum Zingibere et Alumine by Synthetic Weight Mark Method

ZHANG Lin, CHEN Xiao-qun (Dept. of Pharmacy, Nantong Third People's Hospital, Jiangsu Nantong 226006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the processing technology of pinelliae rhizoma preparatum cum zingibere et alumine. METHODS: The processing technology of pinelliae rhizoma preparatum cum zingibere et alumine was optimized by $L_9(3^4)$ orthogonal test and multiple index synthetic weight mark method with the amount of Zingiber officinale and alum, processing time as factors, using the content of effective component total organic acid in pinelliae rhizoma preparatum cum zingibere et alumine, the content of 6-zingiberol in processed *Z. officinale* and the content of alum as index. It was compared with the method stated in *Chinese Pharmacopeia* (*Z. officinale* 25 g, alum 12.5 g), and the validation test was performed. RESULTS: The optimized processing technology was as follows: *Pinellia ternate* 100 g, *Z. officinale* 25 g, alum 8 g, processing for 4 h. The results of 3 validation tests were similar. CONCLUSIONS: Compared with the method stated in *Chinese Pharmacopeia*, the optimized processing technology confirms the processing time and reduces the amount of alum; not only maintains the high content of effective component of pinelliae rhizoma preparatum cum zingibere et alumine, but also reduces the amount of residual alum.

KEYWORDS Pinelliae rhizoma preparatum cum zingibere et alumine; Synthetic weight mark method; Orthogonal design; Processing technology

姜半夏是半夏炮制品中最为常用的品种,炮制的作用是温中化痰、降逆止呕。2010年版《中国药典》规定了姜半夏的炮制方法,但对姜半夏炮制程度的判断,仍采用观察断面颜色、质地以及口尝无麻辣感为判断标准,缺乏量化的质量控制指标^[1]。吴皓课题组研究证明半夏中的总有机酸是姜半夏降逆止呕的活性成分之一^[2],而炮制辅料生姜中6-姜醇为生姜中主要的止呕活性物质^[3],其可增强姜半夏的降逆止呕作用。

本研究以姜半夏中总有机酸含量及6-姜醇含量为有效成分控制指标,同时测定姜半夏中白矾残留量指标,采用正交设计及多指标综合加权评分法,优选姜半夏的炮制工艺。

1 材料

1.1 仪器

数显恒温水浴锅(金坛市金城国胜实验仪器厂);2695高效液相色谱仪分离单元、2996二极管阵列检测器(美国Waters公司);LIBRORAEI-40SM电子分析天平(日本Shimadzu公司);PHS-3C型酸度计(上海仪电科学仪器股份有限公司);HJ-1型磁力搅拌器(金坛市医疗仪器厂);KQ-500DE型医用数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

* 主管中药师,硕士。研究方向:中药质量控制。E-mail:jue-zhangyan@163.com

1.2 药材与试剂

药材生半夏[江苏泰州高港中药饮片公司,批号:20120322,经窦志华主任中药师鉴定为天南星科植物三叶半夏 *Pinellia ternate* (Thunb.) Breit.的干燥块茎];炮制辅料白矾(来源于本院中药房,批号:20121014);生姜(市售,2013年2月购于菜市场,山东临沂产)。

标准品:琥珀酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:896-200001,纯度:99.5%);6-姜醇对照品(本院制剂实验室分离纯化制得,经检测为单一成分,纯度:>99%);含水硫酸铝钾 $[KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O]$,国药集团化学试剂有限公司,批号:1201011,化学纯度:>99.5%;柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液(pH=6.0)、溴百里香草酚蓝指示液、无水乙醇、氢氧化钠、盐酸等其他试剂均为分析纯,亚沸蒸馏水系自制。

2 方法与结果

2.1 姜半夏炮制工艺正交试验设计及样品制备

2.1.1 因素水平的确定。2010年版《中国药典》中姜半夏炮制辅料用量^[1]为:100g半夏用生姜25g、白矾12.5g,但未规定具体炮制时间。依据药典方法结合预试验实际情况,本试验选择生姜用量(g)、炮制时间(h)、白矾用量(g)为试验因素,按 $L_9(3^4)$ 表设计姜半夏炮制工艺,各因素水平见表1。炮制辅料

用量按每100 g半夏药材计。

表1 因素水平表

Tab 1 Factors and levels

水平	因素		
	A,g	B,h	C,g
1	10	4	4
2	25	5	8
3	40	6	12.5

2.1.2 姜半夏炮制样品的制备。称取粒径1 cm左右的净半夏100 g,用水浸泡至内无干心,取出;另取生姜切片适量煎汤,加白矾适量与半夏共煮透(炮制),取出,低温烘干。依次制备得到9个姜半夏炮制供试样品。

2.2 6-姜醇含量测定^[4]

2.2.1 色谱条件的选择。色谱柱:Lichrosphere-C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(65:35),流速:1 ml/min;检测波长:280 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μl。

2.2.2 对照品溶液的制备。精密称取6-姜醇对照品适量,用甲醇制备成质量浓度为0.12 mg/ml的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备。将姜半夏各炮制品粉末(40目)于80 ℃恒温干燥8 h备用。精密称定各样品粉末5 g,每个样品平行2份,置于离心管中,精密加甲醇25 ml,50 ℃温浸6 h,超声30 min(功率500 W,频率40 kHz),离心(离心半径21.46 cm, 5 000 r/min)10 min,将上清液转移至50 ml量瓶中,残渣再加入甲醇25 ml,摇匀,超声30 min,同上离心,上清液转移于量瓶中。残渣加适量甲醇洗涤,洗液合并至量瓶,用甲醇定容至50 ml。精密移取上述溶液10 ml,氮气吹干(45 ℃水浴),残渣用甲醇溶解转移至2 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,过0.22 μm微孔滤膜,得供试品溶液。每份进样2次测定。

2.2.4 线性关系考察。精密吸取6-姜醇对照品溶液1、2、4、8、16、32 μl,以对照品质量浓度(x)为横坐标、峰面积平均积分为纵坐标(y)绘制标准曲线,经回归分析,得回归方程为 $y=411\ 681x-878\ 6$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明6-姜醇检测质量浓度线性范围为0.12~3.84 μg/ml。

2.2.5 溶液稳定性试验。精密吸取姜半夏样品溶液10 μl,于0、2、4、8、12 h进样,测定各样品峰面积,结果其RSD为1.76%($n=5$)。

2.2.6 精密密度、重复性、回收率试验。根据相关方法操作,得精密密度、重复性试验的RSD为0.84%($n=5$)、1.33%($n=5$),平均回收率为100.76%(RSD=1.31%, $n=5$)。

2.3 有机酸含量测定

本文依据《中国药典》中半夏有机酸含量测定方法^[1],以琥珀酸作为对照品,对姜半夏中有机酸含量进行测定。

2.3.1 标准滴定液的制备。参照2010年版《中国药典》(一部)附录X V F滴定液配制方法^[1],分别配制氢氧化钠滴定液(0.1 mol/L)、盐酸滴定液(0.1 mol/L),备用。

2.3.2 对照品溶液的制备。取琥珀酸对照品适量,精密称定,置于100 ml量瓶中,加95%乙醇溶解,并稀释至刻度,制成每1 ml含1.013 mg琥珀酸的对照品溶液,备用。

2.3.3 供试品溶液的制备^[4]。取姜半夏粉末约5 g,精密称定,95%乙醇加热回流提取3次,每次50 ml,每次提取1 h,放冷,滤过,合并滤液,蒸干,残渣精密加入氢氧化钠滴定液(0.1 mol/L)10 ml,超声处理(功率500 W,频率40 kHz)30 min,转移至50 ml量瓶中,加新煮沸的冷水定容至刻度,摇匀,备用。

2.3.4 测定方法。按照电位滴定法[2010年版《中国药典》(一部)附录VIII A]^[1],精密吸取姜半夏供试品溶液20 ml,用盐酸滴定液(0.1 mol/L)滴定过量的碱液,记录盐酸滴定液消耗的体积(V)。以滴定液体积(V)为横坐标,以 $\Delta E/\Delta V$ (即相邻2次的电位差与加入滴定液的体积差之比)为纵坐标,绘制滴定曲线。 $\Delta E/\Delta V$ 的极大值对应的体积即为滴定终点,滴定结果用空白试验校正。计算得每1 ml氢氧化钠滴定液(0.1 mol/L)相当于5.904 mg的琥珀酸(C₄H₆O₄)。

2.3.5 溶液稳定性试验。取姜半夏粉末约5 g,精密称定,按“2.3.3”项下方法制备得到供试品溶液,按“2.3.4”项下方法每隔2 h测定1次,共测6次。结果表明供试品溶液在12 h内稳定,RSD为0.67%($n=6$),符合要求。

2.3.6 精密密度、重复性、回收率试验。根据相关方法操作,得精密密度、重复性试验的RSD为0.64%($n=5$)、0.56%($n=5$),平均回收率为97.25%,RSD=1.12%($n=5$),表明本法重复性、准确度好,符合测定要求。

2.4 白矾含量测定^[5]

2.4.1 指示液、滴定液配制。甲基红、二甲酚橙指示液、锌滴定液(0.05 mol/L)、乙二胺四醋酸二钠滴定液(0.05 mol/L)均按照2010年版《中国药典》(一部)附录相关项下配制^[1],备用。

2.4.2 供试品溶液制备。取姜半夏粉末(过四号筛)约5 g,精密称定,置于坩埚中,缓缓加热,至完全炭化时,逐渐升高温度至450 ℃,灰化4 h,取出,放冷,在坩埚中小心加入稀盐酸约10 ml,用表面皿覆盖坩埚,置于水浴上加热10 min;表面皿用热水5 ml冲洗,洗液并入坩埚中,滤过,用水50 ml分次洗涤坩埚及滤渣,合并滤液及洗液,摇匀,即得供试品溶液。

2.4.3 测定方法。在供试品溶液中加入0.025%甲基红乙醇溶液1滴,滴加氨试液至溶液显微黄色;加醋酸-醋酸铵缓冲液(pH 6.0)20 ml,精密加乙二胺四醋酸二钠滴定液(0.05 mol/L)25 ml,煮沸3~5 min,放冷;加二甲酚橙指示液1 ml,用锌滴定液(0.05 mol/L)滴定至溶液自黄色转变为红色,并将滴定的结果用空白试验校正。每1 ml的乙二胺四醋酸二钠滴定液(0.05 mol/L)相当于23.72 mg的含水硫酸铝钾[KAl(SO₄)₂·12H₂O]。

2.4.4 溶液稳定性试验。取姜半夏粉末约5 g,精密称定,按“2.4.2”项下方法制备得到供试品溶液,按“2.4.3”项下方法每隔1 h测定1次,共测6次。结果表明供试品溶液在6 h内稳定,计算得RSD=0.67%($n=6$),符合要求。

2.4.5 精密密度、重复性、回收率试验。根据相关方法操作,得精密密度、重复性试验的RSD为0.48%($n=5$)、0.72%($n=5$),平均回收率为97.25%(RSD=1.12%, $n=5$)。

2.5 正交试验结果

按照L₉(3⁴)正交设计表的条件进行试验,分别测得6-姜醇、总有机酸和白矾残留量,并进行多指标综合加权评分。半夏总有机酸作为主药半夏的有效成分指标,设定其主观权重为0.6;6-姜醇作为炮制辅料生姜中药理活性成分,设其主观权重为0.2;白矾残留量权重为0.2。以熵值法确定各指标的客观权重^[6],按照综合加权评分值越小越好的评判标准,首先将各指标标值标准化,统一指标得数量级并消除量纲,求得各指标的客观权重依次为0.38、0.27、0.35。取偏好系数为0.6,计算各指标的综合权重依次为0.51、0.23、0.26,求得各指标的综合加权评分值。正交试验结果见表2,各指标方差分析见表3。

2.6 炮制工艺的优选

表2 正交试验结果($n=3$)Tab 2 Results of orthogonal test($n=3$)

试验号	因素				指标			
	A	B	C	D(空白)	总有机酸含量, %	6-姜醇含量, %	白矾残留量, %	综合评分
1	1	1	1	1	0.426	0.002 17	3.025	70.998
2	1	2	2	2	0.667	0.001 87	4.670	55.002
3	1	3	3	3	0.821	0.002 13	6.173	48.363
4	2	1	2	3	0.752	0.006 20	4.523	28.686
5	2	2	3	1	0.787	0.005 60	6.252	45.074
6	2	3	1	2	0.433	0.004 97	3.461	65.738
7	3	1	3	2	0.727	0.007 10	5.975	42.720
8	3	2	1	3	0.441	0.006 70	3.275	51.078
9	3	3	2	1	0.595	0.006 07	4.483	45.105
K_1	58.12	47.47	62.60	53.73				
K_2	46.50	50.38	42.93	54.49				
K_3	46.301	53.07	45.39	42.71				
R	11.82	5.60	19.67	11.78				

表3 各含量指标方差分析结果

Tab 3 Analysis of variance

指标	方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F	P
总有机酸含量	A	0.001 4	2	0.000 7	1.32	
	B	0.006 7	2	0.003 4	6.15	
	C	0.183 2	2	0.091 6	166.89	<0.01
	D(误差)	0.001 1	2	0.000 5		
6-姜醇含量	A	0.000 034 4	2	0.000 017 2	118.45	<0.01
	B	0.000 000 17	2	0.000 000 09	0.59	
	C	0.000 008 9	2	0.000 000 44	3.05	
	D(误差)	0.000 002 9	2	0.000 000 15		
白矾残留量	A	0.045	2	0.023	2.23	
	B	0.090	2	0.045	4.46	
	C	12.475	2	6.238	615.34	<0.01
	D(误差)	0.020	2	0.010		

注: $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$ Note: $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$

姜半夏中单指标的方差分析结果表明:炮制时间B对试验各指标结果影响不显著;生姜用量A对姜半夏中6-姜醇含量有显著性影响;白矾用量C对姜半夏中总有机酸和白矾残留量有显著性影响,两个指标与白矾用量都呈正相关。而理想情况是总有机酸含量越高越好,白矾残留量越低越好。为解决这一矛盾,笔者采用综合加权评分法优选炮制工艺。由表2极差 R 值可以直观分析出3个因素作用的主次顺序为: $C>A>B$,这与单指标分析及综合加权评分法的结果一致。按照本文加权评分法分值越小越好的原则,得分为28.686的炮制工艺A₂B₁C₂为最优水平组合,即每100g净半夏加生姜25g、白矾8g,炮制时间为4h。经3次重复性验证试验,得出同样的结果。

3 讨论

本试验选择姜半夏中半夏总有机酸和炮制辅料生姜中6-姜醇含量为有效成分指标,同药典法比较,使饮片质量控制标准更加客观、量化。采用 $L_9(3^3)$ 正交试验设计,优选的姜半夏炮制工艺中,生姜用量与药典炮制方法一致,而白矾用量8g较药典法中的12.5g用量显著减少。优选的炮制工艺既使姜半夏有效组分保持较高的含量,同时又降低了白矾残留量,因

此,本研究中优选的炮制工艺具有一定合理性。

对于姜半夏麻舌感的控制指标,吴皓课题组试验证明草酸钙针晶是引起半夏麻舌感的刺激性毒性成分^[7]。在预试验中,笔者以姜半夏中草酸钙针晶含量作为毒性成分控制指标,采用高效液相色谱法测定姜半夏的草酸钙针晶含量,但所有炮制品种均未检测出草酸钙针晶。笔者前期研究结果表明,100g半夏与4g白矾一起浸泡,在60℃条件下,经24h后即检测不出草酸钙针晶^[8];且试验结果表明温度对草酸钙针晶含量有显著性影响,随着温度升高草酸钙针晶含量显著下降。笔者初步分析姜半夏经过几小时的高温煎煮,草酸钙针晶与白矾在高温条件下结合成草酸铝络合物,这可能是姜半夏品种检测不出草酸钙针晶的原因。所以在本试验中未将草酸钙针晶作为姜半夏的考察控制指标之一。

试验中的综合加权评分是依据分值越小越好的原则用熵值法^[9]求得的,数值越小表明此条件下各指标值越好。

预试验中发现,在正交试验中,样品中白矾残留量最高者都远低于药典中姜半夏白矾限量指标,所以白矾残留量主观权重制订时选择了较小权重系数0.2,与其炮制辅料生姜中有效成分6-姜醇主观权重系数相同,而未设置为0.3或者其他。

本试验采用综合加权评分,将多指标试验问题转化为单指标试验问题,避免了主观赋权的偏向性,使各指标的权重更加客观、真实,使分析结果更趋合理、可靠。同药典法比较,优化的姜半夏炮制工艺减少了白矾用量,但是否可以达到姜半夏炮制的临床作用,笔者下一步将从药效等方面进行考察、验证。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010:111、附录46、附录111-115.
- [2] 张科卫, 吴皓, 沈绣红. 半夏中总游离有机酸的作用[J]. 南京中医药大学学报, 2001, 17(3): 159.
- [3] Abdel-Aziz H, Windeck T, Ploch M, *et al.* Mode of action of gingerols and shogaols on 5-HT₃ receptors: binding studies, cation uptake by the receptor channel and contraction of isolated guinea-pig ileum[J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 530(1/2): 136.
- [4] 刘逊. 姜半夏炮制工艺及其质量规范化研究[D]. 南京:南京中医药大学, 2009:34.
- [5] 张琳, 吴皓, 朱涛. 多指标综合加权评分法优选法半夏炮制工艺[J]. 中药材, 2008, 31(1): 20.
- [6] 陶菊春, 吴建民. 综合加权评分法的综合权重确定新探[J]. 系统工程理论与实践, 2001, 8: 43.
- [7] 钟凌云, 吴皓, 张科卫, 等. 生半夏中草酸钙针晶的刺激性作用研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(20): 1706.

(收稿日期:2014-03-18 修回日期:2014-11-05)

(编辑:刘萍)