

不同炮制方法对半夏化学成分含量的影响研究

张跃进^{1*}, 孟祥海², 许玲³, 杨东风¹

(1. 西北农林科技大学/生命科学学院, 陕西 杨陵 712100;

2. 陕西新药技术开发中心, 陕西 西安 710075; 3. 西安亨通光华制药, 陕西 杨陵 712100)

[摘要] 目的: 炮制对半夏化学成分含量的影响。方法: 对半夏采用不同方法进行炮制, 测定其化学成分含量。结果: 在生物碱含量方面, 生半夏> 法半夏> 姜半夏> 清半夏, 姜半夏和清半夏没有显著性差异。在鸟苷含量方面, 生半夏> 清半夏> 姜半夏> 法半夏; 在蛋白质含量方面, 生半夏> 法半夏> 清半夏> 姜半夏; 在还原糖含量方面, 清半夏> 姜半夏> 生半夏> 法半夏; 在总糖含量方面, 生半夏> 清半夏> 姜半夏> 法半夏。结论: 生半夏、清半夏、姜半夏和法半夏在化学成分含量上有较大的差异。炮制半夏与生半夏相比较, 在生物碱、鸟苷、蛋白质和总糖含量上都有所降低。

[关键词] 半夏; 炮制; 化学成分

[中图分类号] R284.1, R282.6 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2008)12-0021-03

半夏因其味辛辣、麻舌而刺喉, 具有“戟人咽”的刺激性, 自古以来, 被列为中药的毒品, 需经炮制后入药。《雷公炮炙论》记载: “半夏上有隙涎, 若洗不净, 令人气逆, 肝气怒满”, 半夏洗熟之后, 毒性消失, 可以入药使用。中国药典(2005版)收录了生半夏、清半夏、姜半夏、法半夏^[1]。关于半夏的炮制方法研究已有不少报道^[2-4], 但对半夏炮制系统的化学成分含量比较还未见有报道, 本研究以总生物碱、鸟嘌呤核苷、可溶性蛋白质、还原糖和总糖为检测指标, 采用紫外、高效液相等方法对半夏进行含量测定, 以探求炮制对其化学成分的影响。

1 材料和仪器

1.1 供试材料 依照中国药典半夏炮制方法进行炮制, 得到生半夏、清半夏、姜半夏和法半夏^[1]。将制得半夏于60℃下烘干至恒重, 粉碎过60目筛, 放置干燥器中备用。

1.2 试剂 盐酸麻黄碱对照品(中国生物制品检定所)、鸟嘌呤核苷(Sigma)、甲醇(色谱纯, Tedia)、冰醋酸(色谱纯)、溴麝香草酚蓝标准液、浓氨水、三氯甲烷、蒽酮、硫酸、牛血清蛋白、考马斯亮蓝 G-250 等, 未标注均为市售分析纯。

1.3 仪器 电子分析天平(SHIMADZU AUW220)、SB25-12DT 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)、旋转式蒸发仪(上海亚荣)、紫外可见分光光度计 2802H 型(尤尼柯)、高效液相色谱仪(waters1525 Binary HPLC Pump; waters 2996 Photodiode

[收稿日期] 2008-06-18

[基金项目] 陕西省自然科学基金研究计划项目(2003C103)

[通讯作者] * 张跃进, 13609259036, E-mail: qxzhang@126.com

Array Detector), 固定相: YWG C18 反相柱 (4.6 × 150 mm, 5 μm)。

2 方法和结果

2.1 总生物碱含量测定 利用酸性染料比色法^[5]。以盐酸麻黄碱为对照品制得对照品溶液, 将对照液和样品供试液在 200~ 700 nm 波长进行光谱扫描, 确定以 414 nm 波长作为测定波长。以盐酸麻黄碱含量(μg)为横坐标, 吸光值为纵坐标, 进行回归, 得回归方程为 $Y = 1.44 \times 10^{-2} X + 6.47 \times 10^{-2}$, $R^2 = 0.9994$, 表明盐酸麻黄碱溶液在 0.45~ 7.5 μg·mL⁻¹ 之间呈良好的线性关系。精密称取干燥至恒重的通过 60 目筛的生药粉 0.1550 g, 每个样平行 3 份, 加浓氨水 0.5 mL, 三氯甲烷 10 mL, 冷浸 12 h 后, 冰浴超声提取 50 min, 滤过, 残渣以 10 mL 三氯甲烷分 3 次 (4, 3, 3 mL) 洗涤, 滤过, 合并滤液, 80 °C 回收三氯甲烷并蒸干, 即得样品。用分液漏斗依次精密加入 pH = 5.40 柠檬酸缓冲溶液 5 mL, 水 5 mL, 0.05% 溴麝香草酚蓝溶液 1 mL, 再精密量取三氯甲烷 10 mL, 分 3 次 (4, 3, 3 mL) 将样品转入分液漏斗中, 振摇 1 min, 静置 1 h 后分取三氯甲烷层, 测定吸光度, 根据回归方程, 计算含量。

2.2 鸟苷含量测定

2.2.1 色谱条件 高效液相色谱仪 (waters1525 Binary HPLC Pump; waters 2996 Photodiode Array Detector); 固定相: 色谱柱 YWG C₁₈ 反相柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: MeOH~ 0.01% HAc (5: 95); 流速: 1.000 mL·min⁻¹; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μL; 波长: 254 nm。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取鸟苷标准品 0.0050 g, 加水溶解, 定容于 25 mL 容量瓶中, 得浓度为 200 μg·mL⁻¹ 的鸟苷溶液, 即为对照品溶液。

2.2.3 线性关系考察 分别精密量取标准品溶液 0.1, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用蒸馏水稀释至刻度, 摇匀, 得到不同浓度的标准品溶液, 分别以上述各标准品溶液进样, 鸟苷标准品的 HPLC 图如图 1, 每个浓度进样 2 次, 取峰面积的平均值, 以鸟苷含量(μg)为横坐标, 峰面积为纵坐标, 进行回归, 得回归方程 $Y = 3.18 \times 10^6 X - 3.07 \times 10^3$, $R^2 = 0.9999$, 可见鸟苷在 2.000~ 30.00 μg·mL⁻¹ 范围内线性关系良好。

2.2.4 稳定性试验 制备半夏样品溶液 1 份, 每隔 2 h 进样 1 次, 进样量 20 μL, 结果表明, 样品中鸟苷

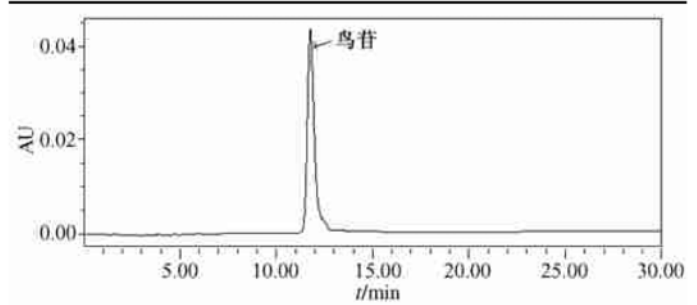


图 1 鸟苷标准品 HPLC 图

峰面积在 10 h 内稳定, RSD= 1.24% (n= 6)。

2.2.5 精密度试验 取浓度为 20 μg·mL⁻¹ 的标准品溶液进样, 进样量 20 μL, 重复测定 6 次, RSD= 0.52% (n= 6)。

2.2.6 加样回收率试验 精密称取半夏粉末约 0.65 g, 平行 5 份, 加入 40 μg·mL⁻¹ 标准品溶液 1.0 mL。分别加 10% 甲醇 10.0 mL, 超声提取 35 min, 于 10 000 r 离心 15 min, 取上清液过 0.2 μm 滤膜, 每份样品进样 2 次, 进样量 20 μL, 根据峰面积值及加入的标准品量计算回收率为 99.53%, RSD 为 1.54%。

2.2.7 样品测定 取已恒重的各半夏样品粉末约 1 g, 每个样平行 3 份, 置 50 mL 三角瓶中, 分别加 10% 甲醇 10.0 mL, 超声提取 35 min, 于 10 000 r 离心 15 min, 取上清液过 0.2 μm 滤膜, 即得样品溶液。取样品溶液 20 μL 进样, 标准品随行对照, 根据回归方程, 计算含量。半夏样品的 HPLC 图如图 2。

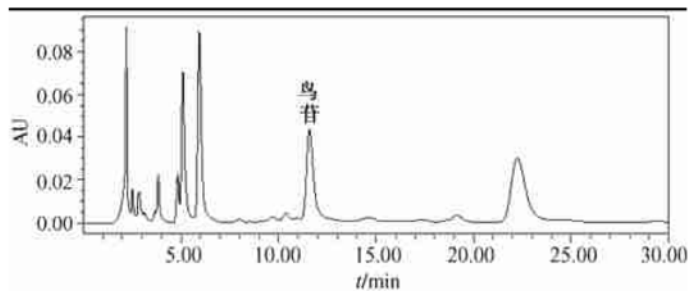


图 2 半夏块茎提取液的 HPLC 图

2.3 可溶性蛋白质含量测定 采用考马斯亮蓝 G-250 染色法测定可溶性蛋白^[6]。以牛血清蛋白为对照品制得对照品溶液, 测定波长为 595 nm, 以蛋白质含量(μg)为横坐标, 吸光值为纵坐标, 进行回归, 得回归方程为 $Y = 9.80 \times 10^{-3} X + 1.46 \times 10^{-2}$, $R^2 = 0.9994$, 表明蛋白质溶液在 10~ 100 μg·mL⁻¹ 之间呈良好的线性关系。取已恒重的各半夏样品粉末约 0.1500 g, 每个样平行 3 份, 置研钵中加 2 mL 水研

磨成匀浆,加水洗涤,定容 10 mL 量瓶中,取 3~ 4 mL,于 5 000 rpm 下离心 10 min,上清液即为样品溶液。取 0.1 mL 样品溶液,加 0.9 mL 水,再加 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 溶液,摇匀放置 2~ 3 min 后,测定吸光度,根据回归方程,计算含量。

2.4 糖含量测定 采用 3,5-二硝基水杨酸法^[6]测定还原糖含量,以葡萄糖含量(mg)为横坐标,吸光值为纵坐标,进行回归,得回归方程为 $Y = 3.31 \times 10^{-1} X - 1.97 \times 10^{-2}$, $R^2 = 0.9988$,表明葡萄糖溶液在 5.56~ 66.67 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间呈良好的线性关系。采用蒽酮-H₂SO₄ 法^[7]测定可溶性糖含量,以葡萄糖含量(μg)为横坐标,吸光值为纵坐标,进行回归,得回归方程为 $Y = 5.70 \times 10^{-3} X + 5.97 \times 10^{-2}$, $R^2 = 0.9995$,表明葡萄糖溶液在 10~ 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间呈良好的线性关系。取已恒重的各半夏样品粉末约 0.500 g,置 15 mL 离心管中,每个样平行 3 份,加入 10 mL 80% 乙醇溶液,80 °C 水浴 60 min,冷却后,3 500 rpm 下离心 10 min。取上清液 4 mL 置蒸发皿中蒸干,用 8 mL 水(4, 2, 2 mL)分 3 次洗涤,使糖溶解,置 15 mL 离心管中 3 500 r 离心 15 min,上清液即为样品溶液。

2.4.1 还原糖测定 取样品溶液 2 mL,置 25 mL 具

塞试管中,加入 3,5-二硝基水杨酸 2 mL,摇匀,在沸水浴中准确加热 5 min,取出后立即用流水冷却,加蒸馏水定容至 20 mL,在 540 nm 波长下测定吸光度。根据回归方程,计算含量。

2.4.2 可溶性糖测定 取 1 mL 样品溶液,稀释 20 倍,取 1 mL 稀释液,再加水 1 mL,然后加入蒽酮-H₂SO₄ 试剂 5 mL,摇匀,在沸水浴中准确加热 10 min,取出后立即用流水冷却至室温,在 620 nm 波长下测定吸光度,根据回归方程,计算含量。

2.5 结果 生半夏、清半夏、姜半夏和法半夏的化学成分含量如表 1 所示。在生物碱含量方面,生半夏 > 法半夏 > 姜半夏 > 清半夏,姜半夏和清半夏没有显著性差异。在鸟苷含量方面,生半夏 > 清半夏 > 姜半夏 > 法半夏,法半夏鸟苷含量最少,相比生半夏减少了 75.90%。在蛋白质含量方面,生半夏 > 法半夏 > 清半夏 > 姜半夏,姜半夏蛋白质含量最少,相比生半夏减少了 97.72%。在还原糖含量方面,清半夏 > 姜半夏 > 生半夏 > 法半夏,法半夏还原糖含量最少,仅相当于清半夏的 2.19%。在总糖含量方面,生半夏 > 清半夏 > 姜半夏 > 法半夏,法半夏的总糖含量相当于生半夏的 8.04%。

表 1 炮制半夏化学成分的含量($\bar{x} \pm s$)

样品	生物碱含量(%)	鸟苷含量(%)	蛋白质含量(%)	还原糖含量(%)	总糖含量(%)
生半夏	0.007 9 ± 0.000 4	0.016 6 ± 0.000 1	4.654 5 ± 0.330 0	0.705 2 ± 0.006 9	5.138 0 ± 0.297 4
清半夏	0.003 9 ± 0.000 3	0.013 1 ± 0.000 2	0.578 0 ± 0.019 7	1.424 7 ± 0.031 8	3.970 0 ± 0.134 6
姜半夏	0.004 6 ± 0.000 2	0.010 9 ± 0.000 2	0.106 2 ± 0.001 0	1.162 3 ± 0.037 4	3.667 6 ± 0.044 0
法半夏	0.006 4 ± 0.000 7	0.004 0 ± 0.000 1	1.676 1 ± 0.025 8	0.031 2 ± 0.001 4	0.414 4 ± 0.017 8

3 结论

半夏按 2005 版药典项下规定进行炮制,生半夏、清半夏、姜半夏和法半夏在化学成分含量上有较大的差异。不同炮制品具有不同的功能与主治,与其化学成分有密切的关系。炮制半夏的化学成分与生半夏相比较,在生物碱、鸟苷、蛋白质和总糖含量上都有所降低,可能正因为不同炮制半夏的不同化学成分降低的幅度不同,或是炮制半夏中可能增加了别的化学成分,使其具有不同的药理作用,这些有待进一步的研究。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S],一部. 北

京: 化学工业出版社, 2005: 78.

[2] 王贵英. 京半夏的传统炮制法[J]. 湖南中医药导报, 2002, 8(1): 40.

[3] 赵典刚, 王兴华, 郝桂兰, 等. 半夏熟法炮制工艺的研究[J]. 中国中医药科技, 2004, 11(2): 104~ 106.

[4] 吴皓, 谈献和, 蔡宝昌, 等. 半夏姜制对麻黄碱含量的影响[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(3): 157~ 158.

[5] 于超, 张明, 王宇, 等. 栽培、野生及不同产地半夏总生物碱测定[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(6): 583-584.

[6] 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006. 38