

半夏褐变抑制条件及其对药理作用的影响

吴玉良, 景亚凤, 申 琴, 罗 丹, 吴纯洁*, 孙灵根

成都中医药大学, 四川 成都 611137

摘要: 目的 研究抑制半夏干燥过程中引起褐变的条件, 并考察其对半夏镇咳、祛痰作用的影响。方法 使用色彩色差计测量各种方法处理的半夏干燥过程中表面颜色的变化值, 优选最佳处理条件, 并辅以镇咳及祛痰实验验证其对半夏药理作用的影响。结果 不同 pH 值的酸性溶液抑制半夏的酶促褐变反应没有显著的差异, 酸性越强, 颜色变化越小; 采用醋酸处理不会影响半夏的镇咳、祛痰作用。结论 酸性环境能够抑制半夏的褐变反应, 且不会对半夏的药理作用产生显著影响。

关键词: 半夏; 酶促褐变; 干燥过程; 镇咳; 祛痰

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)08-1523-03

Inhibition of *Pinelliae Rhizoma* browning and its effects on pharmacological actions

WU Yu-liang, JING Ya-feng, SHEN Qin, LUO Dan, WU Chun-jie, SUN Ling-gen

Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: **Objective** To study the inhibition conditions of browning in the drying process of *Pinellia Rhizoma* (PR) and observe its impact on the antitussive and expectorant effects. **Methods** The surface color data of drying PR were measured by colorimeter to optimize the best conditions, supplemented by experimental verification of its effects on pharmacological actions. **Results** There were no significant difference among inhibition of different pH values on PR browning. The stronger the acidity was, the smaller the color changed. The use of acetic acid did not affect the antitussive and expectorant effects of RP. **Conclusion** Acidic environment could inhibit browning reactions, but will not change the pharmacological effects of PR significantly.

Key words: *Pinellia Rhizoma* (PR); enzymatic browning; drying process; antitussive; expectorant

半夏为天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎, 具有燥湿化痰、降逆止呕、消痞散结的作用。主治呕吐、反胃、咳嗽痰多、胸膈胀满、头晕不眠等症。在半夏的干燥过程中, 常伴有颜色加深等影响半夏外观品相的反应。为了漂白和防蛀, 目前市场上半夏一般都经过硫熏。硫熏虽然可以使药材变得美观, 但是会破坏药材化学成分, 影响药效^[1]。长期服用, 残留的单质硫和硫化物在人体内大量蓄积, 危害人体健康。李先端等^[2]利用 835—50 型氨基酸分析仪进行测定, 发现半夏中含有苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸等 16 种氨基酸。陶宗晋等^[3]从半夏的鲜汁中分离得到相对分子质量为 44 000 的半夏蛋白。Kurata 等^[4]报道, 相对分子质量 6 000 的糖蛋白是半夏块茎中的一种主要蛋白质。

半夏中含有发生褐变反应的酶(蛋白质)和底物(氨基酸), 所以本实验从其酶促褐变抑制条件和药理实验两方面进行研究, 探索一种不影响半夏药效的无硫加工新方法。

1 仪器与试剂

色彩色差计 [柯尼卡美能达办公系统(中国)有限公司], pH 计(雷磁 pHs—3S), 恒压喷雾装置。

半夏购于成都荷花池中药材专业市场, 经成都中医药大学中药鉴定教研室李敏教授鉴定为天南星科植物半夏 *Pinellia ternate* (Thunb.) Breit. 的块茎; 样液: 酸处理半夏水煎液、未处理半夏水煎液, 自制; 氢溴酸右美沙芬片, 哈尔滨泰华药业股份有限公司, 批号 20091106; 痰咳净(散剂), 广州王老吉药业股份有限公司(原羊城药业股份有限公司)生产, 批号 100103。其他试剂均为国产分析纯。

昆明种小鼠, 雌雄各半, 体质量 18~22 g, SPF

收稿日期: 2012-01-05

基金项目: 四川省教育厅重点项目(08ZA119); 四川省科技厅科技支持计划(2009sz0110)

作者简介: 吴玉良, 男, 成都中医药大学在读硕士生, 研究方向为中药新制剂和新剂型的研究。E-mail: chengyou163163@163.com

*通讯作者 吴纯洁 Tel: (028)61801001 E-mail: wcj-one@263.net

网络出版时间: 2012-04-23 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120423.1121.003.html>

级, 由成都达硕生物科技有限公司提供, 动物合格证号: 2005A033 号。

2 方法与结果

2.1 抑制半夏酶促褐变条件研究

2.1.1 酶促反应抑制方法研究 半夏中含有发生褐变反应的酶(蛋白质)和底物(氨基酸), 根据蛋白质的性质, 抑制酶(蛋白质)活性的方法有焯法、强酸、强碱等方法。

(1) 水焯试验: 取新鲜半夏若干, 将半夏脱皮洗净, 分为 2 份, 置于 100 °C 水中分别焯制 1、5 min, 取出, 自然条件下晾干。干燥过程中每隔 1 h 测量半夏表面色彩色差值 (ΔE), 直至其表面颜色值无明显变化(即半夏近干燥)。

(2) 强酸、强碱溶液浸泡试验: 取浓 HCl 与 NaOH, 配置 pH 值分别为 1 和 14 的强酸、强碱溶液。取新鲜半夏若干, 将半夏脱皮洗净, 分为 2 份, 分别置于 pH 值为 1 的强酸溶液和 pH 值为 14 的强碱溶液中浸泡 5 min, 取出, 冲洗表面残存的酸、碱溶液, 置于自然条件下晾晒至干。干燥过程中每隔 1 h 测量半夏表面 ΔE , 至颜色数据无明显变化止。

(3) 结果及分析: 干燥 8 h 后, 半夏表面颜色基本无变化。待 20 h 后, 半夏完全干燥, 再测定其表面颜色值, 确定其干燥后颜色终值, 数据统计结果见表 1。结果显示, 强酸条件比水焯和强碱条件对半夏褐变的抑制作用显著。

2.1.2 不同 pH 值酸液处理试验 取浓 HCl 配制 pH 值分别为 2、3、4、5、6 的酸溶液。取新鲜半夏若

表 1 不同方法处理半夏干燥过程颜色变化 ($n=3$)

Table 1 Color changes during drying process of PR treated by different means ($n=3$)

时间 / h	ΔE 均值			
	水焯 1 min	水焯 5 min	pH 1	pH 14
1	5.98	4.55	1.53	7.70
2	6.66	5.15	1.09	8.71
3	6.20	4.85	0.71	10.10
4	7.16	5.81	0.66	10.75
5	7.54	5.47	1.39	12.34
6	7.92	5.81	2.14	12.91
7	8.29	5.94	2.52	13.66
8	8.18	5.95	3.84	14.46
9	8.87	6.32	3.75	14.29
20	11.27	8.43	3.66	14.35
21	11.22	—	3.81	14.19
22	11.11	—	3.72	14.34

干, 将半夏脱皮洗净, 分为 5 份, 分别置于不同 pH 值酸溶液中浸泡 5 min, 取出, 冲洗表面残存的酸溶液, 置于自然条件下晾晒至干。干燥过程中每隔 1 h 测量半夏表面 ΔE , 至颜色数据无明显变化止。

干燥 8 h 后, 半夏表面颜色基本无变化。待 20 h 后, 半夏完全干燥, 再测定其表面颜色值, 确定其干燥后颜色终值, 数据统计结果见表 2。结果显示, 不同 pH 值的酸性溶液抑制半夏的酶促褐变反应没有显著的差异, 酸性越强, 颜色变化越小。

表 2 不同 pH 值酸液处理半夏干燥过程颜色变化 ($n=3$)

Table 2 Color changes during drying process of PR treated by acid at different pH values ($n=3$)

时间 / h	ΔE 均值				
	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6
0	1.47	1.38	1.59	1.75	1.71
1	1.79	1.57	1.73	1.68	1.98
2	1.95	1.91	2.23	2.25	2.49
3	2.35	2.59	2.87	3.17	3.21
4	2.81	2.94	3.35	3.54	4.09
5	2.63	3.15	3.97	4.27	4.66
6	2.87	3.64	4.21	4.61	4.77
7	3.52	4.06	4.14	5.04	4.83
8	3.97	4.25	4.51	5.37	5.63
20	4.08	4.57	4.75	5.41	5.75
21	4.14	4.61	4.89	5.49	5.77
22	4.10	4.64	4.87	5.52	5.81

2.2 酸液处理对半夏药理作用的影响

2.2.1 对浓氨水致咳小鼠的影响 取昆明种小鼠 40 只, 随机分为 4 组, 即对照组、酸处理半夏组、未处理半夏组, 阳性对照(右美沙芬)组, 每组 10 只, 试验前小鼠禁食不禁水 12 h, 然后各组小鼠按 150 mg/kg ig 给药, 其中对照组给等体积蒸馏水。每天 ig 1 次, 连续 3 d, 末次给药后 1 h, 将小鼠置于恒压喷雾器内, 浓氨水喷雾 30 s, 结束, 立即取出小鼠, 观察有无咳嗽反应。观察 1 min 内咳嗽次数, 结果见表 3。典型的咳嗽动作为: 头上仰, 腹肌收缩或缩胸, 同时张大嘴, 有时可有咳声。对表 3 的数据进行方差分析, 半夏组与对照组、右美沙芬组有显著差异 ($P<0.01$), 说明半夏有一定的止咳作用, 但比右美沙芬的止咳效果弱; 酸处理半夏组和未处理半夏组无显著差异 ($P>0.05$), 说明酸处理对半夏止咳效果无显著影响。

2.2.2 对小鼠气管酚红排泌量的影响 根据文献方法^[5], 以酚红吸光度 (A) 值为纵坐标 (Y), 酚红质

量浓度为横坐标 (X) 进行线性回归, 得回归方程 $Y=0.125\ 03\ X+0.021\ 19$, $R^2=0.999\ 3$, 表明酚红在 $1\sim 10\ \mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

表 3 酸处理半夏对浓氨水致咳小鼠的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 3 Effect of PR treated by acid on concentrated ammonia-induced cough in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组 别	剂量 / ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	咳嗽次数
对照	—	31.5 ± 2.7
酸处理半夏	150	$11.6 \pm 2.1^{**\#}$
未处理半夏	150	$11.7 \pm 2.4^{**\#}$
右美沙芬	150	6.2 ± 1.7

与对照组比较: $^{**}P<0.01$; 与右美沙芬组比较: $^{\#}P<0.01$

$^{**}P<0.01$ vs control group; $^{\#}P<0.01$ vs Dextromethorphan group

表 4 酸处理半夏对小鼠气管酚红排泄量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 4 Effect of PR treated by acid on phenolsulfonphthalein excretion of mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组 别	剂量 / ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	小鼠气管酚红质量 / μg	校正酚红质量 / ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	化痰率 / %
对照	—	$2.643\ 3 \pm 1.269\ 0$	132.165 ± 6.350	—
酸处理半夏	150	$4.530\ 3 \pm 3.480\ 0$	226.515 ± 17.400	171.38
未处理半夏	150	$4.167\ 9 \pm 2.490\ 0$	208.395 ± 13.950	157.67
痰咳净	150	$3.760\ 2 \pm 3.280\ 0$	188.010 ± 16.430	142.25

2.2.3 酸处理半夏急性毒性试验研究 取小鼠随机分为 5 组, 使不同性别和体质量的小鼠能均匀分配于各组, 每组 10 只。按剂间比 $1:0.8$, ig 半夏混悬液, 5 组剂量分别为 0.39 、 0.47 、 0.55 、 0.65 、 $0.76\ \text{g/kg}$, 观察 14 d, 统计各组小鼠的死亡数目, 计算死亡率分别为 20% 、 30% 、 50% 、 70% 、 90% 。用改良寇氏法^[6]计算酸处理半夏的 LD_{50} 为 $0.5\ \text{g/kg}$, 95% 可信限为 $0.5\sim 0.6\ \text{g/kg}$ 。此结果与文献报道^[7]的 $0.55\ \text{g/kg}$ 基本吻合, 说明本方法处理半夏对其毒性没有显著影响。

2.2.4 统计学处理 以上实验数据运用 SPSS 统计软件进行统计学分析, 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析或秩和检验。

3 讨论

实验结果证明, 醋酸处理对半夏的镇咳、祛痰作用和毒性均没有显著的影响, 且能代替硫熏方法抑制半夏褐变, 本方法可以用于半夏的产地加工。

中药硫熏在全国各地长期普遍使用, 直接原因是某些含有大量水份和液质的根茎类药材没有更好的产地加工方法。由于中药材及饮片的硫熏法加工会使中药材及饮片原有化学成分发生转变, 影响药理作用, 因此, 研究替代硫磺熏蒸炮制中药饮片的技术, 不仅是保证中药材及饮片内在质量亟需解决

取昆明种小鼠 40 只, 阳性对照药物为痰咳净, 分组与给药同“2.2.1”项法, 末次给药后 30 min, ip 5% 酚红生理盐水溶液 $0.03\ \text{mL/g}$, 注射后 30 min, 处死小鼠, 剪取气管, 将各气管段放入预先盛有 $3\ \text{mL}$ 的 $5\% \text{NaHCO}_3$ 溶液试管中, 超声波清洗, 使气管段中的酚红完全释放, 溶液于分光光度计 $546\ \text{nm}$ 处测 A 值, 根据回归方程计算出酚红的量, 根据酚红质量和动物体质量计算出校正酚红质量, 计算化痰率, 结果见表 4。数据表明, 酸处理半夏组和未处理半夏组对小鼠酚红排泄量无显著差异 ($P>0.05$), 说明酸处理对半夏化痰效果无显著影响。

校正酚红质量 = 酚红质量 / 小鼠体质量

化痰率 = 给药组校正酚红质量 / 对照组酚红校正质量

的关键问题, 同时也是保证用药安全和实现中医药现代化亟待解决的关键问题。本实验在前期工作^[1]的基础上研究了抑制半夏褐变的条件, 并对其药理作用进行了初步研究, 抑制半夏褐变的最佳条件和分子机制尚需进一步深入研究。

参考文献

- [1] 严茂伟, 万 军, 楚 亮, 等. 半夏干燥过程中褐变机制的研究 [J]. 中草药, 2011, 42(5): 877-880.
- [2] 李先端, 胡世林, 杨连菊. 半夏类药材氨基酸与无机元素分析 [J]. 中国中药杂志, 1990, 15(10): 37-38.
- [3] 陶宗晋, 徐琴钰, 吴克佐, 等. 半夏蛋白的分离、结晶、生物活性和一些化学性质 [J]. 生物化学与生物物理学报, 1981, 13(1): 77-82.
- [4] Kurata K, Tai T, Yang Y, *et al.* Quantitative analysis of anti-emetic principle in the tubers of *Pinellia ternata* by enzyme immunoassay [J]. *Planta Med*, 1998, 64(7): 645-648.
- [5] 李彦文, 孙志蓉, 李志勇, 等. 小叶榕镇咳祛痰及抗炎药理作用研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(11): 3-4.
- [6] 袁伯俊, 廖明阳, 李 波. 药物毒理学实验方法与技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [7] 龚千锋. 中药炮制学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007.