



# 六神曲不同的制备工艺对其淀粉酶活力的影响

王海洋<sup>1</sup>, 高文远<sup>1,2\*</sup>, 张丽霞<sup>2</sup>

(1. 天津中医药大学 中药学院, 天津 300193;  
2. 天津大学 药物科学与技术学院, 天津 300072)

**[摘要]** 目的:优化六神曲的制备工艺。方法:采用单因素试验,以六神曲的淀粉酶活力为评价指标,考察发酵时间及原料药的拌曲工艺等因素对六神曲淀粉酶活力的影响;同时将最优制备工艺所制六神曲与市售六神曲的优品和劣品从淀粉酶活力、可溶性淀粉量、可溶性多糖量 3 个方面进行对比。结果:最佳发酵时间为 7 d;赤小豆的最佳处理方法为煮烂拌曲;青蒿、辣蓼、苍耳草的最佳添加方式为以鲜品水煎液混合均匀后拌曲,发酵后六神曲的酶活力可达  $49.372 \text{ mg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ,可溶性淀粉含量可达 7.967%,可溶性多糖含量可达 16.65%,明显高于市售的 2 种六神曲。结论:六神曲的最优制备工艺为将赤小豆粉碎后,加入面粉、苦杏仁粉末混合均匀,陆续加入青蒿、辣蓼、苍耳草的鲜品水煎液混合均匀后拌曲,发酵时间为 7 d。

**[关键词]** 六神曲;淀粉酶活力;发酵;制备工艺

六神曲又名神曲、六曲,最早收载于唐初甄全撰写的《药性论》<sup>[1]</sup>,味甘、辛,性温,归脾、胃经,明代缪希雍在《神农本草经疏》中记载六神曲:“开胃健脾,消食止泻”<sup>[2]</sup>。六神曲在不同的历史时期所记载的制备工艺也不尽相同,现今多由面粉、赤小豆、苦杏仁按一定比例混以鲜青蒿、鲜苍耳、鲜辣蓼的水煎液发酵制成,含有酵母菌、霉菌、维生素 B 复合体、麦角固醇、挥发油、苷类等<sup>[3]</sup>,具有消食健胃、和中止泻的功效。神曲属药用真菌固体发酵范畴,是历史上最早的真菌固体发酵产品,该类药物的潜力很大<sup>[4]</sup>。仅 2010 年版《中国药典》中含六神曲的成方制剂就有 74 个,而部颁标准中含六神曲的成方制剂更有 326 个之多<sup>[5]</sup>,随着生物技术日新月异的发展,其研究前景广阔。然而各地生产的六神曲处方配比和制备工艺以及卫生质量差异很大,导致市场上销售的六神曲质量参差不齐,功效各异,严重制约着它的临床应用,所以对于六神曲的处方配比以及制备工艺亟待完善和统一。

鉴于天然发酵生产的神曲无客观的质量标准,黄国能通过对其中淀粉酶、蛋白酶以及脂肪酶活力等指标进行了检测,认为可以用蛋白酶和淀粉酶 2 种消化酶的指标来衡量神曲的内在质量<sup>[6]</sup>,而高慧<sup>[7]</sup>对于神曲的发酵和炮制工艺进行研究时就以

淀粉酶活力和蛋白酶活力作为评价六神曲质量的指标,所以本研究采用淀粉酶活力作为六神曲质量的评价指标,从六神曲处方中各种原料药的加工工艺以及发酵时间入手,研究六神曲的最佳制备工艺,并与市场上销售的六神曲从淀粉酶活力、可溶性淀粉含量、可溶性多糖含量这 3 个方面做一对比。

## 1 材料

紫外-可见分光光度计(天津市普瑞斯仪器有限公司),H1650 台式高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

麦芽糖,3,5-二硝基水杨酸,柠檬酸,柠檬酸钠,可溶性淀粉,蒽酮,蔗糖,碘(天津光复精细化工研究所),碘化钾;乙酸乙酯,石油醚。

青蒿、辣蓼、苍耳草采自河北省安国市,经天津大学高文远教授鉴定分别为菊科植物 *Ariemisia annua* 的全草、蓼科植物 *Polygonum flaccidum* Meissn 的全草、菊科植物 *Xanthium sibiricum* Patr. 的地上部分;面粉购自河北省邯郸市五得利面粉集团有限公司;苦杏仁、赤小豆购自河北美威中药材有限公司。

## 2 方法

### 2.1 自制六神曲

按中药炮制规范中对处方中药材的使用比例来制备六神曲,面粉、苦杏仁、赤小豆、鲜青蒿、鲜辣蓼、鲜苍耳草比例为 100:4:4:7:7:7。将苦杏仁碾成粉末,赤小豆碾碎或煮烂,与面粉混匀,再用青蒿、辣蓼、苍耳草经不同的方式处理后,加入到

[稿件编号] 20120105005

[通信作者] \*高文远, Tel/Fax: (022)87401895, E-mail: pharmgao@tju.edu.cn



面粉与苦杏仁、赤小豆混匀的粉末中,搓揉成粗颗粒,以手握能成团,掷之即散为宜。置木制模型压成扁平方块,再用粗纸包严,放于木箱中,每块要留有空隙,温度控制在在 30 ~ 37 ℃。青蒿等分

别采用鲜品水煎、干品水煎、干品直接粉碎方式拌曲,其中鲜品水煎法的发酵时间为 3 ~ 7 d,干品水煎、干品直接粉碎法、赤小豆煮烂法的发酵时间为 7 d(表 1)。

表 1 六神曲的处方比例及拌曲工艺

Table 1 The prescription ratio and processing technology of Massa Medicata Fermentata

No.	面粉 100 kg	苦杏仁 4 kg	赤小豆 4 kg	青蒿、辣蓼、苍耳草 各 7 kg	发酵 时间/d
1	市售	粉碎	粉碎	鲜品加水制成水煎液	3
2	市售	粉碎	粉碎	鲜品加水制成水煎液	4
3	市售	粉碎	粉碎	鲜品加水制成水煎液	5
4	市售	粉碎	粉碎	鲜品加水制成水煎液	6
5	市售	粉碎	粉碎	鲜品加水制成水煎液	7
6	市售	粉碎	煮烂	鲜品加水制成水煎液	7
7	市售	粉碎	粉碎	干品加水制成水煎液	7
8	市售	粉碎	粉碎	干品粉碎混匀	7
9	市售优品(价格高)				
10	市售劣品(价格低)				

## 2.2 淀粉酶活力测定

**2.2.1 粗酶液制备** 称取六神曲 1 g,置于研钵中,加入蒸馏水 10 mL,研成匀浆后转入离心管中,混匀,在室温下放置提取 20 min,每隔数分钟摇动 1 次,然后 8 000 r · min<sup>-1</sup>离心 20 min 收集上清液,转入 25 mL 量瓶中,加蒸馏水至刻度,摇匀,即为淀粉酶提取液,用于淀粉酶活性的测定。

**2.2.2 标准曲线的绘制** 取 7 支 25 mL 具塞刻度试管,编号,各加入 1 g · L<sup>-1</sup>麦芽糖对照液 0, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2, 1.6, 1.8 mL 再用蒸馏水定容至 2 mL,摇匀后各试管再加入 DNS 试剂 2 mL 置沸水浴中煮沸 5 min。取出后流水冷却,加蒸馏水至 15 mL。以 0 号为空白对照,在波长 540 nm 处比色测定,以麦芽糖质量为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为  $Y = 0.3819X - 0.686$ ,  $r = 0.9995$ ,线性范围 0.3839 ~ 1.8136 mg。

**2.2.3 酶活力测定** 取 3 支具塞刻度试管,编号,每支试管加入 1 mL 淀粉酶提取液。1 号试管加入 DNS 试剂 2 mL,之后将 3 支试管和淀粉溶液置于 40 ℃恒温水浴中保温 10 min,之后每支试管加入 10 g · L<sup>-1</sup>淀粉溶液 1 mL,再将 3 支试管置于 40 ℃水浴中准确保温反应 5 min,取出后,在 2,3 号中各加入 DNS 试剂 2 mL,摇匀各试管,置沸水浴中煮沸 5 min,取出后迅速冷却,加蒸馏水至 20 mL,摇匀。按

照与制备标准曲线相同的方法,在 540 nm 下比色,记录测定结果。以样品吸光度平均值与空白对照的吸光度之差,分别在标准曲线上查出相应的麦芽糖质量,淀粉酶活性以每分钟每克六神曲样品中酶催化作用下产生的麦芽糖的质量表示,即 mg · min<sup>-1</sup> · g<sup>-1</sup>。淀粉酶活性 =  $m_t \times V / V_{\text{II}} \times t \times m_0$ 。

## 2.3 可溶性淀粉含量测定

**2.3.1 可溶性淀粉的提取** 取六神曲粉末 1 g 置于离心管中,加入石油醚 5 mL 混合,震荡 5 min, 3 500 r · min<sup>-1</sup>离心 4 min,弃去上清液,重复 3 次;沉淀加 80% 乙醇 5 mL,震荡 5 min, 3 500 r · min<sup>-1</sup>离心 4 min,弃去上清液,重复 3 次,之后将其转入 25 mL 具塞试管,水浴至糊化,定容至 25 mL,即为可溶性淀粉提取液。

**2.3.2 标准曲线的绘制** 取 6 支具塞刻度试管,编号,按顺序加入淀粉标准液 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 mL,碘液 0.2 mL,用蒸馏水稀释至 10 mL,摇匀,待蓝色溶液稳定 10 min 后,在波长 660 nm 处比色测定,以吸光度为纵坐标,淀粉质量为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程为  $Y = 0.0007X + 0.0086$ ,  $r = 0.9995$ ,线性范围 0.0977 ~ 0.9134 mg。

**2.3.3 含量测定** 取淀粉提取液 0.1 mL,加入制备碘液 0.2 mL,定容至 10 mL,于 660 nm 下检测吸光度并计算含量。

## 2.4 可溶性多糖含量测定

**2.4.1 可溶性多糖的提取** 称取六神曲粉末 0.1 g 于研钵中,研磨后,加入少量蒸馏水,转入刻度试管中,再加蒸馏水 5 ~ 10 mL,封口,于沸水中煮 30 min,取出冷却后过滤,滤液滤入 25 mL 量瓶中,将残渣回收入试管,加入蒸馏水 5 ~ 10 mL 再煮沸提取 10 min,滤入量瓶中,定容至刻度,即为可溶性多糖提取液。

**2.4.2 标准曲线的绘制** 取 6 支 25 mL 刻度试管,编号,依次加入  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖标准溶液 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mL, 按顺序加入蒸馏水定容至 2 mL, 混匀后加入蒽酮-乙酸乙酯试剂 0.5 mL 和浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5 mL, 充分振荡,立即将其放入沸水浴中加热,保温 1 min,取出后冷却至室温,以 1 号试管为空白对照,在波长 630 nm 处比色,以吸光度为纵坐标,蔗糖质量为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程为  $Y = 0.0076X - 0.036$ ,  $r = 0.9994$ , 线性范围 0.0196 ~ 0.1007 mg。

**2.4.3 含量测定** 吸取可溶性多糖提取液 0.08 mL, 加入到 25 mL 刻度试管中,加入蒸馏水定容至 2 mL, 混匀后加入蒽酮-乙酸乙酯试剂 0.5 mL 和浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5 mL, 充分振荡,立即将其放入沸水浴中加热,保温 1 min,取出后冷却至室温,在 630 nm 处比色测定。

## 3 结果

### 3.1 六神曲处方的不同处理工艺对六神曲淀粉酶活力的影响

**3.1.1 不同发酵时间所制六神曲淀粉酶活力的测定** 发酵 3, 4 d 时, 淀粉酶活力分别为 39.085, 38.911  $\text{mg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ , 没有显著性差异; 发酵 5, 6 d 时, 淀粉酶活力分别为 43.537, 43.100  $\text{mg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ , 没有显著性差异。发酵 5, 6 d 所制六神曲的淀粉酶活力明显高于发酵 3, 4 d 所制六神曲的淀粉酶活力。发酵 7 d 时淀粉酶活力达到最大, 为 49.372  $\text{mg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ , 明显高于发酵 3, 4, 5, 6 d 所制得的六神曲的淀粉酶活力, 以此得出六神曲的淀粉酶活力随发酵时间的延长呈现上升趋势(图 1)。

**3.1.2 赤小豆不同的添加方式所制六神曲淀粉酶活力的测定** 赤小豆采用煮烂后拌曲所制得的六神曲的淀粉酶活力为 49.372  $\text{mg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ , 明显高于赤小豆粉碎后拌曲制得的六神曲的淀粉酶活力

(图 2)。

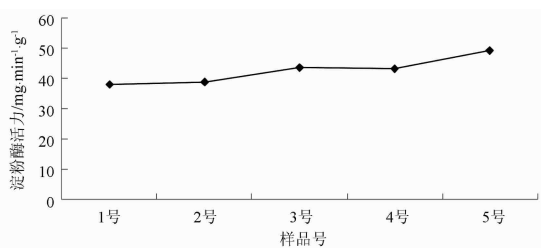


图 1 不同发酵时间所制六神曲的淀粉酶活力

Fig. 1 Results of amylase activity of Massa Medicata Fermentata during different fermentation time

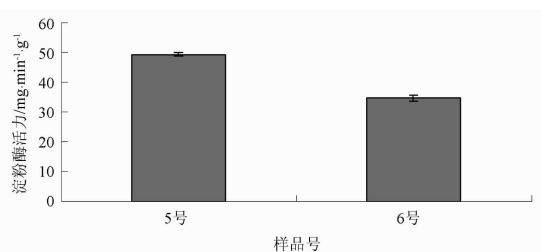


图 2 赤小豆不同的添加方式所制六神曲的淀粉酶活力

Fig. 2 Results of amylase activity of Massa Medicata Fermentata made by different addition way of Adzuki bean

**3.1.3 青蒿、辣蓼、苍耳草的不同添加方式所制六神曲淀粉酶活力的测定** 采用青蒿、辣蓼、苍耳草的鲜品水煎液拌曲所制得的六神曲淀粉酶活力明显高于采用青蒿、辣蓼、苍耳草的干品粉碎拌曲所制得的六神曲的淀粉酶活力 ( $P < 0.05$ ), 明显高于采用青蒿、辣蓼、苍耳草的干品水煎液拌曲所制得的六神曲的淀粉酶活力 ( $P < 0.05$ ) (图 3)。

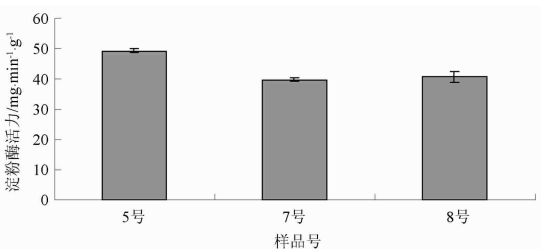


图 3 青蒿、辣蓼、苍耳草的不同添加方式所制六神曲的淀粉酶活力测定

Fig. 3 Results of amylase activity of Massa Medicata Fermentata made by different addition way of *Artemisia annua*, *Polygonum hydropiper* and *Cocklebur grass*



### 3.2 自制六神曲与市售六神曲的淀粉酶活力以及可溶性淀粉含量、可溶性多糖含量的对比

采用之前所述淀粉酶活力最高的工艺所自制的六神曲5号的淀粉酶活力为  $49.372 \text{ mg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ , 可溶性淀粉含量 7.967%, 可溶性多糖含量 16.65%; 市场上销售的优质六神曲的淀粉酶活力为  $39.609 \text{ mg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ , 可溶性淀粉含量 2.36%, 可溶性多糖含量 12.18%; 高于市场上销售的劣质六神曲的蛋白酶活力为  $37.514 \text{ mg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ , 可溶性淀粉量 1.764%, 可溶性多糖量 9.128%。

### 3 讨论

据调查发现目前市场上销售的六神曲质量参差不齐, 各地对于六神曲的制备工艺及其质量标准的规定也不统一, 所以有必要对六神曲的制备工艺进行完善, 并制定统一的质量标准。本实验以淀粉酶活力作为六神曲的评价指标, 对比了不同发酵时间以及不同制备工艺所制的六神曲的淀粉酶活力, 得出了六神曲的最佳制备工艺为将赤小豆粉碎后的粉末与面粉、苦杏仁粉末混合均匀, 采用青蒿、辣蓼、苍

耳草的鲜品水煎液与之混合均匀后拌曲, 制成曲块, 自然发酵 7 d, 之后切小块干燥即可, 为完善六神曲的处方配比及制备工艺提供了参考, 通过将此种工艺制备的六神曲与市场上购买的 2 种品质的六神曲进行对比后发现自制六神曲的淀粉酶活力、可溶性淀粉含量以及可溶性多糖含量均明显高于市售的 2 种六神曲。

#### [参考文献]

- [1] 府炳荣. 影响中药“神曲”功效的因素分析[J]. 抗感染药学, 2009, 6(4): 237.
- [2] 缪希雍. 神农本草经疏[M]. 郑金生注释. 北京: 中医古籍出版社, 2002.
- [3] 雷载权. 中药学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1995: 172.
- [4] 翟理祥. “焦三仙”炮制与功效关系浅谈[J]. 时珍国医研究, 1997, 8(5): 446.
- [5] 练晶军. 六神曲质量特征及发酵变化研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2011.
- [6] 黄国能. 神曲等药曲中消化酶的检测与质量标准的探讨[J]. 中成药, 1981(5): 18.
- [7] 高慧. 神曲发酵及炮制工艺研究[D]. 沈阳: 辽宁中医学院, 2003.

## Influence of different processing techniques of Massa Medicata Fermentata on their amylase activity

WANG Haiyang<sup>1</sup>, GAO Wenyuan<sup>1,2\*</sup>, ZHANG Lixia<sup>2</sup>

(1. School of Chinese Medicine, Tianjin University of Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

2. School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize different processing techniques of Massa Medicata Fermentata. **Method:** Single factor test was adopted, with the amylase activity of Massa Medicata Fermentata as the assessment indicator, to observe the influence of such factors as fermentation time and mixture techniques of active pharmaceutical ingredients on the amylase activity of Massa Medicata Fermentata. Meanwhile, Massa Medicata Fermentata prepared with the optimum processing techniques and superior and inferior products of Massa Medicata Fermentata in the market were compared in amylase activity, soluble starch content and soluble polysaccharide content. **Result:** The optimum fermentation time was 7 days. Adzuki bean shall be boiled before mixed with other materials. *Artemisia annua*, *Polygonum hydropiper* and *Cocklebur grass* shall be evenly mixed water decoction. The amylase activity, the soluble starch content and the soluble polysaccharide content of fermented Massa Medicata Fermentata could reach to  $49.372 \text{ mg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ , 7.967%, and 16.65% respectively, significantly higher than the two types of Massa Medicata Fermentata sold in the market. **Conclusion:** According to the optimum processing techniques, Adzuki beans were smashed and mixed equally with flour and Armeniaceae Semen Amarum powder, and then successively added with *A. annua*, *P. hydropiper* and *C. grass* for even mixture. The fermentation time was 7 days.

**[Key words]** Massa Medicata Fermentata; amylase activity; fermentation; processing technique

doi:10.4268/cjcm20121411

[责任编辑 马超一]

• 2087 •