

神曲制备过程中配料比考察

刘腾飞¹, 贾天柱^{1,2*}

(1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600;

2. 辽宁省中药炮制工程技术研究中心, 辽宁 大连 116600)

[摘要] 目的: 优选神曲制备过程中配料比。方法: 选择麦麸与面粉用量比(麸面比)、麸面与赤小豆的用量比(碳氮比)为考察因素, 将不同配料比制备的神曲在恒温恒湿箱中发酵 5 d, 取出, 低温烘干后制备酶液, 测定淀粉酶、糖化酶和蛋白酶的酶活力, 综合 3 个指标优选神曲配料比, 并对其甲醇提取部位进行 HPLC 特征图谱分析, 以最佳配料比神曲的特征图谱为参照谱, 采用《中药指纹图谱相似度评价系统》2004 年 A 版进行相似度评价。结果: 最佳麸面比 70:30, 碳氮比 100:2。不同麸面比和碳氮比的样品指纹图谱相似度均 >0.9。结论: 酶活力高的神曲在化学成分上与其他样品差异不大, 可推广于实际生产中应用。

[关键词] 神曲; 酶活力; 配料比; 特征图谱; 赤小豆; 苦杏仁; 青蒿

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)15-0040-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014150040

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140609.1548.021.html>

[网络出版时间] 2014-06-09 15:48

Investigation of Materials Compatibility in Preparation Process of Massa Medicata Fermentata

LIU Teng-fei¹, JIA Tian-zhu^{1,2*}

[收稿日期] 20131107(023)

[基金项目] 国家科技重大专项(2010ZX09401-304-105A)

[第一作者] 刘腾飞, 在读硕士, 从事中药发酵研究, Tel:15524879707, E-mail:lfte567@126.com

[通讯作者] * 贾天柱, 教授, 博士生导师, 从事中药炮制原理研究, Tel:0411-85896135, E-mail:jiatzh@126.com

了饮片的密度, 可避免饮片在浸泡、煎煮时漂浮于液面, 更易浸入水中, 有利于饮片浸润及成分溶出。文献报道 HSYA 本身具备极强的水溶性且热稳定性较差, 温度对红花中 HSYA 含量存在显著影响, 随温度升高和加热时间的延长, HSYA 会发生降解^[7]。故本文在考察溶出曲线时先浸泡后加热, 沸腾后 HSYA 含量逐渐下降, 煮沸 20 min 后下降趋势明显。

采用 f_2 相似因子对红花溶出曲线进行相似性评价, 以 HSYA 为参比, f_2 的取值范围 0~100。FDA 认为, 当 2 条溶出曲线的 f_2 在 50~100 时表明两制剂的溶出度相似, 无显著差异。经计算本文中 $50 < f_2 < 100$, 表明红花定量压制饮片压制前后的 HSYA 溶出行为相似, 压制饮片未改变其内在质量。

[参考文献]

[1] 夏玉叶, 闵暘. 羟基红花黄色素 A 对脑循环障碍影响

的实验研究[J]. 中国药理通讯: 自然科学版, 2004, 21(3):6.

[2] 张丽范, 于美霞. 红花注射液治疗冠心病心肌缺血的临床观察[J]. 心血管康复医学杂志, 2002, 11(4):455.

[3] 万秋, 刘秀明, 杨文婷, 等. 红花黄色素研究概述[J]. 生命的化学, 2013, 33(2):54.

[4] 邓苏平. 中药饮片小包装存在的不足及需要解决的问题[J]. 中国药房, 2010, 21(31):2969.

[5] 宋英, 盛蓉, 谈静, 等. 中药饮片的定量压制研制[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(18):1457.

[6] 宋英, 盛蓉, 陈佳, 等. 金银花压制饮片和传统饮片的比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(16):24.

[7] 王慧, 张立伟, 晋民杰, 等. 羟基红花黄色素 A 稳定性研究[J]. 太原科技大学学报, 2010, 31(1):81.

[责任编辑 刘德文]

(1. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China;

2. Liaoning Province Processing Engineering Technology Research Center of Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] Objective: To optimize materials compatibility in preparation process of Massa Medicata Fermentata. **Method:** Taking wheat bran-flour and ratio of wheat bran and wheat flour to Vignae Semen as factors, Massa Medicata Fermentata with different materials compatibility fermented 5 days in constant temperature and humidity box, then took out, after low temperature drying, enzyme liquid was prepared, enzyme activities of amylase, saccharifying enzyme and protease were determined, select the best ingredients proportion according to these three indicators, its methanol extract was analyzed by HPLC fingerprint, taking specific chromatogram spectrum of Massa Medicata Fermentata with the best ingredients proportion as reference spectrum, similarity was evaluated by 2004 A version of 'fingerprint similarity evaluation system of traditional Chinese medicine'. **Result:** The best wheat bran-flour ratio was 70:30, optimum ratio of carbon and nitrogen was 100:2. Fingerprint similarities of different samples were more than 0.9. **Conclusion:** Chemical composition in Massa Medicata Fermentata with high enzyme activity had no significant differences by comparing with other samples, it was suitable for practical application.

[Key words] Massa Medicata Fermentata; enzyme activity; materials compatibility; characteristic spectrum; Vignae Semen; Armeniacae Semen Amarum; Artemisiae Annuae Herba

神曲又名六神曲,始载于《药性论》^[1],具有健脾和胃、消食调中之功效,是由面粉、麦麸、粉碎的赤小豆、苦杏仁加入辣蓼、苍耳草和青蒿的水煎液,混匀后于一定湿度和温度下发酵而成的曲类中药。各地区的神曲制备工艺差异较大^[2],外型多为块状,亦有颗粒状、粉末状;有用全面粉者,也有用麦麸与面粉混合的,后者居多^[3],但用量比多不明确;虽然赤小豆的比例较为固定,但从微生物学角度来看,面粉和麦麸为主要碳源而赤小豆为主要氮源,当三者比例不同时,微生物的生长情况不尽相同,产生酶的种类与活性亦不同,这种物质基础的差异势必对神曲的药效产生影响。故本实验以淀粉酶、蛋白酶和糖化酶的活力为指标^[4],通过对神曲发酵制备工艺中麸面比(麦麸与面粉的用量比)、碳氮比(麸面与赤小豆的用量比)进行考察,选择最佳比例所得样品的甲醇提取部位为参照,并与其他比例样品进行 HPLC 特征图谱比较,以探明酶活高的样品在化学成分方面与其他样品的差异。

1 材料

Multiskan-MK3 型酶标仪(美国 Thermo 公司), LHS-150HC-I 型恒温恒湿箱(上海一恒科学仪器), ZHWY-1102 型双层恒温培养摇床(上海智成科学仪器), LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津), TGL-16C 型离心机(上海安亭科学仪器)。

赤小豆、苦杏仁购自大连市药材公司,辣蓼、苍耳草及青蒿购自河北省安国市,经辽宁中医药大学尹海波教授鉴定依次为豆科植物赤小豆 *Vigna umbeuata* Ohwi et Ohashi 的干燥成熟种子,蔷薇科植物东北杏 *Prunus mandshurica* (Maxim.) Koehne 的干燥成熟种子,蓼科植物伏毛蓼 *Polygonum pubescens* Blume 的干燥全草,菊科植物苍耳 *Xanthium sibiricum* Patr. 的干燥地上部分,菊科植物黄花蒿 *Artemisia annua* L. 的干燥地上部分;面粉、麦麸购自大连市开发区面粉厂,麦芽糖、葡萄糖购自天津市巴斯夫化工有限公司,3,5-二硝基水杨酸、可溶性淀粉、福林酚试剂均购于天津市大茂化学试剂厂有限公司,酪蛋白、干酪素购于国药沪试试剂公司,乙腈、甲醇均为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 神曲的制备 按《全国中药炮制规范》中方法制备。取面粉适量,麦麸、赤小豆和苦杏仁粉碎过筛,将 4 种材料混匀后加入苍耳草、青蒿、辣蓼(干品用量为鲜品的 1/3)的水煎液,配料比见表 1,2,置恒温恒湿箱中,于 32 ℃,相对湿度 70% 的条件下发酵 5 d 后取出^[4],切块,低温烘干。

2.2 酶液的制备及酶活测定

2.2.1 酶液的制备^[5] 取粉碎过 40 目筛的神曲适量,以水为溶媒,料液比 1:20,于 40 ℃ 条件下用摇床(110 r·min⁻¹)振摇提取 0.5 h,离心(6 000 r·min⁻¹,

表 1 不同麸面比神曲酶活力的测定

No.	面粉 /g	麦麸 /g	酶活力/mg·min ⁻¹ ·g ⁻¹		
			淀粉酶	糖化酶	蛋白酶
S1	0	100	12.8	28.9	1.027 × 10 ⁻³
S2	10	90	11.5	35.5	1.151 × 10 ⁻³
S3	20	80	17.9	35.4	1.274 × 10 ⁻³
S4	30	70	50.0	58.9	1.767 × 10 ⁻³
S5	40	60	42.0	20.4	1.151 × 10 ⁻³
S6	50	50	16.4	11.2	1.123 × 10 ⁻³
S7	60	40	6.5	14.4	1.099 × 10 ⁻³
S8	70	30	4.8	14.3	1.014 × 10 ⁻³
S9	80	20	20.0	5.3	0.989 × 10 ⁻³
S10	90	10	21.2	15.6	0.952 × 10 ⁻³
S11	100	0	19.8	12.3	0.913 × 10 ⁻³

注:赤小豆、苦杏仁加入量均为 4 g,辣蓼、苍耳草、青蒿加入量均为 7 g。

表 2 不同碳氮比神曲酶活力的测定

No.	赤小豆 /g	酶活力/mg·min ⁻¹ ·g ⁻¹		
		淀粉酶	糖化酶	蛋白酶
N1	1	24.2	8.5	1.151 × 10 ⁻³
N2	2	51.1	50.9	2.014 × 10 ⁻³
N3	4	55.5	15.3	1.150 × 10 ⁻³
N4	6	19.1	15.1	1.000 × 10 ⁻³
N5	8	47.8	25.0	0.976 × 10 ⁻³

注:面粉+麦麸均为 100 g,辣蓼、苍耳草、青蒿加入量均为 7 g,苦杏仁加入量均为 4 g。

5 min,下同),取上清液,4℃保存,备用。

2.2.2 淀粉酶和糖化酶活测定 采用 DNS 比色法测定酶活^[6]。淀粉酶酶活^[7]的测定方法为将 1% 可溶性淀粉 1 mL 置于试管中,加入 1% NaCl 溶液 400 μL,于 37℃ 保温 5 min,取预热好的酶液 200 μL 加入试管中,准确计时反应 5 min 后,立即加入 NaOH 溶液 200 μL 终止反应,加入 DNS 溶液 200 μL 显色,煮沸 5 min,放凉后用移液枪吸取 200 μL 置于 96 孔板中,重复加 3 个孔,于 540 nm 处测定吸光度(A)。每个反应管均设定空白管,空白管先加入酶液,再加入 NaOH 终止反应,其他操作同上,计算酶活力。

糖化酶酶活的测定方法为将酶液和 2% 可溶性淀粉分别于 50℃ 预热 5 min,吸取酶液 200 μL 和 2% 可溶性淀粉 400 μL 置于同一试管中,精确计时反应 1 h,加入 DNS 溶液 600 μL 和水 800 μL,立即煮沸 5 min,于 540 nm 处测定 A;空白管无需反应

1 h,直接煮沸 5 min 显色,计算酶活力。

2.2.3 蛋白酶酶活的测定 采用福林酚法^[8]。称取酪蛋白 0.5 g,加少量 0.1 mol·L⁻¹的 NaOH 溶液溶解,加入 2 倍量福林酚原液稀释,置于棕色瓶中保存。将酪蛋白溶液和酶液置于 40℃ 预热 5 min,各吸取 1 mL 加入试管中,40℃ 精确保温 15 min 后立即加入三氯乙酸(TCA)终止反应,离心,取上清液 1 mL,依次加入 5% 碳酸钠 5 mL 和福林酚试剂 1 mL,40℃ 保温显色 20 min,空白管在反应开始后立即加入 TCA 终止反应,其他操作相同,于 680 nm 处测定 A,计算酶活力。

2.3 供试品溶液的制备^[9] 将制备的神曲粉碎,过 40 目筛,精密称取 7.50 g,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,称定质量,超声提取 0.5 h,加甲醇补足损失的质量,过滤,精密量取续滤液 20 mL 于 45℃ 水浴挥干,加甲醇溶解并定容至 10 mL,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.4 色谱条件 月旭 Ultimate C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),柱温 30℃,流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~10 min,5% A;10~15 min,5%~10% A;15~30 min,10%~20% A;30~45 min,20%~50% A;45~55 min,50%~75% A;55~70 min,75%~85% A;70~80 min,85%~90% A;80~85 min,90%~92% A;85~86 min,92%~94% A;86~98 min,94%~95% A;98~105 min,95%~98% A;105~115 min,98%~99% A;115~120 min,99%~90% A;120~125 min,90%~60% A;125~140 min,60%~20% A;140~145 min,20%~5% A),检测波长 280 nm,流速程序为 0~10 min,0.6 mL·min⁻¹;10~15 min,0.6~0.9 mL·min⁻¹;15~145 min,0.9 mL·min⁻¹。

2.5 方法学考察 精密度考察以 S4 为供试液连续进样 5 次,稳定性考察分别在该供试液制备后 0,3,6,9,12,24 h 进样分析,以特征图谱 45 min 出现的峰为参照峰,结果各共有峰的相对保留时间 RSD 均 <0.6%,相对峰面积的 RSD 均 <5%,证明仪器精密度良好,供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。将 S1~S6 的供试液进样,记录指纹图谱,结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均 <0.6%,相对峰面积的 RSD 均 <5%,表明该方法重复性良好。

2.6 不同麸面比样品的酶活力测定 不同麸面比神曲的淀粉酶、糖化酶、蛋白酶酶活力变化见表 1。结果显示不同配料比的神曲发酵后酶活力各有差异,3 种酶的活力均呈现先增大后减小的趋势,均在样品

S4 处达最大值,故确定面粉-麦麸用量比 30:70。

2.7 不同碳氮比样品的酶活力测定 不同碳氮比神曲的淀粉酶、糖化酶、蛋白酶活力变化见表 2。结果显示不同碳氮比的神曲发酵后酶活力各有差异,3 种酶的酶活力变化趋势均为先增大后减小,淀粉酶活力在 N3 处达最大值,糖化酶和蛋白酶活力均在 N2 处达最大值,综合 3 个指标,N2 样品的淀粉酶活力稍小于 N3,其他 2 种酶的活力均高于 N3,故最佳碳氮比(面粉+麦麸)-赤小豆(100:2)。

2.8 特征图谱及相似度评价 分别以 S4,N2 酶活最高者为参照图谱,相似度评价参照《中药指纹图谱相似度评价系统》2004 年 A 版,输出相似度值,见图 1,2。结果表明不同麸面比样品的特征图谱相似度分别为 0.940,0.956,0.969,0.947,0.954,0.931,0.901,0.917,0.985,0.931,0.956,从匹配的色谱峰共确定 13 个共有峰,共有峰的相对保留时间依次为 8.532, 10.675, 13.466, 22.124, 23.578, 29.750, 32.736, 41.470, 45.752, 53.280, 64.671, 77.320, 108.230 min;不同碳氮比的特征图谱相似度依次为 0.910,0.978,0.971,0.966,0.958,从匹配的色谱峰共确定 15 个共有峰,共有峰的相对保留时间依次为 10.875, 15.566, 20.324, 22.638, 29.780, 30.656, 36.247, 40.527, 42.283, 44.671, 46.327, 62.213, 64.550, 75.460, 128.930 min;证明酶活力高的神曲样品相对于其他样品在化学成分上相差不大。

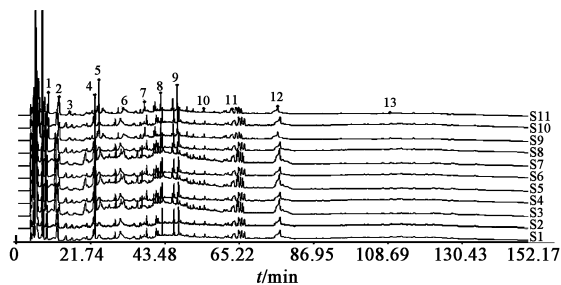


图 1 不同麸面比神曲的特征谱

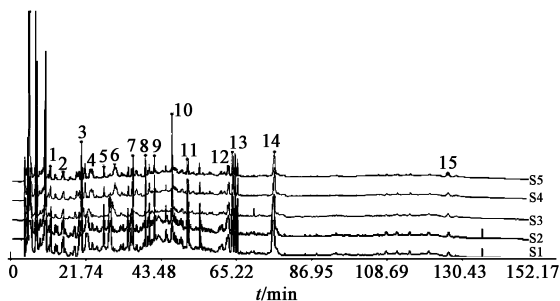


图 2 不同碳氮比神曲特征谱

3 讨论

不同麸面比神曲的酶活力不同,原因可能是由于麦麸和面粉的营养成分不同造成,麦麸中含有大量维生素和微量元素,而面粉中相对少一些,这种培养基成分上的差异势必会对微生物生长及分泌的酶类产生影响。赤小豆中亦含有一些微生物生长所必需的无机盐及生长因子,因此麦麸、面粉及赤小豆加入量达最佳配比状态时,微生物生长和产酶才能达到最佳状态。另外,当麦麸-面粉(70:30)和碳氮比 100:2 时,所得神曲样品(S4,N2)中各种消化酶的酶活力均为最高,可为规范神曲的制备工艺提供参考。与面粉相比,麦麸的成本低了许多,同时赤小豆加入量也减少了,在工业大生产时,将大大降低神曲的原料成本。研究过程中发现不同配料比的神曲在同一时间表面生长的菌丝体各不相同,可通过固定神曲的配料比为筛选优势菌种提供固定条件;不同比例麦麸-面粉在拌曲过程中,随面粉比例的增大,曲料混匀制曲的难度加大,面粉比例少时成形性亦不好,但当麸面比为 7:3 时,每(麦麸+面粉)100 g 加入水煎液约 75 mL 时,混匀和成形均能达到最佳状态,可加快工业生产效率。

[参考文献]

- [1] 高慧. 神曲发酵及炮制工艺研究[D]. 沈阳:辽宁中医学院,2003.
- [2] 刘振启,刘杰. 地道“六神曲”的工艺与混乱品的鉴别[J]. 首都医药,2009,15(1):40.
- [3] 府炳荣. 影响中药“神曲”功效因素的分析[J]. 抗感染药学,2009,6(4):237.
- [4] 徐云,郑璐,相宏宇,等. 六神曲发酵过程中 5 种消化酶的动态分析[J]. 中国酿造,2012,31(10):43.
- [5] 孔杰娜,谢茵,张凯,等. 正交实验优化六神曲中淀粉酶和蛋白酶的提取工艺[J]. 山西医科大学报,2012,43(5):349.
- [6] Noman A S M, Hoque M A, Sen P K, et al. Purification and some properties of α -amylase from post-harvest *Pachyrhizus erosus* L. tuber[J]. Food Chem, 2006, 99(3):444.
- [7] 王海洋,高文远,张丽霞. 六神曲不同制备的工艺对其淀粉酶活力的影响[J]. 中国中药杂志,2012,37(14):2084.
- [8] 袁国兴. 红曲米中蛋白酶、酯化酶活性研究[D]. 济南:山东轻工业学院,2012.
- [9] 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.

[责任编辑 刘德文]