

4 种消食中药的质量生物活性测定方法研究：消化酶种类选择与活力效价测定

胡云瑶¹, 谭 鹏², 杨 婷¹, 贺亚男¹, 阳向波³, 林俊芝⁴, 许润春^{1*}, 张定堃^{1*}

1. 成都中医药大学药学院, 西南特色中药资源国家重点实验室, 四川 成都 611137
2. 四川省中医药科学院, 国家中医药管理局中药质量生物评价重点实验室, 四川 成都 610041
3. 雅安迅康药业有限公司, 四川 雅安 625600
4. 成都中医药大学附属医院, 代谢性疾病中医药调控四川省重点实验室, 四川 成都 610072

摘要: **目的** 为有效评控消食类中药的质量, 研究基于消化酶活力检测的消食类中药生物效价测定方法并结合传统论述以探索消食类中药的质量控制方法。 **方法** 以山楂、六神曲、麦芽、谷芽为研究对象, 筛选适宜消化酶种类; 采用“质反应平行线法”建立基于酶活性的生物效价测定法, 并进行方法学考察, 测定 10 个批次各药物的生物效价; 最后采用营养糊黏度测定法验证不同效价各药降低黏度的活性差异, 评价酶活力效价与药物质量的相关性。 **结果** 蛋白酶、脂肪酶与淀粉酶活力测定方法的吸光度与产物质量浓度有良好线性关系, r^2 均大于 0.99; 结合实验结果与传统论述, 山楂善消肉积且蛋白酶活力效价系数为效价综合系数中的最大值, 六神曲善消谷麦酒积但脂肪酶活力效价系数为效价综合系数中最大值, 麦芽谷芽善消淀粉食积且淀粉酶活力效价系数为效价综合系数中的最大值, 故山楂、六神曲、麦芽和谷芽分别选取蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶做标准酶。实验所用供试品制备方法的量效曲线与阳性药胃蛋白酶片相似, 重复性、精密度及中间精密度考察结果均符合要求; 各药 10 批样品的效价差异较大, 山楂蛋白酶活力效价为 175.40~330.66 U/mg, 六神曲脂肪酶活力效价为 187.36~858.61 U/mg, 麦芽淀粉酶活力效价为 6.18~19.35 U/mg, 谷芽淀粉酶活力效价为 1.87~7.79 U/mg。验证实验结果显示, 各药样品对应效价越高, 营养糊黏度降低越明显, 表明酶活力效价与药物质量有较高相关性。 **结论** 结合药物传统论述所建立的基于消化酶活性的消食类中药生物效价测定方法可靠, 可用于反映部分消化类中药的质量优劣, 可为消食类中药的质量标准研究提供参考。

关键词: 消食药; 蛋白酶; 脂肪酶; 淀粉酶; 生物活性测定; 质量标准; 山楂; 六神曲; 麦芽; 谷芽; 生物效价

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)07-2106-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.07.010

Study on determination methods of biological activity of quality of four kinds of Chinese herbal medicine for digestion: Selection of digestive enzymes and determination of activity potency

HU Yun-yao¹, TAN Peng², YANG Ting¹, HE Ya-nan¹, YANG Xiang-bo³, LIN Jun-zhi⁴, XU Run-chun¹, ZHANG Ding-kun¹

1. School of Pharmacy, State Key Laboratory of Characteristic Chinese Drug Resources in Southwest China, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China
2. Sichuan Key Laboratory of Translational Chinese Medicine, Key Laboratory of Biological Evaluation of TCM Quality of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China
3. Ya'an Xunkang Pharmaceutical Co., Ltd., Ya'an 625600, China
4. Sichuan Key Laboratory of TCM Regulating Metabolic Diseases, Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China

Abstract: Objective In order to effectively evaluate and control the quality of digestible traditional Chinese medicine (TCM), the

收稿日期: 2022-10-08

基金项目: 四川省科技计划资助 (2022YFS0429); 四川省中医药管理局科研专项 (2021MS530)

作者简介: 胡云瑶, 女, 硕士研究生, 从事中药饮片质量研究。E-mail: 1103489750@qq.com

*通信作者: 许润春, 副教授, 硕士生导师, 博士, 从事中药炮制制剂研究。E-mail: wsxrch@qq.com

张定堃, 副教授, 硕士生导师, 博士, 从事中药制剂新技术与质量评价研究。E-mail: zhangdingkun@cduetcm.edu.cn

biological potency determination method of digestible TCM based on the detection of digestive enzyme activity was studied and combined with traditional discussions to explore the quality control method of digestible TCM. **Methods** Shanzha (*Crataegi Fructus*), Liushenqu (*Massa Medicata Fermentata*), Maiya (*Hordei Fructus Germinatus*) and Guya (*Setariae Fructus Germinatus*) were used as objects of study to screen the digestive enzyme types. The “parallel line method of qualitative reaction” was used to establish a method for determining the biological potency of Chinese herbal medicine based on enzyme activity, and the methodology was investigated to determine the biological potency of 10 batches of each drug; The viscosity determination of nutrient paste was used to verify the difference of viscosity reducing activities of each drug with different potencies, and to evaluate the correlation between the activity and potency of each enzyme and the drug quality. **Results** The results showed that the r^2 of the standard curves of each enzyme activity determination method was greater than 0.99, and there was a good linear relationship between the absorbance and the product concentration; Combined with the experimental results and traditional discussion, *Crataegi Fructus* was good at treating dyspepsia caused by meat and had the largest protease activity potency coefficient in the comprehensive potency coefficient; *Massa Medicata Fermentata* was good at treating dyspepsia caused by cereal wine but had the largest lipase activity potency coefficient in the comprehensive potency coefficient; *Hordei Fructus Germinatus* and *Setariae Fructus Germinatus* were good at treating dyspepsia caused by starch and had the largest amylase activity potency coefficient in the comprehensive potency coefficient, so the protease, lipase and amylase were selected as standard enzymes for *Crataegi Fructus*, *Massa Medicata Fermentata*, *Hordei Fructus Germinatus* and *Setariae Fructus Germinatus* respectively. The dose effect curve of the test article preparation method used in the experiment was similar to that of the positive drug pepsin tablets, and the repeatability, precision and intermediate precision inspection results met the requirements; The potency of 10 batches of samples of each drug varied greatly, with *Crataegi Fructus* protease activity ranging from 175.40 to 330.66 U/mg, *Massa Medicata Fermentata* lipase activity ranging from 187.36 to 858.61 U/mg, *Hordei Fructus Germinatus* amylase activity ranging from 6.18 to 19.35 U/mg, and *Setariae Fructus Germinatus* amylase activity ranging from 1.87 to 7.79 U/mg. The validation test results showed that the higher corresponding titer of each drug sample, the more obvious reduction of the viscosity of the nutrient paste, indicating that there was a high correlation between the enzyme activity titer and the drug quality. **Conclusion** The research results show that the method for determining the biological potency of TCM for digestion based on digestive enzyme activity established in this paper is reliable and can be used to reflect the quality of some digestive TCM, and can provide a reference for the quality standard research of TCM for digestion.

Key words: traditional Chinese medicine for digestion; protease; lipase; amylase; biological activity determination; quality standard; *Crataegi Fructus*; *Massa Medicata Fermentata*; *Hordei Fructus Germinatus*; *Setariae Fructus Germinatus*; biological potency

消食药是以消食化积、健脾开胃为主要功效的一类药物，临床应用广泛，包括山楂、神曲、麦芽、谷芽、鸡内金等。由于这些消食药多源于动物器官或经过发酵、发芽等特殊工艺制成，药效物质并不十分确切，质量波动大，缺乏能够有效评价其消食化积功效的质控方法^[1-5]。以《中国药典》2020 年版为例^[1]，仅在山楂项下进行了枸橼酸（有机酸）含量控制，对于鸡内金、麦芽、谷芽无相关定量控制方法；神曲尚未进入《中国药典》，收载于部分省市的中药材地方标准，也无相关定量控制方法。

受多酶片质量控制思路的启示，课题组前期提出了基于胃蛋白酶活性的鸡内金生物效价测定方法，为消食药的质量控制提供了参考^[6]。但基于传统中医药理论，不同消食药的作用特点并不相同，如山楂长于消肉积、神曲长于消谷麦酒积、麦芽和谷芽善消淀粉类食积，鸡内金善消各种积滞；一般食积停滞，常用山楂、神曲；病情较重者宜用鸡内金，轻者多用麦芽、谷芽^[7-11]。是否可根据不同药

物的消食作用特点，选用针对性的消化酶种类进行活性评价，是值得深入探讨的课题。本研究尝试在消食药传统认知基础上，以消化酶生物检定方法为基础，筛选研究适宜于山楂、六神曲、麦芽、谷芽的消化酶种类，并以生物统计为工具，测定药物的效价范围^[12-14]，以期为消食类中药的质量评价方法提供参考，保障消食药的临床疗效。

1 仪器与材料

1.1 仪器

SpectraMax iD3 型多功能酶标仪，美谷分子仪器上海有限公司；96 孔酶标板，美国 Costar 公司；85-2A 型数显恒温测速磁力搅拌器，常州越新仪器制造有限公司；DZKW-4 型电子恒温水浴锅，北京中兴伟业仪器有限公司；KQ-500DE 型数控超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司；LVDV-1T 型数字旋转黏度计，上海方瑞仪器有限公司；L-550 型台式低速大容量离心机，湖南湘仪离心机仪器有限公司。

1.2 试药

山楂、六神曲、麦芽、谷芽各 10 批,其中山楂(S1~S10)、六神曲(L1~L10)、麦芽(M1~M10)、谷芽(G1~G10),经成都中医药大学药学院中药炮制教研室许润春副教授鉴定山楂 *Crataegi Fructus* 为蔷薇科山楂属植物山楂 *Crataegus pinnatifida* Bge. 的成熟干燥果实,六神曲 *Massa Medicata Fermentata* 是由鲜辣蓼、青蒿、鲜苍耳、赤小豆等中药加入面粉混合后经发酵而成的曲剂的炮制加工品,麦芽 *Hordei Fructus Germinatus* 为禾本科大麦属植物大麦 *Hordeum vulgare* L. 的成熟果实经发芽干燥的炮制加工品,谷芽 *Oryzae Fructus Germinatus* 为禾本科狗尾草属植物粟 *Setaria italica* (L.) Beauv. 的成熟果实经发芽干燥的炮制加工品,经分析样品均符合《中国药典》2020 年版与卫生部药品标准要求。阳性对照药:消化酶片,批号 211103,西南药业股份有限公司,粉碎过 4 号筛备用。

1.3 试剂

酪蛋白(批号 SY352182),合肥博美生物科技有限公司;盐酸(批号 2011171),四川西陇科学有限公司;福林酚(批号 20220325),飞净生物科技有限公司;对硝基苯磷酸二钠(PNPP,批号 C13588861),上海麦克林生化科技有限公司;Triton X-100(批号 R009177-100 mL)、三羟甲基氨基甲烷(批号 R007330)、对硝基苯酚(批号 R015309-25 g),上海易恩化学技术有限公司;三氯乙酸(批号 2020121401)、十二烷基硫酸钠(批号 2021031001)、无水碳酸钠(批号 2021042601)、氢氧化钠(批号 2021070101)、可溶性淀粉(批号 2021031801)、四水酒石酸钠(批号 2021061801)、无水硫酸钠(批号 2021040101)、磷酸二氢钠二水合物(批号 20210103)、磷酸氢二钠十二水合物(批号 2021040101)、无水葡萄糖(批号 2021070101)、酪氨酸(批号 201901001)、羧甲基纤维素钠(批号 2022020701),成都市科隆化学有限公司;3,5-二硝基水杨酸(DNS,批号 20200827),国药集团化学试剂有限公司;奶粉(批号 2021121),双城雀巢有限公司;脂肪粉(批号 20211218),无锡超科食品有限公司。

2 方法

2.1 检测原理

2.1.1 蛋白酶活力检测方法 采用 Folin 法^[15-16],以酪蛋白为底物,在一定条件下,同酶液反应,经

一段时间后用三氯乙酸终止反应,通过离心去除沉淀,取上清液用碳酸钠碱化并加入福林酚试剂显蓝色,其颜色深浅与产物酪氨酸的含量成正比,使用酶标仪在 660 nm 紫外吸收波长处测定酪氨酸含量,从而计算蛋白酶的活力。

2.1.2 脂肪酶活力检测方法 采用 PNPP 法^[17-18],以 PNPP 为底物,在一定条件下,同酶液反应,水解产生对硝基苯酚,在碱性条件下呈黄色,使用酶标仪在 410 nm 紫外吸收波长处测定对硝基苯酚含量,从而计算脂肪酶的活力。

2.1.3 淀粉酶活力检测方法 采用 DNS 法^[16,19],以淀粉溶液为底物,在一定条件下与酶液反应生成还原性糖,DNS 与还原糖发生氧化还原反应,生成 3-氨基-5-硝基水杨酸,在煮沸条件下显棕红色,其颜色深浅产生的还原糖的含量成正比,使用酶标仪在 520 nm 紫外吸收波长处测定还原糖含量,从而计算淀粉酶的活力。

2.1.4 酶活力效价的测定 通过计算得到反应率,参照《药品生物检定》简化概率单位法的原理计算相对效价,将供试品和阳性对照药测试质量浓度及其反应率输入生物效价质反应计算软件,计算生物效价。三类消化酶活力效价所用阳性药的效价规定为 300 U/mg^[6]。

2.1.5 酶活力反应率 采用归一化法将样品组和阳性组扣除空白背景吸光度后的吸光度(A)值转化为(0,1)之间的小数,见公式(1)。

反应率 = $(A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}) \times \text{显色样体积} \times 50 \text{ mL} / (A_{\text{值测定}} \times \text{所取显色样体积} \times \text{消食药溶液取样体积} \times \text{调节常数})$ (1)

2.2 酶液制备方法

2.2.1 供试品溶液的制备 精密称取适量药材粉末(过 4 号筛)于 50 mL 离心管,加入 50 mL 超纯水,振荡使其与溶液混匀,超声(300 W、40 kHz)提取 30 min 后置 4 °C 冰箱中静置过夜,使用时以 3000 r/min 离心(离心半径 81 mm) 10 min,取上清液按 1:0.6 倍等比稀释成一定质量浓度的供试品溶液。

2.2.2 阳性对照药溶液的配制 蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶酶活力测定分别取阳性对照药 100.00、800.00、2.00 mg,加超纯水 50 mL,按供试品溶液制备方法制成 2、16、0.04 mg/mL 的阳性对照药溶液,并按 1:0.6 倍剂距等比稀释作为胃蛋白酶活力测定的阳性对照药溶液。

2.3 蛋白酶活力测定方法

2.3.1 0.5%酪蛋白底物溶液(现配) 称取 0.50 g

酪蛋白于研钵中,用少量超纯水润湿,缓慢加入 2 mL 0.4 mol/L HCl 溶液的同时进行研磨,研磨呈黏稠状后用水洗入 100 mL 烧杯中,煮沸 10 min 溶解,冷却定容至 100 mL。

2.3.2 酪氨酸标准曲线 准确称取酪氨酸适量于量瓶中,加入少量超纯水溶解,定容,配制成 200 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液。再取标准溶液加水稀释至质量浓度为 0、10、20、30、40、50、60、70、80、90 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,再按下述方法测定 A 值,以质量浓度为横坐标, A 值为纵坐标建立标准曲线。

2.3.3 测定方法 采用 Folin 法, 10 mL EP 管中加入 0.5%酪蛋白溶液 2 mL 和供试品溶液 5 mL,于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min,取出立即加入 0.4 mol/L 三氯乙酸溶液 2 mL 终止反应,混匀后静置 5 min, 3000 r/min 离心(离心半径 81 mm) 10 min,于 96 孔板中加入上清液 80 μL 、0.4 mol/L 碳酸钠溶液 150 μL 和稀释的福林酚试剂(1 mol/L 福林酚试剂-水 1:0.5) 40 μL ,振荡混匀,在 40 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 20 min,测定 A 值。空白组将酶液替换为等量超纯水。

2.4 脂肪酶活力测定方法

2.4.1 PNPP 底物溶液 取 62.29 mg PNPP 溶于 33 mL 超纯水中,加入 330 μL Triton X-100 和 11.00 mg 十二烷基硫酸钠,制备出 5 mmol/L 的 PNPP 原液。该溶液在 65 $^{\circ}\text{C}$ 磁搅拌加热 20 min,冷却至室温。

2.4.2 对硝基苯酚曲线 准确称取对硝基苯酚适量于量瓶中,加入少量水溶解,定容,配制成 48 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液。再稀释制备成对硝基苯酚的最终质量浓度为 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,并按下述方法测定 A 值,以质量浓度为横坐标, A 值为纵坐标建立标准曲线。

2.4.3 测定方法 在 10 mL EP 管中加入 PNPP 底物溶液 1.2 mL,加入 50 mmol/L pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液 0.6 mL 和供试品溶液 1.2 mL,在 40 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min 后加入 0.5 mol/L 三氯乙酸 1.2 mL 终止反应,摇匀后静置 5 min,加入 0.5 mol/L NaOH 1.8 mL 显色,取 200 μL 于 96 孔板中于 410 nm 处测定 A 值,空白组将酶液替换为等量超纯水。

2.5 淀粉酶活力测定方法

2.5.1 1%的淀粉底物溶液(现配) 取 1.00 g 干淀粉,加入 30 mL 蒸馏水,沸水水浴加热 10 min,冷却后定容至 100 mL。

2.5.2 DNS 溶液的配制 取 18.20 g 四水酒石酸钾钠,溶于 50 mL 超纯水中,于 45 $^{\circ}\text{C}$ 加热溶解,同

时趁热加入 0.63 g 3,5-二硝基水杨酸,取 26.2 mL 2 mol/L NaOH 溶液加入上述溶液,再分别加入 0.50 g 苯酚和无水硫酸钠,搅拌溶解,最后用超纯水定容至 100 mL,转移到棕色量瓶中,避光低温保存,放置 1 周后使用。

2.5.3 葡萄糖标准曲线 准确称取葡萄糖适量于量瓶中,加入少量水溶解,定容,配制成 50 mg/mL 的标准溶液。再稀释制备成葡萄糖的最终质量浓度为 0、100、200、300、400、500、600、700 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,并按下述方法测定 A 值,以质量浓度为横坐标, A 值为纵坐标建立标准曲线。

2.5.4 测定方法 采用 DNS 法,在 10 mL 的 EP 管中加入供试品溶液 1 mL, 2 mL 磷酸盐缓冲液(pH 7 0.05 mol/L)以及 0.5 mL 1%淀粉溶液,在 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中预热 30 min,取出立即加入 1 mL 0.4 mol/L NaOH 溶液,摇匀后 5 min 加入 100 μL DNS,沸水中加热 6 min,取出用流水冷却,等待 10~20 min 后,取 200 μL 于 96 孔板酶标仪 520 nm 处测定 A 值。计算淀粉酶活性。空白组将酶液替换为等量超纯水。

2.6 方法学考察

2.6.1 精密度试验 取同一批次相同质量浓度的供试品溶液,连续重复测定 6 次,计算平均效价和 RSD 值,考察仪器的精密度。

2.6.2 中间精密度试验 实验室 2 名不同实验人员在 2 个不同时间段内,分别重复测定 3 次,计算平均效价和 RSD 值,考察实验的中间精密度。

2.6.3 重复性试验 取同一批次的药材样品适量,精密称定 6 份,分别制成供试品溶液,计算平均效价和 RSD 值,考察方法的重复性。

2.7 营养糊黏度测定方法

课题组前期研究发现,鸡内金胃蛋白酶活力效价值升高,可以显著降低营养糊黏度^[6]。营养糊具有一定黏性,主要成分为蛋白质、脂肪、淀粉等大分子物质,加入含消化酶的药粉,在适宜条件下,酶可促进这些大分子物质水解,黏性下降,在一定范围内,随着酶活性的增强,黏性下降越多。

2.7.1 营养糊的配制 于烧杯中加入 300 mL 超纯水置于磁力搅拌器上,称取 3 g 羧甲基纤维素钠缓慢加入并进行搅拌,搅拌均匀后依次加入 16 g 奶粉、8 g 脂肪粉、8 g 葡萄糖、8 g 可溶性淀粉,搅拌均匀。

2.7.2 黏度测定方法 各消食药(山楂、六神曲、麦芽、谷芽)分别取 4 个批次,于烧杯中称取 40 g

营养糊,加入 0.5 g 样品粉末,搅拌均匀,空白组为 40 g 营养糊,测定水浴 0.5、2.0 h (按酶活力测定时水浴温度) 后的黏度,每次测定平行重复 3 次。

3 结果

3.1 标准曲线

以质量浓度为横坐标 (X), A 值为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线。在 660 nm 处测定 A 值, $Y=0.013\ 4\ X+0.037\ 5$, $R^2=0.998\ 9$, 酪氨酸质量浓度在 10~90 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好; 在 410 nm 处测定 A 值, $Y=0.042\ 0\ X+0.003\ 5$, $R^2=0.999\ 6$, 对硝基苯酚质量浓度在 2~20 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好; 在 520 nm 处测定 A 值, $Y=0.001\ 8\ X-0.069\ 5$, $R^2=0.997\ 4$, 葡萄糖质量浓度在 100~700 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。所选方法适用于测定消化酶催化底物反应。

3.2 各消食药酶活力效价

山楂 (S3)、六神曲 (L10)、麦芽 (M10) 和谷芽 (G10) 的蛋白酶、脂肪酶及淀粉酶活力效价测定结果见表 1。参照品质综合指数研究方法^[20]对 3 种酶活力效价值进行归一化处理和整合分析, 采用比值法将每种药物的 3 类消化酶活力效价值进行归一化处理以消除量纲, 将不同类型酶活力效价值转化为 0~1 的数值, 然后采用三角形面积法对蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶活力效价 3 个方面的数据进行集成处理, 得到不同消食类中药的酶活力效价内涵 (三角形面积数值)。

表 1 4 种消食类中药消化酶活力效价 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Activity titers of digestive enzymes of four kinds of digestion drugs ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

消食药	活力效价/(U·mg ⁻¹)		
	蛋白酶	脂肪酶	淀粉酶
山楂	220.27±1.14	173.77±0.17	3.10±0.06
六神曲	41.08±1.06	282.71±1.44	2.55±0.02
麦芽	33.19±1.19	146.31±0.50	6.08±0.08
谷芽	41.89±0.42	43.48±0.26	2.49±0.02

数据归一化计算公式见公式 (2)。

$$P=P_i/P_{\max}, L=L_i/L_{\max}, A=A_i/A_{\max} \quad (2)$$

P 、 L 和 A 分别代表蛋白酶活力效价系数 (protease potency coefficient)、脂肪酶活力效价系数 (lipase potency coefficient) 和淀粉酶活力效价系数 (amylase potency coefficient); P_i 、 L_i 和 A_i 分别代表各种消化类中药的蛋白酶活力效价系数、脂肪酶活力效价系数和淀粉酶活力效价系数的绝对值; $P_{\max}$ 、 $L_{\max}$ 和 $A_{\max}$ 代表相应的酶活力效价系数的最大值

4 种消食药蛋白酶活力效价系数、脂肪酶活

力效价系数和淀粉酶活力效价系数的计算结果如图 1。由结果可知, 各种消食药在不同消化酶活力效价方面存在明显差异。其中, 山楂对 3 种酶均具有较强活力, 尤其对蛋白酶活力最强; 六神曲对脂肪酶活力最强, 对蛋白酶活力较弱; 麦芽对淀粉酶活力较强, 而谷芽对 3 种酶的整体活力较弱。

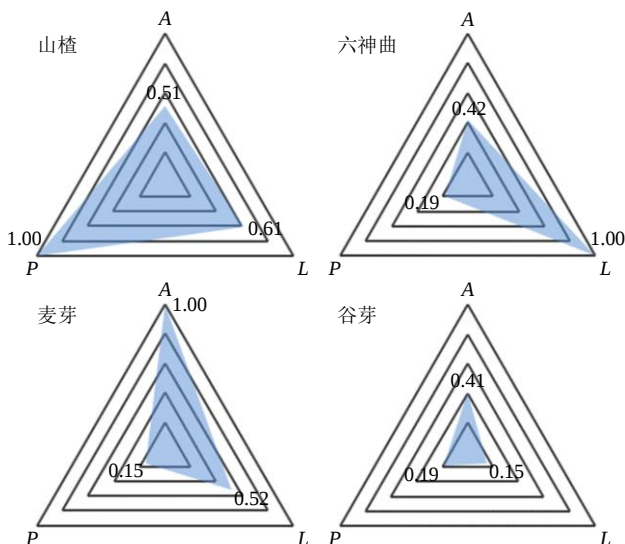


图 1 基于三维数据集成的不同消化类中药的酶活力效价系数
Fig. 1 Titer coefficients of enzyme activity of different digestive TCM based on 3D data integration

通过对 3 种酶活力效价结果进行归一化和集成化, 并计算出山楂、六神曲、麦芽、谷芽的酶活力效价内涵 (三角形面积数值) 分别为 0.429、0.233、0.272、0.052。山楂三角形面积最大, 整体酶活力效价系数较高, 效价综合系数之中蛋白酶活力效价系数最大, 选择蛋白酶为其标准酶; 六神曲效价综合系数之中脂肪酶活力的效价系数最大, 故选择脂肪酶作为其标准酶。麦芽的三角形面积较谷芽更大, 两者淀粉酶活力效价系数最大, 故选取淀粉酶为麦芽和谷芽的标准酶。

3.3 生物效价测定方法学考察

方法学考察结果如表 2 所示。山楂 (S3)、六神曲 (L10)、麦芽 (M10) 和谷芽 (G10) 6 次测定的酶活力效价测定结果的精密度 RSD 在 1.88%~2.62%, 表明实验仪器的精密度良好; 中间精密度 RSD 在 3.17%~6.73%, 表明不同实验人员对 4 种消食类中药酶活力效价测定结果影响都较小; 重复性测定结果 RSD 在 2.72%~6.25%, 表明各方法的重复性较好。

3.4 酶活力效价的标化

3.4.1 酶活性检测和量效关系考察 分别选取 S3、

表 2 各消食类中药标准酶活力效价测定方法学考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Investigation results of methods for determining activity and titer of standard enzymes of TCM for digestion ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

考察指标	考察内容	测定结果/(U·mg ⁻¹)	RSD/%
山楂-蛋白酶	精密度	219.98 ± 5.26	2.62
	中间精密度	213.28 ± 11.98	6.16
	重复性	215.20 ± 8.98	4.57
六神曲-脂肪酶	精密度	290.20 ± 4.98	1.88
	中间精密度	288.96 ± 8.37	3.17
	重复性	283.47 ± 7.46	2.88
麦芽-淀粉酶	精密度	6.02 ± 0.14	2.55
	中间精密度	5.98 ± 0.32	5.83
	重复性	5.91 ± 0.34	6.25
谷芽-淀粉酶	精密度	2.49 ± 0.06	2.46
	中间精密度	2.45 ± 0.09	6.73
	重复性	2.49 ± 0.06	2.72

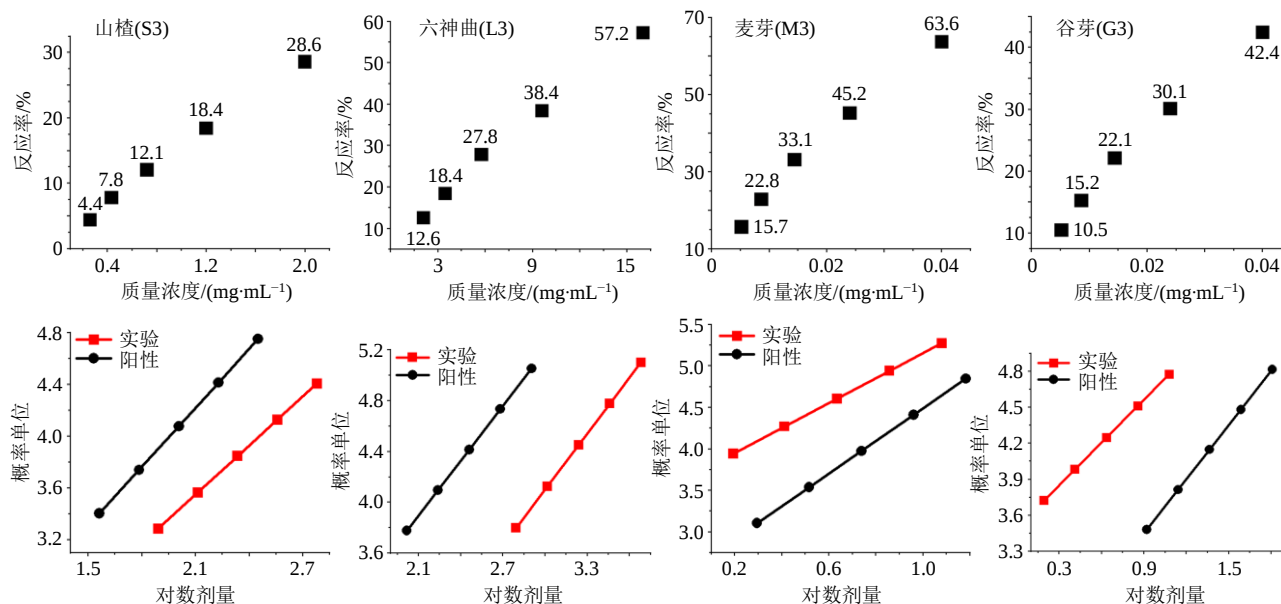


图 2 各消食药标准酶活性反应率及对数剂量与概率单位的线性关系

Fig. 2 Reaction rate of standard enzyme activity of each digestion drug and linear relationship between log dose and probability unit

为 18.59%；六神曲脂肪酶的效价为 187.36~858.61 U/mg，平均值为 401.57 U/mg，RSD 为 53.11%；麦芽淀粉酶的效价为 6.18~19.35 U/mg，平均值为 12.48 U/mg，RSD 为 35.47%；谷芽淀粉酶的效价为 1.87~7.79 U/mg，平均值为 3.92 U/mg，RSD 为 52.69%。

4 种消食类中药的 10 个批次药材对应酶活性效价值大小差异最低 2 倍左右，最高可达 4 倍有余。

L3、M3 和 G3 样品，按供试品制备方法制得供试品溶液，结果见图 2。按对应条件反应并测得各组 A 值，计算酶活力反应率，考察各消食药的酶活性，表明反应率在一定质量浓度范围各具有明显的剂量相关关系。将反应率转换为概率单位 (Y) 后，对数剂量与概率单位呈直线关系，在对应剂量范围内，回归方程的 R^2 均大于 0.98。说明生物检定中的“质反应平行线测定法”适用于山楂、六神曲、麦芽和谷芽的此反应类型进行效价测定。

3.4.2 效价计算 阳性药的参比效价约定为 300 U/mg，根据供试品、阳性药在不同给药质量浓度及其相应反应率，使用生物效价质反应计算软件，得到各药各批次的对应酶活力效价，结果分别见表 3~6。

4 种消食类中药的 10 个不同批次药材对应酶活性效价活性均有差异，山楂蛋白酶的效价为 175.40~330.66 U/mg，平均值为 280.76 U/mg，RSD

3.5 体外黏度测定

将药粉加入营养糊中会增加其黏度，但仍可观察到消食类中药可有效降低营养糊的黏度。同一消食药作用于营养糊时，随着药物标准酶活力效价的升高，黏度依次下降。如表 7 所示，加入山楂粉末后，营养糊黏度有所增高，但随着山楂蛋白酶活力效价值的升高，营养糊黏度依次下降；六神曲粉未能更有效地降低营养糊黏度，随着六神曲脂肪酶

表 3 山楂不同批次蛋白酶活力效价 ($n = 3$)Table 3 Activity and titer of protease in different batches of *Crataegi Fructus* ($n = 3$)

样品	反应率/%				效价/ (U·mg ⁻¹)	FL/ %
	4	2.4	1.44	0.864		
	mg·mL ⁻¹	mg·mL ⁻¹	mg·mL ⁻¹	mg·mL ⁻¹		
S1	0.63	0.39	0.23	0.13	325.22	18.38
S2	0.37	0.22	0.12	0.07	175.40	21.50
S3	0.45	0.27	0.16	0.09	222.95	27.35
S4	0.72	0.43	0.22	0.12	330.66	9.01
S5	0.64	0.36	0.22	0.12	305.47	13.10
S6	0.70	0.39	0.23	0.13	328.22	10.68
S7	0.64	0.37	0.23	0.12	313.44	15.18
S8	0.52	0.28	0.18	0.10	250.50	18.60
S9	0.54	0.31	0.18	0.10	258.49	13.49
S10	0.63	0.35	0.21	0.12	297.27	12.71

表 4 六神曲不同批次脂肪酶活力效价 ($n = 3$)Table 4 Lipase activity titer of different batches of *Massa Medicata Fermentata* ($n = 3$)

样品	反应率/%				效价/ (U·mg ⁻¹)	FL/ %
	8	4.8	2.88	1.728		
	mg·mL ⁻¹	mg·mL ⁻¹	mg·mL ⁻¹	mg·mL ⁻¹		
L1	0.29	0.20	0.14	0.09	241.53	3.31
L2	0.29	0.20	0.13	0.08	238.18	3.18
L3	0.55	0.38	0.27	0.18	570.63	9.34
L4	0.34	0.21	0.15	0.10	276.05	3.65
L5	0.80	0.51	0.33	0.21	858.61	10.76
L6	0.52	0.33	0.22	0.15	480.33	6.29
L7	0.61	0.36	0.24	0.15	571.95	6.95
L8	0.37	0.24	0.16	0.09	307.26	3.90
L9	0.25	0.15	0.10	0.06	187.36	2.56
L10	0.33	0.23	0.15	0.10	283.79	3.79

活力效价值的升高, 营养糊黏度依次下降; 麦芽和谷芽于 60 °C 水浴作用于营养糊, 因水分挥发, 空白组水浴 2.0 h 的黏度高于 0.5 h 的黏度, 随着麦芽和谷芽淀粉酶活力效价值的升高, 营养糊黏度依次下降。营养糊主要成分为蛋白质、脂肪、淀粉等大分子物质, 表明消食类中药可能是通过酶催化促进蛋白质等生物大分子水解, 从而降低食物黏度, 减弱其在胃部的停留, 加快排空速率。初步表明营养糊黏度有可能成为一项在体外测定以佐证消食类中药的药物活性的一个评价参数。

4 讨论

实验过程中发现进行山楂的脂肪酶活力检测时

表 5 麦芽不同批次淀粉酶活力效价 ($n = 3$)Table 5 Amylase activity and titer of different batches of *Hordei Fructus Germinatus* ($n = 3$)

样品	反应率/%				效价/ (U·mg ⁻¹)	FL/ %
	0.6	0.36	0.216	0.1296		
	mg·mL ⁻¹	mg·mL ⁻¹	mg·mL ⁻¹	mg·mL ⁻¹		
M1	0.75	0.46	0.27	0.14	19.35	1.47
M2	0.48	0.26	0.15	0.06	9.98	2.42
M3	0.48	0.26	0.14	0.06	10.00	2.43
M4	0.75	0.43	0.24	0.11	17.51	1.63
M5	0.50	0.26	0.15	0.06	9.86	2.36
M6	0.72	0.40	0.23	0.10	16.52	1.54
M7	0.47	0.28	0.16	0.09	10.29	1.18
M8	0.43	0.25	0.15	0.07	9.10	1.08
M9	0.65	0.41	0.25	0.12	16.02	1.67
M10	0.31	0.20	0.11	0.06	6.18	1.89

表 6 谷芽不同批次淀粉酶活力效价 ($n = 3$)Table 6 Amylase activity and titer of different batches of *Oryzae Fructus Germinatus* ($n = 3$)

样品	反应率/%				效价/ (U·mg ⁻¹)	FL/ %
	4	2.4	1.44	0.864		
	mg·mL ⁻¹	mg·mL ⁻¹	mg·mL ⁻¹	mg·mL ⁻¹		
G1	0.80	0.58	0.39	0.25	7.07	7.66
G2	0.66	0.45	0.30	0.17	4.82	4.31
G3	0.45	0.28	0.15	0.10	4.09	3.54
G4	0.52	0.37	0.24	0.14	3.63	4.28
G5	0.42	0.29	0.18	0.10	2.56	1.93
G6	0.74	0.63	0.43	0.26	7.79	17.83
G7	0.38	0.22	0.10	0.03	1.87	2.77
G8	0.41	0.24	0.14	0.06	2.16	3.84
G9	0.51	0.29	0.18	0.07	2.75	4.86
G10	0.43	0.27	0.16	0.09	2.46	1.37

需要降低样品取样量, 避免其水提液的颜色对最终吸光度值的测量产生较大影响。淀粉酶活力测定时, 难以达到不同梯度浓度的酶液与底物反应后呈现出不同梯度的显色效果, 经对各项实验条件考察发现, 样品取样量需控制在较小值, 加入 DNS 试剂后在沸水中的加热时间和沸水高度对最终显色结果影响显著, 加热时间不宜过长且沸水高度保持在没过试管内液体为宜。实验操作中加入显色剂后应立即测定。使用营养糊进行体外验证黏度测定时, 需注意粉末的均匀性, 并将药粉与营养糊在水浴前进行充分搅拌均匀。

实验发现山楂的蛋白酶活力效价系数最高, 麦

表 7 各消食类中药不同酶活力效价降低营养糊黏度的结果
Table 7 Results of different enzyme activity titers of various TCM reducing viscosity of nutrient paste

消食药	批次	黏度/cP		消食药	批次	黏度/cP	
		0.5 h	2 h			0.5 h	2 h
山楂	空白	57.95	55.80	麦芽	空白	34.27	37.68
	S3	86.30	78.49		M1	17.21	12.00
	S4	74.72	59.78		M3	18.89	14.04
	S9	79.92	77.12		M6	18.28	12.83
	S10	72.43	65.90		M10	19.67	15.12
六神曲	空白	56.78	55.67	谷芽	空白	31.04	36.57
	L2	20.16	8.87		G2	24.04	16.06
	L3	10.02	5.26		G4	24.66	16.31
	L5	4.62	2.20		G6	22.63	14.22
	L8	19.81	7.85		G7	29.41	20.89

芽和谷芽的淀粉酶活力效价系数最高,与传统论述中山楂善消肉食积滞,麦芽谷芽善消淀粉食积的论述相符,且实验测得麦芽淀粉酶活力效价系数高于谷芽,与古言道谷芽消化淀粉的功能不及麦芽之述契合。但六神曲的脂肪酶活力效价系数最高,与神曲长于消化谷麦酒积的论述不完全相同,表明以传统论述为消食类中药质量生物检方法研究的酶种类的选择具有较好的指向价值,但不可作为唯一评价指标。目前,消食类中药的质量检测方法尚不完善,如鸡内金质量的控制指标主要是浸出物含量,麦芽谷芽的控制指标主要为出芽率,难以有效地评价其质量优劣,六神曲尚未被《中国药典》2020 年版所收载,地方标准也未见其有效的质量控制方法,难以保障药物的质量和临床疗效。本课题中所测得的各药标准酶活力效价有明显差异,可以作为良好的质量评价依据,并首次将消食药的传统认知论述结合消化酶生物检定方法,测定消食类中药生物效价,用以评控部分消食类中药的质量,构建能反映消食类中药消食化积的临床功效的质量标准研究,提出以酶活力效价为指标的消食类中药的质量标准研究方法,以期完善《中国药典》等标准中消食类中药的质量评价方法,为消食类中药质量控制研究提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 26.
- [2] 尹丽丽. 山楂的质量评价研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2019.

- [3] 王郡瑶, 程显隆, 李婷, 等. 发酵类中药质量控制现状和问题 [J]. 中国食品药品监管, 2022(2): 60-68.
- [4] 袁铭君, 张恬, 叶杨玉, 等. 中药鸡内金质量评价研究概述 [J]. 中国食品药品监管, 2022(2): 122-128.
- [5] 张慧茹, 张婷婷, 许桢, 等. 基于 NMR 指导的六神曲成分研究 [J]. 中草药, 2019, 50(16): 3764-3768.
- [6] 黄伟, 王伽伯, 谭鹏, 等. 基于消化酶活力检测的鸡内金质量生物检定方法研究 [J]. 药学报, 2021, 56(5): 1453-1459.
- [7] 董嘉琪, 陈金鹏, 龚苏晓, 等. 山楂的化学成分、药理作用及质量标志物(Q-Marker)预测 [J]. 中草药, 2021, 52(9): 2801-2818.
- [8] 何丹, 王乐, 杨成梓, 等. 神曲的考证 [J]. 中国现代中药, 2021, 23(8): 1456-1462.
- [9] 张廷模, 彭成. 中华临床中药学 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 41.
- [10] 田子钰, 刘素香, 陈常青. 中药治疗小儿功能性消化不良的研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(4): 803-807.
- [11] 雷林, 肖锐钰, 瞿领航, 等. 谷芽的本草考证 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(10): 197-204.
- [12] 王帅, 包永睿, 李天娇, 等. 中药质量评价关键问题与分析方法探讨 [J]. 分析测试学报, 2021, 40(1): 132-138.
- [13] 肖小河. 走向精准的中药质量评价与控制 [J]. 药学报, 2019, 54(12): 2139-2140.
- [14] 肖小河, 张定堃, 王伽伯, 等. 中药品质综合量化评控体系: 标准评控力金字塔 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(1): 7-12.
- [15] Dornelles L P, Deodato de Souza M F, da Silva P M, et al. Purification and characterization of a protease from the visceral mass of *Mytella charruana* and its evaluation to obtain antimicrobial peptides [J]. *Food Chem*, 2018, 245: 1169-1175.
- [16] 杨英, 柏松. 蛋白酶和淀粉酶活性检测分析及研究 [J]. 化学工程与装备, 2019(8): 268-269.
- [17] 李成龙, 董倩, 李乔惠, 等. 脂肪酶活力的测定方法及比较分析 [J]. 湖北农业科学, 2021, 60(S1): 323-328.
- [18] Nemati S S, Emadi S, Ghiasvand Mohammadkhani L, et al. Multivariate spectrofluorimetric detection of lipase isolated from *Serratia marcescens* in chromatographic fractions [J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2019, 222: 117137.
- [19] 夏潇潇, 陈群, 湛琴琴, 等. 膨化稻壳的结构表征及固定化 α -淀粉酶的研究 [J]. 合肥工业大学学报: 自然科学版, 2020, 43(11): 1556-1562.
- [20] 张定堃, 王伽伯, 杨明, 等. 中药品质整合评控实践: 附子品质综合指数 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(13): 2582-2588.

[责任编辑 郑礼胜]