

基于消化酶活力检测的鸡内金质量生物检定方法研究

黄伟¹, 王伽伯^{2,3}, 谭鹏⁴, 贺亚男¹, 林俊芝⁵, 黄浩洲¹, 韩丽¹, 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. 中国人民解放军总医院第五医学中心, 全军中医药研究所, 北京 100039; 3. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069; 4. 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; 5. 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: 鸡内金是消食化积类中药的代表, 疗效确切, 现代临床应用广泛。但目前鸡内金的药效物质研究基础较为薄弱, 2020版《中国药典》收载的鸡内金质量控制方法比较简单, 并不能够有效控制其质量。本研究提出基于胃蛋白酶活性的鸡内金生物效价测定方法, 作为其质量控制新的技术方法。以胃蛋白酶活力为评价指标, 优化鸡内金提取方法, 采用“质反应平行线法”建立基于胃蛋白酶活性的鸡内金生物效价测定法, 进行方法学考察, 测定20个批次鸡内金的生物效价与可信限度; 采用营养性半固体糊黏度测定方法验证不同效价鸡内金降低黏度的活性差异; 对比研究小鼠胃残留率与胃蛋白酶活力、醇溶性浸出物含量的相关性差异, 评价胃蛋白酶活力效价与体内活性的相关性。方法学考察结果显示, 鸡内金供试品的最优制备方法为: 取鸡内金粗粉, 加50倍量水, 300 W、40 kHz超声提取0.5 h; 其量效曲线形状与阳性对照药多酶片相似, 精密度、中间精密度及重复性考察结果均符合要求; 20批样品的效价范围为13.49~34.69 U·mg⁻¹, 平均值为22.21 U·mg⁻¹, RSD为31.52%。验证实验结果显示, 鸡内金样品效价越高, 降低营养糊黏度效果越显著; 小鼠胃残留率与胃蛋白酶活力效价、醇溶性浸出物含量的相关性系数 r 分别为0.867、0.518, 表明胃蛋白酶活力效价与体内活性高度相关。研究结果表明, 本文建立的基于胃蛋白酶活性的鸡内金生物效价测定方法可靠, 重复性良好, 能够直接反映鸡内金的质量优劣, 可为其他消食类中药的质量评控参考方法。

关键词: 鸡内金; 消食类中药; 胃蛋白酶; 生物效价; 质量评价

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)05-1453-07

Development of a novel and practical bioassay for the quality evaluation and control of *Galli Gigerii Endothelium Corneum* based on the detection of digestive enzyme activity

HUANG Wei¹, WANG Jia-bo^{2,3}, TAN Peng⁴, HE Ya-nan¹, LIN Jun-zhi⁵, HUANG Hao-zhou¹, HAN Li¹, XU Run-chun^{1*}, ZHANG Ding-kun^{1*}

(1. Pharmacy School, State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 2. China Military Institute of Chinese Medicine, the Fifth Medical Centre of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100039, China; 3. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 4. State Key Laboratory of Biological Evaluation of TCM Quality, National Administration of TCM, Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China; 5. TCM Regulating Metabolic Diseases Key Laboratory of Sichuan Province, Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China)

Abstract: *Galli Gigerii Endothelium Corneum* (GGEC) represents digestion-promoting medicines with

收稿日期: 2021-01-07; 修回日期: 2021-03-30.

基金项目: 成都市科技局技术创新研发项目 (2018-YFYF-00060-SN); 四川省科技厅青年杰出科技人才资助项目 (2019JDJQ0007); 解放军总医院杰青培育项目 (2019-JQPY-003); 解放军总医院医疗大数据项目 (2019MBD-023); 国家重点研发计划项目 (2018YFC1707002); 成都中医药大学中药学学科特色创新科研团队 (CXTD2018006).

*通讯作者 E-mail: wxsrch@qq.com; zhangdingkun@cdutcm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0039

measurable effects and extensive clinical application. However, its effective components are not clear. The quality control index in the current edition of Chinese Pharmacopoeia is rather elementary and does not reflect its clinical efficacy. In this study, a bioassay method based on pepsin activity was proposed as a novel quality control method. With pepsin activity as the evaluation index, the extraction of GGEC was optimized and a method for the determination of biological potency was established by using the qualitative reaction parallel line method. The biological potency and consistency of 20 batches of GGEC were investigated. To provide scientific evidence in support of this bioassay method, two validation experiments were designed. One was to study the viscosity-reducing activity of a nutritional semi-solid paste after adding GGEC samples with differing potency. The other was to correlate the gastric residual rate in mice and pepsin activity with the alcohol soluble extract content. The results showed that the optimal preparation method was to dilute crude powder of GGEC with 50 volumes of water and subject to ultrasonic extraction at 300 W and 40 kHz for 0.5 h. The shape of the dose-response curve was similar to that of the positive control drug multienzyme tablets and the precision, intermediate precision and repeatability met the methodology requirements. The results showed that the potency of 20 batches of samples ranged from 13.49 to 34.69 U·mg⁻¹, with an average value of 22.21 U·mg⁻¹. The validation experiment demonstrated that the effect of reducing the viscosity of the nutrient paste became more significant as GGEC sample potency increased. The correlation coefficient *R* of gastric residual rate with pepsin potency and alcohol soluble extract content was 0.867 and 0.518, respectively, which indicated that the pepsin potency was highly correlated with *in vivo* activity. This study shows that a bioassay method based on pepsin activity is reliable and reproducible for GGEC and could provide reference method for the quality evaluation of other digestant herbs.

Key words: Galli Gigerii Endothelium Corneum; digestant herb; pepsin; potency; quality evaluation

鸡内金 (Galli Gigerii Endothelium Corneum, GGEC) 是中医临床治疗食积不消、呕吐泻痢和小儿疳积的常用药物, 疗效确切, 是消食类中成药的基础药味与高频药味, 具有广阔的药食开发前景^[1]。关于鸡内金的消食化积功效, 古今本草均有详细记载。《滇南本草》首载其“宽中健脾、消食磨胃”功效, 治疗“小儿乳食结滞”引起之“脾积疳积”; 《本草纲目》言其“治小儿食积”; 当代《中华临床中药学》认为鸡内金健脾消食作用较强, 大凡积滞, 不论肉积、乳积、谷积及其他积滞皆宜^[2]。

现代研究表明, 鸡内金的主要成分包括蛋白质(类角蛋白、酶)、多糖、氨基酸、微量元素等^[1], 鸡内金可改善胃肠道动力不足, 恢复生理性胃肠蠕动, 增加胃肠道消化动力, 增强食欲^[3,4]。然而, 目前以鸡内金化学成分为基础构建相应的化学质控方法缺少, 也很难找到能直接反映其消食化积的质控指标。例如, 《中国药典》2020年版(一部) 鸡内金项下仅包含水分、总灰分检查、醇溶性浸出物测定^[5], 但这些指标仅限于常规的理化检测, 与其关键生物活性相关性不高, 对其质量评控力不强, 难以准确反映其临床功效。因此, 建立反映其消食化积功效的生物评价方法具有重要意义^[6,7]。

生物活性测定法是以药物的生物效应为基础, 以生物统计为工具, 运用特定的实验设计, 测定药物有效性的一种方法^[8,9]。研究^[10]表明, 鸡内金中含有胃蛋白酶和淀粉酶, 课题组推测鸡内金与多酶片在药理作用方面具有相似性^[11-13], 可借鉴消化酶活力检测方法控

制鸡内金质量^[14,15]。《中国药典》2020版消化酶活力检测方法均采用底物消化力测定法, 以单位时间内单位体积中产物的增加量作为衡量酶活力强弱的指标, 方法专属性强, 灵敏度高。但测定时, 一是样品在研磨均匀的过程中, 研磨力度和方式等人为因素会影响测定结果^[16]。二是样品被研磨成细粉进行实验, 此时多种酶均匀混合在一起, 在化验过程中会产生相互干扰^[16]。本研究尝试建立基于消化酶活力检测的鸡内金生物效价测定法, 优选适宜的供试品制备方法, 进行系统的方法学考察, 并通过体内外实验进行验证, 以期提升《中国药典》鸡内金质量控制方法, 保障其临床疗效, 为其他消食类中药的质量评控方法提供借鉴。

材料与方法

药材与试剂 鸡内金药材共20批, 分别采自云南(S1)、陕西(S2)、山东(S3)、江苏(S4)、湖南(S5)、湖北(S6)、河北(S7)、广西(S8)、广东(S9)、北京(S10)、安徽(S11)各1批, 河南(S12、S13)2批, 四川(S14~S20)共7批, 经成都中医药大学药学院许润春副教授鉴定均为稚科动物家鸡 (*Gallus gallus domesticus* Brisson) 的干燥砂囊内壁。

阳性对照药: 多酶片(批号: 181206, 四川依科制药有限公司), 先用 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液浸泡 5 min 去掉糖衣, 再置于另一 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液浸泡 5 min, 最后置于超纯水中漂洗, 用滤纸吸干表面水分, 40 °C

烘干, 粉碎过3号筛备用。

三氯乙酸(批号: 2019121001, 成都市科隆化学品有限公司)、福林酚(REF: LA15B3, 飞净生物科技有限公司)、无水碳酸钠(批号: 20121222, 成都市科龙化工试剂厂)、酪蛋白(批号: LC7288, 合肥博美生物科技有限责任公司)、可溶性淀粉(批号: 20100531, 成都市科龙化工试剂厂)、羧甲基纤维素钠(批号: 2016032201, 成都市科龙化工试剂厂)、奶粉(20200602, 双城雀巢有限公司)、葡萄糖(批号: 20190301, 成都市科龙化工试剂厂)。

动物和仪器 KM小鼠, 雌雄各半, SPF级, 体重 20 ± 2 g, 购于成都达硕实验动物有限公司, 动物许可证号: SYXK(川)2014-124。饲养条件: 温度为 20 ± 0.5 °C, 湿度 $55\% \pm 5\%$ 。动物实验规程经成都中医药大学附属医院医学伦理委员会批准(批准号: 2019BL-016)。SpectraMax iD3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)、KQ-500DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)、L-550台式低速大容量离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司)、LVDV-1T型数字旋转黏度计(上海方瑞仪器有限公司)。

检测原理 胃蛋白酶活性检测方法采用Folin法^[17]。以酪蛋白底物, 在一定条件下, 同酶液反应, 经一段时间后终止酶促反应, 经离心除去沉淀物取上清液, 用碳酸钠溶液碱化, 再加入福林酚试剂显色, 蓝色的深浅与滤液中生成产物酪氨酸成正比, 酪氨酸含量用酶标仪在660 nm紫外吸收波长处测定, 从而计算胃蛋白酶的活力。

反应条件和参数设定 在10 mL EP管中加入0.5%酪蛋白溶液2 mL和酶液5 mL, 40 °C水浴30 min后立即加入 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氯乙酸溶液2 mL终止反应, 混匀后静置5 min, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min后取上清液在96孔板中加入上清液110 μL 、 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸钠溶液150 μL 和 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 福林酚试剂40 μL , 振荡混匀在40 °C下孵育20 min, 测定吸光度值。空白组即将酶液替换为等量的超纯水。

供试品制备方法的考察

最佳溶剂筛选 精密称取鸡内金粉末(过3号筛)1 g, 加入50倍量水、40%乙醇、70%乙醇, 超声温度60 °C, 300 W、40 kHz超声提取0.5 h, 置4 °C冰箱中静置过夜, 使用时恢复至常温, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min, 取上清液即得样品溶液。以胃蛋白酶活力效价为评价指标, 筛选最佳溶剂。

提取方法、温度和料液比的影响 精密称取鸡内金粉末(过3号筛)1 g, 加入50倍量水, 分别采用热浸

渍法(40 °C、60 °C水浴)、常温浸渍法、超声提取法(60 °C、300 W 40 kHz超声0.5 h)提取, 按1:50、1:70和1:100的料液比进行制备, 置4 °C冰箱中静置过夜, 使用时恢复至常温, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min, 取上清液即得样品溶液。以胃蛋白酶活力效价为评价指标, 筛选最佳提取方法及温度。

提取时间的考察 精密称取鸡内金粉末(过3号筛)1 g, 加入50倍量水, 超声温度60 °C, 300 W、40 kHz分别超声提取15、30、45和60 min。置4 °C冰箱中静置过夜, 使用时恢复至常温, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min, 取上清液即得样品溶液。以胃蛋白酶活力效价为评价指标, 筛选最佳提取时间。

供试品溶液的制备 取鸡内金药材粉末(过3号筛)1 g加超纯水50 mL, 300 W、40 kHz超声处理30 min, 放冷, 4 °C静置过夜, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min, 取上清液按1:0.6倍剂距等比稀释成一定浓度的供试品溶液。另取阳性对照药0.08 g加超纯水50 mL按上法制成 $1.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的阳性对照药溶液, 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。

胃蛋白酶活力反应率 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OD值转化为(0, 1)之间的小数, 见公式1。

$$\text{反应率} = \frac{(\text{样品溶液OD值} - \text{空白溶液OD值}) \times 9 \text{ mL} \times 50 \text{ mL}}{0.11 \text{ mL} \times 5 \text{ mL} \times 400} \times 100\% \quad (1)$$

方法学考察

精密度 取同一批次相同质量浓度的鸡内金供试品溶液, 连续重复测定6次, 计算平均效价和RSD, 考察方法的精密度。

中间精密度 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, 考察实验的中间精密度。

重复性 取同一批次的鸡内金样品1.00 g, 精密称定6份, 分别制成供试品溶液, 计算平均效价和RSD, 考察方法的重复性。

可靠性检验 根据可靠性检验结果成立的判别要求, 对定量测定鸡内金提取物消化酶活力的结果进行可靠性检验。

鸡内金胃蛋白酶活力效价的测定 取20个不同批次的鸡内金药材, 按供试品制备方法和上述反应条件进行测定, 得到样品溶液和空白溶液OD值, 计算反应率, 参照《药品生物检定》简化概率单位法的原理计算相对效价^[18], 将供试品和阳性对照药测试质量浓度和相应的反应率输入生物效价质反应计算软件, 计算不同批

次鸡内金样品的生物效价。本实验过程中,约定胃蛋白酶活力效价测定所用阳性药的效价为 $300 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。

营养性半固体糊黏度测定的基本原理 营养性半固体糊黏性较强,主要成分为蛋白质和淀粉等大分子物质,加入含胃蛋白酶和淀粉酶的酶液,在适宜条件下,酶促进蛋白质和淀粉等大分子水解,使其黏性下降;且在一定范围内,酶活性越强,单位时间内黏性下降越多。

营养性半固体糊的配制:取羧甲基纤维素钠 5 g 于 300 mL 超纯水中,于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱静置过夜,依次加入 16 g 奶粉、 8 g 葡萄糖、 8 g 可溶性淀粉,搅拌均匀, $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 50 min 后搅拌均匀。

取S2、S4、S5和S17批次共4个批次鸡内金药材,按供试品制备方法配制供试品溶液,取 40 g 营养性半固体糊加入供试品溶液 10 mL ,搅拌均匀,空白组加入超纯水 10 mL , $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 0.5 、 2 h ,分别测定黏度,每次测定平行重复3次。

胃残留率和小肠推进率测定

鸡内金混悬液的配制 根据所采集的20个批次鸡内金胃蛋白酶活力效价测定结果,选取其中效价值有显著差异的5个批次,以 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液为溶剂制成 $0.1 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 鸡内金混悬液,超声处理 30 min ,放冷,摇匀, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 静置过夜。

营养性半固体糊标记物的配制 取羧甲基纤维素钠 10 g 于 300 mL 超纯水中,于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱静置过夜,依次加入 16 g 奶粉、 8 g 葡萄糖、 8 g 可溶性淀粉和 3 g 活性炭粉末,搅拌均匀, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 存放,使用时恢复至常温。

胃残留率和小肠推进率 实验取小鼠(SPF级),雌雄各半,实验前禁食不禁水 20 h ,按性别、体重随机分为5个给药组,每组10只,雌雄各半。各组给药按 $30 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给予小鼠相应的鸡内金混悬液。 60 min 后,每只小鼠灌胃 0.6 mL 营养性半固体糊。 30 min 后,脱颈椎处死小鼠。处死小鼠后立即解剖腹腔,结扎小鼠胃贲门和幽门,取胃用滤纸拭干后称重。然后沿胃大弯剪开胃体,洗出胃内容物后称净重,计算胃残留率(%)。取全胃后,同时自胃幽门剪至回盲部,用镊子不加牵引地取出小肠段,铺直于表面湿润的纸板上,测量幽门至营养糊最前端的距离和幽门至回盲部全长,计算小肠推进率(%)。

醇溶性浸出物含量测定 参照《中国药典》2020版醇溶性浸出物测定法(通则2201)项下的热浸法测定。

统计方法及分析 采用SPSS 20.0软件对数据进行处理,计量资料以均值 \pm 标准差表示,两两比较采用 t 检验,多组比较采用方差分析。胃蛋白酶活力效价与胃残留率、醇溶性浸出物含量的相关性分析采用Pearson相关分析法。

结果

1 供试品制备方法考察

由表1可看出,鸡内金水提物的胃蛋白酶活力效价显著高于其醇提物,因而采用水作溶剂。以水为溶剂采用浸渍法,随温度的升高,胃蛋白酶活力亦显著升高; $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 、不同料液比条件下,超声提取法制取的提取物的酶活力效价均略高于热浸渍法,且方法简便易行,因而选用超声提取法、 $1:50$ 料液比进一步优选提取时间。由表2可看出,超声提取 30 min 的酶活力效价显著高于 15 min ,但 30 、 45 和 60 min 的酶活力效价没有显著差异,超声 30 min 效价略高,最终确定鸡内金供试品最优制备方法为:取鸡内金粗粉,加 50 倍量水, $60 \text{ }^\circ\text{C}$, 300 W 、 40 kHz 超声提取 0.5 h 。

Table 2 Optimization of extraction time for biological evaluation of GGEC ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$). $n = 3$

Time	15 min	30 min	45 min	60 min
Ultrasonic extraction ($60 \text{ }^\circ\text{C}$)	26.13	31.57	28.13	29.88

2 鸡内金生物效价测定方法学考察

2.1 精密度 结果表明,6次测定的胃蛋白酶活力效价分别为 15.17 、 15.37 、 15.48 、 14.93 、 15.58 、 $15.52 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$,平均效价为 $15.34 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$,RSD为 1.62% ,表明仪器的精密度良好。

2.2 中间精密度 中间精密度结果表明,6次测定的胃蛋白酶活力效价分别为 15.09 、 16.12 、 14.84 、 14.28 、 15.23 、 $15.47 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$,胃蛋白酶活力平均效价为 $15.17 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$,RSD 4.07% ,说明不同实验人员对测定结果影响较小。

2.3 重复性 6份供试品溶液的胃蛋白酶活力效价分别为 13.40 、 14.15 、 15.78 、 14.80 、 16.12 和 $14.94 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$,平均效价为 $14.87 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$,RSD为 6.77% ,表明该方法重复性较好。

Table 1 Optimization of extraction method for biological evaluation of Galli Gigerii Endothelium Corneum (GGEC, $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$). $n = 3$

Ratio	Water	40% Ethanol	70% Ethanol	Cold soaking ($25 \text{ }^\circ\text{C}$)	Hot dipping ($40 \text{ }^\circ\text{C}$)	Hot dipping ($60 \text{ }^\circ\text{C}$)	Ultrasonic extraction ($60 \text{ }^\circ\text{C}$)
1:50	31.56	17.83	16.16	16.56	19.67	28.15	30.15
1:70	—	—	—	13.27	15.20	21.69	25.69
1:100	—	—	—	11.45	13.05	18.04	20.01

2.4 可靠性检验 结果表明, 回归项差异显著 ($P < 0.01$), 说明随着质量浓度的增加, 胃蛋白酶活力反应率呈规律性增加。偏离平行不显著 ($P > 0.05$), 表明阳性药和供试品的剂量曲线呈平行直线关系。本方法可靠性检验的结果成立, 可用于定量测定鸡内金提取物胃蛋白酶活力。

3 胃蛋白酶活力效价的标化

3.1 胃蛋白酶活性检测和量效关系考察 选取 S17 鸡内金样品, 按供试品制备方法制备得供试品溶液, 按上述条件反应并测定各组的紫外吸光度值, 计算胃蛋白酶活力反应率, 考察鸡内金的胃蛋白酶活性, 表明反应率在 $2.59 \sim 20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 具有明显的剂量依赖关系, 见图 1A。将反应率转换成概率单位 (Y) 后, 对数剂量与概率单位呈直线关系, 在 $2.592 \sim 20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量内, 回归方程 $Y = 0.958 + 2.140 X$ ($R^2 = 0.999$)。说明此反应类型适合用生物检定中“质反应平行线测定法”进行效价测定, 见图 1B。

3.2 效价计算 根据供试品、阳性药 (多酶片) 的不同给药浓度和相应的反应率, 约定阳性药的参比效价值为 $300 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 使用生物效价质反应计算软件, 得到 S17 批次的鸡内金的胃蛋白酶活力效价为 $29.75 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 见表 3。

Table 3 The pepsin potency in GGEC and control drug multi-enzyme tablets. $n = 3, \bar{x} \pm s$

No.	Sample (S17)		Multi-enzyme tablets	
	Dose / $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	Response rate /%	Dose / $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	Response rate /%
1	20.00	0.86 ± 0.015	1.60	0.89 ± 0.025
2	12.00	0.61 ± 0.019	0.96	0.51 ± 0.003
3	7.20	0.42 ± 0.007	0.58	0.26 ± 0.007
4	4.32	0.28 ± 0.007	0.35	0.16 ± 0.001

课题组预先对酶的种类进行了筛选, 结果表明, 鸡内金中无显著脂肪酶活性, 淀粉酶和胃蛋白酶活性显著, 继而构建了基于胃蛋白酶、淀粉酶活性检测的鸡内金质量生物效价测定法, 用以检测 20 批次鸡内金酶活性差异。结果显示, 20 个不同批次鸡内金胃蛋白酶、淀粉酶

活性效价均有差异, 但淀粉酶活性效价方法重复性较差, 需要进一步优化。按照上述条件测定 20 个批次鸡内金药材的相对效价, 结果见表 4。不同批次鸡内金药材胃蛋白酶活力效价范围为 $13.49 \sim 34.69 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 高低相差近 3 倍。其胃蛋白酶活力效价平均值为 $22.21 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, RSD 为 31.52%。

Table 4 The pepsin potency in different batches of GGEC. $n = 3$

Sample	Response rate/%				Potency / $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	FL/%
	20 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	12 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	7.2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	4.32 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$		
S1	0.82	0.64	0.56	0.33	34.27	27.11
S2	0.84	0.69	0.50	0.35	34.69	25.92
S3	0.46	0.30	0.20	0.13	13.91	10.36
S4	0.58	0.44	0.31	0.21	19.46	14.34
S5	0.55	0.33	0.20	0.12	15.52	10.10
S6	0.77	0.50	0.28	0.18	22.52	12.68
S7	0.42	0.31	0.21	0.16	13.49	11.24
S8	0.51	0.37	0.24	0.16	16.02	11.78
S9	0.76	0.59	0.42	0.30	28.28	20.57
S10	0.56	0.33	0.21	0.11	15.82	10.06
S11	0.82	0.60	0.43	0.30	29.73	20.15
S12	0.61	0.39	0.28	0.19	18.76	12.97
S13	0.57	0.36	0.23	0.14	16.56	10.97
S14	0.72	0.40	0.30	0.19	20.85	12.98
S15	0.51	0.31	0.20	0.14	14.76	10.36
S16	0.72	0.48	0.34	0.23	25.15	15.41
S17	0.86	0.61	0.42	0.28	29.75	18.48
S18	0.82	0.64	0.46	0.32	31.75	22.40
S19	0.73	0.48	0.31	0.18	22.14	13.32
S20	0.69	0.45	0.26	0.19	20.73	12.88

4 体外黏度测定

如图 2 所示, 鸡内金水提液能显著降低营养性半固体糊的黏度, 且随着鸡内金胃蛋白酶活力效价值的升高, 黏度依次显著下降。营养性半固体糊主要成分为蛋白质和淀粉, 提示鸡内金可能是通过其中的消化酶促进蛋白质和淀粉等生物大分子水解, 降低其黏度, 从而减少食物在胃中的停留时间, 加快胃排空速率, 表明营养性半固体糊黏度测定可以有效反映鸡内金的消食活性。

5 胃残留率测定

如图 3 所示, 随着鸡内金胃蛋白酶活力效价值的

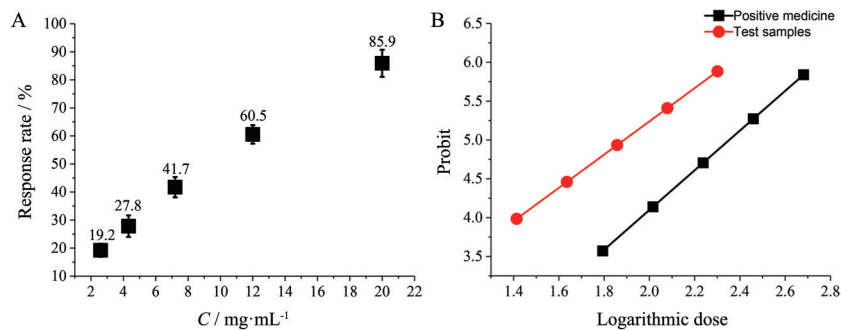


Figure 1 Pepsin activity of GGEC (A) and linear relationship between logarithmic dose and probabilistic unit (B)

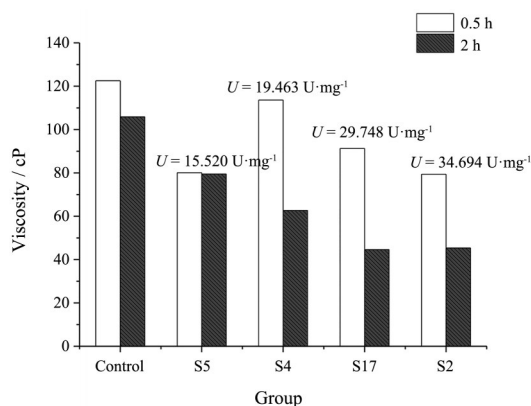


Figure 2 Results of different pepsin potency reduced nutritional paste viscosity of GGEC

升高,小鼠胃残留率呈现逐渐降低趋势,且效价值最高的S2组的胃残留率显著低于效价值最低的S5和S8组,S4和S6组胃残留率显著低于S8组;随着效价指标的升高,小鼠体内胃排空速率也显著增加,表明效价指标与小鼠体内胃排空速率高度相关,可反映鸡内金消食化积的临床功效。

6 醇溶性浸出物测定

表5表明,不同批次鸡内金药材浸出物含量(%)存在差异。浸出物含量中间值为6.72%~13.21%,平均值为9.49%,RSD为18.25%。其中S2、S17浸出物含量较高,它们效价值也较高,分别为34.69 U·mg⁻¹ (FL% = 25.92)、29.75 U·mg⁻¹ (FL% = 18.48),S19、S20批次浸出物含量低于7.5%,常规鉴定判为不合格,但其效价值并非最低,分别为22.14 U·mg⁻¹ (FL% = 13.32)、20.73 U·mg⁻¹ (FL% = 12.88),说明醇溶性浸出物测定结果与胃蛋白酶活力测定结果并不完全一致。

7 相关性分析

为了判断不同方法评价鸡内金健胃消食临床功效的有效性,分析胃蛋白酶活力效价、醇溶性浸出物含量和胃残留率的相关性。从相关性系数*r*(图4)可以看出,效价指标与小鼠胃残留率显著相关,相关性系数达

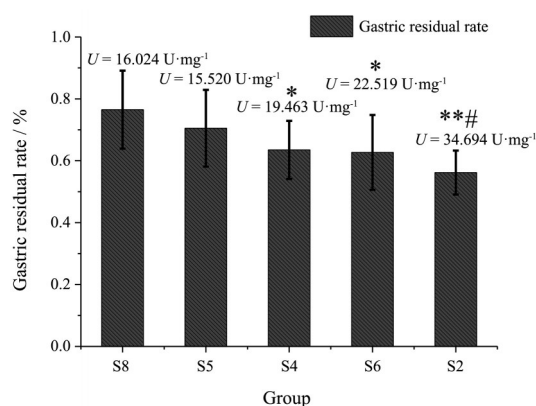


Figure 3 Effect of GGEC with different pepsin activity titer on promoting gastric emptying in mice. $n = 6, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs S8; # $P < 0.05$ vs S5

Table 5 The content of ethanol-soluble extract in different batches of GGEC. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Sample	Extract content/%	Sample	Extract content/%
S1	10.09 ± 0.70	S11	9.47 ± 0.92
S2	13.21 ± 0.73	S12	8.73 ± 0.25
S3	7.99 ± 0.86	S13	8.22 ± 0.72
S4	10.39 ± 0.55	S14	7.63 ± 0.42
S5	11.44 ± 0.24	S15	7.59 ± 0.39
S6	9.17 ± 1.9	S16	11.59 ± 0.42
S7	8.06 ± 0.48	S17	11.05 ± 0.70
S8	9.70 ± 0.75	S18	10.56 ± 0.46
S9	9.84 ± 0.70	S19	7.11 ± 0.11
S10	11.23 ± 0.11	S20	6.72 ± 0.10

到0.867,而浸出物含量与小鼠胃残留率的相关性系数为0.518,表明胃蛋白酶活力效价与体内活性高度相关。本研究建立的胃蛋白酶活力效价指标相较于醇溶性浸出物含量可以更有效地评价鸡内金品质,反映其健胃消食功效强弱。

讨论

鸡内金临床消食疗效显著,不同产地的鸡内金胃蛋白酶活力效价差异显著,且相同产地不同批次间样

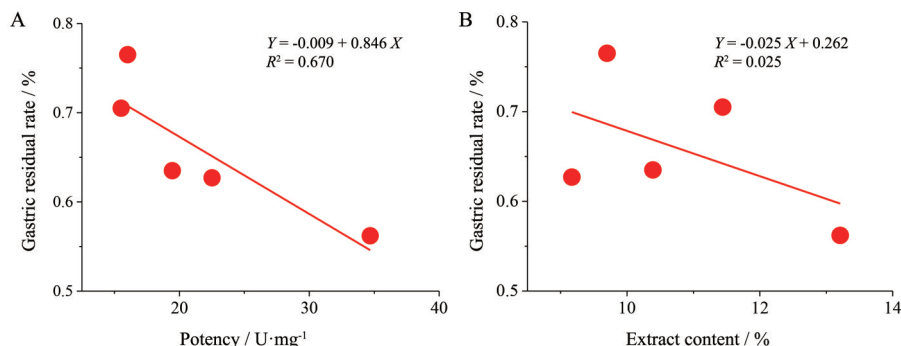


Figure 4 Correlation analysis between gastric residual rate and pepsin activity titer in mice (A) and correlation between gastric residual rate and content of alcohol soluble extract in mice (B)

品效价值差异也较大。原因可能有以下方面,一是由于现代社会生产方式发生重大变革,导致鸡内金的药物来源发生重大变化,饲养鸡(饲养周期2~3个月)鸡内金亦成为其药物来源,而传统家养鸡饲养周期为2~3年甚至更长,二者厚度、脆碎度等性状指标有明显差异,家鸡和饲养鸡鸡内金的胃蛋白酶活力效价可能存在显著差异,本文所收集的20个批次样品中可能存在部分饲养鸡鸡内金。二是鸡内金各省皆产,各地取材方式不一,有将鸡砂囊置于沸水中涮洗后再剥离其内壁,沸水温度过高会导致酶活力下降。三是从各药材市场收集到不同产地及批次的鸡内金,而各地贮存条件不一,对温度和湿度未进行严格控制,叶久之等^[14]发现当温度超过40℃、相对湿度大于75%时,多酶片原料中各酶活力均会下降,贮存条件不当亦可能导致鸡内金中酶活力下降。目前,《中国药典》2020年版收载的鸡内金质量控制指标主要是浸出物含量,难以真正有效地评控不同来源鸡内金的质量差异性,亦难以反映其临床疗效。本课题首次建立基于消化酶活力检测的生物效价测定法用于评价与控制鸡内金质量,通过系统的方法学评价和体内外实验验证,构建了能反映鸡内金消化化积临床功效的质量评价方法,以期完善和提升《中国药典》鸡内金质量控制方法,并为神曲、红曲、麦芽、谷芽等消食类中药质量生物控制研究提供方法参考。

作者贡献: 黄伟、谭鹏和张定堃设计实验;黄伟、贺亚男、林俊芝和黄浩洲进行实验数据采集;张定堃、韩丽和许润春进行药材收集;黄伟、王伽伯、许润春和张定堃撰写、修改论文。

利益冲突: 无利益冲突。

References

- [1] Wang H, Jin P, Liang XH, et al. Studies on chemical constituents and pharmacological effects of Endothelium Corneum Gigeriage Galli [J]. Jilin J Chin Med (吉林中医药), 2018, 38: 1071-1073.
- [2] Lei ZQ, Zhang TM. Chinese Clinical Pharmacy (中华临床中药学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1998: 1014.
- [3] Wang Y, Zhong DD, Ji XH, et al. Multi-center randomized double-blind controlled study on children's anorexia (spleen-stomach disharmony) treated with child compound endothelium corneum [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2020. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20201125.501.
- [4] Shen M, Huang XQ, Ruan MJ, et al. Galli Gigerii Endothelium Corneum can improve gastrointestinal function in rats with functional dyspepsia [J]. Fujian J Tradit Chin Med (福建中医药), 2019, 50: 35-37.
- [5] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 193.
- [6] Xiao XH. Towards accurate quality evaluation and control of traditional Chinese medicine [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2019, 54: 2139-2140.
- [7] Wang X, Gan QC, Shi JY, et al. Measurement of antiplatelet aggregation and potency of hirudo [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2019, 54: 2178-2183.
- [8] Wang S, Bao YR, Li TJ, et al. Discussion on key problems for quality evaluation of traditional Chinese medicines and their analysis methods [J]. J Instrum Anal (分析测试学报), 2021, 40: 132-138.
- [9] Yan D, Xiao XH. Investigation on pattern and methods of quality control for Chinese materia medica based on Dao-di herbs and bioassay bioassay for *Coptis chinensis* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2011, 46: 568-572.
- [10] Cai ZZ, Cheng ZX, Lin LH, et al. Determination of chemical composition in different processed Galli products of white feather chicken and domestic chicken [J]. Strait Pharm J (海峡药学), 2015, 27: 50-52.
- [11] Petersen KU. Pepsin and its importance for functional dyspepsia: relic, regulator or remedy? [J]. Dig Dis, 2018, 36: 98-105.
- [12] Uchida M, Kobayashi O, Iwamoto C, et al. Effects of *L*-tryptophan on gastric emptying evaluated by breath test in relation to gastric accommodation evaluated by Barostat in rats [J]. J Pharm Sci, 2015, 127: 229-231.
- [13] Freitas D, Le Feunteun S, Panouillé M, et al. The important role of salivary α -amylase in the gastric digestion of wheat bread starch [J]. Food Funct, 2018, 9: 200-208.
- [14] Ye JZ, Zhong RJ, Zhu BJ, et al. Determination of enzymic activities of multienzyme tablets [J]. Chin J Pharm (中国医药工业杂志), 2000, 31: 26-27.
- [15] Yan D, Xiao XH. Investigation on pattern of quality control for Chinese materia medica based on famous-region drug and bioassay - the work reference [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2011, 36: 1249-1252.
- [16] Jiao XW, Liang EY, Jiang YH, et al. Study on the specific activity and purity determination of pepsin tablets [J]. Pharm Biotechnol (药物生物技术), 2020, 27: 527-531.
- [17] Yang Y, Bai S. Analysis and study on the activity of protease and amylase [J]. Chem Eng Equip (化学工程与装备), 2019, 110: 268-269.
- [18] Zhou HJ. Drug Biological Analysis (药品生物检定) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005: 127-134.