

2 种胃膜素制备方法比较

杨先炯 (贵州医科大学化学教研室, 贵州贵阳 550004)

摘要 [目的]比较分析制备胃膜素的2种方法,优化制备方法,为工业化规模生产提供试验依据。[方法]以猪胃黏膜为材料,采用单产工艺和联产工艺提取胃膜素,比较分析2种制备方法所得胃膜素的性状、得率、总氮含量和还原性物质含量的差异。[结果]2种方法提取的胃膜素在黏度、酸度、干燥失重和炽灼残渣等方面差异不大,总氮含量和还原性物质含量也无明显差异,均符合国家标准。单产工艺胃膜素得率较高,平均达3.5%,联产工艺得率偏低,仅有1.7%,但联产工艺可以得到副产品胃蛋白酶。[结论]单产工艺的得率高于联产工艺,联产工艺可以同时得到副产品。

关键词 胃膜素;制备方法;单产工艺;联产工艺

中图分类号 Q513 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)27-0142-02

Comparative Study of Two Methods for Gastric Mucin Preparation

YANG Xian-jiong (Department of Chemistry, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004)

Abstract [Objective] To compare the two methods for gastric mucin preparation, to optimize preparation method, and to provide references in gastric mucin industrialization-scale production. [Method] With porcine gastric as the research materials, gastric mucin was extracted by single production method and joint production method. Differences in the gastric mucin characters and yield, total nitrogen content and reducing matter content were compared by the two methods. [Result] There were no significant differences in the viscosity, acidity, drying loss and residue on ignition between the two methods. However, there were no significant differences in total nitrogen content and reducing substance content, which all met the national standard. The yield of gastric mucin by single production method was higher than that of joint production method, which were 3.5% and 1.7%, respectively. However, the two production methods could get by-products of pepsin. [Conclusion] The yield rate of single production method is higher than that of joint production method, while joint production method achieves by-products simultaneously.

Key words Gastric mucin; Preparation method; Single production method; Joint production method

黏蛋白是一类主要由黏多糖组成的高分子量糖蛋白,属于成分、结构均比较复杂的结合蛋白质,主要分布于消化道、呼吸道、泌尿生殖道等机体管腔内表面,特别是胃肠道中。胃肠道中的黏蛋白种类很多,从胃黏液中分离出来的黏蛋白相对分子质量高达 2×10^6 D。研究证实,黏蛋白对上皮细胞起重要的保护和润滑作用,黏蛋白还能参与上皮细胞的分化、更新,调节细胞黏附、参与细胞信号转导,甚至与肿瘤的发生发展及演进、愈后的关系密切,在各种生理、病理过程中均发挥重要作用^[1]。因此,黏蛋白的研究及应用越来越受到人们的重视。

胃膜素又称胃黏膜素,是从猪胃黏膜中提取的一种以黏蛋白为主要成分的生化药物,有抗胃蛋白酶分解和弱抗酸作用,能在胃内形成保护膜,覆盖溃疡面,减少胃酸的刺激,有利于溃疡面的愈合,在胃炎、胃溃疡、十二指肠溃疡等多种胃肠道疾病的治疗方面有显著的疗效^[2]。目前,常用的胃膜素制备方法有2种:一种是乙醇沉淀法即单产工艺,得到的产品只有胃膜素;另一种是丙酮分级沉淀法即联产工艺,除得到胃膜素外,可同时获得附属产品胃蛋白酶。该研究利用生物化学试验技术,以猪胃黏膜为材料,分别采用单产工艺和联产工艺提取胃膜素,计算2种方法提取胃膜素的得率,然后对胃膜素的总氮含量和还原性物质含量进行检测,对2种制备方法所得胃膜素进行比较分析,为胃膜素的工业化规模生产工艺优化提供试验依据。

1 材料与方

1.1 材料 新鲜猪胃,重庆靖康生物技术有限公司。盐酸、

乙醇、丙酮、氯仿等常规无机化学试剂,重庆川东化工(集团)有限公司。电热干燥箱,上海一恒科学仪器有限公司;电热恒温水浴锅,上海浦东荣丰科学仪器有限公司;电子天平,梅特勒—托利多仪器(上海)有限公司;组织捣碎机,金坛市医疗器械厂;全自动血液流变快测仪,重庆维多生物科技有限公司;KDN-04CII定氮仪,上海精隆科学仪器有限公司;其他常规玻璃器皿及耗材,购于重庆化玻公司。

1.2 方法

1.2.1 材料处理。取新鲜猪胃,洗净、剥离胃黏膜,用组织捣碎机将其捣碎。

1.2.2 单产工艺流程(乙醇沉淀法)。取捣碎的胃黏膜浆50 g于烧杯中,用2 mol/L盐酸调pH至3.0~3.5,加入少量氯仿。用保鲜膜密封烧杯口,于45℃水浴中消化4 h,双层纱布过滤,除去未消化杂质。用氢氧化钠溶液调节消化液pH至4.0~5.0,在搅拌下加入无水乙醇,使其含量为70%,放入4℃冰箱中静置12 h。取出、过滤,收集沉淀并尽量压干,按所得沉淀重量的2倍加入70%乙醇,充分混匀、洗涤2次,压干沉淀,在70℃干燥箱中烘干,得到胃膜素粗品。再用乙醚脱脂,于50℃干燥箱中烘干,研碎,即得胃膜素成品。其简要流程如图1。

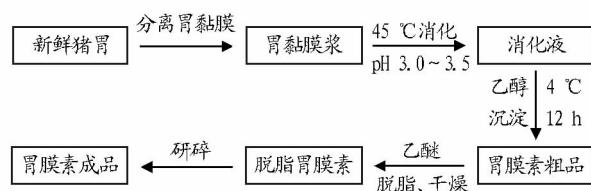


图1 单产工艺流程

Fig.1 Process flow of single production method

作者简介 杨先炯(1979-),女,贵州贵阳人,副教授,硕士,从事生物化学研究。

收稿日期 2016-07-27

1.2.3 联产工艺流程(丙酮沉淀法)。称取一定量的胃黏膜浆于烧杯中,加入 2 mol/L 盐酸调 pH 至 2.5~3.0,于 45 ℃ 水中搅拌消化 3~4 h,双层纱布过滤,消化液于 5.0 ℃ 以下静置过夜,次日搅拌下缓慢加入冷至 5.0 ℃ 的丙酮,使液体相对密度达 0.94~0.96,析出沉淀,双层纱布过滤(收集滤液备用),得胃膜素粗品。再用 70% 乙醇洗涤,70 ℃ 干燥,乙醚脱脂 2 次,烘干,研碎,即得胃膜素成品。取沉淀胃膜素后的母液在搅拌下补加冷至 5 ℃ 的丙酮,使液体相对密度达 0.89~0.91,静置沉淀 4 h,收集沉淀,于真空干燥器中 70 ℃ 以下干燥,磨碎,得胃蛋白酶成品。简要流程如图 2。

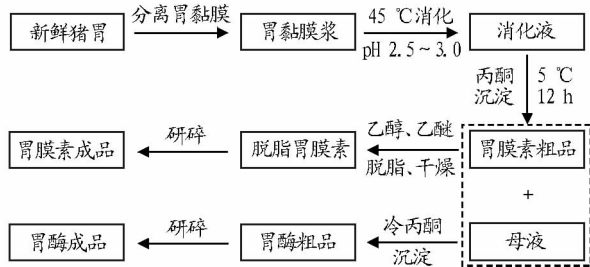


图 2 联产工艺流程

Fig. 2 Process flow of joint production method

1.2.4 产品得率计算。产品得率是指所取的胃黏膜浆经提取得到的胃膜素成品占胃黏膜浆标准重量的百分比,其计算公式为产品得率 = 胃膜素成品重量/胃黏膜浆 × 100%。

1.2.5 粘度、酸度、干燥失重和炽灼残渣分析。取所得胃膜素样品,分次加水、研匀,制成 10 mg/mL 的供试溶液,采用全自动血液流变快测仪测量其黏度。在酸度分析中,取胃膜素样品 0.5 g,加水溶解定容至 50 mL,测定其 pH。在干燥失重分析中,取一定量的供试品,干燥至恒重,从减失的重量和取样量计算供试品的干燥失重。在炽灼残渣分析中,取一定量的供试品置于已炽灼至恒重的坩埚中,按 2005 版《中华人民共和国药典》(第二部)^[3] 进行炽灼残渣分析,按如下公式计算样品的炽灼残渣含量:炽灼残渣 = (残渣及坩埚重 - 空坩埚重)/(供试品重) × 100%。

1.2.6 总氮含量测定。精确称取一定量样品,按照 2005 版《中华人民共和国药典》(第二部)规定的标准^[3],参照文献[4]的方法,采用 KDN-04CII 型定氮仪测定样品总氮含量。

1.2.7 还原性物质分析。按照 2005 版《中华人民共和国药典》(第二部)规定的标准^[3],精确称取一定量样品,参照文献[5]的方法,以葡萄糖作为标准品,采用硫代硫酸钠滴定法测定样品还原性糖的含量,以表征样品中还原性物质含量。

1.3 数据统计分析 每组试验重复 3 次,试验数据以平均数 ± 标准偏差表示,采用 Student's t-test 分析两组数据之间的差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 胃膜素成品得率 单产和联产工艺 2 种方法提取的胃膜素均为黄褐色粉末,具有蛋白胨样肉臭味。单产工艺胃膜素的平均得率达 3.5%,联产工艺的平均得率仅有 1.7%,明显低于单产工艺 ($P < 0.05$),但联产工艺可以同时得到附属

产品胃蛋白酶。

2.2 胃膜素质量指标 测定 2 种工艺得到的胃膜素的黏度、酸度、干燥失重和炽灼残渣发现,单产工艺胃膜素的黏度为 3.2,酸度为 4.3,干燥失重和炽灼残渣分别为 4.3% 和 4.8%;联产工艺所得胃膜素的黏度为 3.4,酸度为 4.5,干燥失重和炽灼残渣分别为 4.2% 和 4.5%。可见,2 种工艺提取的胃膜素的质量指标没有明显差异,均符合国家标准。

2.3 胃膜素总氮含量 测定 2 种工艺得到的胃膜素的总氮含量发现,单产工艺和联产工艺所得胃膜素的总氮含量平均值分别为 8.13% 和 8.10%,两者比较没有明显差异,均符合国家标准。

2.4 胃膜素还原物质含量 测定 2 种工艺得到的胃膜素的还原物质发现,单产工艺和联产工艺所得胃膜素的还原糖含量平均值分别为 26.75% 和 27.90%,两者比较没有明显差异,均符合国家标准。

3 讨论与结论

由于胃膜素对胃炎、胃溃疡、十二指肠溃疡等胃肠道疾病有显著的疗效,近年来,胃膜素的研究开发及临床应用越来越受到人们的重视。目前,从猪胃黏膜中提取仍然是胃膜素的主要来源,人们对从猪胃黏膜中提取胃膜素的工艺条件进行了优化,采用乙醇沉淀法可以较好地得到胃膜素。除了胃膜素外,猪胃黏膜中还含有胃蛋白酶等蛋白水解酶,可分别采取 2 个单产工艺从猪胃黏膜中提取胃膜素和胃蛋白酶。为了提高提取效率、降低成本,人们将 2 个单产工艺整合成采用丙酮沉淀的联产工艺,可同时得到胃膜素和胃蛋白酶^[6],但 2 种工艺所得胃膜素的差异还不太清楚。

该研究对单产和联产 2 种工艺提取胃膜素的得率进行了比较分析,并对所得胃膜素进行了定性和相关质量标准检测。结果发现,2 种工艺所得胃膜素的性状无明显差异,在黏度、酸度、干燥失重和炽灼残渣等方面差异不大,均达到国家标准。2 种工艺所得胃膜素的总氮含量均小于 10.0%,还原物质含量均大于 20.0%,2 组产品比较没有明显差异,均符合《化药部颁标准》中的标准,表明 2 种工艺条件对从猪胃黏膜中提取胃膜素是可行的。在产品得率方面,2 种工艺显示出较大差异,单产工艺胃膜素的得率明显高于联产工艺,但联产工艺同时得到了另一种产品胃蛋白酶。与其他研究报道的得率比较^[7],该研究单产工艺的得率稍低,可能与该研究没有对工艺参数进行优化有关。

综上所述,在从猪胃黏膜中提取胃膜素的研究开发中,联产工艺可同时得到胃膜素和胃酶,应该是工业化规模生产的主要发展方向,但目前该工艺胃膜素的得率不高。因此,如何优化联产工艺条件以提高胃膜素得率,将是胃膜素分离提取研究的重要环节。

参考文献

- [1] 彭志红,汪荣泉. 粘蛋白研究进展[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2010,19(10):952-955.
- [2] 李良铸,李明晔. 最新生化药物制备技术[M]. 北京:中国医药科技出版社,2002:147-148.

的最佳处方(IPM: Tween80: 甘油: 水的比例为5: 32: 8: 200)制备得到的大黄素纳米乳的粒径为 (9.92 ± 2.28) nm; 大黄素纳米乳与游离大黄素相比, 能更有效地诱导 Caco-2 细胞凋亡, 将细胞周期阻滞于 G0/G1 期。李会丽^[25]采用超声乳化法制备大黄素纳米乳, 并依次对大黄素纳米乳的处方成分、处方组成、制备工艺进行考察得到最适制备处方和工艺; 同时发现 SD 大鼠对大黄素纳米乳表现出消除减慢、滞留时间久、生物利用度高的一系列缓释现象。Shi 等^[26]通过荧光检测小鼠血浆和组织内大黄素纳米乳和游离大黄素含量发现, 大黄素纳米乳的药时曲线面积(AUC)、血浆药物峰浓度(C_{max})、半衰期($t_{1/2}$)和药物滞留时间(MRT)分别是大黄素的2.37、1.62、3.99和2.39倍。由此可见, 纳米乳这一新剂型的使用成倍地提高了大黄素的生物利用度, 起改善大黄素溶解度、延长药物体内滞留时间、提高药效的作用, 是一种可靠的药物新剂型。

6 大黄素其他新剂型

除上述几种大黄素新剂型外, 大黄素新型制剂还包括大黄素固体分散体、大黄素微丸等, 但应用并不十分广泛。

7 结语

大黄素由于具有广泛且明显的抗肿瘤活性而备受关注, 大黄素新剂型如固体脂质纳米粒、聚合物胶束、包合物、脂质体、纳米乳的应用不但显著地提高了疗效, 且在提高疗效的基础上起到有效治疗剂量小、副作用少、作用缓释的作用。新剂型在药效方面改善了溶解度、有目的地靶向运输药物, 又避开了普通制剂可能带来的不良反应。这些新剂型具有其他新剂型的基本特点(改善药物溶解度、提高药效等), 又各具特色, 可以在实际应用中根据需求甄别应用。

通过检索文献可以看出大黄素新剂型种类繁多, 制备方法各异。如何进一步改善修饰载体精准地靶向抗肿瘤、如何制定出稳定性高且重复性好的处方、制备大规模生产工艺仍是未来新剂型的研究方向, 以期更好地发挥药效用于临床。

参考文献

- [1] HSU S C, CHUNG J G. Anticancer potential of emodin[J]. *Bio Medicine*, 2012, 2(3): 108-116.
- [2] BLASI P, GIOVAGNOLI S, SCHOUBBEN A, et al. Solid lipid nanoparticles for targeted brain drug delivery[J]. *Advanced drug delivery reviews*, 2007, 59(6): 454-477.
- [3] CHATTOPADHYAY P, SHEKUNOV B Y, YIM D, et al. Production of solid lipid nanoparticle suspensions using supercritical fluid extraction of emulsions(SFEE) for pulmonary delivery using the AERx system[J]. *Advanced drug delivery reviews*, 2007, 59(6): 444-453.
- [4] CHEN Y Y, CHIANG S Y, LIN J G, et al. Emodin, aloe-emodin and rhein inhibit migration and invasion in human tongue cancer SCC-4 cells through

the inhibition of gene expression of matrix metalloproteinase-9[J]. *International journal of oncology*, 2010, 36(5): 1113-1120.

- [5] HARLEV E, NEVO E, LANSKY E P, et al. Anticancer potential of aloe: Antioxidant, antiproliferative, and immunostimulatory attributes[J]. *Planta Med*, 2012, 78(9): 843-852.
- [6] 刘薇, 叶玲, 赵洁, 等. 高效液相色谱法考察大黄素在 HBSS 溶液中的溶解度及其稳定性[J]. *中国卫生检验杂志*, 2009(8): 1775-1777.
- [7] 夏爱晓, 宋倩倩, 孙渊. 固体脂质纳米粒制备及应用研究进展[J]. *药学实践杂志*, 2012(5): 331-334, 368.
- [8] WANG S P, CHEN T K, CHEN R, et al. Emodin loaded solid lipid nanoparticles: Preparation, characterization and antitumor activity studies[J]. *Int J Pharm*, 2012, 430: 238-246.
- [9] MARTINS S, COSTA-LIMA S, CARNEIRO T, et al. Solid lipid nanoparticles as intracellular drug transporters: an investigation of the uptake mechanism and pathway[J]. *International journal of pharmaceutics*, 2012, 430(1): 216-227.
- [10] 张洪, 张福明, 闫士君. 大黄素固体脂质纳米粒在大鼠体内的药理学研究[J]. *中国药师*, 2011(2): 173-175.
- [11] OWEN S C, CHAN D P Y, SHOICHET M S. Polymeric micelle stability[J]. *Nano Today*, 2012, 7(1): 53-65.
- [12] 典灵辉, 于恩江, 程纪伦, 等. 大黄素 soluplus 聚合物胶束的制备及质量评价[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014(16): 15-18.
- [13] YANG L J, CHEN W, MA S X, et al. Host-guest system of taxifolin and native cyclodextrin or its derivative: Preparation, characterization, inclusion mode, and solubilization[J]. *Carbohydrate polymers*, 2011, 85(3): 629-637.
- [14] 安松松. β -环糊精及其衍生物包合物的研究与分析应用[D]. 兰州: 兰州大学, 2013: 49-52.
- [15] 夏翠英, 李勇, 程建明. 正交试验法制备大黄素包合物工艺优选研究[J]. *现代中药研究与实践*, 2004(3): 51-53.
- [16] 王春苗, 侯华新, 黎丹戎, 等. 激光扫描共聚焦显微镜观测大黄素 β 环糊精包合物在鼻咽癌细胞的跨膜转运及分布[J]. *中国激光*, 2014(5): 92-96.
- [17] 徐贤绸, 温培楠, 王兆洪, 等. 大黄素治疗裸鼠胰腺癌肝转移瘤的实验研究[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2014(3): 207-210.
- [18] 索绪斌, 刘艳, 吴燕红, 等. 脂质体对大黄素游离醌类成分的包封及其质量控制[J]. *中药材*, 2010, 33(4): 614-616.
- [19] 雷瑶, 王志洁, 邱国福, 等. 大黄素脂质体对 Hep-2 细胞毒的检测[J]. *武汉大学学报(理学版)*, 2006, 52(2): 247-251.
- [20] WANG T C, YIN X D, LU Y P, et al. Formulation, antileukemia mechanism, pharmacokinetics, and biodistribution of a novel liposomal emodin[J]. *International journal of nanomedicine*, 2012, 7: 2325-2337.
- [21] GUPTA V, MUN G H, CHOI B, et al. Repair and reconstruction of a resected tumor defect using a composite of tissue flap-nanotherapeutic-silk fibroin and chitosan scaffold[J]. *Annals of biomedical engineering*, 2011, 39(9): 2374-2387.
- [22] LAWRENCE M J, REES G D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems[J]. *Advanced drug delivery reviews*, 2012, 64: 175-193.
- [23] SHI Y B, LI H L, LI J C, et al. Development, optimization and evaluation of emodin loaded nanoemulsion prepared by ultrasonic emulsification[J]. *Journal of drug delivery science and technology*, 2015, 27: 46-55.
- [24] 曹琴. 大黄素纳米乳的制备及体外抗大肠癌 Caco-2 细胞的研究[D]. 郑州: 河南中医学院, 2013: 18-35.
- [25] 李会丽. 大黄素纳米乳递释系统的优化及其药物动力学研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2015: 13-39.
- [26] SHI Y B, LI J C, REN Y, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of emodin loaded nanoemulsion in rats[J]. *Journal of drug delivery science and technology*, 2015, 30: 242-249.

(上接第 143 页)

- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 389-390.
- [4] 王海波, 邸学, 袁丹, 等. 凯氏定氮测定钩藤饮片总氮含量研究[J]. *时珍国医医药*, 2013, 24(7): 1559-1560.
- [5] 武金霞, 高洁, 张贺迎, 等. 硫代硫酸钠滴定法测定淀粉 DE 值[J]. *中国*

酿造, 2008(16): 91-92.

- [6] 林国平, 何兆雄. 胃蛋白酶、胃膜素联产提取工艺改进[J]. *中国医药工业杂志*, 1989, 20(5): 193-195.
- [7] 董娜, 董文宾, 田颖. 猪胃黏膜中胃膜素提取工艺的优化[J]. *食品科学*, 2011, 32(2): 39-42.