



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102603924 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 25

(21) 申请号 201210064002. 8

(22) 申请日 2012. 03. 12

(71) 申请人 南京健友生化制药股份有限公司

地址 210061 江苏省南京市高新开发区

MA010-1 号地

(72) 发明人 王春华 王玘玮

(74) 专利代理机构 南京天华专利代理有限责任

公司 32218

代理人 徐冬涛

(51) Int. Cl.

*C08B 37/10* (2006. 01)

*A61K 31/727* (2006. 01)

*A61P 7/02* (2006. 01)

*A61P 9/10* (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页

(54) 发明名称

一种从肝素副产物分离舒洛地特原料的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种从肝素副产物分离舒洛地特原料的方法,将肝素副产物溶解为溶液,加入醋酸钾使质量分数增加,再用醋酸调节溶液的 pH 值,然后沉淀,收集上清液;再加入班氏试剂和饱和氢氧化钠溶液,搅拌后沉淀,分离出上清液;向上清液中加入氯化钠,溶解后再加入乙醇进行沉淀,分离出沉淀物,将其用水稀释,加入 EDTA,搅拌溶解后继续加入阴离子交换树脂进行搅拌吸附;吸附后先氯化钠溶液搅拌洗涤树脂,然后用氯化钠溶液搅拌洗脱树脂,收集洗脱液并用无水乙醇沉淀,得到舒洛地特原料。本方法有效解决了存储或丢弃大量肝素副产物所需财力和物力,并变废为宝,将副产物再次利用,既节约了大量成本,又创造了价值。

1. 一种从肝素副产物分离舒洛地特原料的方法,其特征在于包括如下步骤:

(1) 将肝素副产物溶解为 5%~20% 质量分数的溶液,向其中加入醋酸钾使质量分数增加至 10%~60%,再用醋酸调节溶液的 pH 值至 5~7,然后沉淀 1~5 天,收集上清液;

(2) 向步骤 (1) 收集的上清液中加入班氏试剂和饱和氢氧化钠溶液,搅拌后沉淀,分离出上清液;

(3) 向步骤 (2) 得到的上清液中加入氯化钠,溶解后再加入乙醇进行沉淀,分离出沉淀物,将其用水稀释为质量分数 10%~15% 的沉淀物溶液,再加入 EDTA,搅拌溶解后继续加入阴离子交换树脂进行搅拌吸附;吸附后先用 0.1~0.6M 的氯化钠溶液搅拌洗涤树脂,然后采用 2~4M 氯化钠溶液搅拌洗脱树脂,收集洗脱液并用无水乙醇沉淀,得到舒洛地特原料。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于所述肝素副产物是从猪小肠粘膜经过离子交换至分级沉淀生产肝素的过程中产生的副产物。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于步骤 (1) 中,肝素副产物先溶解为 6%~10% 质量分数的溶液;加入醋酸钾后使溶液的质量分数增加至 30%~50%。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于步骤 (1) 中,用醋酸调节溶液的 pH 值至 6;调节 pH 值之后的沉淀在 5~25℃ 下进行;沉淀后采用离子心分离的方式收集上清液。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于步骤 (2) 中,所述班氏试剂的体积为上清液体积的 0.5~2 倍,所述饱和氢氧化钠溶液的体积为上清液体积的 0.05~0.3 倍。

6. 根据权利要求 5 所述的方法,其特征在于步骤 (2) 中,所述班氏试剂的体积为上清液体积的 0.8 倍,所述饱和氢氧化钠溶液的体积为上清液体积的 0.1 倍;搅拌后的沉淀在 20~25℃ 下进行,沉淀时间为 10~60 分钟。

7. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于步骤 (3) 中,所述氯化钠的加入量为上清液质量的 1%~3%;加入氯化钠并溶解后,采用上清液体积 1~2 倍的无水乙醇进行沉淀。

8. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于步骤 (3) 中,所述 EDTA 的加入量为沉淀物溶液质量的 1%~3%;所述阴离子交换树脂体积与沉淀物溶液的体积相同;用阴离子交换树脂体积进行搅拌吸附的时间为 6~24 小时。

9. 根据权利要求 1 或 8 所述的方法,其特征在于步骤 (3) 中,所述阴离子交换树脂为丙烯酸类强碱性阴离子交换树脂。

10. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于步骤 (3) 中,用 0.1~0.6M 的氯化钠溶液搅拌洗涤树脂的时间为 2~4 小时;采用 2~4M 氯化钠溶液搅拌洗脱树脂的时间为 3~12 小时;收集得到的洗脱液用洗脱液体积 1~2 倍的无水乙醇进行沉淀。

## 一种从肝素副产物分离舒洛地特原料的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种舒洛地特原料的制备方法,尤其涉及一种从肝素副产物中分离舒洛地特原料的方法。

### 背景技术

[0002] 舒洛地特,商品名为“伟素”,是1973年意大利的Alfa Wassermann公司上市的一种低分子肝素类药物,与肝素同属糖胺聚糖类药物。药物中同时含有的硫酸乙酰肝素和硫酸皮肤素可以协同发挥作用,使该药具有与肝素不同的特征。与肝素相比,舒洛地特的抗血栓作用强,而引起出血的可能性小。舒洛地特可以口服的特点尤使其适合抗血栓的长期治疗。舒洛地特是通过抗凝作用、纤溶作用、血液流变学作用、抗增殖作用及维持膜通透选择性作用发挥其药理作用。这使得舒洛地特能够用于防治血栓性疾病;而其血液流变学作用、抗增殖作用和维持膜通透选择性作用是舒洛地特能够阻遏动脉粥样硬化进展的基础。舒洛地特对于糖尿病肾病的治疗作用源于其抗增殖作用和维持膜通透选择性作用。

[0003] 舒洛地特中硫酸乙酰肝素的含量为: $\geq 70.00\%$ ,硫酸皮肤素的含量为: $\leq 20.00\%$ ,传统的生产方式是将硫酸乙酰肝素和硫酸皮肤素按照一定比例混合,使得最终符合规定要求即可。但是由于单纯的硫酸乙酰肝素很难分离并且储量相对较少,使得舒洛地特的原料很难获得,价格也很高;并且简单的将两种原料混合,工艺很难控制,使得最终得到的原料不符合要求规定。

[0004] 从猪小肠粘膜经过离子交换以及分级沉淀生产肝素的过程中产生了大量的副产物,其中主要组成是硫酸乙酰肝素、硫酸皮肤素和少量残留肝素。但是由于其中的有效物质分离困难,故生产肝素后一般将这些副产物丢弃或存储,目前为止没有可继续利用的报道。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是为了提供一种从肝素副产物分离舒洛地特原料的方法。

[0006] 本发明的目的可以通过以下措施达到:

[0007] 一种从肝素副产物分离舒洛地特原料的方法,其包括如下步骤:

[0008] (1) 将肝素副产物溶解为 $5\% \sim 20\%$ 质量分数的溶液,向其中加入醋酸钾使质量分数增加至 $10\% \sim 60\%$ ,再用醋酸调节溶液的pH值至 $5 \sim 7$ ,然后沉淀 $1 \sim 5$ 天,收集上清液;

[0009] (2) 向步骤(1)收集的上清液中加入班氏试剂和饱和氢氧化钠溶液,搅拌后沉淀,分离出上清液;

[0010] (3) 向步骤(2)得到的上清液中加入氯化钠,溶解后再加入乙醇进行沉淀,分离出沉淀物,将其用水稀释为质量分数 $10\% \sim 15\%$ 的沉淀物溶液,再加入EDTA,搅拌溶解后继续加入阴离子交换树脂进行搅拌吸附;吸附后先用 $0.1 \sim 0.6\text{M}$ 的氯化钠溶液搅拌洗涤树脂,然后采用 $2 \sim 4\text{M}$ 氯化钠溶液搅拌洗脱树脂,收集洗脱液并用无水乙醇沉淀,得到舒洛地特原料。

[0011] 本发明中的肝素副产物是从猪小肠粘膜经过离子交换至分级沉淀生产肝素的过程中产生的副产物,其中主要含有硫酸乙酰肝素、硫酸皮肤素和少量残留肝素。

[0012] 步骤(1)中,肝素副产物优选先溶解为6%~10%质量分数的溶液(水溶液),进一步优选溶解至8%;浓度过高则会导致沉淀不单是残留肝素,也可能混有硫酸皮肤素。

[0013] 步骤(1)中,加入醋酸钾后优选使溶液的质量分数增加至30%~50%。加入醋酸钾后可进一步搅拌使溶解。

[0014] 步骤(1)中,用醋酸调节溶液的pH值时优选调节至6。调节pH值之后的沉淀进一步在温度5~25℃下进行。沉淀后可采用常规的固液分离方式,如离子心分离的方式,收集上清液。该上清液为清除肝素后的硫酸多糖溶液。

[0015] 步骤(2)中,班氏试剂的体积优选为上清液体积的0.5~2倍,进一步优选为0.8倍;饱和氢氧化钠溶液的体积优选为上清液体积的0.05~0.3倍,进一步优选为0.1倍。班氏试剂和饱和氢氧化钠溶液的用量变化均会影响最终产品中两物质的比例。

[0016] 步骤(2)中,搅拌后的沉淀在常温下进行,进一步在20~25℃下进行,沉淀时间优选为10~60分钟。沉淀后的分离方法可采用现有常规固液分离方式,如离心分离等。

[0017] 步骤(3)中,所述氯化钠的加入量优选为上清液质量的1%~3%;加入氯化钠并溶解后,采用上清液体积1~2倍的无水乙醇进行沉淀。

[0018] 步骤(3)中,所述EDTA的加入量优选为沉淀物溶液质量的1%~3%;所述阴离子交换树脂体积与沉淀物溶液的体积相同;用阴离子交换树脂体积进行搅拌吸附的时间为6~24小时。所述阴离子交换树脂优选为丙烯酸类强碱性阴离子交换树脂,如FPA98CL 丙烯酸类强碱性阴离子交换树脂(以下简称FPA98型阴离子交换树脂)。

[0019] 步骤(3)中,用0.1~0.6M的氯化钠溶液搅拌洗涤树脂的时间优选为2~4小时;采用2~4M氯化钠溶液搅拌洗脱树脂的时间优选为3~12小时;收集得到的洗脱液用洗脱液体积1~2倍的无水乙醇进行沉淀。吸附和洗脱时间减少会在一定程度上影响吸附和洗脱效果,最终产率降低。

[0020] 本发明建立了一种新的分离纯化工艺,从肝素副产物中分离舒洛地特原料,即硫酸乙酰肝素和硫酸皮肤素的混合物,本方法利用肝素、硫酸乙酰肝素和硫酸皮肤素的溶解度差异,以及和班氏试剂的特殊反应最终成功得到舒洛地特原料。所得到的舒洛地特原料经检测各项指标均符合舒洛地特原料的要求,下表为实施例1得到的硫酸乙酰肝素和硫酸皮肤素的混合物的具体测试结果:

[0021]

检测内容	规定要求	测量结果
外观性状	白色或类白色粉末,有引湿性	类白色粉末,有引湿性
溶解性	在水中易溶	在水中易溶
硫酸乙酰肝素含量	≥70.00%	79.5%
硫酸皮肤素含量	≤20.00%	18.2%
电泳鉴别(中国药典2005版二部附录VF二法)	斑点位置与颜色与对照品一致	斑点位置与颜色与对照品一致
比旋度(中国药典2005版二部附录VIE)	≥24°	32°

[0022]

硫含量（中国药典 2005 版二部附录 VII C）	6.97%-11.90%	8.95%
溶液澄明度与颜色（中国药典 2005 版二部附录 IX A 第一法）	溶液应澄清，颜色与黄色 1 号标准对比，不得更深	澄清、颜色浅于黄色 1 号标准
吸光度（中国药典 2005 版二部附录 IV A）	≤0.160	0.125
PH（中国药典 2005 版二部附录 VI H）	5.0-8.0	6.84
干燥失重（中国药典 2005 版二部附录 VIII L）	≤8.00%	4.9%
重金属（中国药典 2005 版二部附录 VIII H 第二法）	≤30 PPM	15 PPM
细菌内毒素（中国药典 2005 版二部附录 XI E）	<0.01EU/IU	<0.01EU/IU
有机残留（中国药典 2005 版二部附录 VIII P）	乙醇含量≤0.5%	乙醇含量 0.26%
抗 Xa 因子活性（中国药典 2005 版二部附录 XI V）	70-100 lu/mg	85 lu/mg

[0023] 本方法有效解决了存储或丢弃大量肝素副产物所需财力和物力，并变废为宝，将副产物再次利用，即节约了大量成本，又创造了价值。本工艺从副产物中直接分离得到符合规定的舒洛地特原料，原料的各个指标项目易控制，避免了传统生产方式中混合后原料指标不好控制的缺陷。传统生产方式中的要分离获得硫酸乙酰肝素相当困难，最终导致舒洛地特原料的价格升高，而本方法获得舒洛地特原料工艺简单，成本低廉，适合工业化生产。

具体实施方式

[0024] 下面结合实例对本发明所述的内容作进一步阐述。

[0025] 实施例 1

[0026] 将肝素副产物溶解为质量分数为 8% 的溶液，向其中加入醋酸钾使得质量分数至 37%，搅拌溶解，以醋酸调节 PH 至 6，在 20℃ 下沉淀 1 天。离心收集上清，得到清除肝素后的硫酸多糖溶液。向硫酸多糖溶液中加入 0.8 倍体积的班氏试剂和 0.1 倍体积的饱和氢氧化钠溶液，搅拌后室温 20℃ 下沉淀 30 分钟，离心分离上清液和沉淀。向上清液中加入 3% 氯化钠，溶解后加入 2 倍体积的无水乙醇沉淀，将沉淀用纯化水稀释为质量分数为 10% 的溶液，加入 1% EDTA，搅拌溶解后加入相同体积的 FPA98 型阴离子交换树脂，搅拌吸附 20 小时。用 0.3M 氯化钠溶液搅拌洗涤树脂 2 小时，然后以 2.5M 氯化钠溶液搅拌洗脱树脂 6 小时，收集洗脱液以 2 倍体积的无水乙醇沉淀，得到硫酸乙酰肝素（70% 以上）和硫酸皮肤素（20% 以下）的混合物，所得混合物的旋光值为 32.5°。

[0027] 实施例 2

[0028] 将肝素副产物溶解为质量分数为 10% 的溶液，向其中加入醋酸钾使得质量分数至 26%，搅拌溶解，以醋酸调节 PH 至 5，在 5℃ 下沉淀 3 天。离心收集上清，得到清除肝素

后的硫酸多糖溶液。向硫酸多糖溶液中加入 0.5 倍体积的班氏试剂和 0.05 倍体积的饱和氢氧化钠溶液,搅拌后室温 20℃下沉淀 10 分钟,离心分离上清液和沉淀。向上清液中加入 3%氯化钠,溶解后加入 2 倍立体的无水乙醇沉淀,将沉淀用纯化水稀释为质量分数为 15%的溶液,加入 2% EDTA,搅拌溶解后加入相同体积的 FPA98 型阴离子交换树脂,搅拌吸附 24 小时。用 0.1M 氯化钠溶液搅拌洗涤树脂 3 小时,然后以 2M 氯化钠溶液搅拌洗脱树脂 3 小时,收集洗脱液以 2 倍体积的无水乙醇沉淀,得到硫酸乙酰肝素(70%以上)和硫酸皮肤素(20%以下)的混合物,所得混合物的旋光值为 30.6°。

[0029] 实施例 3

[0030] 将肝素副产物溶解为质量分数为 12%的溶液,向其中加入醋酸钾使得质量分数至 45%,搅拌溶解,以醋酸调节 PH 至 7,在 20℃下沉淀 3 天。离心收集上清,得到清除肝素后的硫酸多糖溶液。向硫酸多糖溶液中加入 1.5 倍体积的班氏试剂和 0.15 倍体积的饱和氢氧化钠溶液,搅拌后室温 20℃下沉淀 60 分钟,离心分离上清液和沉淀。向上清液中加入 2%氯化钠,溶解后加入 1 倍立体的无水乙醇沉淀,将沉淀用纯化水稀释为质量分数为 10%的溶液,加入 3% EDTA,搅拌溶解后加入相同体积的 FPA98 型阴离子交换树脂,搅拌吸附 12 小时。用 0.6M 氯化钠溶液搅拌洗涤树脂 2 小时,然后以 3M 氯化钠溶液搅拌洗脱树脂 8 小时,收集洗脱液以 1 倍体积的无水乙醇沉淀,得到硫酸乙酰肝素(70%以上)和硫酸皮肤素(20%以下)的混合物,所得混合物的旋光值为 28.5°。

[0031] 实施例 4

[0032] 将肝素副产物溶解为质量分数为 15%的溶液,向其中加入醋酸钾使得质量分数至 60%,搅拌溶解,以醋酸调节 PH 至 7,在 5℃下沉淀 5 天。离心收集上清,得到清除肝素后的硫酸多糖溶液。向硫酸多糖溶液中加入 1.5 倍体积的班氏试剂和 0.3 倍体积的饱和氢氧化钠溶液,搅拌后室温 20℃下沉淀 30 分钟,离心分离上清液和沉淀。向上清液中加入 2%氯化钠,溶解后加入 2 倍立体的无水乙醇沉淀,将沉淀用纯化水稀释为质量分数为 10%的溶液,加入 3% EDTA,搅拌溶解后加入相同体积的 FPA98 型阴离子交换树脂,搅拌吸附 12 小时。用 0.3M 氯化钠溶液搅拌洗涤树脂 4 小时,然后以 4M 氯化钠溶液搅拌洗脱树脂 6 小时,收集洗脱液以 2 倍体积的无水乙醇沉淀,得到硫酸乙酰肝素(70%以上)和硫酸皮肤素(20%以下)的混合物,所得混合物的旋光值为 29.0°。

[0033] 实施例 5

[0034] 将肝素副产物溶解为质量分数为 20%的溶液,向其中加入醋酸钾使得质量分数至 50%,搅拌溶解,以醋酸调节 PH 至 6,在 20℃下沉淀 5 天。离心收集上清,得到清除肝素后的硫酸多糖溶液。向硫酸多糖溶液中加入 1 倍体积的班氏试剂和 0.2 倍体积的饱和氢氧化钠溶液,搅拌后室温 25℃下沉淀 10 分钟,离心分离上清液和沉淀。向上清液中加入 1%氯化钠,溶解后加入 1 倍立体的无水乙醇沉淀,将沉淀用纯化水稀释为质量分数为 15%的溶液,加入 1% EDTA,搅拌溶解后加入相同体积的 FPA98 型阴离子交换树脂,搅拌吸附 6 小时。用 0.3M 氯化钠溶液搅拌洗涤树脂 4 小时,然后以 2.5M 氯化钠溶液搅拌洗脱树脂 8 小时,收集洗脱液以 1 倍体积的无水乙醇沉淀,得到硫酸乙酰肝素(70%以上)和硫酸皮肤素(20%以下)的混合物,所得混合物的旋光值为 30.0°。

[0035] 实施例 6

[0036] 将肝素副产物溶解为质量分数为 10%的溶液,向其中加入醋酸钾使得质量分数至

45%，搅拌溶解，以醋酸调节 PH 至 5.5，在 20℃下沉淀 1 天。离心收集上清，得到清除肝素后的硫酸多糖溶液。向硫酸多糖溶液中加入 0.8 倍体积的班氏试剂和 0.1 倍体积的饱和氢氧化钠溶液，搅拌后室温 20℃下沉淀 20 分钟，离心分离上清液和沉淀。向上清液中加入 2%氯化钠，溶解后加入 2 倍体积的无水乙醇沉淀，将沉淀用纯化水稀释为质量分数为 10%的溶液，加入 1% EDTA，搅拌溶解后加入相同体积的 FPA98 型阴离子交换树脂，搅拌吸附 18 小时。用 0.3M 氯化钠溶液搅拌洗涤树脂 2 小时，然后以 3M 氯化钠溶液搅拌洗脱树脂 8 小时，收集洗脱液以 2 倍体积的无水乙醇沉淀，得到硫酸乙酰肝素（70%以上）和硫酸皮肤素（20%以下）的混合物，所得混合物的旋光值为  $28.6^{\circ}$ 。