

硫酸软骨素的开发及生产工艺控制

李 南

(江苏省镇江生物化学制药厂, 212004)

摘 要 介绍了硫酸软骨素的临床应用, 如对听觉障碍、肝肾疾患、心血管疾病、眼病、肿瘤等具有治疗抑制作用。文中对其再开发及达标生产工艺, 如方法选择、温控操作、成品纯化等作了讨论。

关键词 硫酸软骨素, 临床应用, 再开发, 生产工艺

中图分类号 TQ460.6

硫酸软骨素(Chondroitin Sulfate, 以下简称(CS))广泛分布于人和动物的组织中, 是构成动物的软骨、腱、血管壁、皮肤等结合组织的组成部分, 特别在软骨中, 它与胶原一起作为主要成份占软骨干燥物的20%~40%。在这些动物的鼻中隔软骨中含量尤为丰富。CS系动物软组织提取的粘多糖类药物, 主要成份是CSA、CSC、硫酸角(皮)质素、透明质酸和少量CSB等异构体的混合物。CS在组织成长和再生过程中以及机体与许多传染源(细菌、病毒)的免疫功能上都起着重要作用。CS治疗疾病的范围相当广泛, 其各剂型均能很好地被肌肉、胃肠、皮肤、粘膜所吸收并且无毒副作用, 无论作为治疗剂或作为预防药、营养保健品、保护皮肤的化妆品均有开发前途[张天民等 1981, 吴梧桐等 1993]。

1 CS 的临床应用与再开发

1.1 治疗疼痛、听觉障碍、肝肾疾病

CS片、CS注射液首先用于治疗神经痛、头痛、神经性偏头痛、关节痛(风湿性)、关节炎、肩胛关节周围疼痛、开腹手术后疼痛, 都有显著疗效。国内镇江、常州等生化药厂把CS与中草药(芍药、附子、甘草)制成复方制剂用于治疗关节炎、神经痛、老年肩痛等, 临床应用1000余例, 取得了较为满意的疗效。CS对预防和治疗链霉素引起的听觉障碍患者以及各种职业性的噪音造成的听觉困难、耳鸣症(用50mg本品连续注射15~16次, 所得结果平均有20~30分贝的听力上升)效果显著, 比使用V_A、V_B治疗效果更佳。CS还对于慢性肾炎及肾硬化均有良好的效果; 治疗尿路结石(肾结石、膀胱结石)也有特殊的价值。对于急慢性肝炎、肝硬化、血清肝炎、病毒性肝炎可使自觉症状和肝功能好转。

1.2 防治心血管疾病及冠心病

CS 能降低血液中的胆固醇从而防止动脉粥样硬化。有专刊报道用 CSA 和 CSC 或它们的混合物治疗急性缺血性冠状动脉硬化病人(剂量 1.5~3g/d, 疗程三年, 病例 180 人)均有显著的疗效, 而且无毒副作用, 同时还观察到有 80% 病人可使血栓形成的时间延长 6~12 小时。60 年代后很多国家已将 CSA 和 CSC 主要用于防治冠心病, 临床结果是令人满意的。对 CSA 预防和治疗冠心病进行了大量长期的临床工作, 120 例临床确认给予冠心病患者 CSA 治疗, 时间至少二年甚至最长达六年, 剂量 10g/d, 三个月后逐渐减少至 0.5~1.5g/d, 对照组病人同期用其它冠心病药物治疗。结果表明 CSA 对心绞痛、心肌梗塞、心肌缺血和冠状动脉肌能不全等均有较好的疗效, 和对照组比较发病率为 6:42 ($P < 0.001$)、死亡率 4:14 ($P < 0.001$), 而且无毒副作用。国内南昌生化制药厂用 5% 碱液所提取的 CS 就能起到 CSA 的药理作用, 其制剂 CS-钠胶囊、CS-钠注射液能抑制磷酸二酯酶 (PPH) 的活性, 使环状磷酸腺苷 (C-CMP) 含量增加、活化脂解酶、促进脂质的降解, 防止脂类于动脉管壁沉着, 并有抗动脉粥样硬化和斑块形成的作用, 并有抗凝、抗炎、抗血栓形成和促进冠状动脉分枝或倒枝循环的作用, 对于动脉硬化、冠心病、心绞痛、心肌缺血、心肌梗塞、降低血脂和胆固醇等症有一定疗效。四川成都制药三厂利用 CS 的 A、B、C 型的钙盐在乙醇中不同溶解度进行分离加以提纯, 精制成 CSA 钙, 再通过阳离子交换树脂转型制成 CSA-钠, 用于治疗冠心病, 并做了大量的药理和临床研究工作, 结果表明 CSA 对降低血中脂质、改善心电图、治疗心绞痛均有较好疗效, 对于冠心病和有心肌梗塞病史患者用 CSA 可降低死亡率, 并对高血压心肌梗塞的临床使用效果进行观察。

1.3 治疗眼疾并能消肿接骨等

CS 对某些眼科疾病如角膜炎、老视均有治疗效果。把 CS 与其它一些药物(生理盐水、羧基水杨酸乙基汞钠等)制成复方眼药水用于治疗角膜炎、角膜溃疡损伤等眼病。国内镇江生化药厂等也生产类似的药剂(角膜宁眼药水)。对于外伤、手术后促进伤口的愈合和脑振荡、肌肉胫骨的内伤及骨折愈合等都有相对的 CS 药剂生产(如复方脑氨肽片、麝香虎骨膏、消肿接骨冲剂等)。

1.4 抑制肿瘤新发现

今天以肿瘤血管为治瘤新靶这一全新治癌理论的创立和抑制肿瘤新生血管的有效物质——鲨鱼软骨提取物的新发现。1990 年世界卫生组织 (WHO) 有关方面表示鲨鱼软骨对癌症有疗效, 发现肿瘤的血管网络明显减少和消失, 有大量的疤痕组织细胞在肿瘤周围生长完全包裹而坏死, 原肿瘤新生血管网络成了基础并把大量的免疫细胞带到肿瘤处去抗击。1991 年美国、巴拿马、古巴、墨西哥、以色列、日本等国和港、台等地区先后进行了对不同年龄、不同程度和不同种类的实体肿瘤患者的临床治疗。1994 年美国食品药品监督管理局 (FDA) 正式批准鲨鱼软骨进入临床。我国海军医学研究所开创了国内鲨鱼软骨抗肿瘤研究先河, 并报告了鲨鱼软骨具有抑制肿瘤细胞及血管内皮细胞生长, 能刺激机体免疫系统增强机体抵抗力 (中国人民解放军海军医学研究所 1994)。解放军 301 医院、北京肿瘤医院研究所、辽宁省肿瘤医院所也相继开展了鲨鱼软

(1) 中国人民解放军海军医学研究所, 1994. 鲨鱼骨提取的抗肿瘤作用; 鲨鱼软骨制剂抗肿瘤作用的研究. 第四次中国海洋潮药物学术开发研讨会论文集。

骨及CS的抗肿瘤作用研究。经过长期针对性试验(动物、临床)和研究(剂型、含量、剂量),基于鲨鱼软骨及CS的作用机理和特征,证实其对实体肿瘤的疗效是确切的,而对非实体肿瘤基本无效。鲨鱼软骨提取物含有最为丰富的“阻止肿瘤新生血管生长因子”,能有效地抑制肿瘤新生血管的生长,断绝癌细胞营养的供应和新陈代谢物的排出,从而起到直接控制肿瘤的生长和转移。它还具有明确的针对性,不会出现任何对人体健康组织造成伤害的现象。它含有大量的生物调节剂,能通过提高机体的免疫能力而实现抗癌的目的。它无任何毒副作用,可长期服用。它无诱发癌细胞抗药性和耐药性现象,能预防癌细胞的出现和转移。这使人类有了治疗实体癌症肿瘤的希望和曙光。

1.5 保胶性和保水性的特性应用

CS还可与某些物质调制成化妆品用于保护皮肤的健美,我国出口到西德汉姆公司等基本上用于护肤化妆品;又由于CS具有保水性、保胶性和高粘性,我国出口到日本、韩国的CS都被用作食品添加剂。

1.6 对CS衍生物开发

CS衍生物的研究在国外也比较活跃。有专利报道CS、CSA和CSC与局部麻醉剂利多卡因、马卡因或用苯甲脂作用制成衍生物。这些衍生物有持续的局部麻醉作用,可广泛地用于外科手术前的麻醉;这些衍生物对正常的血液循环没有影响,而且比单一的局部麻醉更稳定、麻醉作用更持久。还有专利报道用CS与硝酸铋或氢氧化铝反应制成CS—铋或CS—铝的结合物,用于治疗消化性溃疡具有进一步疗效。也有将CS与吡哆胺制成结合物用于预防动脉粥样硬化及抑制血小板凝集。国内有人将CS与铜等金属离子结合制成外用药剂用于皮肤病的治疗。国外已有报导用CS—钠制成复盐或络盐具有复方制剂的特点。如用CS—钠与氯化水杨酰、氯化乙酰水杨酰或氯化邻乙酰水杨酰胺在二甲基甲酰胺(DMF)或吡啶中作用(酯化),制得具有阿斯匹林同样作用但刺激性与毒性均较阿斯匹林小的CS酯化物。

2 CS的生产工艺及达标控制

目前,国内外大都从动物猪、牛、羊、马、鸡、鲨、鲸、乌贼、鳔的软骨中提取CS。提取方法有高温高压法、中性盐法、碱提法、酶解法等;分离纯化则有乙醇分级沉淀法、纤维素分离法、吸附法、季铵盐络合法、离子交换层析法、区带电泳分离法等[马淑涛等 1991,沈渤江等 1990,刘智等 1990]。CS产品质量标准基本按部标口服级($WS_1-C_3-0030-89$)执行[中华人民共和国卫生部药典委员会 1989],并参照苏、赣、湘、沪等省市的有关标准(江苏省标准 1982a,江苏省标准 1982b)。由于各种标准不同,CS生产工艺可有所掌握,这里介绍我们多年来实践经验总结,又根据我国现有基本生产条件、吸取各种成熟的工艺特点,在具体操作上做了一点改进,达到总收率高、溶剂用量少、质量达标、产品分等多用之目标。

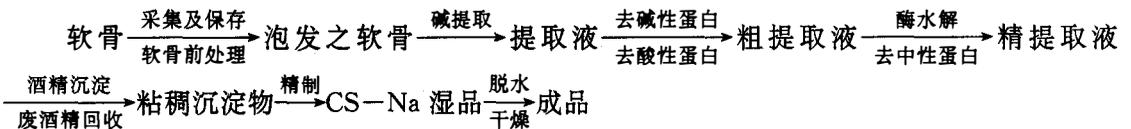
(2)江苏省标准, 1982a。苏卫药准字(82)3002—5号。

(3)江苏省标准, 1982b。苏卫药准字(82)3000—1号。

2.1 CS 部标、省标、出口标准质量要求

生产CS原粉可分口服级、针用级、出口级三种,质量标准上的不同主要在含量上。氨基葡萄糖大于24.0%(口服级,以下简称“口”)、CS-Na 大于80%(针剂级,以下简称“针”)、CS-Na 大于86%(出口级,以下简称“出”)。澄清度,澄清(吸收度 <0.05)(口)、澄清($<$ 黄色二号)(针)、没要求(出)。含氮量,2.5%~3.8%(口)、2.5%~3.5%(针)、小于3.4%(出)。氯化物,小于1.0%(口)、没要求(针)、小于0.4%(出)。游离硫酸盐,没要求(口)、小于0.2%(针)、含硫量小于5.10%或硫酸盐灰粉小于2.90%(出)。蛋白质,没要求(口)、不发生浑浊(针)、小于2.45%(出)。铁盐,没要求(口)、小于0.01%(针)、重金属小于0.0020%(出)。卫生指标,小于1000个/g(口)、无热源(针)、小于500个/g(出)。

2.2 CS 的生产工艺流程图(李 南等 1988)



技术指标中收得率为:12%~16%(干品计),3.5%~5.0%(湿品计)
(干喉骨/湿喉骨 $\leq 1/2.7$)

2.3 操作、质控、得率的影响因素讨论

国内外制备常用的工艺基本上用碱提取方法,不同厂在具体步骤和条件上各有差异。我们在对三种典型工艺的实验基础上,探讨如何使产品符合标准以实验多项指标为依据,除了在三种碱液浓度提取情况下,其它各工艺基本相同,用来进行研究讨论。

不同碱浓度提取 CS 实验结果(产品以针用粉为例)如下表。

检测项目	稀碱工艺 (2%~5%浓度)	中碱工艺 (10%~15%浓度)	浓碱工艺 (25%以上浓度)	备 注
平均收得率(%)	12.00	13.50	10.50	干喉骨计,与软骨质量有关
生产周期(h)	72以上	30左右	30左右	投100kg 干料至成品出料
外 观	白色细粉	白色粉颗粒	类白色颗粒	
澄清度	0.025	0.038	0.118	吸收度
葡萄糖醛酸(%)	15.93	17.34	25.12	
氨基己糖(%)	28.45	32.50	31.40	酒精沉淀浓度61°~62°条件下含量
硫酸基(%)	7.23	7.35	8.45	
氮含量(%)	4.51	3.0	3.58	均没超过5%
蛋白质(%)	3.62	2.40	2.31	溶解度和蛋白质均符合标准
特性粘数	38.0	32.4	22.5	软骨品种不同而有所不同
分子量	8500	7600	4300	
比旋度(°)	-28.08	-26.33	-23.60	

(5)李 南等,1988. 产品工艺路线、操作规程质量标准、技术指标. 88版 4~7. 江苏镇江生化制药厂.

在不同温度条件操作下 CS 实验结果如下表。

检测项目	碱提取温度(℃)		酸碱中和温度(℃)		酶水解温度(℃)		沉淀温度(℃)	
	38~42	48~52	35以下	45左右	40~45	50~55	30以下	40以下
澄清度(吸收度)	0.035	0.042	0.035	0.041	0.035	0.06	0.035	0.042
含氮量(%)	2.8	3.5	2.8	4.0	2.8	5.0	2.8	3.2
游离硫酸盐(%)	0.15	0.35	0.15	0.45	0.15	0.20	0.15	0.25
氨基葡萄糖(%)	31.80	30.5	31.80	28.00	31.80	26.50	31.80	29.70
收得率(%)	13.00	11.80	13.00	10.50	13.00	11.60	13.00	12.10
外观	白色粉末	淡棕色	白色粉末	淡棕色	白色粉末	白细粉末	白色粉末	白色颗粒粉末

(1)CS 与蛋白质结合而存在,用碱提取有利于破坏 CS 与蛋白质之间的键使 CS 释出,加上 CS 分子上的硫酸基一般对碱较稳定。浓碱工艺生产周期短,产品具有纯度高但粘度下降,CS 中糖苷键的断裂而降解,色泽深,杂蛋白多致使含氮量高,收率低等特点;稀碱工艺生产周期太长(3~5天),CS 分子间不易降解致使纯度不够理想,但产品色泽淡、总收率高[马淑涛等,1991]。本工艺系采用中度碱浓度结合酶解法,产品生产周期只24~30小时,收率高达12%~16%,色泽为类白色细粉,纯度一般在80%以上,含氮量符合标准,集中吸取了浓、淡碱工艺的优点,又符合规模性生产的特点[张天民等 1981,吴梧桐等 1993]。

(2)本工艺综合应用了产品纯化方法。首先应用调 pH 等电点方法在调 pH 2.8至9.5之间,碱性、中性、酸性杂蛋白(占杂蛋白量95%以上)是用等电点变性沉淀过滤而除去。第二,应用酶解肝糖肱(即淀粉酶),酶解溶液中附着的油脂类物(即脂肪酶)水解成可溶性脂肪酸类物,酶解产品提取液中无法除尽的极少量结合性大分子杂蛋白(即蛋白酶)水解成可溶性小分子脲、胨、肽、氨基酸类物,所以在酒精沉淀时只沉淀出 CS,而抽去以上水解成可溶性杂质部分。第三,应用微量盐溶作用和酒精分段结晶法来纯化最后 CS—Na 成品。操作中加入盐的浓度小于0.5%,溶液中加入一定量浓度的盐(氯化钠或醋酸盐)对小分子杂质起到盐溶作用,对大分子粘多糖有助于从溶液中析出;90度冷酒精用量以不超过2倍体积为宜(一般1.25倍乙醇沉淀),乙醇的加入改变溶液的极性,导致粘多糖溶解度的下降(粘多糖溶液的浓度以10%~15%为最佳)。温度愈低沉淀速度愈快,结晶愈松散,乙醇的用量也大大减少。最终的酒精沉淀浓度的掌握必须正确,避免非所需的酶解水解产物也一起再度变性沉淀,所以这时操作酒精的加入要按先慢后快、搅拌速度要先快后慢的均匀原则。从酒精沉淀浓度30~64度,CS 往往呈糖浆粘稠状物沉淀,我们收集后用2倍体积的70度酒精反复洗涤多次,即大量的含水乙醇带走相当的盐、CS 的完全脱盐又可除去不纯物,再用浓酒精、丙酮脱水即可甩干后低温烘干或真空干燥成类白色疏松无定型散状产品[张天民 1981,吴梧桐等 1993]。

(3)工艺中温度控制很重要,提取采用循环水浴加热、加工控制装置。碱提取温控在38℃~42℃,酸碱中和温控在35℃以下,酶解温控在40℃~45℃,杀酶去热源温度达90℃~95℃即可(短时间),沉淀结晶用冷酒精温控在30℃以下,烘干温度在60℃以下2小时,这与成品色泽、纯度大有关系,有时还会影响收率。

(4)过滤材质、过滤速度、过滤液澄清度是本工艺另一个重要因素。本工艺过滤布是用长纤维涤纶帆布,每条过滤布5~6米长,应用折叠式过滤法过滤。在去碱性蛋白过滤前加一道双层纱布粗滤,为了加快精滤速度,在提取液中加入少量滑石粉助滤,总的说滤液要澄清、过滤速度

要快。如果滤液混浊,最后产品含氮量不能达标,如过滤速度慢、不能规模性生产而且在酸性溶液中(去碱性蛋白时)时间加长,CS容易分解、色泽加深(最后精滤可用活性炭或白陶土作助滤,达到脱色、去热源等)。最后过滤布中残留液最好要压滤或甩干,以上压滤液或甩干液集中再过滤,尽量提高滤液量来提高成品的收得率。

(5)操作中最后的CS酒精沉淀析出,为了不使大量杂质同时沉淀下来,操作上只要求静止沉淀片刻就把上层酒精液抽出,于贮存池内待回收。但是抽出的上层酒精废液中有一部分没沉淀完全的CS也被带走,我们为了提高产品收率特要求把废酒精集中于用瓷砖贴面的废液池中沉淀3~5天后上层废酒精再回收,一个月集中收集池底的沉淀物再进行溶解、脱色、过滤、再结晶、收集烘干、检验合格后作片用粉原料待用。这样CS的总收率可提高2%~4%的百分比。

参 考 文 献

- 中华人民共和国卫生部药典委员会. 1989. 中华人民共和国卫生部药品标准. 生化药品第一册, 43~44.
- 马淑涛等. 1991. 部颁标准硫酸软骨素生产工艺的探讨. 生化药物杂志, (3):30~33.
- 刘 智等. 1990. 硫酸软骨素生产新工艺(稀碱浓盐法). 中国医药工业杂志, 21(3):106.
- 沈瀚江等. 1990. 不同工艺制备的硫酸软骨素的理化性质. 中国医药工业杂志, 21(5):208~210.
- 吴梧桐等. 1993. 生物制药工艺学. 北京:中国医药科技出版社. 385~400.
- 张天民等. 1981. 动物生化制药学. 北京:人民卫生出版社. 207~223.

DEVELOPMENT AND PROCESSING CONTROL OF CHONDROITIN SULFATE

LI Nan

(Zhenjiang Biochemical Pharmaceutical Factory of Jiangsu Province, 212004)

ABSTRACT The clinical practice of chondroitin sulfate such as its therapeutic or inhibition effects on hearing barrier, tumor and diseases of liver, kidney, cardiovascular system and eyes was approached in this paper. In addition, in order to meet the required standard the redevelopment and processing technique of chondroitin sulfate are discussed in the selection of proper processing flow, control of temperature, purification of product, etc.

KEYWORDS chondroitin sulfate (CS), clinical practice, re-development, processing technique