

一种低分子肝素达肝素钠标准品库及其制备方法

技术领域

本发明涉及生物医药领域，具体地说是一种低分子肝素达肝素钠标准品库及其制备方法。

背景技术

肝素（普通肝素即未分级肝素）是一种高度硫酸化的糖胺聚糖，在体内和体外都有抗凝血作用。但普通肝素存在生物利用度低、副作用大和给药次数过频等缺陷，而其换代产品低分子肝素如达特安瑞不仅抗血栓作用优于普通肝素，而且具有生物利用度高、体内半衰期长、出血倾向小等优点。肝素的抗凝血活性分为抗栓活性（FXa）和抗凝（FIIa）活性两大类，在抗血栓形成的过程中，抗 FXa 活性与抗 FIIa 活性的作用都是必需的，抗血栓作用的衡量标准用抗 FXa/FIIa 值表示，其值越大，表示抗血栓作用越强，出血倾向越小。低分子达特安瑞是由经亚硝酸降解而得到的低分子肝素的一种，是普通肝素的一种升级产品，相对平均分子量在 5600~6400 Da 之间，平均值在 6000 Da，其主要组成部分为在糖链的非还原末端具有 2 位氧硫酸化的艾多糖醛酸，在糖链的还原末端具有 6 位氧硫酸化的 2,5-脱氢甘露醛。用于治疗急性深静脉血栓；急性肾功能衰竭和慢性肾功能不全者进行血液透析和血液过滤期间防止在体外循环系统中发生凝血；不稳定型冠状动脉疾病；预防与手术有关的血栓形成。具有体内半衰期延长、生物利用度高等优点，是目前主流的抗血栓类的药物。

低分子达特安瑞（Dalteparin Sodium）是未分级肝素在特定的温度和 pH 条件下，与亚硝酸盐作用，使未分级肝素中的 N-硫酸葡萄糖胺反应脱去 HSO_4^- 形成 $-\text{NH}_2$ ， $-\text{NH}_2$ 与亚硝酸盐发生重氮化反应，在放出 N_2 的同时糖苷键断裂，电子转移，缩环生成 2,5-脱氢甘露醛，后者经还原糖或脱氢形成甘露糖醇。它与肝素产品相比，有着更好的抗血栓活性，更小的出血危险，以及更低的对血小板的影响。但是在现有技术中，制备的低分子肝素样品拥有纯度不够、分子量分布不集中、杂质残留过多等缺点。而想要利用低分子肝素达肝素钠形成可以用于研究的标准品库，则需要高品质、高质量的低分子肝素达肝素钠，这些都是目前的工艺所不能解决的问题。

发明内容

本发明的第一目的是针对上述现有技术的不足，提供一种低分子肝素达肝素钠标准品

库的制备方法。与其他低分子肝素钠相比，该方法制备的高品质低分子肝素达肝素钠标准品库有着非常好的稳定性和抗血栓活性。

本发明的第二目的在于提供一种低分子肝素达肝素钠标准品库，其由上述低分子肝素达肝素钠标准品库的制备方法制备得到，具有纯度高、分子量分布集中、抗血栓活性好的优点。

本发明的技术任务是按以下方式实现的：

一种低分子肝素达肝素钠标准品库的制备方法，包括以下步骤：

1) 酶解：向粗品肝素钠中加入 10~15 倍量水（质量比），溶解得原料液，调节原料液温度至 35℃~39℃，加入复合酶，搅拌反应 10~15 小时，去沉淀，上清液过滤，收集滤液；

2) 氧化：控制步骤 1) 所得滤液温度至 40℃~50℃，调整滤液 pH 值至 9~11，加入 0.1%~0.5% 滤液体积的过氧化氢，搅拌反应 6~8 小时，得纯化液；

3) 超滤除杂：采用截留分子量为 3,000 Da~5,000 Da 的超滤膜对步骤 2) 所得纯化液进行切向流循环超滤，循环超滤 5~10 小时，收集截留液；

4) 醇沉除杂：截留液醇沉除杂，沉淀物干燥称重；

5) 降解：向步骤 4) 所得沉淀物中加 7~8 倍量的水溶解，用盐酸溶液调节料液 pH 值至 2.0~4.0，调整料液温度至 15~30℃，加入适量亚硝酸钠，搅拌反应 90~120 分钟；所述亚硝酸钠的加入量为步骤 4) 所得沉淀物质量的 2%~3%；

6) 还原：降解反应完成后，迅速用氢氧化钠溶液调节料液的 pH 值至 9.0~10.0，加入适量硼氢化钠，搅拌反应 10~15 小时，反应完成后用盐酸溶液调节 pH 值至 2.0~5.0，继续搅拌反应 15~30 分钟，反应完成后，用氢氧化钠溶液调节料液的 pH 值至 6~8，并加入适量的氯化钠，搅拌溶解并过滤，向滤液中加入 3~5 倍体积的醇液，搅拌后静置 12~15 小时；去上清液，向沉淀物中加入水，搅拌使其溶解，并进行 20~30 分钟紫外照射；所述硼氢化钠的加入量为步骤 4) 所述沉淀物质量的 0.9%~1.1%；氯化钠与料液的质量体积比为 0.9%~1.1%；

7) 碱氧纯化：用氢氧化钠溶液调节料液 pH 值至 9~10，加入 1~3% 料液体积的过氧化氢，20~30℃ 料液温度下搅拌反应 6~8 小时；氧化完毕后，醇沉，并将沉淀物用适量水溶解，所用水的量为步骤 4) 所述沉淀物质量的 3~4 倍；

8) 超滤精制：将步骤 7) 所得溶液用 5000 Da~6000 Da 的膜循环超滤，收集截留液；截留液经 0.22 μm 的膜超滤，得滤液，调节滤液 pH 值至 6.4~7.4；

9) 冻干：将滤液冻干，得低分子肝素达肝素钠标准品库。

优选的，所述复合酶包括木瓜蛋白酶、核糖核酸酶 II 及脱氧核糖核酸酶 I，木瓜蛋白酶的用量为肝素钠粗品重量的 1%~2%，核糖核酸酶 II 的用量为肝素钠粗品重量的 0.5%~1%，

脱氧核糖核酸酶 I 的用量为肝素钠粗品重量的 0.5%~1%。

步骤 4)、步骤 7) 中, 可以利用现有技术中公知的醇沉方法完成醇沉操作, 但是, 为了得到更好的提纯效果, 优选以下具体方法实现:

步骤 4) 醇沉除杂时, 向步骤 3) 所得的截留液中加入 0.6~0.8 倍体积的甲醇, 沉淀 14~18 小时, 分离得沉淀物; 再将沉淀物加水溶解, 向溶液中加入 1~1.2 倍体积的甲醇, 沉淀 14~18 小时, 分离得沉淀物, 将沉淀物真空干燥并称重;

步骤 7) 醇沉的具体过程: 用盐酸溶液调节料液 pH 至 6~8, 向其中加入适量氯化钠及 2~3 倍体积的乙醇, 搅拌 20~30 分钟以后, 静置沉淀 8~10 小时, 去上清液; 氯化钠与料液的质量体积比为 1%~3%。

步骤 6) 中, 所述醇液优选为甲醇溶液或乙醇溶液。

一种低分子肝素达肝素钠标准品库, 由上述低分子肝素达肝素钠标准品库的制备方法制备得到, 低分子肝素达肝素钠标准品库的分子量为 5800 Da~6200 Da, 分子量分布: <1600 的比例 ≤40.0%; >4500 的比例 ≤11.0%。

与现有技术相比, 本发明的低分子肝素达肝素钠标准品库的制备方法具有以下突出的有益效果:

(一) 以复合酶解和改良的亚硝酸盐降解法为基础, 以粗品肝素钠为原料, 选用木瓜蛋白酶、核糖核酸酶 II 等蛋白和核酸酶优化组合, 对粗品肝素中蛋白和核酸进行高效降解, 并结合膜技术一次性去除蛋白和核酸杂质, 避免了传统工艺中从粗品到精品制备反复除杂的繁琐过程;

(二) 未分级肝素在特定的温度和 pH 条件下, 与亚硝酸盐作用, 使未分级肝素中的 N-硫酸葡萄糖胺反应脱去 HSO_4^- 形成 $-\text{NH}_2$, $-\text{NH}_2$ 与亚硝酸盐发生重氮化反应, 在放出 N_2 的同时糖苷键断裂, 电子转移, 缩环生成 2,5-脱氢甘露醛, 后者经还原糖或脱氢形成甘露糖醇, 后通过低分子膜分离技术获得具有特定平均分子量 (5800- 6200) 的低分子肝素达肝素钠标准品库;

(三) 通过本发明方法制备得到的低分子肝素达肝素钠标准品库平均分子量为 5800~6200, 分子量分布: <1600 的比例 ≤40.0%; >4500 的比例 ≤11.0%; 抗 FXa/FIIa > 30, 抗 FXa 效价: 195~210 IU/mg, 抗 FIIa 效价: <5.0 IU/mg, 与其他低分子肝素钠相比, 有着非常好的稳定性和抗血栓活性, 产品质量超越欧洲药典标准, 有望成为新生代的肝素类抗血栓药物。

(四) 本发明所提供的低分子肝素达肝素钠标准品库, 其分子量为 5800 Da~6200 Da, 分子量分布: <1600 的比例 ≤40.0%; >4500 的比例 ≤11.0%。具有纯度高、分子量分布集中等优点, 达到科研活动中的对于标准品的严苛要求, 非常适合作为科研活动中的标准品

使用。

具体实施方式

以具体实施例对本发明的低分子肝素达肝素钠标准品库的制备方法作以下详细地说明。

制备实施例 1:

具体步骤:

1) 酶解: 称取粗品肝素钠 20 mg, 向其中加入 240 mg 水, 溶解得原料液; 调节原料液温度至 37℃, 分别加入木瓜蛋白酶 0.2 mg、核糖核酸酶 II 0.1 mg 及脱氧核糖核酸酶 I 0.1 mg, 搅拌反应 12 小时, 去沉淀, 上清液过滤, 收集得第一滤液。

2) 氧化: 控制步骤 1) 所得第一滤液温度至 45℃, 用 20% (w/v) 氢氧化钠溶液调整第一滤液的 pH 值至 9.5~10, 加入 2.4 μl 过氧化氢, 搅拌反应 7 小时, 得第一纯化液。

3) 超滤除杂: 采用截留分子量为 4,000 Da 的超滤膜对步骤 2) 所得第一纯化液进行切向流循环超滤, 循环超滤 7 小时, 收集得第一截留液 63.2 μl。

4) 醇沉除杂: 向步骤 3) 所得的第一截留液中加入 50.4 μl 甲醇, 沉淀 16 小时, 分离得初级沉淀物; 再将初级沉淀物加水溶解至 60 μl, 并加入 60 μl 甲醇, 沉淀 16 小时, 分离得第一沉淀物, 将第一沉淀物真空干燥并称重 (16.6 mg)。

5) 降解: 向步骤 4) 所得第一沉淀物中加 120 mg 水溶解, 用 2 mol/L 盐酸溶液调节 pH 值至 2.0~4.0, 调整温度至 15℃, 加入 0.4 mg 亚硝酸钠, 搅拌反应 90 分钟, 得到第一料液。

6) 还原: 降解反应完成后, 迅速用 20% (w/v) 的氢氧化钠溶液调节第一料液的 pH 值至 9.0~10.0, 加入 0.17 mg 硼氢化钠, 搅拌反应 12 小时, 得到第二料液。反应完成后用 4 mol/L 的盐酸溶液调节第二料液的 pH 值至 2.0~5.0, 继续搅拌反应 20 分钟, 得到第三料液。反应完成后, 再用 20% (w/v) 氢氧化钠溶液调节第三料液的 pH 值至 6.5~7, 并加入 1% (w/v) 第三料液体积的 NaCl, 搅拌溶解并过滤, 得到第二滤液, 向第二滤液中加入 4 倍体积的药用乙醇, 搅拌后静置 14 小时, 去上清液, 得到第二沉淀物。向第二沉淀物中加入水至 120 μl, 搅拌使其溶解, 并进行 25 分钟紫外照射, 得到第四料液。

7) 碱氧纯化: 用 20% (w/v) 的氢氧化钠溶液调节第四料液 pH 值至 9.5~10, 加入 1.5% 第四料液体积的过氧化氢, 25℃ 的温度下搅拌反应 7 小时, 得到第五料液。氧化完毕后, 用 1mol/L 的盐酸溶液调节第五料液的 pH 至 6.5~7, 向其中加入 1.5% (w/v) 第五料液体积的 NaCl 及 2.5 倍第五料液体积的乙醇, 搅拌 25 分钟以后, 静置沉淀 9 小时, 去上清液, 得到第三沉淀物。将第三沉淀物用 60 mg 水溶解, 得到第二纯化液。

8) 超滤精制: 将步骤 7) 所得第二纯化液用 5000 Da 的膜循环超滤, 收集得到第二截留液。第二截留液经 0.22 μm 的膜超滤, 得第三滤液, 调节第三滤液的 pH 值至 6.4~7。

9) 冻干: 将调节 pH 后第三滤液冻干, 得低分子肝素达肝素钠标准品库成品 8.6 mg。

制备实施例 2:

具体步骤:

1) 酶解: 称取粗品肝素钠 40 mg, 向其中加入 400 mg 水, 溶解得原料液; 调节原料液温度至 37 $^{\circ}\text{C}$, 分别加入木瓜蛋白酶 0.8 mg、核糖核酸酶 II 0.2 mg 及脱氧核糖核酸酶 I 0.2 mg, 搅拌反应 12 小时, 去沉淀, 上清液过滤, 收集得第一滤液。

2) 氧化: 控制步骤 1) 所得第一滤液温度至 45 $^{\circ}\text{C}$, 用 20% (w/v) 氢氧化钠溶液调整第一滤液的 pH 值至 9.5~10, 加入 5 μl 过氧化氢, 搅拌反应 7 小时, 得第一纯化液。

3) 超滤除杂: 采用截留分子量为 4000 Da 的超滤膜对步骤 2) 所得第一纯化液进行切向流循环超滤, 循环超滤 7 小时, 收集得第一截留液 140 μl 。

4) 醇沉除杂: 向步骤 3) 所得的第一截留液中加入 112 μl 甲醇, 沉淀 16 小时, 分离得初级沉淀物。再将初级沉淀物加水溶解至 140 μl , 并加入 160 μl 甲醇, 沉淀 16 小时, 分离得第一沉淀物, 将第一沉淀物真空干燥并称重 (34.4 mg)。

5) 降解: 向步骤 4) 所得第一沉淀物中加 240 mg 水溶解, 用 2 mol/L 盐酸溶液调节 pH 值至 2.0~4.0, 调整温度至 30 $^{\circ}\text{C}$, 加入 0.8 mg 亚硝酸钠, 搅拌反应 120 分钟, 得到第一料液。

6) 还原: 降解反应完成后, 迅速用 20% (w/v) 的氢氧化钠溶液调节第一料液的 pH 值至 9.0~10.0, 加入 0.34 mg 硼氢化钠, 搅拌反应 12 小时, 得到第二料液。反应完成后用 4 mol/L 的盐酸溶液调节第二料液的 pH 值至 2.0~5.0, 继续搅拌反应 30 分钟, 得到第三料液。反应完成后, 再用 20% (w/v) 的氢氧化钠溶液调节第三料液的 pH 值至 6.5~7, 并加入 1% (w/v) 第三料液体积的 NaCl, 搅拌溶解并过滤, 得到第二滤液。向第二滤液中加入 4 倍体积的药用乙醇, 搅拌后静置 14 小时, 去上清液, 得到第二沉淀物。向第二沉淀物中加入水至 240 μl , 搅拌使其溶解, 并进行 25 分钟紫外照射, 得到第四料液。

7) 碱氧纯化: 用 20% (w/v) 的氢氧化钠溶液调节第四料液的 pH 值至 9.5~10, 加入 1.5% 第四料液体积的过氧化氢, 25 $^{\circ}\text{C}$ 料液温度下搅拌反应 7 小时, 得到第五料液。氧化完毕后, 用 1 mol/L 的盐酸溶液调节第五料液的 pH 至 6.5~7, 向其中加入 1.5% (w/v) 第五料液体积的 NaCl 及 2.5 倍第五料液体积的乙醇, 搅拌 25 分钟以后, 静置沉淀 9 小时, 去上清液, 得到第三沉淀物。将第三沉淀物用 120 mg 水溶解, 得到第二纯化液。

8) 超滤精制: 将步骤 7) 所得第二纯化液用 5000 Da 的膜循环超滤, 收集得到第二截留液。第二截留液经 0.22 μm 的膜超滤, 得第三滤液, 调节第三滤液的 pH 值至 6.4~7。

9) 冻干: 将调节 pH 后第三滤液冻干, 得低分子肝素达肝素钠标准品库 18.4 mg。

实施例 3:

具体步骤:

1) 酶解: 称取粗品肝素钠 40 mg, 向其中加入 400 mg 水, 溶解得原料液; 调节原料液温度至 35℃, 分别加入木瓜蛋白酶 0.4 mg、核糖核酸酶 II 0.2 mg 及脱氧核糖核酸酶 I 0.2 mg, 搅拌反应 10 小时, 去沉淀, 上清液过滤, 收集得第一滤液。

2) 氧化: 控制步骤 1) 所得第一滤液温度至 40℃, 用 20% (w/v) 氢氧化钠溶液调整第一滤液 pH 值至 9.0~10.0, 加入 4 μl 过氧化氢, 搅拌反应 6 小时, 得第一纯化液。

3) 超滤除杂: 采用截留分子量为 3000 Da 的超滤膜对步骤 2) 所得第一纯化液进行切向流循环超滤, 循环超滤 5 小时, 收集得第一截留液 140 μl。

4) 醇沉除杂: 向步骤 3) 所得的第一截留液中加入 84 μl 甲醇, 沉淀 14 小时, 分离得初级沉淀物; 再将初级沉淀物加水溶解至 140 μl, 并加入 140 μl 甲醇, 沉淀 14 小时, 分离得第一沉淀物, 将第一沉淀物真空干燥并称重 (32 mg)。

5) 降解: 向步骤 4) 所得第一沉淀物中加 224 mg 水溶解, 用 2 mol/L 盐酸溶液调节 pH 值至 2.0~3.0, 调整温度至 15℃, 加入 0.64 mg 亚硝酸钠, 搅拌反应 90 分钟, 得到第一料液。

6) 还原: 降解反应完成后, 迅速用 20% (w/v) 的氢氧化钠溶液调节第一料液的 pH 值至 9.0~10.0, 加入 0.29 mg 硼氢化钠, 搅拌反应 10 小时, 得到第二料液。反应完成后用 4 mol/L 的盐酸溶液调节第二料液的 pH 值至 2.0~3.0, 继续搅拌反应 15 分钟, 得到第三料液。反应完成后, 再用 20% (w/v) 的氢氧化钠溶液调节第三料液的 pH 值至 6.0~6.5, 并加入 0.9% (w/v) 第三料液体积的 NaCl, 搅拌溶解并过滤得到第二滤液, 向第二滤液中加入 3 倍体积的药用乙醇, 搅拌后静置 12 小时, 去上清液, 得到第二沉淀物。向第二沉淀物中加入水至 240 μl, 搅拌使其溶解, 并进行 20 分钟紫外照射, 得到第四料液。

7) 碱氧纯化: 用 20% (w/v) 的氢氧化钠溶液调节第四料液的 pH 值至 9.0~9.5, 加入 1% 第四料液体积的过氧化氢, 20℃ 的温度下搅拌反应 6 小时, 得到第五料液。氧化完毕后, 用 1 mol/L 的盐酸溶液调节第五料液 pH 至 6.0~6.5, 向其中加入 1% (w/v) 第五料液体积的 NaCl 及 2 倍第五料液体积的乙醇, 搅拌 20 分钟以后, 静置沉淀 8 小时, 去上清液, 得到第三沉淀物, 将第三沉淀物用 120 mg 水溶解, 得到第二纯化液。

8) 超滤精制: 将步骤 7) 所得第二纯化液用 5000 Da 的膜循环超滤, 收集得到第二截留液: 第二截留液经 0.22 μm 的膜超滤, 得第三滤液, 调节第三滤液 pH 值至 6.4~7。

9) 冻干: 将调节 pH 后第三滤液冻干, 得低分子肝素达肝素钠标准品库 17 mg。

实施例 4:

具体步骤:

1) 酶解: 称取粗品肝素钠 40 mg, 向其中加入 600 mg 水, 溶解得原料液; 调节原料液温度至 39℃, 分别加入木瓜蛋白酶 0.8 mg、核糖核酸酶 II 0.4 mg 及脱氧核糖核酸酶 I 0.4 mg, 搅拌反应 15 小时, 去沉淀, 上清液过滤, 收集得第一滤液。

2) 氧化: 控制步骤 1) 所得第一滤液温度至 50℃, 用 20% (w/v) 氢氧化钠溶液调整第一滤液 pH 值至 10.5~11.0, 加入 6 μl 过氧化氢, 搅拌反应 8 小时, 得第一纯化液。

3) 超滤除杂: 采用截留分子量为 5000 Da 的超滤膜对步骤 2) 所得第一纯化液进行切向流循环超滤, 循环超滤 10 小时, 收集得第一截留液 180 μl。

4) 醇沉除杂: 向步骤 3) 所得的第一截留液中加入 144 μl 甲醇, 沉淀 18 小时, 分离得初级沉淀物; 再将初级沉淀物加水溶解至 180 μl, 并加入 216 μl 甲醇, 沉淀 18 小时, 分离得第一沉淀物, 将第一沉淀物真空干燥并称重 (37 mg)。

5) 降解: 向步骤 4) 所得第一沉淀物中加 296 mg 水溶解, 用 2 mol/L 盐酸溶液调节 pH 值至 3.0~4.0, 调整温度至 30℃, 加入 1.11 mg 亚硝酸钠, 搅拌反应 120 分钟, 得到第一料液。

6) 还原: 降解反应完成后, 迅速用 20% (w/v) 的氢氧化钠溶液调节第一料液的 pH 值至 9.5~10.0, 加入 0.41 mg 硼氢化钠, 搅拌反应 15 小时, 得到第二料液。反应完成后用 4 mol/L 的盐酸溶液调节第二料液的 pH 值至 4.0~5.0, 继续搅拌反应 30 分钟, 得到第三料液。反应完成后, 再用 20% (w/v) 的氢氧化钠溶液调节第三料液的 pH 值至 7.5~8.0, 并加入 1.1% (w/v) 第三料液体积的 NaCl, 搅拌溶解并过滤得到第二滤液, 向第二滤液中加入 5 倍体积的药用乙醇, 搅拌后静置 15 小时, 去上清液, 得到第二沉淀物。向第二沉淀物中加入水至 300 μl, 搅拌使其溶解, 并进行 30 分钟紫外照射, 得到第四料液。

7) 碱氧纯化: 用 20% (w/v) 的氢氧化钠溶液调节第四料液的 pH 值至 9.5~10.0, 加入 3% 第四料液体积的过氧化氢, 30℃ 的温度下搅拌反应 8 小时, 得到第五料液。氧化完毕后, 用 1 mol/L 的盐酸溶液调节第五料液 pH 至 7.5~8.0, 向其中加入 3% (w/v) 第五料液体积的 NaCl 及 3 倍第五料液体积的乙醇, 搅拌 20 分钟以后, 静置沉淀 10 小时, 去上清液, 得到第三沉淀物, 将第三沉淀物用 160 mg 水溶解, 得到第二纯化液。

8) 超滤精制: 将步骤 7) 所得第二纯化液用 6000 Da 的膜循环超滤, 收集得到第二截留液: 第二截留液经 0.22 μm 的膜超滤, 得第三滤液, 调节第三滤液 pH 值至 7~7.4。

9) 冻干: 将调节 pH 后的第三滤液冻干, 得低分子肝素达肝素钠标准品库 19 mg。

实施例 5:

具体步骤:

1) 酶解: 称取粗品肝素钠 40 mg, 向其中加入 500 mg 水, 溶解得原料液; 调节原料

液温度至 36℃，分别加入木瓜蛋白酶 0.48 mg、核糖核酸酶 II 0.32 mg 及脱氧核糖核酸酶 I 0.32 mg，搅拌反应 13 小时，去沉淀，上清液过滤，收集得第一滤液。

2) 氧化：控制步骤 1) 所得第一滤液温度至 45℃，用 20% (w/v) 氢氧化钠溶液调整第一滤液 pH 值至 10.0~10.5，加入 5 μl 叔丁基过氧化氢，搅拌反应 8 小时，得第一纯化液。

3) 超滤除杂：采用截留分子量为 4000 Da 的超滤膜对步骤 2) 所得第一纯化液进行切向流循环超滤，循环超滤 8 小时，收集得第一截留液 160 μl。

4) 醇沉除杂：向步骤 3) 所得的第一截留液中加入 130 μl 甲醇，沉淀 16 小时，分离得初级沉淀物；再将初级沉淀物加水溶解至 160 μl，并加入 180 μl 甲醇，沉淀 17 小时，分离得第一沉淀物，将第一沉淀物真空干燥并称重 (36.4 mg)。

5) 降解：向步骤 4) 所得第一沉淀物中加 280 mg 水溶解，用 2 mol/L 盐酸溶液调节 pH 值至 3.0~3.5，调整温度至 25℃，加入 0.78 mg 亚硝酸钠，搅拌反应 100 分钟，得到第一料液。

6) 还原：降解反应完成后，迅速用 20% (w/v) 的氢氧化钠溶液调节第一料液的 pH 值至 9.5~10.0，加入 0.36 mg 硼氢化钾，搅拌反应 12 小时，得到第二料液。反应完成后用 4 mol/L 的盐酸溶液调节第二料液的 pH 值至 4.0~5.0，继续搅拌反应 20 分钟，得到第三料液。反应完成后，再用 20% (w/v) 的氢氧化钠溶液调节第三料液的 pH 值至 7.5~8.0，并加入 1.0% (w/v) 第三料液体积的 NaCl，搅拌溶解并过滤得到第二滤液，向第二滤液中加入 4 倍体积的药用乙醇，搅拌后静置 13 小时，去上清液，得到第二沉淀物。向第二沉淀物中加入水至 260 μl，搅拌使其溶解，并进行 30 分钟紫外照射，得到第四料液。

7) 碱氧纯化：用 20% (w/v) 的氢氧化钠溶液调节第四料液的 pH 值至 9.5~10.0，加入 3% 第四料液体积的过氧化氢，30℃ 的温度下搅拌反应 8 小时，得到第五料液。氧化完毕后，用 1 mol/L 的盐酸溶液调节第五料液 pH 至 7.5~8.0，向其中加入 2% (w/v) 第五料液体积的 NaCl 及 2.5 倍第五料液体积的乙醇，搅拌 25 分钟以后，静置沉淀 9 小时，去上清液，得到第三沉淀物，将第三沉淀物用 160 mg 水溶解，得到第二纯化液。

8) 超滤精制：将步骤 7) 所得第二纯化液用 5000 Da 的膜循环超滤，收集得到第二截留液：第二截留液经 0.25 μm 的膜超滤，得第三滤液，调节第三滤液 pH 值至 7~7.4。

9) 冻干：将调节 pH 后的第三滤液冻干，得低分子肝素钠标准品库 19.6 mg。

实施例 6:

具体步骤:

1) 酶解：称取粗品肝素钠 40 mg，向其中加入 460 mg 水，溶解得原料液；调节原料液温度至 36℃，分别加入木瓜蛋白酶 0.72 mg、核糖核酸酶 II 0.32 mg 及脱氧核糖核酸酶 I 0.2 mg，搅拌反应 12 小时，去沉淀，上清液过滤，收集得第一滤液。

2) 氧化: 控制步骤 1) 所得第一滤液温度至 45°C, 用 20% (w/v) 氢氧化钠溶液调整第一滤液 pH 值至 9.5~10.0, 加入 8 mg 过氧化钠, 搅拌反应 8 小时, 得第一纯化液。

3) 超滤除杂: 采用截留分子量为 3000 Da 的超滤膜对步骤 2) 所得第一纯化液进行切向流循环超滤, 循环超滤 10 小时, 收集得第一截留液 180 μl。

4) 醇沉除杂: 向步骤 3) 所得的第一截留液中加入 140 μl 甲醇, 沉淀 15 小时, 分离得初级沉淀物; 再将初级沉淀物加水溶解至 180 μl, 并加入 180 μl 甲醇, 沉淀 16 小时, 分离得第一沉淀物, 将第一沉淀物真空干燥并称重 (35.6 mg)。

5) 降解: 向步骤 4) 所得第一沉淀物中加 260 mg 水溶解, 用 2 mol/L 盐酸溶液调节 pH 值至 2.0~2.5, 调整温度至 20°C, 加入 0.76 mg 亚硝酸钠, 搅拌反应 90 分钟, 得到第一料液。

6) 还原: 降解反应完成后, 迅速用 20% (w/v) 的氢氧化钠溶液调节第一料液的 pH 值至 9.5~10.0, 加入 0.37 mg 氢化铝锂, 搅拌反应 12 小时, 得到第二料液。反应完成后用 4 mol/L 的盐酸溶液调节第二料液的 pH 值至 4.0~5.0, 继续搅拌反应 20 分钟, 得到第三料液。反应完成后, 再用 20% (w/v) 的氢氧化钠溶液调节第三料液的 pH 值至 7.5~8.0, 并加入 1.0% (w/v) 第三料液体积的 NaCl, 搅拌溶解并过滤得到第二滤液, 向第二滤液中加入 4 倍体积的药用乙醇, 搅拌后静置 13 小时, 去上清液, 得到第二沉淀物。向第二沉淀物中加入水至 260 μl, 搅拌使其溶解, 并进行 30 分钟紫外照射, 得到第四料液。

7) 碱氧纯化: 用 20% (w/v) 的氢氧化钠溶液调节第四料液的 pH 值至 9.5~10.0, 加入 3% 第四料液体积的叔丁基过氧化氢, 30°C 的温度下搅拌反应 8 小时, 得到第五料液。氧化完毕后, 用 1 mol/L 的盐酸溶液调节第五料液 pH 至 7.5~8.0, 向其中加入 3% (w/v) 第五料液体积的 NaCl 及 3 倍第五料液体积的乙醇, 搅拌 25 分钟以后, 静置沉淀 10 小时, 去上清液, 得到第三沉淀物, 将第三沉淀物用 200 mg 水溶解, 得到第二纯化液。

8) 超滤精制: 将步骤 7) 所得第二纯化液用 4000 Da 的膜循环超滤, 收集得到第二截留液: 第二截留液经 0.2 μm 的膜超滤, 得第三滤液, 调节第三滤液 pH 值至 6.5~7.0。

9) 冻干: 将调节 pH 后的第三滤液冻干, 得低分子肝素达肝素钠标准品库 16.8 mg。

试验例: 参照美国药典方法对样品进行活性检测

以制备实施例 1~6 所得低分子肝素达肝素钠标准品库为样品进行试验, 试验结果见表一。

表一:

检测项	抗 FXa (抗血栓作用)	分子量及其分布	生物利用度	给药频次	副作用
实施例 1	202 IU/mg	平均分子量为 6034 Da;	>95%	每日 1 次	不会引起出血、

		<3000 的含量 8%; >8000 的含量为 15%			血小板减少等副作用
实施例 2	205 IU/mg	平均分子量为 6097 Da; <3000 的含量 9%; >8000 的含量为 16%	>95%	每日 1 次	不会引起出血、血小板减少等副作用
实施例 3	195 IU/mg	平均分子量为 5800 Da; <3000 的含量 11%; >8000 的含量为 13%	>95%	每日 1 次	不会引起出血、血小板减少等副作用
实施例 4	201 IU/mg	平均分子量为 5950 Da; <3000 的含量 10%; >8000 的含量为 14%	>95%	每日 1 次	不会引起出血、血小板减少等副作用
实施例 5	210 IU/mg	平均分子量为 6130 Da; <3000 的含量 8%; >8000 的含量为 17%	>95%	每日 1 次	不会引起出血、血小板减少等副作用
实施例 6	207 IU/mg	平均分子量为 6200 Da; <3000 的含量 7%; >8000 的含量为 17%	>95%	每日 1 次	不会引起出血、血小板减少等副作用
Dalteparin Sodium Injection (医院购买)	178 IU/mg	平均分子量为 5656 Da; <3000 的含量 12.5%; >8000 的含量为 18%	>95%	每日 1 次	不会引起出血、血小板减少等副作用
Dalteparin Sodium 标准(欧洲药典)	150~210 IU/mg	平均分子量为 5600~6400 Da; <3000 的含量 ≤13%; >8000 的含量 ≤15%~25%	>95%	每日 1 次	不会引起出血、血小板减少等副作用
其他低分子肝素钠标	95~125 IU/mg	平均分子量为 3800~5000 Da; 2000 以下含量应为 12.0%~20%;	70%~90%	每日 2 次	会有一些几率引起出血、血小板减少等副作

准(欧洲药典)		2000~8000 含量应为 68.0%~82.0%			用
普通肝素	170 IU/mg	>10000	25%~30 %	每日 1~2 次	极易引起出血 及血小板减少

由上述检测结果可知，本方法生产的低分子肝素达肝素钠标准品库符合欧洲药典标准，其平均分子量更接近于 6000 Da 的特征值，且抗血栓活性（抗 FXa）优于市场上销售的同类产品。

最后应说明的是：以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案，而非对其限制；尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明，但本领域的普通技术人员应当理解：其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改，或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换；而这些修改或者替换，并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围。

本发明的低分子肝素达肝素钠标准品库的制备方法具有以下突出的有益效果：

（一）以复合酶解和改良的亚硝酸盐降解法为基础，以粗品肝素钠为原料，选用木瓜蛋白酶、核糖核酸酶 II 等蛋白和核酸酶优化组合，对粗品肝素中蛋白和核酸进行高效降解，并结合膜技术一次性去除蛋白和核酸杂质，避免了传统工艺中从粗品到精品制备反复除杂的繁琐过程；

（二）未分级肝素在特定的温度和 pH 条件下，与亚硝酸盐作用，使未分级肝素中的 N-硫酸葡萄糖胺反应脱去 HSO_4^- 形成 $-\text{NH}_2$ ， $-\text{NH}_2$ 与亚硝酸盐发生重氮化反应，在放出 N_2 的同时糖苷键断裂，电子转移，缩环生成 2,5-脱氢甘露醛，后者经还原糖或脱氢形成甘露糖醇，后通过低分子膜分离技术获得具有特定平均分子量（5800- 6200）的低分子肝素达肝素钠标准品库；

（三）通过本发明方法制备得到的低分子肝素达肝素钠标准品库平均分子量为 5800~6200，分子量分布： <1600 的比例 $\leq 40.0\%$ ； >4500 的比例 $\leq 11.0\%$ ；抗 FXa/FIIa > 30 ，抗 FXa 效价：195~210 IU/mg，抗 FIIa 效价： < 5.0 IU/mg，与其他低分子肝素钠相比，有着非常好的稳定性和抗血栓活性，产品质量超越欧洲药典标准，有望成为新生代的肝素类抗血栓药物。

（四）本发明所提供的低分子肝素达肝素钠标准品库，其分子量为 5800 Da~6200 Da，分子量分布： <1600 的比例 $\leq 40.0\%$ ； >4500 的比例 $\leq 11.0\%$ 。具有纯度高、分子量分布集中等优点，达到科研活动中的对于标准品的严苛要求，非常时候作为科研活动中的标准品使用。

权利要求书

1. 一种低分子肝素达肝素钠标准品库的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

1) 酶解：向粗品肝素钠中加入 10~15 倍质量的水，溶解得原料液，调节所述原料液温度至 35℃~39℃，加入复合酶，搅拌反应 10~15 小时，去沉淀，上清液过滤，收集得到第一滤液；所述复合酶包括木瓜蛋白酶、核糖核酸酶 II 及脱氧核糖核酸酶 I，其中，所述木瓜蛋白酶的用量为所述粗品肝素钠重量的 1%~2%，所述核糖核酸酶 II 的用量为所述粗品肝素钠重量的 0.5%~1%，所述脱氧核糖核酸酶 I 的用量为所述粗品肝素钠重量的 0.5%~1%；

2) 氧化：控制所述第一滤液温度至 40℃~50℃，并调整所述第一滤液 pH 值至 9~11，加入 0.1%~0.5% 第一滤液体积的过氧化氢，搅拌反应 6~8 小时，得第一纯化液；

3) 超滤除杂：采用截留分子量为 3000 Da~5000 Da 的超滤膜对所述第一纯化液进行切向流循环超滤，循环超滤 5~10 小时，收集得到第一截留液；

4) 醇沉除杂：所述第一截留液醇沉除杂，得到第一沉淀物，对所述第一沉淀物干燥称重；

5) 降解：向所得第一沉淀物中加 7~8 倍质量的水溶解，用盐酸溶液调节 pH 值至 2.0~4.0，调整温度至 15~30℃，加入适量亚硝酸钠，搅拌反应 90~120 分钟，得到第一料液；所述亚硝酸钠的加入量为所述第一沉淀物质量的 2%~3%；

6) 还原：降解反应完成后，迅速用氢氧化钠溶液调节所述第一料液的 pH 值至 9.0~10.0，加入适量硼氢化钠，搅拌反应 10~15 小时，得到第二料液；反应完成后用盐酸溶液调节所述第二料液的 pH 值至 2.0~5.0，继续搅拌反应 15~30 分钟，得到第三料液；反应完成后，用氢氧化钠溶液调节所述第三料液的 pH 值至 6~8，并加入适量的氯化钠，搅拌溶解并过滤，得到第二滤液，向所述第二滤液中加入 3~5 倍体积的醇液，搅拌后静置 12~15 小时；去上清液，得到第二沉淀物，向所述第二沉淀物中加入水，搅拌使其溶解，并进行 20~30 分钟紫外照射，得到第四料液；所述硼氢化钠的加入量为所述第一沉淀物质量的 0.9%~1.1%；氯化钠与所述第三料液的质量体积比为 0.9%~1.1%；

7) 碱氧纯化：用氢氧化钠溶液调节所述第四料液 pH 值至 9~10，加入 1~3% 所述第四料液体积的过氧化氢，20~30℃ 温度下搅拌反应 6~8 小时，得到所述第五料液；对所述第五料液醇沉，得到第三沉淀物；并将所述第三沉淀物用适量水溶解得到第二纯化液，所用水的量为所述第三沉淀物质量的 3~4 倍；

8) 超滤精制：将步骤所述第二纯化液用 5000 Da~6000 Da 的膜循环超滤，收集得到第二截留液；所述第二截留液经 0.22 μm 的膜超滤，得第三滤液，调节所述第三滤液

pH 值至 6.4~7.4;

9) 冻干: 将调节 pH 值后的所述第三滤液冻干, 得低分子肝素达肝素钠标准品库。

2. 根据权利要求 1 所述的低分子肝素达肝素钠标准品库的制备方法, 其特征在于, 步骤 4) 醇沉除杂时, 向所述第一截留液中加入 0.6~0.8 倍体积的甲醇, 沉淀 14~18 小时, 分离得初级沉淀物; 再将所述初级沉淀物加水溶解得到初级沉淀物溶液, 向所述初级沉淀物溶液中加入 1~1.2 倍体积的甲醇, 沉淀 14~18 小时, 分离得所述第一沉淀物, 将所述第一沉淀物真空干燥并称重。

3. 根据权利要求 1 所述的低分子肝素达肝素钠标准品库的制备方法, 其特征在于, 步骤 6) 中, 所述醇液为甲醇溶液或乙醇溶液。

4. 根据权利要求 1 所述的低分子肝素达肝素钠标准品库的制备方法, 其特征在于, 步骤 7) 醇沉的具体过程为: 用盐酸溶液调节所述第五料液的 pH 值至 6~8, 加入适量氯化钠及 2~3 倍体积的乙醇, 搅拌 20~30 分钟以后, 静置沉淀 8~10 小时, 去上清液; 氯化钠与所述第五料液的质量体积比为 1%~3%。

5. 一种低分子肝素达肝素钠标准品库的制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

将粗品肝素的溶液与复合酶混合反应, 过滤后得到第一滤液;

将所述第一滤液调整为碱性, 与氧化剂混合发生氧化反应, 醇沉后得到第一沉淀物;

将所述第一沉淀物溶解, 并调整第一沉淀物的溶液为酸性, 与亚硝酸盐混合降解, 得到降解液;

所述降解液与还原剂混合发生还原反应。

6. 根据权利要求 5 所述的低分子肝素达肝素钠标准品库的制备方法, 其特征在于, 所述复合酶包括木瓜蛋白酶、核糖核酸酶 II 和脱氧核糖核酸酶 I; 其中, 所述木瓜蛋白酶的用量为所述粗品肝素重量的 1%~2%, 优选为 1.2%~1.8%, 所述核糖核酸酶 II 的用量为所述粗品肝素重量的 0.5%~1%, 优选为 0.5%~0.8%, 所述脱氧核糖核酸酶 I 的用量为所述粗品肝素重量的 0.5%~1%, 优选为 0.5%~0.8%。

7. 根据权利要求 5 或 6 所述的低分子肝素达肝素钠标准品库的制备方法, 其特征在于, 所述粗品肝素的溶液与所述复合酶混合反应的温度为 35°C~39°C, 反应时间为 10~15 小时。

8. 根据权利要求 5 所述的低分子肝素达肝素钠标准品库的制备方法, 其特征在于, 在所述第一滤液在与所述氧化剂反应之前, 将所述第一滤液的 pH 值调整至 9~11, 温度调整至 40°C~50°C。

9. 根据权利要求 5 或 8 所述的低分子肝素达肝素钠标准品库的制备方法, 其特征

在于，所述氧化剂选自由过氧化氢、叔丁基过氧化氢、过氧化钠和过氧化钾组成的组中的至少一种，优选地，所述氧化剂选自由过氧化氢、叔丁基过氧化氢组成的组中的至少一种，更优选地，所述氧化剂为过氧化氢，所述氧化剂的体积为所述第一滤液的0.1%~0.5%，优选为0.2%~0.3%。

10. 根据权利要求5~9任一项所述的低分子肝素达肝素钠标准品库的制备方法，其特征在于，所述第一滤液在与所述氧化剂混合发生氧化反应之后，醇沉之前还包括第一次除杂步骤：将所述第一滤液与所述氧化剂混合反应之后得到的纯化液，采用截留分子量为3000 Da~5000 Da的超滤膜进行切向流循环超滤，超滤时间为5~10小时，得到第一截留液。

11. 根据权利要求10所述的低分子肝素达肝素钠标准品库的制备方法，其特征在于，将所述第一截留液与醇溶剂混合，沉淀14~18小时，分离得到所述第一沉淀物；所述第一截留液与醇溶剂的体积比为1:0.6~0.8。

12. 根据权利要求5所述的低分子肝素达肝素钠标准品库的制备方法，其特征在于，在将所述第一沉淀物的溶液与所述亚硝酸盐混合降解之前，将所述第一沉淀物的溶液的pH值调整为2.0~4.0，温度调整为15℃~30℃；所述第一沉淀物的溶液与所述亚硝酸盐混合降解的反应时间为90~120分钟，所述亚硝酸盐的质量为所述第一沉淀物的2%~3%。

13. 根据权利要求12所述的低分子肝素达肝素钠标准品库的制备方法，其特征在于，所述还原剂选自由硼氢化钠、硼氢化钾和氢化铝锂组成的组中的至少一种，优选为硼氢化钠或硼氢化钾，更优选为硼氢化钠。

14. 根据权利要求12或13所述的低分子肝素达肝素钠标准品库的制备方法，其特征在于，所述降解液与所述还原剂反应之前，先将所述降解液的pH值调整至9.0~10.0；所述还原剂的质量为所述第一沉淀物的0.9%~1.1%；所述降解液与所述还原剂反应的时间为10~15小时。

15. 根据权利要求5~14任一项所述的低分子肝素达肝素钠标准品库的制备方法，其特征在于，还包括所述降解液与所述还原剂混合发生还原反应之后的后处理步骤：将所述降解液和所述还原剂反应之后得到的反应液的pH值调整至2.0~5.0，反应15~30分钟，再调整pH至6~8，过滤得到第二滤液；将所述第二滤液与3~5倍体积的醇溶剂混合，静置12~15小时，过滤得到第二沉淀物；将所述第二沉淀物溶解，并将所述第二沉淀物的溶液进行20~30分钟的紫外照射。

16. 根据权利要求15所述的低分子肝素达肝素钠标准品库的制备方法，其特征在于，还包括后处理步骤之后的第二次除杂步骤：将紫外照射后的所述第二沉淀物的溶

液进行氧化、醇沉，并采用 5000 Da~6000 Da 的膜循环超滤，得到第二截留液，将所述第二截留液经 0.2~0.25 μm 的膜超滤得到第三滤液，将所述第三滤液的 pH 调整至 6.4~7.4，并进行冻干处理。

17. 一种低分子肝素达肝素钠标准品库，其特征在于，由如权利要求 1~16 任一项所述的低分子肝素达肝素钠标准品库的制备方法制备得到，所述低分子肝素达肝素钠标准品库的分子量为 5800 Da~6200 Da，分子量分布： <1600 的比例 $\leq 40.0\%$ ； >4500 的比例 $\leq 11.0\%$ 。

18. 根据权利要求 17 所述的低分子肝素达肝素钠标准品库，其特征在于，所述低分子肝素达肝素钠标准品库的抗 FXa/FIIa >30 ，抗 FXa 效价：195~210 IU/mg，抗 FIIa 效价： <5.0 IU/mg。

摘要

本发明公开了一种低分子肝素达肝素钠标准品库及其制备方法，属于生物医药领域。该方法采用粗品肝素铈为原料，以复合酶解和改良的亚硝酸盐降解法为基础，经酶解、氧化、超滤除杂、醇沉除杂、降解、还原、碱氧纯化、超滤精制、冻干等步骤制得具有特定平均分子量（5600~6400）的低分子肝素达肝素钠标准品库，具有制备工艺简单、产品的稳定性和抗血栓活性好等特点。该低分子肝素达肝素钠标准品库具有纯度高、分子量分布集中等优点，达到科研活动中的对于标准品的严苛要求，非常适合作为科研活动中的标准品使用。