

硫酸软骨素快速提取法研究^{*}

罗 曼 蒋立科

(安徽农业大学生物工程系 合肥 230036)

摘要 硫酸软骨素是用于治疗冠心病、神经系统疼痛及链霉素引起的肝脏障碍和肝炎辅助治疗的药物,来源于动物的软骨。本文采用先高温蒸煮后加稀碱与酶解相结合的方法提取药物,并用氯仿反萃取,较其他方法缩短了原工艺一半流程,提高了纯度,减轻了碱盐提取所带来的环境污染。

关键词 硫酸软骨素,快速提取,氯仿,稀碱,酶解

中图分类号:Q538 文献标识:A 文章编号:0250-3263(2000)05-37-03

A Study on Fast Extraction of Chondroitin Sulfate

LUO Man JIANG Li-Ke

(Anhui Agriculture University Hefei 230036, China)

Abstract: Chondroitin sulfate, extracted from animal cartilages, is a medicine for curing coronary heart disease, pain in nervous system, liver disease brought about by streptomycin and hepatitis. The result of our study showed that the method of extracting chondroitin sulfate, boiling at high temperature and then adding thin alkali, enzyme and trans-extraction by chloroform, shortened the original extraction process by half, obtained higher purity extracts and had less environmental pollution.

Key words: Chondroitin sulfate; Fast extraction; Chloroform; Thin alkali and enzyme hydrolysis

硫酸软骨素(chondroitin sulfate, Chs)是来自动物喉骨、鼻软骨、气管等富含 Chs 软骨组织的一类重要酸性粘多糖,有 ChsA、C 和 D 三种异构体。均由 D-葡萄糖醛酸和 N-乙酰-D-氨基半乳糖组成,只是硫酸基团位置不同。60 年代后,国外还将 Chs 用于治疗冠心病,临床效果满意。目前还用于某些神经性头痛、关节痛、偏头痛、动脉粥样硬化等症及链霉素引起的听觉障碍和肝炎的辅助治疗。此外,还是化妆品的重要物料。随着制备方法的改变,还开发出多硫酸软骨素(chondroitin polysulfate, Chps)和低分子硫酸软骨素(low molecular chondroitin sulfate, LMChs),大大拓宽了 Chs 临床应用范围,

并增强了它的药效(图 1)。

我国是一个农牧业发达的国家,随着科学技术的进步,畜产品加工业日趋发展,但对其牛、羊、猪等的软骨深加工和应用存在薄弱环节,加工工艺粗糙,不仅工序长,提取率低,而且质量也难达到要求。对于硫酸软骨素提取加工及研究的报道甚少,一直沿用 60 年代初的传统方法^[1]。本文报道一种碱-酶水解快速提取的技术路线,以推动我国对家畜软骨加工的产业

^{*} 动物粘多糖研究项目的一部分,省教委资助项目;
第一作者介绍:罗曼,女,36,硕士,副教授;研究方向:分子生物学;

收稿日期:1999-06-07,修回日期:1999-10-12

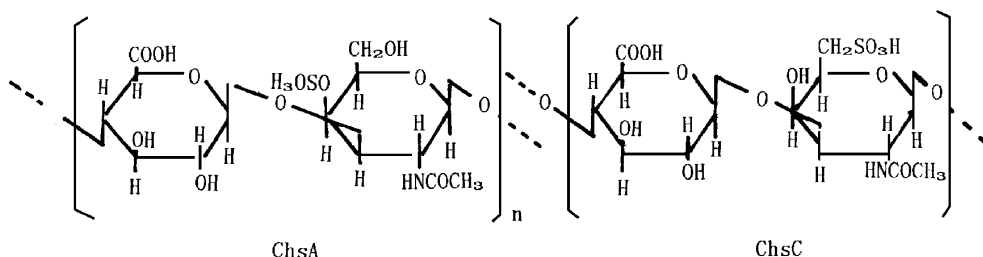


图1 硫酸软骨素分子结构式

化,提高资源利用率。

1 材料与方 法

1.1 试验材料 原料:菜牛喉骨、鼻软骨、气管;NaOH、HCl、酒精、丙酮、氯仿,本地化学试剂公司供应;胰蛋白酶、胃蛋白酶,上海生物化学试剂公司提供,均为国产;标准样品,来自美国Sigma公司。

1.2 制备方法

1.2.1 软骨预处理 将软骨投入80℃恒温蒸煮锅煮4~6小时,捞起用自来水洗净,放入冷库于-25℃速冻6~8小时即绞碎,称重,按照材料与46波美度(Baume degrees,即比重)NaOH之比(即1:6.25)于室温提取1.5小时,用2 mol/L HCl调pH6~6.5,用双层纱布过滤(滤液待用),滤渣再以料液1:0.12之比加46波美度NaOH,40℃下提取1小时,再用双层滤布过滤,弃滤渣,合并两次滤液,并量取体积待用。滤液用2 mol/L HCl调节pH8.0~9.0,按照料液与胰蛋白酶1 000:0.5加入胰酶,于40~50℃水解1小时后,按1 000:0.5加胃蛋白酶于40~50℃水解1.5小时,用4层纱布过滤,按重量比向清液分别加入0.5%的高岭土和活性炭,进行吸附,慢速间歇搅拌4小时,置冷室下自然澄清,虹吸清液。其底层沉淀物用过滤棉抽滤,弃沉淀,留取滤液,调节滤液pH6.8~7.2,向滤液加2.5倍体积95%以上乙醇沉淀,待其澄清后,虹吸上清液,底层沉淀以1 500 r/min离心7~10分钟,收集沉淀,其沉淀物为硫酸软骨素。对沉淀按样品重量加入4倍丙酮,抽滤,滤渣放入生石灰或五氧化二磷中干燥或于60~80℃直接烘干得成品。其清液

供回收乙醇。

1.2.2 硫酸软骨素提取工艺 见图2。

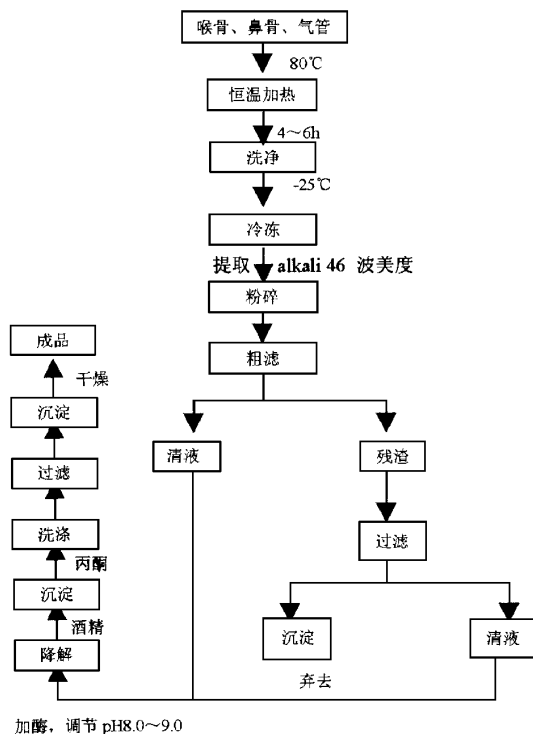


图2 硫酸软骨素制备流程

1.3 纯度鉴定 琼脂糖电泳参照吴梧桐等改良法^[2],标准品Chs为对照。

1.4 产品质量测定 1989年后,Chs质量标准统一改为葡萄糖醛酸的含量^[3],其测定方法参照1989年部颁标准^[4]。

2 结果和讨论

2.1 有效成份和纯度 根据上述工艺,每公斤原料可获硫酸软骨素118~125g(最高为130g),葡萄糖醛酸为27.7%(30%以上可出口,

24%以上即达部颁标准,可用于制药),若在加乙醇沉淀前按滤液与氯仿之比例 1:1 反萃取,再酒精沉淀,即可使葡萄糖醛酸含量达 35%以上(即为优级纯)。琼脂糖凝胶电泳为均一带,若含微量蛋白质,由于蛋白质带电较多,泳动速度稍快,略在纯 Ch_5 前,电泳图谱呈荸荠状,前端有一洞穴。纯 Ch_5 为实心荸荠状。

2.2 内含蛋白与色素的分离 样品粗提取液经酶解后,呈米黄色,且提取液较澄清。为使产品保持白色,采用高岭土和活性炭吸附,既去除提取液中少量蛋白,又脱去色素。

2.3 酶解过程 pH 的调节与控制 为保持去蛋白的良好效果,降低样品蛋白含量并提高样品有效成分含量,酶解过程需注意 pH 的调节,特别是胰蛋白酶的水解过程,随着水解的进行及氨基酸释放,反应液 pH 不停地下降,需用 NaOH 调节并保持 pH 8.0 以上。只有待提取液完全透明后,才加胃蛋白酶水解,此时的 pH 约为 5.7~6.1。

2.4 低分子多肽及其它聚合物的排除 按传统方法制备的产品,样品液混浊,且时间长,污染重,故改为现方法。其原因是在稀碱等温和条件下,软骨中的胶原蛋白、粘蛋白等不能完全水解,而且它在中性盐和弱酸溶液中是可溶的,

在溶液中不易被除去。乙醇沉淀使其变性,制得的产品溶于水后就出现混浊,产品中分子杂质如多肽等也随同聚合物沉淀,影响产品纯度。

2.5 酶蛋白失活与分离 为进一步提高产品产量,所含蛋白应尽量除去。若直接作为药厂的原料,需在酶解后,按 5% 体积比加入 5% 预冷的三氯醋酸,静置 20 分钟,于 3 000 r/min 离心去沉淀,立即对清液调节 pH 6.8~7.2,然后再用乙醇沉淀实验品。

2.6 产品质量标准 根据医药生产要求,产品澄清度(以吸收度表示) < 0.05 ,氮含量为 2.5%~3.8%,葡萄糖醛酸含量为 24.0%。本产品的澄清度为 0.032,含氮量为 3.5%,葡萄糖醛酸含量为 27.7%。

参 考 文 献

- [1] 吴梧桐主编. 生物制药工艺学. 北京: 中国医药科技出版社, 1993. 399~401.
- [2] 吴梧桐, 陈琼华, 徐碧如等. 银耳孢子多糖的分离和分析. 真菌学报, 1982, 1(2): 119~124.
- [3] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中国药典, 二部 (M). 北京: 化学工业出版社, 1985. 附录 42~43.
- [4] 中华人民共和国卫生部药品标准. 生化药品, 第一册. 1989 年. WS₁-C₁-0039-89.