肝素及其衍生物的酶解 - 氧化协同精制工艺及效能评价

杨　丹，马牧青，吴　彦，孟昊天，陈嘉蕙，罗志波*
（杭州微远生物科技有限公司，浙江杭州 310053）

摘要：该研究构建了一种基于酶解－氧化协同作用的七步精制工艺，以提升肝素及其衍生物的纯度与生物活性。该工艺包括酸性预处理、酶解、靶向氧化、树脂吸附、活性炭脱色、氧化还原纯化及盐析沉淀。以效价、紫外吸光度（OD_{260}/OD_{280}）、组分分析及多硫酸软骨素含量为评价指标，对七步精制工艺进行优化。最终确定优化工艺为：酸性预处理（pH 1.5，4 h）、DNA和RNA特异性核酸酶组合（45 ℃）及2.0%高锰酸钾氧化除杂（45 ℃）。结果显示，该优化工艺显著改善了产品质量，所得产品效价回收率达85%，OD_{260}和OD_{280}分别为0.233及0.137，慢移动组分比例降为0，核磁共振谱中δ为$(2.08\pm0.02)\times10^{-6}$～$(2.16\pm0.03)\times10^{-6}$区间的杂质信号也被精准除去。该工艺通过酶解－氧化协同作用实现了杂质的靶向去除，同时较好地维持了肝素的生物活性，为高纯度肝素类产品的规模化生产提供了技术路径参考，具有良好的产业应用前景。

关键词：肝素及其衍生物；酶解 - 氧化协同策略；精制；靶向除杂；酸性预处理
中图分类号：TQ464.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2026)08-0968-10
引用：杨丹, 马牧青, 吴彦, 等. 肝素及其衍生物的酶解-氧化协同精制工艺及效能评价[J]. 中国医药工业杂志, 2026, **57**(8): 968-977. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2026.08.011

Construction and Efficiency Evaluation of Synergistic Enzymolysis-oxidation Refining Process of Heparin and Its Derivatives

YANG Dan, MA Muqing, WU Yan, MENG Haotian, CHEN Jiahui, LUO Zhibo*
(*Hangzhou Weiyuan Biotechnology Co., Ltd., Hangzhou 310053*)

ABSTRACT: This study established a seven-step purification process based on synergistic effect of enzymolysis and oxidation to improve the purity and biological activity of heparin and its derivatives. The process consisted of acidic pretreatment, enzymatic hydrolysis, targeted oxidation, resin adsorption, activated carbon decolorization, redox purification, and salting-out precipitation. The seven-step purification process was optimized using potency, UV absorbance (OD_{260}/OD_{280}), component analysis, and oversulfated chondroitin sulfate content as evaluation indicators. The final optimized process was determined as follows: acidic pretreatment (pH 1.5) for 4 h, treatment with a combination of DNA- and RNA-specific nucleases at 45 ℃, and impurity removal via oxidation with 2.0% of potassium permanganate at 45 ℃. The results showed that the optimized process significantly improved product quality, with a potency recovery of 85%, and OD_{260} and OD_{280} values of 0.233 and 0.137, respectively. Slow-moving components were reduced to undetectable levels, and the impurity signals in the range of $(2.08\pm0.02)\times10^{-6}$ to $(2.16\pm0.03)\times10^{-6}$ in the NMR spectrum were also completely removed. Through the synergistic effect of enzymatic hydrolysis and oxidation, this process achieves targeted removal of impurities while maintaining the structural integrity and biological activity of heparin, providing a reliable technical route for large-scale production of high-purity heparin products, with promising industrial application prospects.

Key Words: heparin and its derivatives; synergistic strategy of enzymolysis and oxidation; refining; targeted impurity removal; acidic pretreatment

肝素指从动物组织提取的高度硫酸化糖胺聚糖（glycosaminoglycan，GAG），是临床常用的抗凝药，在血栓栓塞性疾病的防治中具有不可替代的地位[1]。其衍生物，如硫酸乙酰肝素（heparan sulfate，HS）、低分子肝素（low-molecular-weight heparin，LMWH）等，通常具有比肝素更低的相对分子质量、更高的结构均一性与更优良的药理特性[2-3]。这类衍生物主要通过增强抗凝血酶Ⅲ（antithrombin Ⅲ，AT Ⅲ）的活性发挥功能，表现出较高的抗Ⅹa/抗Ⅱa活性比，在维持抗凝效果的同时可显著降低出血风险。因此，肝素类衍生物在心血管疾病防治、肿瘤辅助治疗及围手术期抗凝等多个临床领域具有重要应用价值，市场需求持续增长[4]。

在工业生产中，肝素及其衍生物主要从猪肠黏膜等动物组织中提取。所得粗品通常含有多种杂质，包括核酸（>15%）、硫酸皮肤素（dermatan sulfate，DS，5%～8%）、硫酸软骨素（chondroitin sulfate，CS，3%～8%）、过硫酸化硫酸软骨素（oversulfated chondroitin sulfate，OSCS，3%～5%）及蛋白质（>10%）等。这些杂质会使产品的生物效价显著降低至20～40 IU/mg。效价是评价肝素及其衍生物生物活性的核心指标，通常以其抗Ⅹa/抗Ⅱa活性来综合评定[5]。

传统精制工艺多依赖强酸、强碱或剧烈氧化法，虽能部分去除杂质，但往往导致目标产物糖链断裂、硫酸酯键水解或活性位点破坏，造成效价损失严重（回收率常低于50%）[6]、组分不可控的问题[7]。此外，由于核酸及过硫酸化杂质难以彻底清除[8]，导致产品存在显著的合规与安全风险[9]。USP 42版严格限定了这些杂质的^{1}H NMR特征峰，即合格品在$(2.08\pm0.02)\times10^{-6}$（DS甲基峰）及$(2.16\pm0.03)\times10^{-6}$（OSCS峰）区间不得出现信号干扰（主峰容差为$\pm0.03\times10^{-6}$）。

因此，开发能精准、靶向去除特定杂质，同时有效维持肝素及其衍生物天然糖链结构完整性的精制工艺，成为提升肝素类产品质量、保障用药安全和推动产业升级的核心挑战。本研究提出了一种基于酶解－氧化协同策略的七步精制工艺，依次通过酸性预处理、酶解处理去除核酸、靶向氧化除杂、树脂吸附、活性炭脱色、氧化还原深度纯化及盐析沉淀，实现了杂质靶向去除。该工艺在高效提纯的同时，可维持产物的结构完整性与高活性，从而为高纯度、合规性肝素类产品的规模化生产提供了可靠的精制方案。

1 仪器与试药

SpectraMax M5型酶标仪（上海一恒科学仪器有限公司）；DYY-8C型不连续电泳跑胶仪（北京六一生物科技有限公司）；PHS-3E型pH计（上海雷磁仪器厂）；H1200R型高速离心机（上海卢湘仪离心机仪器有限公司）；砂芯过滤器（天津市津腾实验设备有限公司）；DZF-6210B型真空干燥箱（绍兴市易诚仪器制造有限公司）；AVANCE Ⅲ HD型400 MHz核磁共振仪（德国Bruker公司）。

猪肠黏膜粗品肝素钠［深圳市海普瑞药业集团股份有限公司，批号NP032408014，慢移动（slow-moving heparin，SM）肝素比例28%，效价65 IU/mg，260与280 nm处的吸光度值（OD_{260}和OD_{280}）分别为2.993和2.845］；绵羊血浆、肝素钠标准品（USP标准品，200 IU/mg，批号250420）均购于山东兰陵向明生化助剂厂；脱氧核糖核酸酶（deoxyribonuclease，DNase，美国New England Biolabs公司）；核糖核酸酶（ribonuclease，RNase，德国Merck公司）；D254型阴离子交换树脂（西安蓝晓科技新材料股份有限公司，氯型，季铵基功能基团，含水量75%～85%，交换容量≥4.50 mmol/g）；活性炭（浙江杭木活性炭有限公司，相对分子质量12.01，孔径为75 μm的筛网通过率≥95%）；其他试剂均为市售分析纯。

2 方法与结果

2.1 精制工艺

2.1.1 七步协同精制法

七步协同精制法的工艺流程（图1）包括酸性预处理、酶解处理、靶向氧化除杂、树脂吸附、活性炭吸附脱色、氧化还原深度纯化和盐析沉淀7个步骤。

酸性预处理：取肝素钠粗品100.00 g，用去离子

收稿日期：2026-03-06

基金项目：杭州市领军型创新创业团队建设项目（TD2025019）、杭州市农业与社会发展领域公益性科研引导项目（20241029Y103）、浙江省海洋科技研究项目（浙海经产发〔2026〕4号）

作者简介：杨　丹，工程师，硕士，从事低分子肝素类抗凝药物的研究。

通信作者：罗志波，高级工程师，博士，从事生物学与药物化学工程转化的研究。

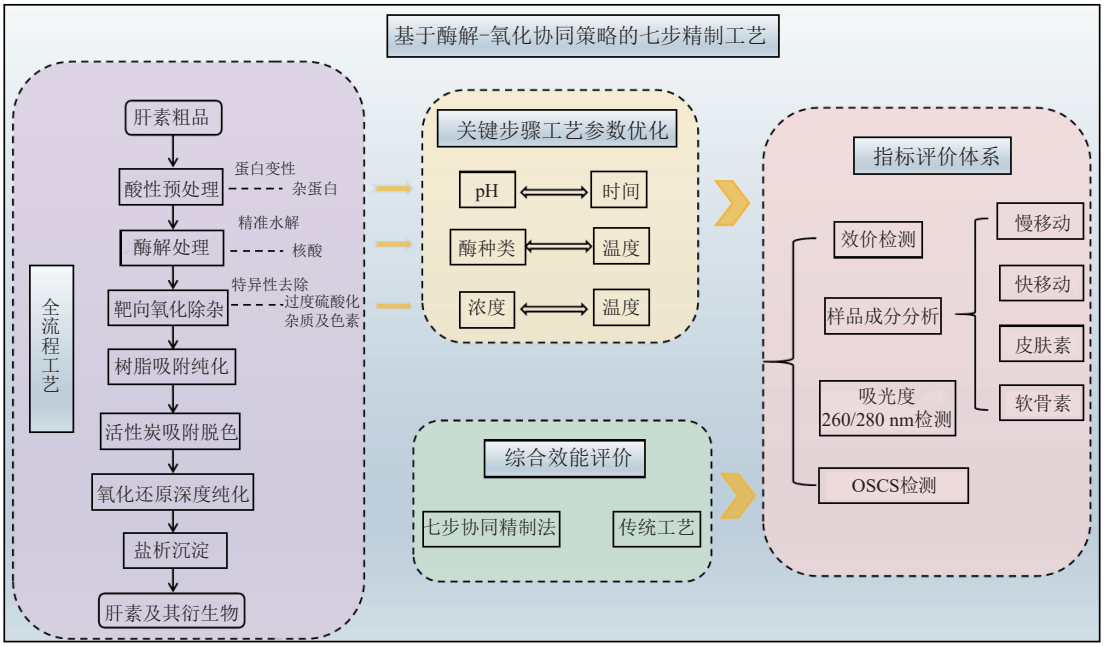


图 1　基于酶解 - 氧化协同策略的七步精制工艺流程图

Fig.1　Flow Chart of the Seven-step Refining Process Based on Enzymolysis-oxidation Synergistic Strategy

水 3 000 mL 溶解，于 30 ℃搅拌至澄清。以 5 mol/L 稀盐酸调至 pH 1.5，静置 4 h 选择性沉淀，离心 (15 292×*g*) 15 min，取上清液。

酶解处理：以 1 mol/L 氢氧化钠溶液将所得上清液调至 pH 8.0，加入终质量浓度为 1.0% 的 DNase 和 RNase（*活力单位比* 1 ∶ 1），于 45 ℃、180 r/min 搅拌反应 4 h 以降解核酸；于 85 ℃保温 10 min，以灭活酶，再离心 (15 292×*g*) 8 min，所得上清液即为初级产物。

靶向氧化除杂：在上述初级产物中加入终质量浓度为 2.0% 的高锰酸钾，于 45 ℃反应 8 h，然后用 1 mol/L 稀盐酸调至 pH 中性，离心 (15 292×*g*) 8 min，取上清液，待用。

树脂吸附纯化：取 D254 型强碱性阴离子交换树脂装柱（有机玻璃柱 10 cm×44 cm），将上步所得的上清液以 20 mL/min 的流速上样。上样结束后，先用 0.5 mol/L 氯化钠溶液约 20 mL/min 洗脱 5 个柱体积 (column volume，CV)，洗去部分弱结合的杂质，再用氯化钠水溶液梯度洗脱（流速为 20 mL/min；0—5 CV，氯化钠溶液浓度为 0.5—1.5 mol/L），收集高纯度洗脱组分。

活性炭吸附脱色：用 1 mol/L 稀盐酸将洗脱液调至 pH 6.0，加入终质量分数为 2.5% 活性炭，于 60 ℃、180 r/min 搅拌吸附 2 h，经 0.22 μm 微孔滤膜（水系）砂芯抽滤装置过滤，以去除活性炭及残留色素。

氧化还原深度纯化：取前步滤液，加入 30 倍体积去离子水，于 60 ℃、180 r/min 搅拌，加入终质量分数为 5.0% 的硼氢化钠，于 45 ℃反应 8 h，离心 (2 250×*g*) 10 min，弃去上清液，剩余物中加入 30 倍体积去离子水，60 ℃放置至溶液澄清，加入终质量分数为 3.0% 的过氧化氢溶液，于 45 ℃反应 8 h，经复合沉淀系统分离和纯化，得终产物粗品溶液。

盐析沉淀：取上述终产物粗品溶液，离心 (2 250×*g*) 10 min，收集上清液，加入终质量分数为 5% 的氯化钠，再加入无水乙醇调至乙醇终质量分数为 90%，进行盐析沉淀；所得沉淀用适量无水乙醇洗涤、重悬，重复操作 2 ～ 3 次进行沉淀纯化。取沉淀于 65 ～ 70 ℃减压干燥 48 h，即得精制肝素及其衍生物。

2.1.2　传统方法

首次氧化：将经酸性预处理所得的上清液用 5 mol/L 稀盐酸调至 pH 2.5，加入终质量分数为 3.0% 的过氧化氢溶液，于 25 ℃反应 8 h；反应液离心

(15 292×*g*) 15 min，取上清液，用 5 mol/L 氢氧化钠溶液调至 pH 7.0，待用。

多次氧化：取上步所得的上清液，用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调至 pH 8.5，加入终质量分数为 5.0%的过氧化氢溶液，于 35 ℃反应 6 h；反应液经超滤（截留分子量 10 000）法去除降解片段。

盐析沉淀：取上步超滤所得的清液，加入终质量分数为 5%的氯化钠，并加入无水乙醇调至乙醇终质量分数为 90%，进行盐析沉淀；将所得沉淀用适量无水乙醇洗涤、重悬，重复操作 2 ～ 3 次进行沉淀纯化。

2.2 分析检测方法

2.2.1 效价检测

肝素及其衍生物的效价检测采用羊血浆法[10]。取绵羊血浆 1 mL 于具塞试管中，加入 0.25%氯化钙溶液 0.8 mL，混匀，置 (37±1) ℃水浴中保温，若 5 min 内凝结则血浆可用。取肝素钠标准品用纯化水配成 100 IU/mL 的贮备液，临用前用 0.9%氯化钠溶液稀释至 10 IU/mL。取具塞试管，分别加入 10 IU/mL 的肝素钠标准品溶液 100、120、140、160、180、200 μL，血浆 1 mL，以及 0.25%氯化钙溶液 0.8 mL，混匀，置 (37±1) ℃水浴中保温 1 h，测定使血浆半凝固 (1/2 凝固度) 所需肝素钠体积 ($V_{1/2}$)。取精制后的样品，同法检测 $V_{1/2}$。按式①计算样品效价 (Y)，并按式②计算全流程处理过程中产物的效价回收率。

$$Y=V_{std}\times c_{std}\times V/(V_{sam}\times m_{sam}) \quad ①$$

$$\text{效价回收率}=\text{产物效价}\times\text{产物质量}/(\text{底物效价}\times\text{底物质量})\times 100\% \quad ②$$

式中：V_{std} 为 1/2 凝固度时加入的肝素钠标准溶液体积 /μL；c_{std} 为肝素钠标准品溶液的效价浓度 /(U·mL^{-1})；V_{sam} 为 1/2 凝固度时加入的供试品溶液体积 /μL；m_{sam} 为样品质量 /mg；V 为测定样品总体积 /mL。

2.2.2 样品成分分析

采用不连续琼脂糖凝胶电泳分析肝素及其衍生物的成分。样品以去离子水溶解，质量浓度为 4 mg/mL，上样量为每孔 5 ～ 10 μL。以 0.04 mol/L 乙酸钡溶液 -0.1 mol/L 丙二胺溶液（体积比 1 ∶ 1）为电泳液，0.1%十六烷基三甲基溴化铵溶液为固定液，经 0.1%甲苯胺蓝溶液染色 1 h，再用 0.1%乙酸脱色至背景清晰后拍摄，并用 ImageJ 1.48V 软件计算各组分峰面积比例。肝素及其衍生物主要包括 4 个组分：SM 肝素、快移动 (fast-moving heparin，FM) 肝素、DS、CS。

2.2.3 吸光度检测

取样品适量，用去离子水配制成 4 mg/mL 的样品溶液，采用酶标仪测定 OD_{260} 和 OD_{280}，平行测定 3 次，取均值。

2.2.4 OSCS 检测

采用核磁共振仪检测。用 D_2O 配制 10 mg/mL 的样品于核磁管中，以 d_4-3-(三甲基硅基) 丙酸钠盐 [3-(trimethylsilyl) propionic acid-d_4 Sodium salt，TSP-d_4] 为内标，检测频率为 400 MHz，扫描次数 16 次，测试温度为 25 ℃。采用核磁共振仪测定 ^{1}H NMR 谱，重点识别 2.08×10^{-6} 至 2.16×10^{-6} 区间的特征杂质峰。

2.3 酸性预处理工艺优化

通过精确控制 pH 酸性环境，可促使杂蛋白高效变性、沉淀，使核酸碱基质子化，破坏氢键和双螺旋结构[11]。这一步骤不仅可去除大部分核酸和杂蛋白，而且为后续纯化工艺创造了理想反应条件。本研究采用单因素法考察了酸性预处理的 pH 值与时间对产物效价、组分及吸光度的影响。

2.3.1 酸性预处理 pH 值

设置酸性预处理 pH 值分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5，其他条件参照“**2.1.1**”项，制备精制肝素及其衍生物，再按“**2.2**”项下方法检测效价、组分、OD_{260} 和 OD_{280}。结果（图 2）表明，随着 pH 值从 0.5 增加至 2.5 时，效价回收率呈现先上升后下降的趋势，OD_{260} 和 OD_{280} 值呈现先下降后上升的趋势，而肝素及其衍生物中的成分组成无明显变化。当酸性预处理时的 pH 值为 1.5 时，效价回收率、OD_{260}、OD_{280} 以及 SM 组分比例分别为 96.42%、1.700、0.823 和 25.9%，表现较优。pH<1.5 的强酸性环境会导致肝素及其衍生物降解，效价回收率骤降至 52.47% (pH 0.5)；同时，部分蛋白质发生变性、凝聚，与肝素

一同沉淀，造成产品中蛋白污染，表现为 OD_{260} 和 OD_{280} 分别从 1.700 和 0.823 升至 pH 0.5 时的 2.742 和 1.480。而 pH>1.5 环境的酸度不足以使蛋白质杂质完全沉淀，残留的蛋白质与肝素共沉淀，同样导致产品中的蛋白含量升高，效价回收率相应下降，吸光度也呈上升趋势。因此，后续试验选择酸性预处理 pH 值为 1.5。

2.3.2　酸性预处理时间

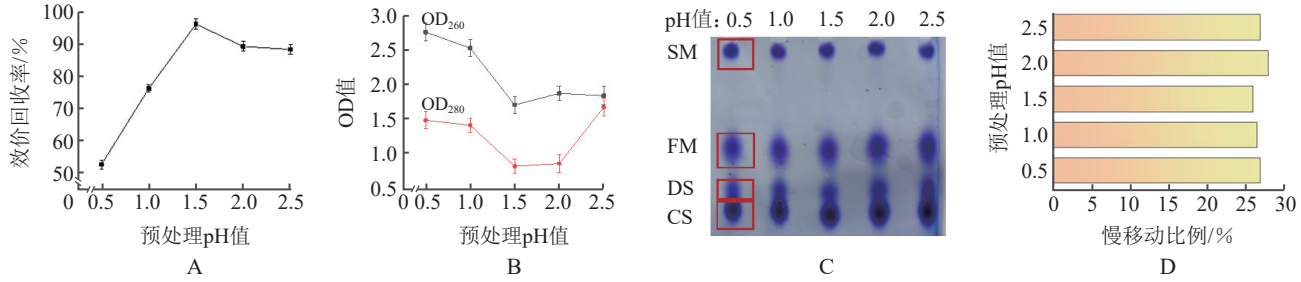
设置酸性预处理时间分别为 4、8、12、16、20 h，其他条件参照“**2.1.1**”项，制备精制肝素及其衍生物，再按“**2.2**”项下方法检测。结果（图 3）显示，随着反应时间的延长，效价回收率逐渐从 96.42%降至 85.44%，OD_{260} 和 OD_{280} 大致也呈现缓慢上升的趋势（OD_{280} 从 1.700 升至 1.780，OD_{260} 从 0.823 升至 0.880）。当体系长时间处于低 pH 值环境，可能导致肝素及其衍生物糖链的非特异性水解或 pH 敏感的硫酸酯键断裂，从而导致其生物活性（抗 X a 或抗 II a 效价）不可逆下降，效价回收率显著降低、杂质增多，表现为 OD_{260} 和 OD_{280} 值也增加。因此，后续酸性预处理工艺选择反应时间为 4 h。

2.4　酶解处理工艺优化

核酸杂质不仅影响产品的化学纯度和工艺收率，更可能引发严重的生物安全风险。因此，高效去除核酸是确保肝素类药物安全性和有效性的关键步骤。然而，肝素精制工序中用于去除核酸的常规方法，普遍存在选择性不高、去除不彻底或易导致肝素损失等问题[12]。为了制备高纯度的肝素及其衍生物，本研究采用核酸酶酶解技术高效去除核酸杂质，并通过单因素法考察核酸酶种类与酶解温度对产物效价、组成及吸光度的影响。

2.4.1　酶的筛选

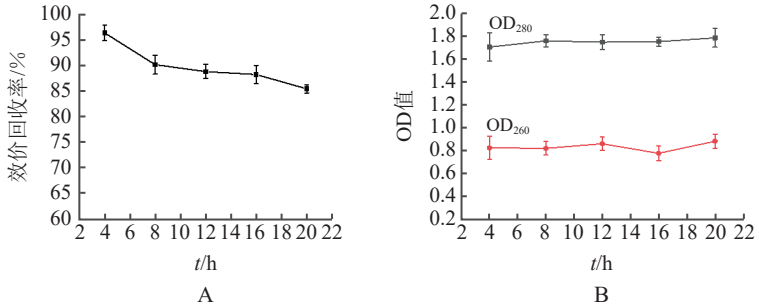
设置核酸酶分别为 DNase、RNase、DNase 和



A—效价回收率（n=3）；B—OD_{260} 和 OD_{280}（n=3）；C—全成分组成的电泳图谱；D—SM 组分占比。

图 2　酸性预处理 pH 值对肝素及其衍生物各项指标的影响

Fig.2　Effects of pH Value in Acidic Pretreatment on Various Indicators of Heparin and Its Derivatives



A—效价回收率；B—OD_{260} 和 OD_{280}。

图 3　酸性预处理时间对肝素及其衍生物各项指标的影响（n=3）

Fig.3　Effects of Acid Pretreatment Time on Various Indicators of Heparin and Its Derivatives (n=3)

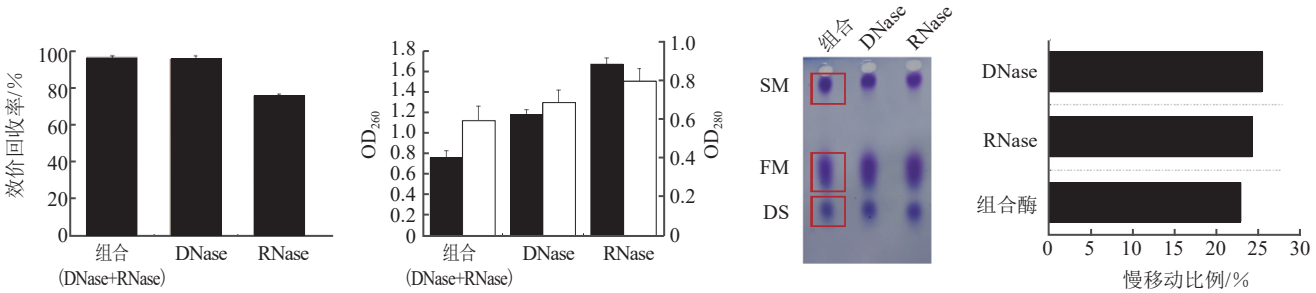
RNase 混合物（活力单位比 1 ∶ 1），其他条件参照“**2.1.1**”项，制备精制肝素及其衍生物，再按“**2.2**”项下方法检测。结果（图 4）表明，相较于 RNase 处理组，DNase 处理组肝素及其衍生物中 OD_{260} 值更低，推测原因在于肝素粗品中污染物以长链 DNA 为主，而 DNase 可高效水解 DNA，从而大幅降低总核酸浓度；混合核酸酶处理组产物的效价回收率为 96.09 %，OD_{260} 和 OD_{280} 分别为 0.746 和 0.588，说明采用组合酶解，能更有效减少核酸污染。此外，采用不同核酸酶进行酶解处理，对肝素及其衍生物中 SM 组分占比影响较小。综上所述，选择 DNase 和 RNase 混合物（活力单位比 1 ∶ 1）进行后续试验。

2.4.2 酶解温度

选择 DNase 进行酶解温度优化。设置酶解温度分别为 25、35、45、55、65 ℃，其他条件参照“**2.1.1**”项，制备精制肝素及其衍生物，再按“**2.2**”项下方法检测。结果（图 5）表明，随着酶解温度的升高，效价回收率呈先上升后下降的趋势，OD_{260} 和 OD_{280} 值呈先减小后增加的趋势。效价回收率在 25～45 ℃上升，主要归因于酶反应动力学的增强；当温度大于 45 ℃时，效价回收率下降，则主要因为高温导致核酸酶的酶解效率下降，引发核酸去除不完全。当温度为 45 ℃时，所得肝素及其衍生物的效价回收率、OD_{260} 和 OD_{280} 值分别为 96.09 %、0.746 和 0.588。为实现酶促反应效率最大化与产物结构完整性，后续试验的酶解温度设置为 45 ℃。

2.5 靶向氧化工艺优化

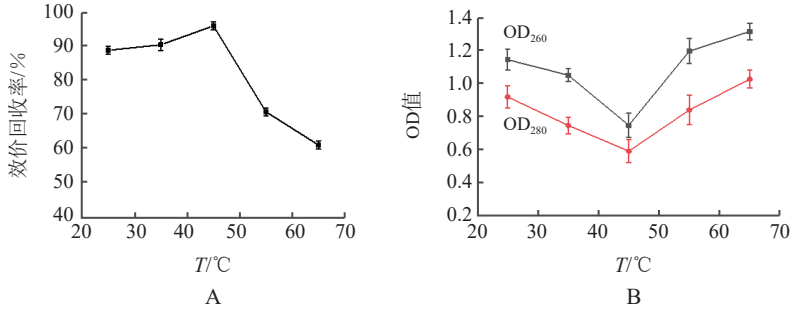
按“**2.2.4**”项下方法分析靶向氧化工艺处理后的样品，^{1}H NMR 谱图结果（图 6）显示，高锰酸钾对特征性杂质的去除具有显著选择性：高锰酸钾可特异性消除 DS 中的甲基特征峰［化学位移 δ 为 $(2.08\pm0.02)\times10^{-6}$］及 OSCS 中的过度硫酸化修饰物峰［$\delta$ 为 $(2.16\pm0.03)\times10^{-6}$］区间的杂质信号，清除效率高达 99 %。该氧化步骤主要作用于



A—效价回收率（n=3）；B—OD_{260}（■）和 OD_{280}（□）值（n=3）；C—全成分组成的电泳图谱；D—SM 组分占比。

图 4 采用不同核酸酶酶解对肝素及其衍生物各项指标的影响

Fig.4 Effects of Enzymatic Hydrolysis with Different Nucleases on Heparin and Its Derivatives



A—效价回收率；B—OD_{260} 和 OD_{280}。

图 5 DNA 特异性核酸酶酶解温度对肝素及其衍生物各项指标的影响（n=3）

Fig.5 Effects of Enzymolysis Temperature of DNA-specific Nucleases on Indexes of Heparin and Its Derivatives (n=3)

肝素的连接区，将末端丝氨酸残基转化为羧甲基化（—CH_2COOH）或酰胺化（—CH_2CONH_2）产物，使其能在后续纯化中被有效去除[13]（图 7）。本研究通过单因素试验考察氧化剂浓度与反应温度对产物效价、组成、吸光度及多硫酸软骨素残留的影响。

2.5.1　氧化剂浓度

设置高锰酸钾质量分数分别为 1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%，其他条件参照“**2.1.1**”项，

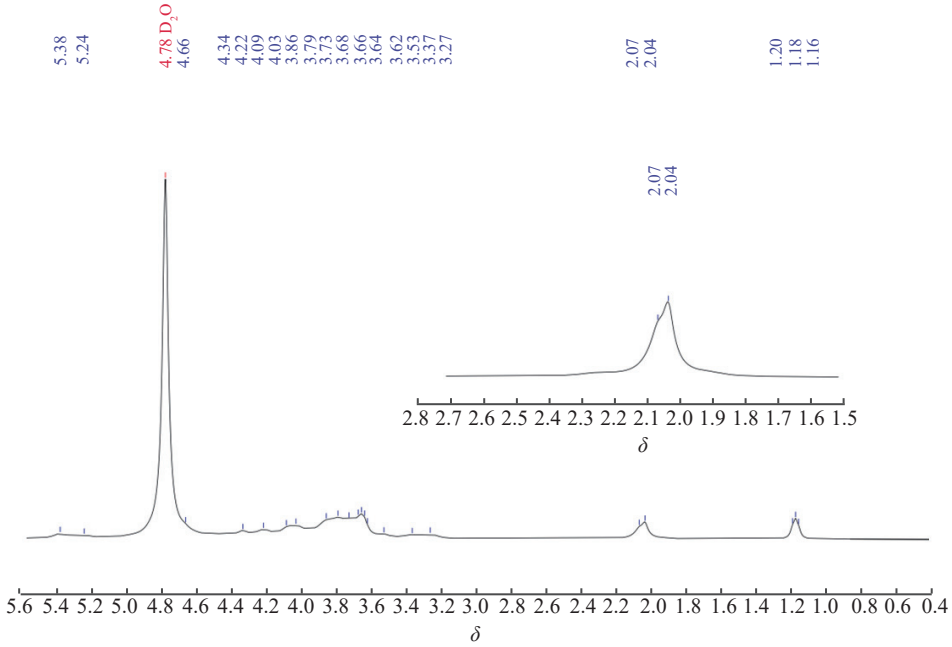


图 6　高锰酸钾氧化处理后产品的 ^{1}H NMR 图谱

Fig.6　^{1}H NMR Spectrum of the Product after Potassium Permanganate Oxidation Treatment

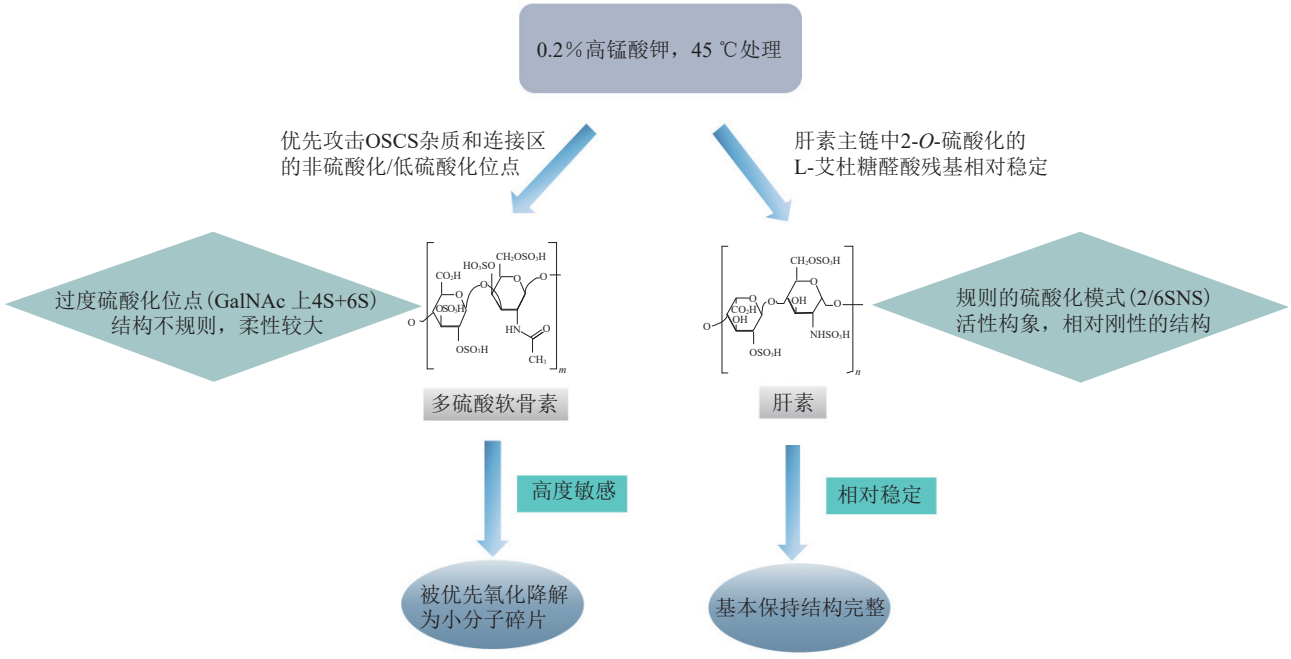


图 7　靶向氧化除杂原理示意图

Fig.7　Schematic Diagram of Impurity Removal Mechanism by Targeted Oxidation

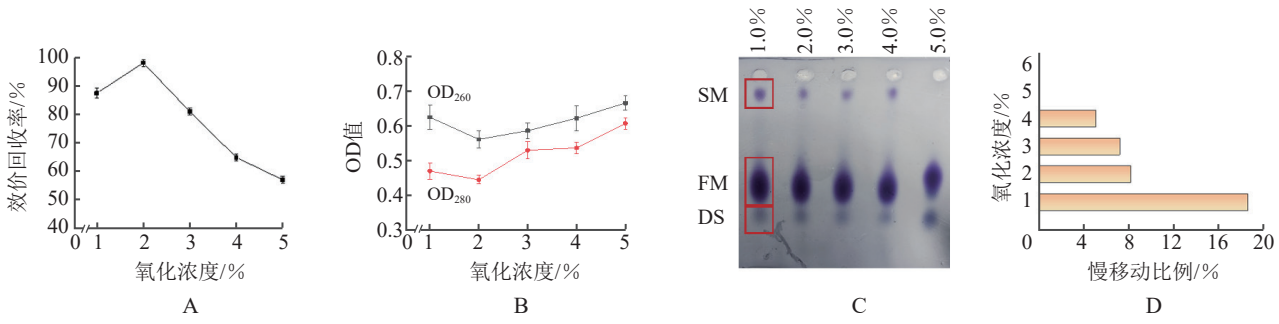
制备精制肝素及其衍生物，按“**2.2**”项下方法检测。结果（图 8）表明，随着高锰酸钾浓度增加，效价回收率先上升后下降，OD_{260} 和 OD_{280} 先下降后升高，而 SM 组分占比逐渐降低。当高锰酸钾质量分数为 1.0%～2.0%时，能高效降解核酸和色素等杂质，表现为 OD_{260} 和 OD_{280} 值显著下降。此阶段，氧化作用主要针对杂质，对肝素及其衍生物主链的破坏有限，因此效价回收率较高，但此时已有部分对氧化作用敏感的高度硫酸化 SM 组分被降解。当高锰酸钾质量分数高于 2.0%时，可导致肝素及其衍生物糖链的糖环开环、硫酸基团脱落或糖链断裂，同时 SM 组分被彻底氧化降解，比例最终可降至 0。综上所述，选择高锰酸钾质量分数为 2.0%进行后续试验。

2.5.3 氧化反应温度

设置氧化反应温度分别为 25、35、45、55、65 ℃，其他条件参照“**2.1.1**”项，制备精制肝素及其衍生物，按“**2.2**”项下方法检测。结果（图 9）显示，随着氧化反应温度的升高，效价回收率先升高后下降。氧化温度为 45 ℃时，效价回收率较高（98.00%），OD_{260} 和 OD_{280} 值为 0.562 和 0.445。氧化反应温度为 25 ℃时，反应速率低，纯化除杂效果略差，因此 OD_{260} 和 OD_{280} 值相较于 45 ℃时略高。反应温度高于 45 ℃时，氧化反应速率大幅提升，氧化剂会使肝素的糖苷键随机断裂[14]，导致效价回收率急剧降低；同时，高温下可能发生大量副反应，导致产品吸光度升高。综上所述，后续试验选择氧化反应温度为 45 ℃。

2.6 七步协同精制法综合效能评价

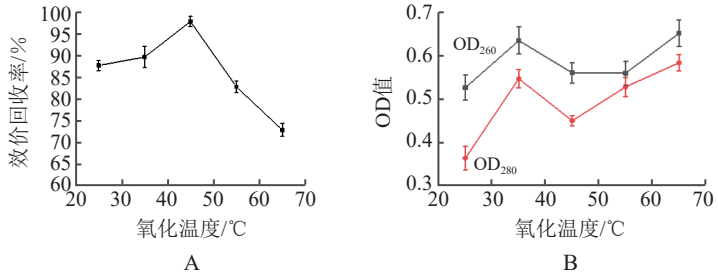
分别以优化的七步协同精制工艺和传统工艺[15]制备肝素及其衍生物，按“**2.2**”项下方法评价其效价总收率、吸光度、SM 组分占比和 OSCS。结果（图 10）显示，采用七步协同精制工艺制备的肝素及其衍生物，效价总回收率高达 85%，OD_{260} 和 OD_{280} 值分别为 0.233 和 0.137，SM 组分占比为 0，均优于传统工艺制备组。^{1}H NMR 试验结果显示，



A—效价回收率（n=3）；B—OD_{260} 和 OD_{280}（n=3）；C—全成分组成的电泳图谱；D—SM 组分占比。

图 8 高锰酸钾浓度对肝素及其衍生物各项指标的影响

Fig.8 Effects of Potassium Permanganate Concentration on Heparin and Its Derivatives



A—效价回收率；B—OD_{260} 和 OD_{280}。

图 9 氧化温度对肝素及其衍生物各项指标的影响（n=3）

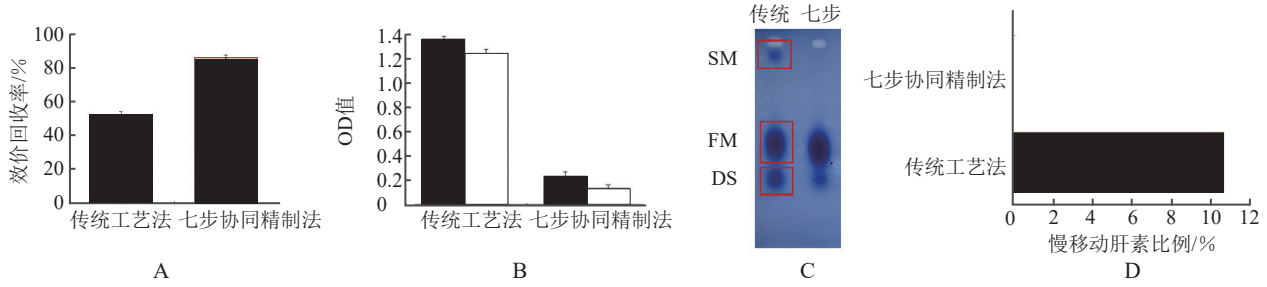
Fig.9 Effects of Oxidation Temperature on Heparin and Its Derivatives (n=3)

采用本精制工艺制备的肝素及其衍生物的图谱中 δ 为 (2.08±0.02)×10^{-6} ～ (2.16±0.03)×10^{-6} 区间的杂质信号 (δ 2.12) 被精准除去。传统工艺通常依赖于强酸、强碱或剧烈氧化等化学方法，虽能去除杂质，但常导致目标产物结构破坏、活性损失及组分不可控。而七步协同精制工艺通过生物酶解与阶梯式化学处理的精密耦合，实现了精准提纯，所得产品质量更优。

3　总结与讨论

肝素及其衍生物精制的核心矛盾在于高效除杂同时保全活性，而传统化学法难以实现二者平衡。非特异性氧化作用常导致肝素活性位点上的硫酸基团脱落或糖链过度解聚，从而造成产品抗凝效价显著下降。本研究提出酶解 - 氧化协同策略，通过生物法与化学法的理性序贯，创新性地解决了这一难题。

该策略的核心在于酶解与氧化步骤的序贯设计。



A—效价回收率 (n=3)；B—OD_{260}(■) 和 OD_{280}(□) 值 (n=3)；C—全成分组成的电泳图谱；D—SM 组分占比。

图 10　传统工艺法与七步协同精制法所得产物的各项指标对比

Fig.10　Comparison of Various Indicators of the Products Obtained by the Traditional Process and Seven-step Synergistic Refining Method

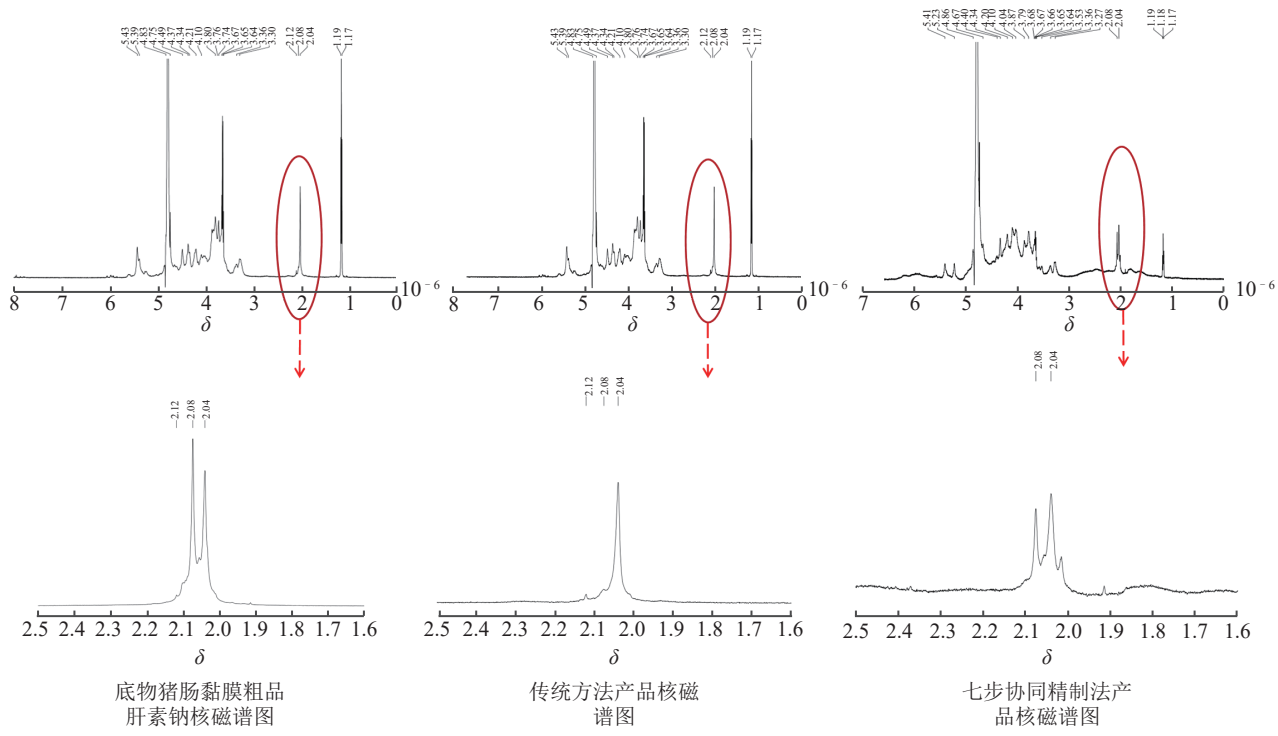


图 11　原料、传统工艺终产物与七步协同精制法终产物的 ^{1}H NMR 图谱对比

Fig.11　Comparison of ^{1}H NMR Spectra of Raw Material, Final Products Obtained by theTraditional Process and Seven-step Synergistic Refining Method

传统氧化工艺在同一步骤除去多种杂质，往往需要高强度条件，易引发非特异性降解。本研究采用酸性预处理先去除大部分蛋白质，然后引入条件温和的核酸酶解步骤，从而降解核酸并简化杂质谱，为后续氧化剂（高锰酸钾）处理提供了有利条件。通过控制高锰酸钾用量和反应温度，可实现仅将 DS、OSCS 等特征杂质氧化、去除，避免传统工艺因过度氧化导致的肝素结构损伤。

本工艺表现出良好的应用潜能，但仍存在一定局限。例如，RNase 和 DNase 成本较高，可能影响大规模应用的经济性；本工艺的参数优化基于猪源组织，对不同来源原料的普适性还有待验证。此外，高锰酸钾靶向氧化的反应机制与副产物路径需进一步明确，以确保过程安全、可控。后续研究可着眼于酶成本控制、扩大工艺适用范围、阐明反应机制，同时探索绿色温和的氧化体系。

参考文献：

[1] 蔡鑫鑫, 袁建梅, 李曰珍, 等. 低分子量肝素盐的精制工艺及其临床应用研究进展[J]. 当代化工, 2024, **53**(11): 2721-2723.

[2] Zhang B, Shi D L, Li M M, *et al*. A quantitative mass spectrometry method to differentiate bovine and ovine heparins from pharmaceutical porcine heparin [J]. *Carbohydr Polym*, 2023, **301** (Pt A): 120303.

[3] 杜曦, 兰舫, 赵晓晓, 等. 牛源肝素及其制备的低分子肝素的研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2025, **56**(11): 1379-1385.

[4] 杜曦, 杨祎, 王亮, 等. 猪、牛、羊源依诺肝素钠的制备及结构研究[J]. 中南药学, 2025, **23**(1): 149-155.

[5] Iqbal Z, Sadaf S. Commercial low molecular weight heparins-patent ecosystem and technology paradigm for quality characterization [J]. *J Pharm Innov*, 2023, **18**: 803-805.

[6] Feng K, Wang K X, Zhou Y, *et al*. Non-anticoagulant activities of low molecular weight heparins: a review [J]. *Pharmaceuticals*, 2023, **16**(9): 1254.

[7] Yang F L, Xu R R, Huang H, *et al*. Controllable polysaccharide depolymerization by heparinases for efficient low molecular weight heparin production [J]. *Carbohydr Polym Technol Appl*, 2026, **13**: 101087.

[8] Yu Y L, Fu L, He P, *et al*. Chemobiocatalytic synthesis of a low-molecular-weight heparin [J]. *ACS Chem Biol*, 2022, **17**(4): 637-646.

[9] Baytas S N, Varghese S S, Jin W H, *et al*. Preparation of low molecular weight heparin from a remodeled bovine intestinal heparin [J]. *J Med Chem*, 2021, **64**(4): 2242-2253.

[10] 孟长虹, 陆益红. 肝素钠及其制剂效价测定方法的改进[J]. 中国生化药物杂志, 2008(5): 337-339.

[11] Colombo E, Mauri L, Marinozzi M, *et al*. NMR spectroscopy and chemometric models to detect a specific nonporcine ruminant contaminant in pharmaceutical heparin [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2022, **214**: 114724.

[12] 于海宁, 张鹏, 陶艳红, 等. 固定化酶解猪小肠黏膜制备肝素的工艺研究[J]. 天然产物研究与开发, 2016, **28**(2): 300-306.

[13] Urso E, Mantione G, Sala F, *et al*. Structural variation in the linkage region of pharmaceutical heparin arising from oxidative treatments during manufacture [J]. *Carbohydr Res*, 2022, **514**: 108540.

[14] 胡立娜, 张惠, 赵一凡. 高锰酸钾氧化脱色技术在肝素制备中的应用研究[J]. 煤炭与化工, 2025, **48**(7): 135-140.

[15] 徐晖, 毛建卫, 魏培莲. 肝素钠精制工艺研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2004, **26**(2): 44-46.