

静息细胞法制备高质量醋酸泼尼松的工艺研究

罗浩 王霜* 冯蕾 廖俊 汤伟 田玉林
华中药业股份有限公司

DOI:10.12238/fcmr.v7i2.14492

[摘要] 本文通过对静息细胞法转化醋酸可的松的能力、静息细胞法与传统发酵法的转化能力对比以及静息细胞法与传统发酵法制备醋酸泼尼松的质量对比等进行研究,当发酵液培养至18h,制备成静息细胞后,投料3%浓度的醋酸可的松,发酵转化率最高,可达到93.8%,静息细胞法与传统发酵法相比,具有较高的转化能力,静息细胞法转化制备的醋酸泼尼松含量高、未知单杂含量可控制在0.05%以下,杂质较少,产品质量显著提升。

[关键词] 静息细胞法; 高质量; 醋酸泼尼松

中图分类号: Q343.5 文献标识码: A

Study on the Preparation of High Quality Acetate Prednisone by Resting Cell Method

Hao Luo Shuang Wang* Lei Feng Jun Liao Wei Tang Yulin Tian

Huazhong Pharmaceutical Co., Ltd.

[Abstract] This article conducts research on the ability of resting cell method to convert cortisone acetate, the comparison of the conversion ability between resting cell method and traditional fermentation method, and the comparison of the quality of acetic acid prednisone prepared by resting cell method and traditional fermentation method. It is found that resting cell method has higher conversion ability compared to traditional fermentation method. When the feed concentration is 3%, the highest conversion rate of resting cell method can reach 93.8%. The acetic acid prednisone produced by resting cell method meets the standards of Chinese Pharmacopoeia (2020 edition), and the unknown impurity content can be controlled below 0.05%. The product quality is high, and the process is simple, suitable for industrial production.

[Key words] Resting cells; high quality; Prednisone acetate

醋酸泼尼松能够有效抑制炎症、免疫、过敏等反应。该药物不仅具备显著的抗炎作用,还能通过抑制免疫系统的过度反应来达到抗过敏的效果,同时其免疫抑制作用也使其在防止免疫系统攻击自身组织方面表现突出。还具有抗毒和抗休克的能力,对于细菌内毒素引发的毒性反应以及由此导致的休克状态有一定的缓解效果^[1]。该药物广泛应用于治疗多种疾病,常见的适应症包括风湿病及红斑狼疮等。醋酸泼尼松通过其多重作用机制,能够有效减轻这些疾病引起的炎症和组织损伤,从而改善患者的症状和生活质量。不仅能够迅速控制急性发作,还可以通过长期使用来维持疾病的缓解状态,有助于减少病情反复发作的频率和严重程度。

目前醋酸泼尼松主要是通过简单节杆菌发酵转化底物醋酸可的松,然后通过提取精制制备得到,技术路线见图1:

在传统发酵生产过程中,是将底物醋酸可的松直接投料至发酵液中进行转化,但是存在发酵转化率偏低,且反应体系中各类杂质多导致转化制备的醋酸泼尼松杂质含量高,需要经过多

次提取精制才能将杂质去除,严重影响产品质量和收率。

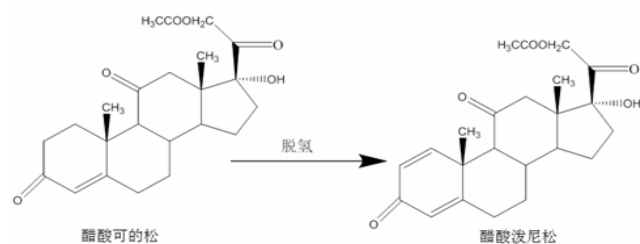


图1 醋酸泼尼松制备技术路线

静息细胞被用于将细菌体与液体分离,并直接利用菌体进行底物转化,这种方法不仅具有极高的选择性,还能实现高转化率,因此得到广泛应用^[2、3]。反应条件相对温和,能够显著增强选择性,避免产生污染,且成本较低。由于副产物较少,倍增时间短,微生物的生物量能够迅速积累,使得酶的产量得以提高,从而大幅提升转化效率。操作条件易于控制,反应后的产物分

离和纯化过程也较为简便高效,使其在工业生产中具有明显的优势^[4,5]。

本文通过对静息细胞法转化醋酸可的松的能力、静息细胞法与传统发酵法的转化能力对比以及静息细胞法与传统发酵法制备醋酸泼尼松的质量对比等进行研究,旨在开发出一种可制备高质量醋酸泼尼松的新工艺。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株来源及原料。菌株为公司菌种室保藏的一株工业生产菌——简单节杆菌。

底物醋酸可的松:从湖北某甾体激素生产厂家采购。

1.1.2 试剂。片碱(工业级):本次研究中使用的该类材料来自于青海宜化;无水乙醇(工业级):本次研究中使用的该类材料来自于岳阳兴旺;乙酸乙酯(工业级):本次研究中使用的该类材料来自于兖矿鲁南;h活性炭(工业级):本次研究中使用的该类材料来自于宁国市恒达;乙腈、甲醇(色谱纯):本次研究中使用的该类材料来自于西陇化工股份有限公司。

1.1.3 培养基。菌种斜面培养基配方:葡萄糖的加入比例为0.6%、玉米浆的加入比例为0.3%、酵母膏的加入比例为0.6%、磷酸二氢钾的加入比例为0.25%,加片碱调pH:7.5~7.8,加入2%琼脂,121℃灭菌30min。

种子培养基配方:葡萄糖的加入比例为1.0%、玉米浆的加入比例为1.2%、酵母膏的加入比例为0.5%、磷酸二氢钾的加入比例为0.3%,加片碱调pH:7.5~7.8,加入1%消泡剂,121℃灭菌30min。

发酵培养基配方:葡萄糖的加入比例为1.2%、玉米浆的加入比例为1%、磷酸二氢钾的加入比例为0.25%、加片碱调pH:7.5~7.8,加入1%消泡剂,121℃灭菌30min。

1.2 设备

LDZX-30KBS立式高压蒸汽灭菌器:上海申安医疗器械厂;净化工作台:本次研究中使用的该设备来自于苏州其嘉;LRH-250培养箱:本次研究中使用的该设备来自于上海一恒;旋转蒸发器:本次研究中使用的该设备来自于上海予华;SPH-211C摇床:本次研究中使用的该设备来自于上海世平;TD5A-WS离心机:本次研究中使用的该设备来自于金坛金南;HH-W0(2L)水浴:本次研究中使用的该设备来自于上海精仪;SHZ-DIII泵:本次研究中使用的该设备来自于上海沪析;1200色谱仪:本次研究中使用的该设备来自于美国安捷伦。

1.3 实验方法

1.3.1 静息细胞法转化醋酸可的松工艺研究。将保存的简单节杆菌冻干管接种至斜面培养基置于恒温培养箱,30℃,培养72h,斜面接种到培养基,置于摇床,30℃,170r/min条件下培养48h,种子液按照发酵液培养基体积的10%接种,同样30℃,170r/min处理,取培养至不同时间发酵摇瓶,离心收集菌体,加入与发酵液等体积的无菌水中,再按照发酵液体积,加入4%乙醇和3%、4%和5%三种不同浓度的醋酸可的松,转化条件

为:33℃,200r/min,转化周期2d,每个样品三瓶重复,结果取平均值。

1.3.2 静息细胞法与传统发酵法的转化能力对比。将保存的简单节杆菌冻干管接种至斜面培养基置于恒温培养箱,30℃,培养72h,然后将培养的斜面接种至种子培养基,置于恒温摇床,30℃,170r/min培养48h,将培养的种子液按照发酵培养基体积的10%进行接种,置于恒温摇床,30℃,170r/min培养,培养至18h,分别按照静息细胞法(1.3.1中操作)和传统发酵法(直接向发酵液中投料),加入4%乙醇和3%醋酸可的松,转化条件为:33℃,200r/min,转化周期2d,每个样品三瓶重复,结果取平均值。

1.3.3 静息细胞法与传统发酵法制备醋酸泼尼松的质量对比。提取:分别取1.3.2中静息细胞法和传统发酵法转化结束后的发酵液,三个平行样合并后离心收集固体物料,烘干碾碎,得到醋酸泼尼松脱氢物,按照醋酸泼尼松脱氢物重量,分别加入18倍体积的乙酸乙酯和1%药用炭,升温至70~80℃,回流2h,保温过滤去除菌体杂质,收集滤液,然后将滤液减压浓缩,然后降温至20℃以下,抽滤,烘干,可获得粗品。

精制:按照醋酸泼尼松粗品重量,分别加入3倍体积的乙酸乙酯,升温至70~80℃,回流2h,然后降温至20摄氏度以下,抽滤,烘干,得醋酸泼尼松。

1.3.4 发酵转化率分析。为了进行发酵转化液的处理,首先取1毫升发酵液,随后加入9毫升乙酸乙酯,然后将其在超声波设备中处理10分钟,接着进行离心操作,最后将上清液通过滤器过滤,所获得的滤液即为供试品,用于后续分析步骤。

在制备醋酸泼尼松成品的过程中,首先需要从样品中精密称取一定量的物质,然后将其溶解于流动相中,并进行定量稀释,使得最终每1毫升溶液中含有0.5毫克的醋酸泼尼松,获得供试品溶液,用于具体检测。

对于对照品配置,需要取醋酸泼尼松对照品,将其溶解于甲醇中,进行定量稀释,使得每1毫升溶液中含有0.1毫克的醋酸泼尼松,用于对照实验的进行。

在制备混合溶液时,首先取一定量的泼尼松与醋酸可的松对照品,然后将其溶解于流动相中,并进行定量稀释,使得最终每1毫升混合溶液中分别含有0.5毫克的泼尼松和醋酸可的松。

1.3.5 液相色谱分析。采用C18柱填充剂(色谱柱尺寸为150mm×4.6mm,粒径为5μm);以乙腈-水(33:67)为处理中的流动相;检测波长为240nm,进样体积20μl,流速1mL/min,柱温30℃,等度洗脱,其中泼尼松出峰时间为9.291min,醋酸泼尼松出峰时间为12.257min,醋酸可的松出峰时间为13.212min,按照面积归一法计算发酵转化液和醋酸泼尼松成品中各成分的含量。

2 结果与分析

2.1 静息细胞法转化醋酸可的松结果

分别取培养至14h、16h、18h和20h发酵液,收集菌体,制备成静息细胞体系,然后分别加入3%、4%和5%的醋酸可的松进行转化,转化结果见表1。

表1 静息细胞法转化醋酸可的松结果

投料时间 (h)	投料浓度 (%)	醋酸泼尼松 (%)	醋酸可的松 (%)	转化率
14	3	91.6	8.4	91.6
	4	89.6	10.4	89.6
	5	86.4	13.6	86.4
16	3	93.2	6.8	93.2
	4	91.5	8.5	91.5
	5	89.3	10.7	89.3
18	3	93.8	6.2	93.8
	4	92.4	7.6	92.4
	5	90.2	9.8	90.2
20	3	92.1	7.9	92.1
	4	90.5	9.5	90.5
	5	88.7	11.3	88.7

由表1可知,使用静息细胞法,在14h分别投料3%、4%和5%浓度的醋酸可的松,发酵转化率分别可达到91.6%、89.6%和86.4%;16h投料,发酵转化率分别可达到93.2%、91.5%和89.3%;18h投料,发酵转化率分别可达到93.8%、92.4%和90.2%;20h投料,发酵转化率分别可达到92.1%、90.5%和88.7%,以上结果表明发酵液培养至18h,制备成静息细胞后,投料3%浓度的醋酸可的松,发酵转化率最高,可达到93.8%。

2.2 静息细胞法与传统发酵法的转化能力对比结果

在发酵液培养至18h时,分别使用传统发酵法和静息细胞法,投加4%的乙醇和不同浓度的醋酸可的松,发酵转化,比较数据详见图2。

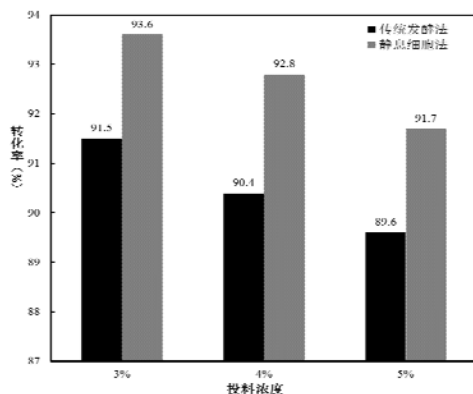


图2 静息细胞法与传统发酵法的转化能力对比结果

由图2可知,通过静息细胞法和传统发酵法,分别投料3%、4%和5%浓度的醋酸可的松,传统发酵法的转化率分别为91.5%、90.4%和89.6%,静息细胞法的转化率分别为93.6%、92.8%和91.7%,静息细胞法转化率均高于传统发酵法,该结果表明,静息细胞法与传统发酵法相比,具有较高的发酵转化能力。

2.3 静息细胞法与传统发酵法制备醋酸泼尼松的质量对比结果

将传统发酵法和静息细胞法转化不同浓度的醋酸可的松得到的发酵液离心,收集固体,提取精制获得醋酸泼尼松,测定结果详见下表2。

表2 静息细胞法与传统发酵法制备醋酸泼尼松的质量对比

样品 序号	发酵方法	投料浓 度(%)	醋酸波 尼松(%)	醋酸可 的松(%)	波尼松(%)	其他单杂 (%)	总杂 (%)
			97%~102%	≤1.5%	≤0.5%	≤0.1	≤2.0%
1	传统发酵法	3	99.36	1.28	0.09	0.17	1.54
2	静息细胞法	3	100.2	0.94	0.07	0.01	1.28
3	传统发酵法	4	98.56	1.45	0.16	0.28	1.82
4	静息细胞法	4	99.35	1.09	0.09	0.03	1.43
5	传统发酵法	5	97.66	1.86	0.22	0.45	2.16
6	静息细胞法	5	98.86	1.28	0.14	0.04	1.67

从表2可知, 分别使用传统发酵法和静息细胞法, 投料不同浓度的醋酸可的松转化制备得到的醋酸泼尼松, 经过对比, 静息细胞法制备得到醋酸泼尼松含量均高于传统发酵法, 其他单杂含量均在0.05%以下, 有关物质醋酸可的松、泼尼松及其他单杂含量均较传统发酵法低, 以上结果表明, 静息细胞法转化制备的醋酸泼尼松含量高、未知单杂含量可控制在0.05%以下, 杂质较少, 质量更为优秀。

3 结论

对静息细胞法转化醋酸可的松的能力进行分析研究,发现在发酵液培养至18h时,制成静息细胞,投料3%浓度的醋酸可的松,转化率为93.8%;通过静息细胞法和传统发酵法转化醋酸可的松的能力进行对比研究,结果发现相同投料时间,投料3%、4%和5%浓度的醋酸可的松,静息细胞法转化率均高于传统发酵法,将两种方法发酵转化得到醋酸泼尼松脱氢物进行提取、精制,检测结果表明息细胞法转化制的醋酸泼尼含量高、未知单杂含量可控制在0.05%以下,杂质含量低,制备出的醋酸泼尼松产品质量较传统发酵法高。

[参考文献]

[1]张佳佳.雷公藤多苷联合醋酸泼尼松治疗肾病综合征的临床效果[J].临床合理用药,2024,17(11):24-26.

[2]朱宏莉,张嘉,宋纪蓉,等.静息细胞法转化天麻素的研究[J].生命科学与医药学,2007,37(1):73-76.

[3]杨大娇,任天宝,王凤芹,等.静息细胞在发酵工业中的研究进展[J].食品与发酵工业,2013,39(08):187-191.

[4]余伯阳.中药与天然药物生物技术研究进展与展望[J].中国药科大学学报,2002,33(5):359-363.

[5]刘凤丽,沐万孟,江波,张涛,李兴峰.静息细胞转化合成苯乳酸的条件优化[J].食品工业科技,2008,(08):67-70.

作者简介:

罗浩(1972--),男,汉族,湖北襄阳人,本科,工程师,从事药物研究与开发。

*通讯作者:

王霜(1987-),男,回族,湖北襄阳人,研究生,工程师,从事药物研究与开发。