

兽用生物制药学

丁文雅 主编

东北农业大学

主 编 丁文雅 (东北农业大学)
编 者 刘艳艳 (东北农业大学)
张忠斌 (哈尔滨三联药业)
盛尊来 (东北农业大学)
陈雪英 (东北农业大学)
陈俭清 (东北农业大学)
主 审 李艳华 (东北农业大学)

前　　言

《兽用生物制药学》是动物药学专业的必修课程，本书共分 12 章，详细系统地讲述了生物药物提取分离的各种制备方法，如盐析法、有机试剂沉淀法、等电点法、吸附法、离子交换法、凝胶色谱法、亲和层析法及膜分离法等，并将这些方法应用于各类生化药物的制备工艺中，如氨基酸的制备、多肽的制备、蛋白质的制备、酶的制备、核酸的制备、多糖的制备、脂肪及维生素与辅酶的制备等；也介绍了发酵法及固定化酶法制备兽用常用药抗生素药的原理及工艺操作，并根据生物药物的特点讲解了这类药物的独特贮存方法及其质量分析测定方法。全书内容翔实丰富、概念准确，完整的表达了本课程应包含的知识，可供动物药学专业学生教学使用，也可供从事相关专业的工作人员阅读、学习和参考。

本书具有理论知识系统性、知识内容广泛性、提取工艺方法多样性及较强的理论结合实践性的特点，对于从事生物药物的生产、研制、经营和使用具有重要的指导作用，也对培养能在生物制药生产一线从事生产操作、科研开发、创新改造、市场开发等工作的高等技术应用性专门人才具有重要的意义。

由于《兽用生物制药学》是首次出版，而本学科所含内容丰富博大，以至于在编写时深感心力不足，总觉有很多不足之处，加之水平和时间等原因，本书难免存在不少缺点和错误，敬请各方面人士多加指正。

编者

2016 年 11 月

目 录

第一章 生物药物概论	1
第一节 生物药物的特点	2
一、生物药物的来源与历史.....	2
二、生物制药的特点.....	3
第二节 生物药物的分类	4
一、生物药按化学本质分类.....	4
二、生物药按原料来源分类.....	5
三、生物药按生理功能和用途分类.....	7
第三节 生物药物的研究发展趋势	7
一、资源的综合利用与开发.....	7
二、现代生物技术医药产品的大力开发.....	8
三、依靠生化理论从天然存在的生理活性物质中寻找新药.....	8
四、发展化学合成和蛋白质工程开发新结构药物.....	8
五、中西结合创制新型生物药物.....	9
第二章 生化药物分离纯化的基础技术	9
第一节 原料的选择和预处理	10
一、生物材料的选择原则.....	10
二、原材料的预处理.....	10
三、组织和细胞的破碎.....	10
第二节 活性物质的提取	12
一、提取方法选择的影响因素.....	12
二、提取的注意事项.....	12
三、提取溶剂的极性判断与选择.....	12
四、提取时活性物质的保护措施.....	13
五、影响提取的因素.....	14

六、提取方法.....	14
第三节 生物活性物质的浓缩与干燥.....	15
一、生物活性物质的浓缩.....	15
二、生物活性物质的干燥.....	15
第四节 盐析法.....	16
一、盐析法定义.....	16
二、盐析法原理及分类.....	17
三、盐析法常用的中性盐.....	17
四、盐析法的优点与缺点.....	17
五、盐析法的操作.....	17
第五节 有机溶剂沉淀法.....	20
一、有机溶剂沉淀法的优点与缺点.....	20
二、有机溶剂沉淀法的主要机理.....	20
三、有机溶剂沉淀法操作条件的控制.....	21
第六节 等电点沉淀法.....	22
一、等电点沉淀法的原理.....	22
二、等电点沉淀法的注意事项.....	23
第七节 结晶法.....	23
一、结晶的条件.....	24
二、结晶过程.....	24
三、结晶法特点.....	25
四、结晶方法.....	25
第八节 吸附法.....	26
一、吸附的基本原理.....	26
二、吸附方法.....	27
三、吸附法的类型.....	27

四、吸附速度.....	28
五、影响吸附的因素.....	29
六、常用吸附剂.....	31
七、吸附法的溶剂与洗脱剂.....	38
第九节 离子交换法.....	40
一、离子交换法的定义.....	40
二、离子交换法的原理.....	40
三、离子交换法特点.....	41
四、离子交换法的洗脱方法.....	41
五、离子交换树脂的分类与要求.....	42
六、离子交换树脂的骨架分类.....	44
七、离子交换操作方法.....	45
第十节 凝胶层析.....	45
一、凝胶层析定义.....	45
二、凝胶层析原理.....	46
三、凝胶层析的特点.....	46
四、几种常用的凝胶.....	47
五、凝胶色谱的操作.....	49
第十一节 亲和层析.....	51
一、亲和层析定义.....	52
二、亲和层析特点.....	52
三、亲和层析的过程.....	52
四、亲和层析载体.....	52
五、亲和层析配基.....	54
六、影响亲和作用的因素.....	55
七、亲和层析的非专一性吸附.....	55

八、亲和层析的洗脱方法.....	55
九、亲和层析柱的再生.....	55
第十二节 膜分离技术.....	56
一、膜的分类.....	56
二、膜分离原理.....	56
三、微孔膜过滤法.....	56
四、超滤法.....	58
五、反渗透法.....	60
六、透析法.....	61
第三章 氨基酸类药物.....	62
第一节 氨基酸类药物的基本概念.....	62
一、氨基酸类药物的基本知识.....	62
二、氨基酸的分类.....	63
三、氨基酸的理化性质.....	64
四、氨基酸及其衍生物在医药中的应用.....	67
第二节 氨基酸类药物的生产方法.....	69
一、水解法制备氨基酸.....	70
二、发酵法制备氨基酸.....	72
三、酶转化法制备氨基酸.....	75
四、化学合成法制备氨基酸.....	78
第三节 氨基酸输液.....	80
一、氨基酸输液的组成原理与比例.....	80
二、氨基酸输液的配方.....	81
三、氨基酸输液的配制.....	81
四、氨基酸输液的质量标准.....	82
五、氨基酸输液的作用与用途.....	82

第四章 多肽与蛋白质类药物.....	82
第一节 多肽及蛋白质类药物的性质与提纯方法.....	82
一、多肽类药物的概述.....	82
二、蛋白质类药物的概述.....	84
三、多肽、蛋白质类药物的性质.....	85
四、蛋白质类药物的分离与纯化.....	86
五、溶液中蛋白质浓度的测定.....	90
六、蛋白质的纯度检查.....	91
七、多肽与蛋白质的化学合成.....	91
第二节 多肽及蛋白质类药物的制备工艺.....	93
一、主要多肽类药物的制备.....	93
二、主要蛋白质类药物的制备.....	95
第五章 核酸类药物的制备技术.....	98
第一节 概述.....	98
一、核酸类药物的基本知识.....	99
二、核酸类药物的一般性质.....	100
三、核酸类药物的紫外吸收性质.....	101
四、核酸类药物的变性和复性.....	101
五、核酸的颜色反应及其在测定上的应用.....	101
六、核酸中含磷量的测定.....	101
七、核酸分析测定时样品的预处理.....	102
第二节 核酸类物质的分离提取及其发酵生产.....	102
一、核酸类物质的作用及用途.....	102
二、RNA 与 DNA 的提取与制备.....	103
三、核酸的提取实例.....	106
四、常用核酸药物制备.....	108

第六章 酶类药物的制备技术.....	111
第一节 概述.....	111
一、酶类药物的简介.....	111
二、酶类药物的组成及分类.....	112
三、酶类药物的应用.....	112
第二节 酶类药物生化产品的提取分离方法.....	113
一、酶类药物的原料选择.....	113
二、酶类药物生物材料的预处理.....	115
三、酶类药物的提取.....	116
四、酶类药物的纯化.....	116
第三节 酶类药物.....	118
一、胃蛋白酶的制备.....	118
二、胰蛋白酶的制备.....	119
三、尿激酶的制备.....	120
四、细胞色素的制备.....	121
五、超氧化物歧化酶的制备.....	123
第七章 糖类药物的制备技术.....	124
第一节 概述.....	124
一、糖类药物的分类.....	125
二、糖类药物的作用.....	125
第二节 糖类药物制备的一般方法.....	126
一、单糖类药物的制备.....	127
二、多糖类药物的分离与纯化.....	127
第三节 糖类药物.....	130
一、D-甘露醇的制备.....	130
二、1、6—二磷酸果糖的制备.....	130

三、肝素的制备.....	131
三、硫酸软骨素的制备.....	132
四、透明质酸的制备.....	133
第八章 脂类药物的制备技术.....	134
第一节 脂类的概述.....	134
一、脂类药物的简介.....	134
二、脂类药物的分类.....	135
三、脂类的结构与性质.....	135
四、脂类药物在临床上的应用.....	136
五、脂类药物制备.....	137
六、脂类药物的分离.....	138
七、脂类药物的精制.....	139
第二节 脂类生化药物.....	139
一、磷脂类药物的制备.....	139
二、胆酸类药物的制备.....	140
三、色素类药物的制备.....	141
四、固醇类药物的制备.....	142
五、不饱和脂肪酸类药物的制备.....	142
六、人工牛黄的制备.....	145
第九章 维生素及辅酶类药物.....	146
第一节 维生素及辅酶.....	146
一、维生素的基本概念.....	146
二、维生素与辅酶、辅基的关系.....	146
三、维生素及辅酶类药物的生产方法.....	147
第二节 重要维生素及辅酶类药物.....	147
一、维生素 C 的制备.....	147

二、维生素 B ₂ 的制备.....	151
三、辅酶 I 的制备.....	151
四、辅酶 A 的制备.....	153
第十章 发酵法与抗生素类药物的制备.....	154
第一节 概述.....	154
一、发酵微生物法的发展阶段.....	155
二、发酵产物的类型.....	155
第二节 发酵工业的菌种与发酵方式.....	156
二、高产菌的选育.....	156
三、菌种的保藏.....	157
四、菌种的扩大培养.....	159
五、发酵的培养基.....	159
六、常用的灭菌方法.....	161
七、发酵的方法.....	162
第三节 发酵的影响因素.....	163
二、发酵培养基对微生物生长的影响.....	164
三、纯种发酵与灭菌对微生物生长的影响.....	164
四、温度对微生物生长的影响.....	164
五、pH 对微生物生长的影响.....	165
六、溶氧对发酵的影响.....	166
七、发酵产生的泡沫.....	166
第四节 发酵产物的提取.....	167
一、发酵液的预处理.....	167
二、发酵目的物的提取纯化.....	168
第五节 抗生素的制备工艺.....	171
一、抗生素的分类.....	171

二、抗生素的剂量表示法.....	173
三、抗生素的体外抗菌作用.....	173
四、抗生素的生产过程.....	174
五、青霉素的制备.....	176
六、四环素的制备.....	179
七、土霉素的制备.....	180
第十一章 酶工程制备生物药物.....	182
第一节 概述.....	182
一、酶的特性.....	183
二、酶的分类.....	183
三、酶催化作用的特点.....	183
四、酶工程简介.....	184
第二节 酶的固定化.....	185
一、游离酶的缺点.....	185
二、固定化酶的发展史.....	185
三、固定化酶的基本概念.....	186
四、固定化酶的优点与缺点.....	186
五、固定化酶的制备方法.....	186
第三节 酶工程制备药物.....	192
一、6-氨基青霉烷酸的制备.....	192
二、5-复合单核苷酸的制备.....	193
第十二章 生化产品的保存与质量分析.....	194
第一节 生化产品保存的一般方法.....	194
一、生化产品保存的目的与前提条件.....	194
三、各类生化产品的保存方法.....	195

第二节 生化药物的质量分析.....	197
一、仪器分析方法.....	197
二、化学分析方法.....	198
三、纯度测定方法.....	198

第一章 生物药物概论

生物制药是利用生物体、生物组织及其成分，综合应用生物学、生物化学、微生物学、免疫学、物理化学和药学原理与方法进行加工制造而成的一大类预防、诊断、治疗制品。其从广义上讲生物药物包括动物、植物、微生物等生物体中制取的各种天然生物活性物质及其人工合成或半合成的天然物质类似物，主要包括生化制药和生物制品。生化制药是运用生物化学研究方法，将生物体中起重要生理生化作用的各种基本物质经过提取、分离、纯化等手段制造出的药物；或者将上述这些已知药物加以结构改造或人工合成创造出的自然界没有的新药物，主要有氨基酸、多肽蛋白类、核酸类、多糖、脂、细胞生长调节因子等。如尿黑酸氧化酶，此为机体中正常存在的酶，当其缺乏时，会使酪氨酸代谢障碍，导致尿黑症。药物阿糖胞苷，它不存在于自然界，且与生理性类似物胞核苷的区别在于其2'糖分子的位置上有OH基，它是非急性淋巴细胞性白血病治疗的首要药物，并逐渐扩大应用到某些急性淋巴细胞性白血病和恶性淋巴瘤，其原理为阿糖胞苷可以竞争性抑制DNA多聚酶，并插入到DNA链内，进而终止DNA的活动，是一种DNA复制的抑制剂。生物制品是指以微生物、寄生虫、动物毒素、生物组织作为起始原料，采用生物学工艺或分离纯化技术制备，并以生物学技术和分析技术控制中间产物和成品质量制成的生物活性制剂。主要包括疫（菌）苗、毒素、类毒素、免疫血清、血液制品、免疫球蛋白、抗原、变态反应原、细胞因子、激素、酶及辅酶、发酵产品、McAb、DNA重组产品、体外免疫试剂等。

随着生命科学的不断进步及药学和现代生物分离技术发展的日益更新，越来越多的生物活性物质被分离纯化并作为药物用于人类疾病的防治。从全球生物药品品种分布情况来看，生物药物在制药产业中所占的市场份额以及药物年销售额呈现逐年上升趋势，美国占全球份额的63%，其次是欧洲25%，日本7%，在中国生物医药制造业也增长迅速，大量生物药品在市场涌现，如安徽安科公司“重组人干扰素db”、“重组人生长激素”等具有国际先进水平的生物高科技产品，山东东阿阿胶集团生产的用于肾性贫血及多种贫血替代输血治疗的重组人红细胞生成素，云南大学生物技术有限公司单克隆生物技术生产的优生试

纸、女性不孕检测试纸等产品也已正式大批量投放市场。市场中常用生化药物如小牛血清去蛋白注射液，是小牛血经去蛋白提取、精制制得，内含多种游离氨基酸和肽可用于改善脑部血液循环和营养障碍性疾病(缺血性损害、颅脑外伤)所引起的神经功能缺损；末梢动脉、静脉循环障碍及其引起的动脉血管病，腿部溃疡；皮肤移植术；皮肤烧伤、烫伤、糜烂；愈合伤口(创伤、褥疮)；放射所致的皮肤、粘膜损伤等症状。药品脑蛋白是猪脑中提取的多肽蛋白，可用于预防老年痴呆。药品干扰素（IFN）是一种具有多种功能的活性蛋白质（主要是糖蛋白），是由单核细胞和淋巴细胞产生的细胞因子，也是一种广谱抗病毒剂，它并不直接杀伤或抑制病毒，而主要是通过细胞表面受体作用使细胞产生抗病毒蛋白，从而抑制乙肝病毒的复制；同时它还可以增强自然杀伤细胞（NK 细胞）、巨噬细胞和 T 淋巴细胞的活力，从而起到免疫调节作用，并增强抗病毒能力。

第一节 生物药物的特点

一、生物药物的来源与历史

生物药物主要是从天然的生物材料如人体、动物、植物、微生物和各种海洋生物中制取而来。是一类既古老又年轻的新型药物，据记载孙思邈用羊肝治疗“雀目”（系指夜间视物不清的一类病症，又有鸡蒙眼、鸡盲和夜盲等别称），其主要原理为羊肝中含有丰富的维生素 A，具有治疗夜盲症的效果；神农用羊的包括甲状腺的头部肌肉治疗甲状腺肿，其原理为羊的头部肌肉可以治疗碘缺乏病；古代所用药物秋石是男性尿中沉淀出的物质，这些物质主要包含类固醇激素，它是最早从尿中分离类固醇激素的方法，具有滋阴降火的作用，能治骨蒸劳热、咳嗽、咳血、咽喉肿痛、噎食反胃、遗精、白浊、膏淋、妇女赤白带下等疾病；动物药蜈蚣具有攻毒散结，通络止痛的功效，用于小儿惊风、抽搐、痉挛、中风和半身不遂等疾病；动物脏器鸡内金具有消食健胃、涩精止遗的功效，可用于饮食积滞、小儿疳积、肾虚遗精、遗尿等疾病。羚羊角具有平肝息风、清肝明目、凉血解毒的功效，主治肝风内动、惊痫抽搐、谵语发狂、肝阳头痛眩晕、肝火目赤肿痛、血热出血和温病发斑等疾病。早期的生物药物多来自动物及其脏器，具有有效成分不明确的缺点，随着

科技的不断进步，人们对动物脏器的有效成分逐渐有所了解，出现了从动物脏器中提取纯化有效成分制备生物药物的工艺，如纯化胰岛素、甲状腺素、各种必需氨基酸、必需脂肪酸、以及多种维生素类药物的制备并在临幊上广泛应用。

二、生物制药的特点

1、药理学特点

(1) 治疗针对性强，治疗的生理生化机制合理，疗效可靠。如细胞色素 C 为呼吸链中的一个重要成员，用它治疗因组织缺氧所引起的一系列疾病，如二氧化碳中毒、安眠药中毒、新生儿窒息、严重休克缺氧等，大脑严重缺氧最容易导致脑细胞缺氧死亡，导致大脑结构和功能上的损伤，短时间的缺氧可以导致晕厥，缺氧超过 5 分钟就会导致不可逆损伤，缺氧超过 15 分钟就一定死亡；激肽释放酶包括血浆激肽释放酶和组织激肽释放酶，正常情况下，绝大部分是以无活性的前体，即血浆前激肽释放酶的形式存在，故血浆中只含有微量激肽，其活性产物是缓激肽，组织激肽释放酶广泛存在于肾、胰腺、胃肠道粘膜及中枢神经系统等许多组织中，它以激肽释放酶原的形式在组织中合成，再经胰蛋白酶激活形成组织激肽释放酶，并可释放至血液循环，静脉注射缓激肽可引起全身小动脉舒张，显著降低外周血管循环阻力，血管通透性增强，从而引起血压下降，缓激肽还具有强大的利尿钠效应，可使肾脏血流量增多，肾小管周围毛细血管血压增高，抑制肾小管再吸收，并通过刺激入球小动脉压力感受器及致密斑而产生利尿钠作用。凝血酶是一种凝血酶前体形成的蛋白质水解酶，可催化纤维蛋白元变成纤维蛋白而促使血液凝固，用于手术中不易结扎的小血管止血、消化道出血及外伤出血等。

(2) 药理活性高。生物药物是从大量原料中精制出来的高活性物质，因此具有高效的药理活性，如注射纯的 ATP 三磷酸腺苷可以供给机体能量，且效果显著，细胞色素 C 静注， $15\text{mg} \sim 30\text{mg}/\text{次}$ ， $1 \sim 2 \text{ 次}/\text{日}$

(3) 毒副作用小营养价值高。生物药物主要有蛋白质、核酸、糖类、脂类等，这些物质由氨基酸、核苷酸、单糖等单元组成，不仅无毒害还是重要的营养物质

(4) 生理副作用常有发生。生物药物是从生物原料制得，由于生物进化的结果使不同生物，甚至相同生物的不同个体间活性物质的结构差异较大，这种差异的存在使生物药

物表现出副作用，如免疫反应、过敏反应等。

2、在生产、制备中的特殊性

(1) 原料药中的有效物质含量低，杂质种类多且含量高，因此提取、纯化工艺复杂。如胰岛素，它是由动物(牛、猪)胰脏提取的一种蛋白质生物制剂，胰腺中胰岛素的含量仅为0.002%，还含有多种酶、蛋白质等杂质，所含不纯物质不仅对人体具有抗原性，而且还影响胰岛素的生理作用，因此其提纯工艺复杂。

(2) 稳定性差。生物药物的分子结构中一般具有特定的活性部位，生物大分子药物以其严格的空间构象来维持其生物活性功能，一旦遭到破坏就失去其药理作用。引起活性破坏的因素主要有生物性的破坏，如被自身酶水解；理化因素破坏，如温度、压力、重金属、酸碱等。

(3) 易腐败。由于生物药物原料及产品均为营养价值高的物质，因此极易染菌腐败，从而造成有效物质被破坏失活，并产生热源或致敏物质，因此生产过程中对温度、无菌操作要求较高。

(4) 注射用药有特殊要求。生物药物由于易被肠道的酶分解，所以给药途径主要是注射用药，因此对药品制剂的均一性、安全性、稳定性、有效性等均有严格的安全检查。

3、质量检查中的特点。由于生物药物有特殊的生理功能，因此药物不仅要有理化检验指标，还要有生理活性检验指标。

第二节 生物药物的分类

一、生物药按化学本质分类

1、氨基酸类药物：此类药物使用量大，总产量高达百万吨，如胱氨酸，用于抗过敏、肝炎等；蛋氨酸，用于预防肝炎、肝坏死、脂肪肝；还有精氨酸、鸟氨酸等。

2、多肽和蛋白质类药物：多肽是由多种氨基酸按一定顺序连接起来的化合物，分子量较小且多无空间构象，即使某些具有空间构象其稳定性也很差，多肽在生物体中具有浓度低活性强的特点。如催产素为九肽，能促进子宫收缩，帮助娩出婴儿，并在婴儿出生后，

它继续发挥作用，使子宫回缩，停止出血；胰多肽是36个氨基酸组成的直链多肽激素，由胰腺的PP细胞分泌，可以抑制胆囊收缩素和胰酶的排放，使胆囊平滑肌松弛，可降低胆囊内的压力，胆总管括约肌紧张加强，抑制胆汁向十二指肠的排放等作用。蛋白质类药物分为单纯蛋白质和结合蛋白质，结合蛋白有糖蛋白，脂蛋白，色蛋白等。

3、酶和辅酶类药物：酶类有助消化酶类、消炎酶类、心血管疾病治疗酶类、抗肿瘤酶类等；辅酶在酶促反应中起着递氢、递电子或基团转移的作用对酶的催化反应起着关键性决定作用，如辅酶1、辅酶Q、辅酶A等。

4、核酸及其降解物和衍生物类药物：核酸类药物有从猪、牛肝脏中提取的RNA制品，可用于慢性肝炎、肝硬化和肝癌的辅助治疗；核酸类药物也有从小牛胸腺或鱼精中提取的DNA制品，可用于治疗精神迟缓、虚弱和抗辐射等。

5、多糖类药物：多糖类药物具有抗凝、降血脂、抗病毒、抗肿瘤、增强免疫力等功能，如肝素，它是一种黏多糖，具有抗凝血、抑制血小板，增加血管壁的通透性，调控血管新生和调血脂的作用，在临幊上广泛应用于防治血栓栓塞性疾病、弥漫性血管内凝血疾病等。此外，多糖类药物还有硫酸软骨素、透明质酸和壳聚糖等。

6、脂类药物：脂类药物有磷脂类、多价不饱和脂肪酸、前列腺素、胆酸类、固醇类等。

7、细胞生长因子与组织制剂：细胞生长因子是在体内对动物细胞的生长有调节作用，并在靶细胞上有特异受体的一类物质，它们不是细胞的营养物质大多为多肽和蛋白质，如基因工程白细胞介素（IL）、红细胞生成素（EPO）、干扰素、肿瘤坏死因子、集落刺激因子等。

8、生物制品：生物制品有预防用制品、治疗用制品和诊断用制品。按原料不同预防制品分为菌苗如霍乱菌苗、百日咳菌苗、鼠疫菌苗等；疫苗如乙肝疫苗、流感疫苗、狂犬疫苗等；类毒素如白喉类毒素、破伤风类毒素等。治疗用品可分为有特异性治疗用品、非特异性治疗用品。

二、生物药按原料来源分类

1、人体组织来源：种类多，疗效好，无副作用，但受到法律和伦理的限制，主要有

人血液制品、人胎盘制品、人尿制品等。

主要特点有①安全性好，此类生物制品与人体内成分差异小，不易产生免疫反应，但原料不一定都是健康人，难免污染病原物和同种抗原性物质，因此也有不安全的一面。②效价高，疗效可靠，如纯化的因子制剂，效价比原血浆高十倍至上千倍。③稳定性好，可制成冻干制剂，在10℃以下可保存2年。

2、动物组织来源：主要包括动物脏器制药的全部内容及其它小动物产品如蛇毒、蝎毒、蜂毒等。此类生物制品原料来源丰富，价格低廉，可批量生产，但由于动物种族的差异，产品要进行严格的药理毒理实验。其主要特点有①具有生物药物的共同特性。②原料来源丰富，如羊、牛、猪、鸡等。③需重视安全性，由于动物与人类的种族差异，会使某些蛋白质等在结构上有一定差异，而产生抗原性。如从脑组织中可获得脑磷脂、卵磷脂、大脑组织液、凝血致活酶、脑酶解液、催眠多肽、吗啡样因子、脑蛋白水解液等。从心组织中可获得细胞色素C、心脏激素、辅酶Q₁₀、辅酶A、辅酶I。从肺组织中可获得抑多肽、纤维酶原激活剂、肝素、肺表面活性剂、核苷酸等。从肝组织中可获得RNA、过氧化氢酶、SOD、肝抑素、肝解毒素、肝细胞生长因子、造血因子、抑肽酶、抗脂血作用因子等。从脾组织中可获得RNA、DNA、脾转移因子等。从胃肠及粘膜组织中可获得胃蛋白酶、胃膜素蛋白酶、凝乳酶、肝素、胃肠道激素等。

3、植物组织来源：植物药物是中草药的主要成分，中药现代化研究是重点，全世界有40%的药物来源于植物。我国是中草药资源最丰富的国家，有详细记载的近5000种，中草药治疗疾病的历史上千年，中医药已形成完整的科学体系，对于植物药效成分的研究已形成“天然药物化学”研究的新领域。

药用植物中具有药物功能的物质种类繁多，结构复杂。除小分子的天然有机化合物以外，还有多种生物大分子活性物质如植物蛋白质、多肽、酶类生理活性物质，植物糖类药物，植物脂类药物，脂肪和脂肪酸类，如亚油酸、亚麻酸、花生四烯酸、磷脂类等。

4、微生物来源：如抗生素类、氨基酸、维生素等，其生产多用微生物发酵技术。

5、海洋生物来源：是最新的药物资源，种类多、资源丰富、潜力大。国外自20世纪60年代就开始对海洋天然药用活性物质进行研究，且1967年在美国召开了首次海洋药物

国际学术会议。近几年来，各国科学家对海洋生物进行了广泛的研究，并从中分离和鉴定了数千种海洋天然药物，它们与陆生天然物质相比有特异的化学结构。1982年“联合国海洋公约”出台后，许多国家都把开发利用海洋作为基本国策，美、日、法、英、独联体等推出了包括海洋药物在内的“海洋生物技术计划”，“海洋蓝宝石计划”，“海洋生物开发计划”。进入80年代后，随着现代生物技术及其相关技术的发展，使海洋微量活性成分的分离、提纯和鉴定有了长足的进步，如从海藻中提取褐藻酸钠、烟酸甘露醇脂、六硝基甘露醇等；从柳珊瑚中提取前列腺素A₂及萜类抗菌药等。

三、生物药按生理功能和用途分类

- 1、治疗药物：用于常见病、多发病。
- 2、预防药物：菌苗、疫苗、类毒素等，主要用于传染病。
- 3、诊断药物：具有速度快、灵敏度高、特异性强等特点。
- 4、其他生物医药用品：生化试剂、保健品、化妆品、食品、医用材料等。

第三节 生物药物的研究发展趋势

近年来生物药物发展迅速，新的生理活性物质不断被发现，且生物工程药物进入产业化，资源得到了极好的综合利用与扩大开发，这种由同一资源生产多种有效成分的理念，达到了一物多用，充分合理利用生物资源的目的，不仅可以降低成本而且可以降低三废（废气、废水、废渣），也可提高药品纯度，减少副作用等。

一、资源的综合利用与开发

1、脏器综合利用：用现代化的生化技术可使同一脏器生产若干生化产品，如胰脏，先用有机溶剂提取得提取液和残渣，提取液调节PH值，达到蛋白质等电点，沉淀蛋白质类物质如胰蛋白酶、胰淀粉酶等，而滤液中主为多肽类药物如胰岛素、胰高血糖素、胰多肽等，残渣再经提取也可得蛋白类物质如胰蛋白酶、胰淀粉酶、抑肽酶等。

2、血液综合利用：血制剂按理化性质分为细胞成分和血浆蛋白成分，细胞成分包括红细胞、白细胞、血小板；血浆蛋白成分包括白蛋白、免疫球蛋白、各种凝血因子、纤维

蛋白酶原等。

3、人尿综合利用：由于人尿制备的药物与人体成份同源，因此不存在异种蛋白抗原性问题。健康男性尿中可制备尿激酶，是一种传统溶栓药物，被广泛地运用于急性心肌梗塞、脑血栓、肺静脉血栓、下肢静脉血栓等多种血管栓塞疾病。此外还有激肽释放酶、尿抑胃素、蛋白酶抑制剂、睡眠因子、CSF 和 EGF 等。妊娠妇女与绝经期妇女的尿液中可制备 HCG.（绒毛膜促性腺激素）是妇产科医生们所熟悉和最常使用的“妊娠试验”激素，其主要功能就是刺激黄体，有利于雌激素和黄体酮持续分泌，以促进子宫蜕膜的形成，使胎盘生长成熟。

4、新资源的扩大与开发：如海洋生物、昆虫、毒蛇、和低等生物等资源的开发。

二、现代生物技术医药产品的大力开发

生物技术是人们利用微生物、动植物体为原料进行加工，以提供产品来为社会服务的技术。它主要包括发酵技术和现代生物技术，是一门新兴的，综合性的学科。近些年来，以基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程为代表的现代生物技术发展迅猛，并日益影响和改变着人们的生产和生活方式。生物技术应用于制药可以生产出大量廉价的防治人类重大疾病的新型药物，如 80 年代后生物技术公司研制出的生理活性物质、干扰素、抗体、疫苗、抗生素等。

三、依靠生化理论从天然存在的生理活性物质中寻找新药

现发现的药用生理活性物质仅为机体内存在的活性物质的一小部分，许多新活性物质正等待人们去开发，此为寻找新药的另一重要方向，如大脑发现控制生育和内分泌的影响物质活性多肽，它能促进细胞的分裂，调整细胞的新陈代谢，确保基因的表达和复制，保证细胞内蛋白质合成的数量、质量和速度处在正常状态，提高蛋白质的合理利用率，进而控制人体的生长和发育，衰老与疾病等；活性多糖，它参与生物体的免疫调节，参与生命细胞的各种活动，具有降血糖、降血脂、抗炎症、抗氧化、抗衰老、抗肿瘤等作用。

四、发展化学合成和蛋白质工程开发新结构药物

蛋白质工程是研究蛋白质的结构及结构与功能的关系，然后人为地设计一个新蛋白质，并按这个设计的蛋白质结构去改变其基因结构，从而产生新的蛋白质。由于蛋白质工

程是在基因工程的基础上发展起来的，在技术方面有许多同基因工程技术相似的地方，因此人们也把蛋白质工程称为第二代基因工程。

化学合成药物是指以化学理论为指导，依据化学规律研究和生产合成药物。化学合成是新药开发的重要途径之一，其合成药物特点是对疾病治疗疗效快，效果明显，但人体是一个复杂系统，化学合成药缺乏对人体本身结构分子水平的分析研究及人体各部分相关联的整体综合考察，因此治疗效果虽然明显，但有头痛医头、脚痛医脚的局限性治疗特征，且常有程度不同的副作用。

五、中西结合创制新型生物药物

中西结合是生物药物新药创制重要路径之一，面对新的药品专利法的实施和“复关”的挑战，我国药品从以仿制为主向创制转变，中西药结合乃是必由之路。专家们指出，所谓中西药结合，是以中医药传统理论为基础，用现代科学技术对中药进行深入全面的研究，并用现代科学语言对其药理、毒理、药效、化学成分、质量标准等进行定性定量的科学表述。

第二章 生化药物分离纯化的基础技术

生化药物是从动物、植物及微生物提取、分离、纯化所得物质，亦可用化学合成或生物技术制得的可用于预防、治疗和诊断疾病的生化物质，如氨基酸、多肽、蛋白质、酶、辅酶、多糖、核苷酸、脂和生物胺等，以及其衍生物、降解物及大分子的结构修饰物等。生化制药是把生物体内的基本物质，即保持原来的结构和功能又能在含有多种物质的液相或固相中较高纯度的分离出来。这些生物活性物质都有复杂的空间结构，维系这种特定的空间结构主要靠氢键用力、二硫键用力、疏水作用力和范德华力等，这些活性物质对外界条件非常敏感，过酸、过碱、高温、剧烈的震荡等都可能导致失活，因此在分离、纯化工艺中要尽量选择温和的条件，在低温下操作，同时还要防止体系中重金属离子和细胞自身酶的破坏作用。

生化药物制备的基本步骤主要有：原料药的选择和预处理；组织和细胞的破碎；提取

有效成分制成粗品；粗品的纯化（采用各种生物技术手段从粗品中将目的物精制出来）；生化药物的干燥与保存；生化药物制成制剂。

第一节 原料的选择和预处理

生化药物原料的主要来源为动物脏器、血液、分泌物及其他代谢物、海洋生物、植物、微生物等生命物质。

一、生物材料的选择原则

1、生物品种的选择：选取富含有效成分的生物品种是选材的关键。凝乳酶可以将乳蛋白凝聚成乳酪，而乳酪易于被蛋白酶消化，因此它可用于治疗消化不良，由于它作用于乳蛋白，因此应存在于哺乳动物胃中，需选取哺乳动物做原材料；催乳素为腺垂体分泌的一种蛋白质激素，它由 199 个氨基酸残基所组成，对乳腺有泌乳的作用，可促进乳腺的生长发育，维持泌乳，因此制备催乳素也应选择哺乳动物。

2、组织器官的选择：应选含有大量目的物的组织器官。胃蛋白酶是一种消化性蛋白酶，由胃部中的胃粘膜主细胞所分泌，其功能是将食物中的蛋白质分解为小的肽片段，因此制备胃蛋白酶应选择胃做原材料。免疫球蛋白是一类重要的免疫效应分子，由高等动物免疫系统淋巴细胞产生的蛋白质，经抗原的诱导可以转化为抗体，主要存在于血浆中，因此制备免疫球蛋白应选血液或富含血液的胎盘组织做原材料。

3、生物生长期的选择：生物的生长期对生理活性物质的含量影响较大，凝乳酶只能以哺乳期小牛、仔羊的第四胃为材料，成年的牛羊不适用。

二、原材料的预处理

- 1、动物：剔除结缔组织、脂肪组织等非含活性物质成分的部分。
- 2、植物：去壳除脂，如花生，花生中提取异黄酮、抗氧化剂等有重要的保健作用植物活性化学物时，需要去壳除脂的预处理。
- 3、微生物：进行菌体和发酵液的分离。

三、组织和细胞的破碎

1、物理方法

- (1) 磨切法，如绞肉机、均浆器、乳钵等搅碎研磨。
- (2) 压力法：压榨法、高压法、减压法、渗透压法等。
- (3) 反复冻融法：原理为因突然冷冻，细胞内形成冰晶，胞内外溶液中盐类物质的浓度也突然改变，进而破坏细胞。其操作方法是将待破碎的细胞在-20℃以下冰冻，再室温融解，反复几次，由于细胞内冰粒形成和剩余细胞液的盐浓度增高引起溶胀，使细胞结构破碎。
- (4) 急热骤冷法：将材料投入沸水中维持 85~90 分钟，再转至水浴中急速冷却，使得材料体积变化速度过快，导致分子力被破坏，材料裂纹甚至破碎，可用于细菌及病毒等材料。

2、化学方法

用酸、碱、盐、有机溶剂或表面活性剂处理细胞，破坏细胞结构，释放内容物。某些有机溶剂（如苯、甲苯）、抗生素、表面活性剂、金属螯合剂、变性剂等化学药物都可以改变细胞壁或细胞膜的通透性从而使细胞内含的物质有选择地渗透出来。其多用于破碎细菌，且作用比较温和，提取核酸时，常用此法破碎细胞。其存在的问题为耗费时间长，效率低；化学试剂毒性较强，同时对产物也有毒害作用，需用透析等方法进一步分离除去这些试剂；通用性差，某种试剂只能作用于某些特定类型的微生物细胞。

3、生物方法

- (1) 组织自溶法：利用组织中自身酶的作用改变破坏细胞结构，释放出目的物的方法称为组织自溶法，但此法不适用于易受酶降解的目的物制备。
- (2) 酶解法：用外来酶处理生物材料，如用溶菌酶处理某些细菌，将细胞壁分解，使细胞内含物释放出来。有些细菌对溶菌酶不敏感，加入少量巯基试剂或尿素处理后，可以使细菌转为对溶菌酶敏感而被破坏，此法适用于多种微生物。此法优点是作用条件温和，内含物成分不易受到破坏，细胞壁损坏的程度可以控制。其存在的问题是易造成产物的抑制作用，可能导致胞内物质释放率低；溶酶价格高，限制了大规模利用；酶解法通用性差，不同菌种需选择不同的酶，有一定局限性。

(3) 噬菌体法：用噬菌体感染细菌能引起宿主菌的裂解，裂解细胞释放内容物。如噬菌体感染大肠杆菌制备 DNA。

第二节 活性物质的提取

提取是利用制备目的物的溶解特性将目的物与细胞的固形成份或其他成分分离，使其由固相转移到液相或从细胞内的生理状态转移到特定溶液环境中的过程，它贯穿于整个分离纯化过程中。

一、提取方法选择的影响因素

根据生物材料和目的物的性质选择合适的溶剂和提取条件，其影响因素如下：目的物与杂质的溶解度差异，如 DNA 在 1mol/L 氯化钠中溶解好，RNA 在 0.14mol/L 氯化钠中溶解好，胰岛素在酸性乙醇溶液中溶解好；目的物与杂质的分子量，二者分子量的差异可以使用分子筛原理的分离方法或半透膜的分离方法纯化；目的物与杂质的等电点，如胰岛素提取后加氨水调 PH8~8.4，可以让碱性杂蛋白沉淀；目的物与杂质的稳定性差异，如 RNA 提取后加入苯酚可以使杂蛋白沉淀；目的物与杂质的比重和粘度差异可以使用离心或过滤的方法分离；注意目的物含量，当含量低时需简化操作步骤减少损失；考察主要杂质种类及性质以选择适宜的方法除杂；考察原料中有关酶类的特性，防止酶对目的物的分解破坏。

二、提取的注意事项

- 1、对酶类药的提取要防止辅酶的丢失和其他活性因素的干扰。
- 2、对蛋白质类药物要防止其高级结构的破坏，即避免高热，强烈搅拌，强酸、强碱及金属离子作用等。
- 3、对多肽及核酸类药物应避免酶对其降解作用。

三、提取溶剂的极性判断与选择

1、溶剂的选择：根据物质溶解的一般规律，即相似相溶原则。溶剂的极性由小到大顺序为石油醚<汽油<庚烷<己烷<二硫化碳<二甲苯<甲苯<氯丙烷<苯<溴乙烷<溴化苯<二氯乙烷<三氯甲烷<异丙醚<硝基甲烷<乙酸丁酯<乙醚<乙酸乙酯<正戊

烷 < 正丁醇 < 苯酚 < 甲乙醇 < 叔丁醇 < 四氢呋喃 < 二氧六环 < 丙酮 < 乙醇 < 乙腈 < 甲醇 < 氮氮二甲基甲酰胺 < 水。

2、按形成氢键的能力判断溶剂的极性

(1) 形成两个以上氢键的溶剂，通常这类溶剂分子在溶液中具有三维网状空间结构，如水，属于大极性溶剂。

(2) 形成两个氢键的溶剂，通常这类溶剂分子既能供氢又能得氢，如乙醇、甲醇等，属于极性较大溶剂。

(3) 形成一个氢键的溶剂，如只作质子供体的溶剂分子氯仿，属于小极性溶剂。

(4) 不能形成氢键的溶剂，如四氯化碳，属于非极性溶剂。

四、提取时活性物质的保护措施

1、采用缓冲系统。防止提取过程中某些酸性基团、碱性基团的解离导致溶液 PH 值大幅度变化，使某些活性物质变性失活或因 PH 变化影响提取效果。常用缓冲剂有磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、醋酸盐缓冲液、碳酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液等。

2、添加保护剂。防止某些生理活性物质的活性基团及酶的活性中心受到破坏，因此添加保护剂，如巯基是许多活性蛋白或酶的催化活性基团，易被氧化，因此提取时常添加半胱氨酸，还原型谷胱甘肽等还原剂，而对易受重金属影响的活性物质提取时应添加金属螯合剂作为保护剂。

3、抑制水解酶活性，防止目的物被酶降解。根据不同水解酶的性质可采用不同的方法。对需要金属激活的水解酶，加入 EDTA 或柠檬酸缓冲液以降低或去除金属离子，抑制酶活力，如脱氧核糖核酸酶活性依赖于钙离子，并能被镁离子或二价锰离子激活，因此提取 DNA 时需加入 EDTA 或柠檬酸缓冲液，因为在镁离子存在条件下，脱氧核糖核酸酶可随机剪切双链 DNA 的任意位点；对热不稳定的水解酶可选择热变性除酶提取，加热使酶失活，如甲磺隆水解酶热稳定性很差，在 45℃下 30 分钟其活性下降近 50%，因此可用加热法使其变性失活；也可根据溶解性的差异，用不同 PH 的缓冲体系进行提取以减少酶的释放，或根据酶的最适 PH 选用酶的发挥活力最低的 PH 进行提取；最有效的办法为添加酶抑制剂，如提取 RNA 时添加核糖核酸酶抑制剂（十二烷基磺酸钠、脱氧胆酸钠、肝素

等), 提取蛋白或酶类药物时加入各种蛋白酶抑制剂。

4、其他保护, 为保持某些大分子活性应避免光照、高温、过酸、过碱、强力搅拌等对活性物质的破坏。

五、影响提取的因素

1、温度: 多数物质的溶解度随温度的升高而增大, 且升高温度可降低物质的粘度, 利于扩散和机械搅拌, 所以对耐热成分如多糖可用浸煮法(50°C~90°C)提取, 但对不耐热成份需在低温(0°C~10°C)下提取。有些物质提取时需要酶解激活, 如蛋白水解酶在体内最初以酶原的形式存在无活性, 需要酶解激活, 即水解一个或几个肽键使酶原转化为具有活性的酶, 因此在提取蛋白水解酶须在30°C~40°C下操作。

2、酸碱度: 大多数生化物质在中性条件下稳定, 即pH在4~9范围稳定, 因此这类物质在中性条件下提取。而酸性环境稳定的药物可在酸性条件下提取, 如胰蛋白酶、胰岛素在5%醋酸的乙醇中提取; 在碱性中稳定的药物应在碱性中提取, 如多糖类; 为增加目的物溶解度, 应避免在目的物的等电点附近提取, 因为等电点时溶解度最高。

3、盐浓度: 少量的盐存在, 可以增加药物溶解度, 这主要是由于盐能作用于生物大分子表面, 使表面电荷增加, 极性增加, 水合作用增加, 此为盐溶, 因此一些不溶于纯水的生物大分子能溶于稀盐溶液。盐溶能力与盐的浓度有关, 也与其离子强度有关, 一般高价酸盐的盐溶比低价酸盐的盐溶能力强, 常用的盐溶液有氯化钠溶液、磷酸盐缓冲液、焦磷酸钠缓冲液、醋酸盐缓冲液、柠檬酸缓冲液等。

六、提取方法

1、用酸、碱、盐水溶液提取: 提取水溶性、盐溶性物质如胰蛋白酶、肝素、多糖、DNA、RNA等可以用此法。在提取某些与细胞结构结合牢固的生物高分子时可采用高盐浓度, 此为盐解法。

2、用表面活性剂提取: 表面活性剂具有亲水基团和疏水基团, 具有分散、乳化和增溶作用, 离子型表面活性剂作用较强, 但易引起蛋白质等生物大分子变性, 而非离子型表面活性剂作用小, 但对生物大分子的变性作用弱, 适用于盐、水无法提取的蛋白质或酶。表面活性剂提取的缺点是为进一步纯化带来困难, 需用离子交换法或凝胶色谱法除去表面

活性剂，常见的表面活性剂有十二烷基磺酸钠、吐温（20、40、60、80）、Span(司盘)等。

3、有机溶剂提取：分为固-液提取和液-液提取，固-液提取常用于水不溶性的脂类、脂蛋白、蛋白结合酶等提取。液-液萃取是利用溶质在互不混溶的两个溶剂中溶解度的差异将溶质从一个溶剂向另一个溶剂转移的操作，其影响因素为目的物在两相中的分配比。液-液萃取的溶剂选择应选取溶质在其中分配系数差异大的两种互不混溶溶剂，且萃取后溶剂与溶质应易分离回收，最好选取两溶剂密度相差大的溶剂以减轻乳化现象，溶剂应无毒、不易燃、廉价易得。

第三节 生物活性物质的浓缩与干燥

一、生物活性物质的浓缩

1、盐析浓缩法：添加中性盐使某些蛋白质沉淀出来从而达到浓缩的目的，常用盐有氯化钠、硫酸钠、硫酸镁、硫酸钾等。

2、有机溶剂浓缩法：在生物大分子水溶液中逐渐加入乙醇、丙酮等有机溶剂，可使生化药物溶解度降低，从溶液中沉淀出来。

3、葡聚糖凝胶浓缩：向目的物的稀溶液中加入干燥的固体葡聚糖凝胶，搅拌，凝胶吸水膨胀，目的物大分子留在溶液中，而水被凝胶吸走，如此反复多次，可起到浓缩效果。每次加入的凝胶为溶液量的五分之一，用过的凝胶水洗后可加乙醇脱水干燥后重复使用。

4、聚乙二醇浓缩：将待浓缩液放入透析袋中，透析袋外放聚乙二醇，透析袋内水分很快被袋外的聚乙二醇吸收，起到浓缩效果。

5、真空减压浓缩与薄膜浓缩：真空减压浓缩在生产中较为常用，具有蒸发温度低，蒸发速度快等优点。薄膜浓缩原理为增加汽化面积使液体形成薄膜而蒸发，方式有使液体快速流过加热面而蒸发或使物料剧烈沸腾形成大量泡沫，以泡沫的内外表面为蒸发面进行蒸发。

6、超滤浓缩：利用超滤法，将溶剂小分子除去，保留生物大分子。

二、生物活性物质的干燥

1、定义：干燥是使物质从固体或半固体状经除去水分或其它溶剂从而获得干燥物品的过程。

2、目的：提高药物或药剂的稳定性，以利于保存与运输；使药物或药剂有一定的规格标准。

水在物料中存在状态有表面水、毛细管中的水、细胞内的水，表面水可通过汽化除去；毛细管中的水，由于毛细管壁的作用难以除去；细胞内的水，由于被细胞膜包围封闭，不扩散到膜外则更不易除去。

3、干燥方法：

(1) 减压干燥法：在密闭容器中除去空气后进行干燥。优点：可加速干燥，使干燥产品疏松易碎。

(2) 喷雾干燥法：喷雾干燥要求将料液分散成极细的雾滴，因此料液能形成很大的比表面积，使雾滴同热空气产生剧烈的热质交换，在几秒至几十秒内迅速排积物料水分而获得干燥。喷雾干燥的干燥时间短，干燥物为粉末状不需粉碎即可应用，其效果决定于雾滴的大小，喷嘴越小，喷速越高，喷出的雾滴越小，则干燥越易进行。

(3) 冷冻干燥：在低温低压条件下，利用水的升华性能进行干燥的方法，是指通过升华从冻结的生物产品中去掉水分或其他溶剂的过程。

第四节 盐析法

一、盐析法定义

1、固相析出分离法：在生化物质的提取和纯化的整个过程中，目的物经常作为溶质而存在于溶液中，改变溶液的条件，使它以固体形式从溶液中分出的操作技术称为固相析出分离法。若析出物为结晶称为结晶法，析出物为无定型固体称为沉淀法。固相析出法主要有盐析法，有机溶剂沉淀法，等电点沉淀法，结晶法等。

2、盐析法：是利用各种生物分子在浓盐溶液中溶解度的差异，通过向溶液中引入一定数量的中性盐，使目的物或杂蛋白以沉淀析出，达到纯化目的的方法为盐析法。

二、盐析法原理及分类

1、原理

高浓度的中性盐溶液中存在着大量的带电荷的盐离子，它们能够中和生物分子表面的电荷，使之赖以稳定的双电层受损，从而破坏分子外围的水化层。另外，大量盐离子自身的水合作用降低了自由水的浓度，从另一方面摧毁了水化层，使生物分子相互聚集而沉淀。

2、分类

(1) K_s 盐析法：在一定的 PH 和温度下改变离子强度（盐浓度）进行盐析，称作 K_s 盐析法，由于各生物分子的分子结构不同，其水化层的稳定程度各有差异，它们达到沉淀所需盐的浓度不同。K_s 盐析法多用于提取液的前期分离工作，主要由于在多数情况下，这种方法被盐析物质的溶解度易产生剧烈下降造成共沉淀现象，故分辨率不高。

(2) β盐析法：在一定离子强度下仅改变 PH 和温度进行盐析，称作β盐析法。β盐析法在分离的后期阶段易应用，主要由于β盐析法溶质溶解度变化缓慢且变化幅度小，沉淀分辨率比 K_s 盐析法好，因此为了求得较好的分辨率，或者为了达到洁净的目的，应用β盐析法。

三、盐析法常用的中性盐

常用的中性盐主要有硫酸铵、硫酸镁、硫酸钠、氯化钠、磷酸钠，其中硫酸铵最为常用。

四、盐析法的优点与缺点

优点有经济、设备简单、操作简便、安全、应用范围广、不易引起变性等。缺点有分级分离能力不高等。

五、盐析法的操作

(一) 盐的选择条件

- 1、阴离子对盐析效果比阳离子好，尤其高价阴离子，因此磷酸盐强于硫酸盐强于卤盐。
- 2、应选在水中溶解度大，溶解度随温度变化小，在低温下也能盐析的盐。
- 3、应选有生物惰性，不影响目的物活性的盐。

4、应选来源丰富易得、廉价的盐。

在蛋白质盐析中，硫酸铵是最常用的一种盐析剂，其优点是价廉，在水中溶解度大，且溶解度随温度变化小，因此在低温下也能盐析，且其对大多数蛋白质的活力无影响。缺点是对金属有腐蚀性，在贮存过程中常会使 PH 下降，在较高 PH 溶液中容易释放氨。其他盐析剂如硫酸钠和磷酸盐，虽然盐析能力强，但其溶解度随温度变化显著，低温溶解度很小，常达不到蛋白质或酶的析出浓度。

(二)浓度表示方法

硫酸铵的加量有不同的表示方法，常用“饱和度”来表征在溶液中的最终浓度。25℃时，硫酸氨的饱和浓度为 4.1mol/L（即 767g/L），此浓度定义为 100% 饱和度。如在 1L 水中溶入 383.5g 的硫酸氨，浓度为 50% 饱和度或 0.5 饱和度。国外常用的两种饱和度有荷氏饱和度，即在盐析溶液中所含饱和硫酸铵的体积与总体积比；欧氏饱和度，即在溶液中所含的硫酸铵重量与该溶液所能饱和溶解的硫酸铵重量之比。

(三) 盐的加入方式

硫酸铵加入方式有两种：一种是直接加入固体粉末，工业生产常采用这种方式，要求加入时速度不能太快，应分批加入，并充分搅拌，使其完全溶解和防止局部浓度过高；另一种是加入硫酸铵饱和溶液，在实验室和小规模生产中，当硫酸铵浓度不需太高时，可采用这种方法，它可防止溶液局部过浓，但加量过多时，料液会被稀释。

(四) 盐析方法

1、分级盐析法：分级盐析法是最适用的常规操作法。例如用不断增加盐浓度的方法可以从血浆混合物中分别提取 3~5 种蛋白。生产上有时先以较低的盐浓度除去部分杂蛋白，再提高饱和度沉淀目的物。此外分级盐析也是了解高分子或提取物的溶解度和盐析行为的有效手段。如胰蛋白提取液加 40% 硫酸铵，杂蛋白沉淀，过滤，除杂蛋白，再加 70% 硫酸铵则使胰蛋白沉淀。

2、重复盐析法：在实际操作中，为了避免蛋白浓度过稀造成体积过大、回收率较低的情况发生，盐析可采用稍高的蛋白质浓度，而蛋白质浓度高则易发生共沉淀，造成引入杂质多，分辨率低的情况，此时可用重复盐析的方法加以克服。如在 γ -球蛋白的制备中多

次进行 30%~33% 硫酸氨饱和度的重复盐析以求得较高纯度目的物。

3、反抽提法：在实际操作中，有时为了排除共沉淀的干扰，先在一定的盐浓度下将目的蛋白夹带一定数量的杂蛋白一同沉淀。然后再将沉淀用较低浓度盐溶液平衡，溶出其中的杂蛋白，以达到纯化目的。例如大肠杆菌提取液加 33% 硫酸铵过滤除去杂蛋白，滤液加 50% 硫酸铵沉淀目的物和杂蛋白，沉淀再加 42% 硫酸铵溶解杂蛋白，过滤得目的物 RNA 聚合酶。

（五）注意事项

1、盐饱和度：由于蛋白质的结构和性质不同，其盐析行为不同， K_s 和 β 也不同，盐析要求盐的饱和度也不同。如血红蛋白和纤维蛋白原的 K_s 分别为 0.71 和 1.46。

2、pH 值的选择：一般认为蛋白质分子表面所带的电荷越多，它的溶解度就越大，当其表面电荷为零时其溶解度达到相对最低值，因此调节 pH 或加入与其极性基团结合的离子可改变其溶解度，选择在等电点 pH 时进行盐析可以节约中性盐，同时减少共沉淀杂质。下图是在不同 pH 的浓磷酸盐缓冲液下血红蛋白的溶解度曲线。从图中曲线可见，蛋白质在不同的 pH 下有着不同的溶解度，远离等电点处蛋白质的溶解度最大，等电点处溶解度最小。因此在盐析时常选择溶液 pH 值在该蛋白质等电点附近。但必须注意在水中或稀盐溶液中测得的蛋白质等电点与高盐浓度下所测的结果是不同的。需根据实际情况调整 pH 值至蛋白质溶解度最低处，才能使盐析获得更好效果。

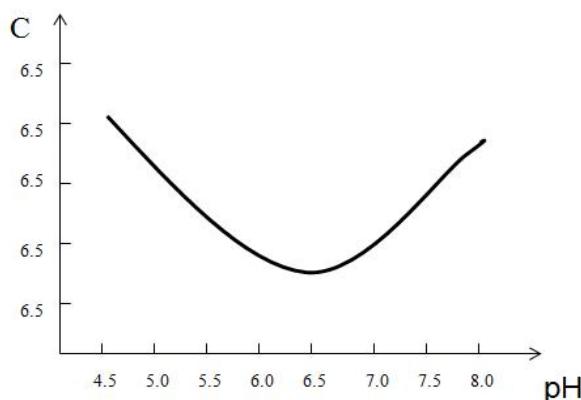


图 2-1

3、蛋白质浓度：在相同条件下，蛋白质浓度越大越易沉淀，使用盐的量也愈低。但

蛋白质浓度愈高，其他蛋白质共沉作用也愈强，易引入杂质，因此应选择适当的蛋白质浓度，一般蛋白质浓度在 2~3%。

4、温度：一般在室温下进行，因为浓盐对蛋白质有保护作用。但对温度敏感的蛋白质，要在低温下进行，常在 0~4 °C 范围内迅速操作，如尿激酶在 4 °C 左右提取。

5、盐的加入方法：防止局部过浓，加入固体盐时应将固体盐研成细末分批加入并搅拌，加入饱和液体时应边加边搅拌。

6、盐析沉淀通常需经一段老化时间后分离，目的是让大晶体继续长大，小晶体消失。

7、采用的分离方法须考虑介质的相对密度和黏度。盐浓度较高时溶液的相对密度大而黏度较小，用过滤法比较有利；盐浓度较低时溶液的相对密度小而黏度较大，用离心法比较方便。

8、盐析沉淀物的脱盐：盐析沉淀分离后，经脱盐才能获得纯品。最常用的脱盐方法是透析，时间一般较长，凝胶法是利用分子筛原理除盐。

第五节 有机溶剂沉淀法

在蛋白质水溶液中，加入一定量亲水性（与水互溶）的有机溶剂，能显著降低溶质的溶解度，使目的物沉淀析出的分离纯化方法为有机溶剂沉淀法。有机溶剂对于许多蛋白质（酶）、核酸、多糖和小分子生化物质都能发生沉淀作用，是较早使用的沉淀方法之一。

一、有机溶剂沉淀法的优点与缺点

1、优点（与盐析法比较）：分辨力强、有机溶剂易挥发，产品更纯净、沉淀物与母液密度差别大、易于离心分离。

2、缺点：易使蛋白质变性，需低温操作、使用受限，成本较高，溶剂易燃易爆，生产应有防护措施。

二、有机溶剂沉淀法的主要机理

亲水性有机溶剂加入溶液后能降低了介电常数 K ，使得溶质分子之间的静电引力增加，易于聚集形成沉淀。根据库仑定律可知，两个带电电质点间的静电力，在 q 值不变、 r 不

变的情况下， F 与介电常数 K 成反比。另一方面，水溶性有机溶剂本身的水合作用降低了自由水的浓度，压缩了亲水溶质分子表面原有水化层的厚度，降低了它的亲水性，导致目的物脱水凝集，产生沉淀。

$$F = \frac{q_1 q_2}{kq^2}$$

三、有机溶剂沉淀法操作条件的控制

1、溶剂的选择

溶剂应选择介电常数小，沉淀作用强，对生物分子的变形作用小，毒性小，挥发性适中，与水互溶的溶剂。有时氯仿、乙醚也用于沉淀，但其适用对象和方法与前者不同。沉淀蛋白质和酶常用的是乙醇、甲醇和丙酮。乙醇具有沉淀作用强，沸点适中，无毒等特点，广泛应用于沉淀蛋白质、核酸、多糖等生物高分子及核苷酸、氨基酸等物质。丙酮的沉淀作用大于乙醇，用丙酮代替乙醇可减少用量 $1/4\sim 1/3$ ，但沸点低，挥发损失大，毒性大，所以应用不及乙醇广泛。甲醇的沉淀作用与乙醇相当，对蛋白质的变性作用比乙醇、丙酮都小，但毒性大，这限制了使用。

2、沉淀时的温度控制：

多数生物大分子如蛋白质、酶和核酸等物质在有机溶剂中对温度特别敏感，温度稍高就会引起变性，且有机溶剂与水混合时易发生放热反应，因此溶剂必须预冷冻，有机溶剂最好冷至 $-10\text{ }^\circ\text{C}\sim 20\text{ }^\circ\text{C}$ 为宜，且操作要在冰盐浴中进行，加入有机溶剂时必须缓慢且不断搅拌加入以免局部过浓。大多数蛋白质在乙醇-水混合液中的溶解度随温度降低而降低，这有利于提高提取效率，且通常需要使沉淀在低温下老化处理，然后进行离心分离。

3、样品的浓度

低浓度样品回收率低，需要使用比例更大的有机溶剂进行沉淀，但共沉淀作用小；高浓度样品，可以节省有机溶剂，减少变性的危险，但杂蛋白的共沉淀作用大。因此通常使用的蛋白质初浓度为 $0.5\%\sim 2\%$ ，多糖的初浓度为 $1\%\sim 2\%$ 为宜。

4、pH 值的控制

选择在样品稳定的 pH 值范围内提取，通常是选在等电点附近，这能提高此沉淀法的

分辨能力。若目的物在等电点处不稳定则需避免在此 pH 处提取，同时注意防止目的物与主杂质带相反电荷，产生严重共沉淀的现象发生。

5、离子强度的控制：

盐浓度太大或太小都有不利影响，通常盐浓度以不超过 5% 为宜，使用乙醇的量也以不超过原蛋白质水溶液的 2 倍体积为宜，少量的中性盐对蛋白质变性有良好的保护作用，但盐浓度过高会增加蛋白质在水中的溶解度，降低了沉淀效果，因此通常是在低浓度缓冲液中沉淀蛋白质。

6、某些重金属的助沉淀作用

一些金属离子如锌离子铜离子等可以与某些呈阴离子状态的蛋白质形成复合物，这种复合物溶解度低又不影响生物活性，利于沉淀。如胰岛素粗品加 30%丙酮，调节 pH4.2 沉淀杂蛋白，滤液调 pH6.0 加锌离子，使胰岛素锌盐沉淀。

沉淀所得的固体样品，如果不是立即溶解进行下一步的分离，则应尽可能抽干沉淀，减少其中有机溶剂的含量，如若必要可以装透析袋透析脱有机溶剂，以免影响样品的生物活性。为防止溶剂局部浓度过高，加入有机溶剂时应搅拌均匀，速度要适当，避免局部浓度过高，引起沉淀物的破坏、变性或失活。

第六节 等电点沉淀法

一、等电点沉淀法的原理

两性电解质在溶液 pH 处于等电点 (pI) 时分子表面净电荷为零，导致赖以稳定的双电层及水化膜的削弱或破坏，分子间引力增加，溶解度降低。调节溶液的 pH 值，使两性溶质溶解度下降，析出沉淀的操作。等电点沉淀法是利用蛋白质在等电点时的溶解度最低，而各种蛋白质又具有不同的等电点的特性进行分离的工艺过程。氨基酸、蛋白质、酶和核酸都是两性电解质，可以利用此法进行初步的沉淀分离。

等电点沉淀法优点为操作简单、试剂消耗少，是一种常用的分析纯化方法。缺点是各种蛋白质在等电点时仍有一定的溶解度而沉淀不完全，且多数蛋白质的等电点又都十分接

近，所以单独使用效果不理想，分辨力差，多用于提取后除杂蛋白。实际生产中常与有机溶剂沉淀法、盐析法联合使用。

二、等电点沉淀法的注意事项

1、生物大分子的等电点易受盐离子的影响而发生变化，如目的物与阳离子结合则等电点升高，目的物与阴离子结合则等电点降低。

2、操作时应考虑目的物的稳定性，如胰蛋白酶在中性或碱性条件下失活，因此提取时应避免 pH 高于 5。

3、生物大分子在等电点附近盐溶作用明显，所以必须控制溶液的离子强度。

第七节 结晶法

结晶是一种历史悠久的分离技术，5000 年前中国人的祖先已开始利用结晶原理制造食盐。目前结晶技术广泛应用于化学工业，在氨基酸、有机酸和抗生素等生物产物的生产过程中也已成为重要的分离纯化手段，可以认为，大多数固体产品都是以结晶的形式出售的。因此，在产品的制造过程中一般都要利用结晶技术。

结晶是制备纯物质的有效方法，在一定条件下，溶液中的溶质因分子有规则的排列而结合成晶体，通常只有同类分子或离子才能排列成晶体，所以结晶过程有很好的选择性，通过结晶，溶液中的大部分杂质会留在母液中，经过滤、洗涤可得到纯度高的晶体。许多抗生素、氨基酸、维生素等就是利用多次结晶的方法制取高纯度产品的。结晶法是改变溶液的某些条件，使其中的溶质以晶体形式析出的方法称为结晶法。

结晶是从液相或气相生成形状一定、分子（或原子、离子）有规则排列的晶体的现象（如图 2-2 所示）。结晶可以在液相或气相中生成，但工业结晶操作主要以液体原料为对象。显然，结晶是新相生成的过程，是利用溶质之间溶解度的差别进行分离纯化的一种扩散分离操作，这一点与沉淀的生成原理是一致的。结晶与沉淀两者的区别在于结晶是内部结构的质点元（原子、分子、离子）作三维有序规则排列、形状一定的固体粒子，而沉淀则是无规则排列的、无定形粒子。结晶的形成需在严密控制的操作条件下进行，因此，结晶的

纯度远高于沉淀。

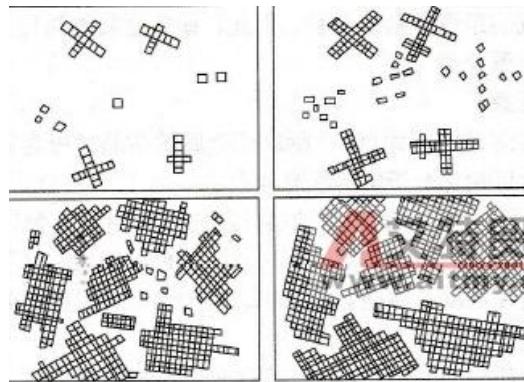


图 2-2 结晶过程

一、结晶的条件

1、纯度：各种物质在溶液中均需达到一定的纯度才能析出结晶，如蛋白质和酶结晶其纯度不低于 50%，且目的物越纯越易结晶，但得到的结晶制品并不意味达到了绝对的纯化，只能说达到了相当纯的程度。

2、浓度：当目的物溶液浓度较高，达到过饱和度时易于结晶，因为高浓度时利于分子间的碰撞聚合，产生沉淀。但当浓度过高时，溶液黏度均会增大，这不利分子运动，不利于结晶，同时浓度高时相应的杂质浓度也会增加，易生成纯度较差的粉末结晶。

3、pH：选择 pH 在 pI 附近，此条件下溶液中目的物溶解度最小，有利于晶体析出。

4、温度：通常在低温条件进行，活性物质不易变性，又可避免细菌繁殖，同时许多物质在低温时具有较低的溶解度，利于结晶。

5、时间：结晶的生成和生长需要时间，因此结晶后放置一段时间有利于晶体的长大，但许多生物药物要求在几小时内完成，因此放置的时间不宜过长。

6、晶种：不易结晶的药物常加晶种，或进行摩擦产生静电，进而加速晶种的形成。

7、溶剂：选取的溶剂应对提取的目的物具有生物惰性，不引起变性；对目的物具有一定的溶解度，对杂质具有更大的溶解能力；对目的物的溶解度具有可调性；易于从晶体上除去等特性。

二、结晶过程

结晶是指溶质自动从过饱和溶液中析出，形成新相的过程。这一过程不仅包括溶质分

子凝聚成固体，还包括这些分子有规律地排列在一定晶格中，这一过程与表面分子化学键力变化有关，因此，结晶过程是一个表面化学反应过程。其过程包括过饱和溶液的形成、晶核生成和晶体的生长三个步骤。晶核是过饱和溶液中初始生成的微小晶粒，是晶体成长过程必不可少的核心，分为均相成核和非均相成核，均相成核是在介稳区内，洁净的过饱和溶液还不能自发地产生晶核。非均相成核是溶液中混入外来固体杂质粒子，如空气中的灰尘或其它人为引入的固体粒子，则这些杂质粒子对初级成核有诱导作用。

三、结晶法特点

选择性高，只有同类分子或离子才能排列成晶体；纯度高，通过结晶，溶液中大部分的杂质会留在母液中，再通过过滤、洗涤，可以得到纯度较高的晶体；设备简单，操作方便；影响因素多。

四、结晶方法

1、蒸发溶剂法：借蒸发除去部分溶剂的结晶方法，在常压或减压下加热蒸发除去一部分溶剂，以达到或维持溶液的过饱和度。此法适用于溶解度随温度变化不显著的物质或随温度升高溶解度降低的物质，而且要求物质有一定的热稳定性。

2、盐析结晶法：这是生化制药中应用最多的结晶方法。其作用是通过向结晶溶液中引入中性盐，逐渐降低溶质的溶解度使其过饱和，经过一定时间后晶体形成并逐渐长大。例如细胞色素 C 的结晶，向细胞色素 C 浓缩液中按每克溶液 0.43 克的比例加入少量的硫酸铵细粉来结晶，或向溶液中加入饱和溶液，这样便于精确控制，不易造成局部过浓，如弹性酶的缓冲液中加入饱和硫酸铵溶液。盐析结晶法可与冷却法结合，提高溶质从母液中的回收率，另外，结晶过程的温度保持在较低的水平也有利于热敏性物质结晶。

3、透析结晶：可使溶解度的变化既缓慢又连续，以减少共沉淀的产生。由于盐析结晶时溶质溶解度发生跳跃式非连续下降，下降的速度也较快，易产生共沉淀，且对一些结晶条件苛刻的蛋白质，最好是溶解度的变化缓慢而且连续，为达到此目的，透析法最方便。如：糜胰蛋白酶的结晶是将硫酸铵盐盐析得到的沉淀溶于少量水，再加入适量含 25% 硫酸铵的 pH6.0 的磷酸缓冲液，装入透析袋，室温下对含 27.5% 硫酸铵的相同磷酸缓冲液透析，每日换外透析液 4~5 次，1~2 天后可见菱形猪糜胰蛋白酶晶体析出。透析法同样可以用于

在盐浓度缓慢降低的结晶场合，这种透析法又称脱盐结晶法。透析法还可用在向结晶液缓慢输入某种离子的产生结晶的情况，如牛胰蛋白酶结晶时，外透析液中需要由 Mg^{2+} 存在，它是牛胰蛋白酶结晶的条件。

4、有机溶剂结晶法：向待结晶溶液中加入某些有机溶剂，以降低溶质的溶解度产生结晶，如天门冬酰胺酶的有机溶剂结晶法。应用此法的缺点是有机溶剂可能会引起蛋白质等物质的变性，另外，结晶残液中有机溶剂常需要回收。

5、等电点结晶：调整结晶溶液的 pH 值至 pI 附近，目的物溶解度降低，结晶析出。等电点法常与盐析法、有机溶剂沉淀法一起使用。如溶菌酶（3%~5%）调整 pH 9.5~10.0 后在搅拌下慢慢加入 5% 的氯化钠细粉，室温放置 1~2d 即可得到正八面体结晶。

6、温度诱导结晶：蛋白质、酶等生化物质的溶解度大多数受温度影响。将目的物溶液浓度升高或降低温度，可使溶液逐渐达到过饱和，即可慢慢析出结晶。例如猪胰 α -淀粉酶，室温下用 0.005mol/L pH 8.0 的 $CaCl_2$ 溶液溶解，然后在 4℃ 下放置，可得结晶。

第八节 吸附法

吸附法指利用吸附作用，将样品中的生物活性物质或杂质吸附于适当的吸附剂上，利用吸附剂对活性物质和杂质间吸附能力的差异，使目的物和其他物质分离，达到浓缩和提纯目的的方法。吸附作用指物质从流体相（气或液相）浓缩到固体表面从而达到分离的过程称为吸附作用。吸附是指物质分子在两相界面上浓度的增加。

一、吸附的基本原理

由于界面上的分子同时受到不相等的两相分子的作用力，因此界面分子的力场是不饱和的，即存在一种固体的表面力，它能从外界吸附分子、原子或离子，并在吸附剂表面附近形成多分子层或单分子层。吸附剂吸附某物质时，总是存在着吸附与解吸两个相反的过程，当两者达到相等时，即达到了一个动态平衡—吸附平衡，在达到平衡后，吸附剂对溶质的吸附量，就是此吸附剂对此溶质吸附能力大小的表征值，通常以每克吸附剂所能吸附物质的摩尔数表示。当条件发生变化时，例如选择适当的溶剂即洗脱剂可使平衡向解吸方

向移动，这就是我们所称的洗脱。

吸附剂指把在表面上能发生吸附作用的固体称为吸附剂。吸附物指被吸附的物质称。

吸附法是利用吸附作用将物质进行分离纯化的方法。正吸附指用吸附剂吸附提取液中的有效成分。负吸附是用吸附剂吸附提取液中的杂质成分。在生化物质的分离纯化中，采用吸附工艺主要有两方面的作用，一种是吸附杂质，使杂质浓集于吸附剂界面；另一种是吸附所需物质，使要提取的物质浓集。当吸附剂对杂质的吸附能力较强，而对所提取的物质基本无影响时，可用吸附剂除去杂质。如果提取液中所需的物质能被吸附剂大量吸附，再结合洗脱，即可达到分离纯化目的物的目的。

二、吸附方法

静态吸附法是向装有提取液的容器中加入适量吸附剂，搅拌或震荡，使达到吸附平衡即可，此法设备简单，操作易掌握，但吸附分离效率较差，吸附不完全，较佳的吸附在 80% 左右，药物纯化中常加活性炭使用静态吸附法除去杂质。

动态吸附法是将吸附剂装入柱中进行吸附，即柱层析。在装吸附剂的层析柱中，加含待分离物质的提取液，当此提取液全部加样色谱柱中后，接着加洗脱剂进行洗脱，在此过程中，柱内连续不断地发生吸附、解吸、再吸附、再解吸的作用。由于吸附剂对不同物质的吸附能力和洗脱剂对这些物质的解吸能力不同，各种物质在柱内移动的距离也不相同，吸附较弱的、比较容易洗脱的，移动的距离大些；吸附较强的、较难洗脱的，移动的距离较小。继续加洗脱剂可使提取液中各种物质依次全部由柱中洗出，分别收集即可达到分离的目的。

优点：操作简便、设备简单、安全廉价、较少引起活性物质变性。

缺点：天然吸附剂吸附性能差、吸附条件难于控制、吸附选择性差、回收率不高、难以连续操作。

三、吸附法的类型

1、物理吸附：吸附剂和吸附物通过范德华力产生的吸附。

物理吸附特点：

(1) 全界面吸附，即吸附不限于一些活性中心，而是整个自由界面。

(2) 放热、吸附热较小，分子被吸附后功能降低，故是放热过程，吸附热较小，在 $2.09\sim4.18\times10^4\text{J}/\text{mol}$ 的范围内。

(3) 活化能小，吸附物分子的状态变化不大，需要的活化能很小，多数在较低的温度下就可以进行。

(4) 瞬间即可平衡，由于吸附时除吸附剂的表面状态外，其它性质都未改变，所以两相在瞬间即可达到平衡，有时吸附速度很慢，这是由于在吸附剂颗粒的孔隙中的扩散速度是控制步骤的缘故。

(5) 可逆性，即在吸附的同时，被吸附的分子由于热运动会离开固体表面，此现象称为解吸附。

(6) 物理吸附可以是单分子层吸附或多分子层吸附。

(7) 没有严格的选择性，由于分子力的普遍存在，一种吸附剂可吸附多种物质，但由于吸附物性质不同，吸附的量有所差别。

(8) 物理吸附与吸附剂的表面积、细孔分布和温度等因素有密切的关系。

2、化学吸附：在吸附剂和吸附物之间发生化学反应而产生的吸附，属于库仑力范围。这种吸附与吸附剂的表面化学性质以及吸附物的化学性质直接有关，反应时发出大量热量，一般在 $2.09\sim4.18\times10^4\text{J}/\text{mol}$ 的范围内，化学吸附需要一定的活化能，且选择性较高，一般为单分子层吸附，吸附后较稳定，不易解吸。

四、吸附速度

吸附速度是指单位重量吸附剂在单位时间内所吸附的物质量。吸附速度决定于吸附剂对吸附质的吸附过程，多孔吸附剂对溶液中的吸附物质的吸附过程基本上可分为三个连续阶段：第一个阶段称为颗粒外部扩散（又称为膜扩散）阶段，吸附质从溶液中扩散到吸附剂表面；第二阶段称为孔隙扩散阶段，吸附质在吸附剂孔隙中继续向吸附点扩散；第三阶段称为吸附反应阶段，吸附质被吸附在吸附剂孔隙内的表面上。一般而言，吸附速度主要由膜扩散或孔隙扩散速度来控制。根据实验得知，颗粒外部膜扩散速度与溶液浓度成正比。对一定重量的吸附剂，膜扩散速度还与吸附剂的表面积（即膜表面积）的大小成正比。因为表面积与颗粒直线成反比，所以颗粒直径越小，膜扩散速度就越大。另外，增加溶液和

颗粒之间的相对运动速度，会使液膜变薄，可以提高膜扩散速度。孔隙扩散速度与吸附剂孔隙的大小及结构、吸附质颗粒大小及结构等因素有关。一般来说，吸附剂颗粒越小，孔隙扩散速度越快，即扩散速度与颗粒直径的较高次方成反比。因此，采用粉状吸附剂比粒状吸附剂有利。其次，吸附剂内孔径大可使孔隙扩散速度加快，但会降低吸附量。对这种情况，就要根据使用的工艺条件来选择最适宜的吸附剂。

五、影响吸附的因素

1、吸附剂的特性

吸附剂的理化性质对吸附的影响很大，而吸附剂的性质与其原料、合成方法和再生条件有关，一般要求吸附剂的吸附容量大、吸附速度快和机械强度好。吸附速度主要与颗粒度和孔径分布有关，颗粒度越小，吸附速度就越快。吸附剂的机械强度则影响其使用寿命。

吸附现象在界面发生，因此吸附剂表面积越大，吸附量越多，吸附剂的这一特性，叫“比表面积”，比表面积即每克吸附剂所具有的表面积，例如活性炭的比表面积一般为 $300\sim500\text{m}^2/\text{g}$ ，有的甚至达到 $1000\text{m}^2/\text{g}$ 。因此增加吸附剂表面可以增加吸附量，增加吸附剂表面的方法有，将吸附剂磨碎成小的颗粒，使颗粒表面凹凸多变；将吸附剂制成具有大量微孔的颗粒。

2、吸附物质的性质

(1) 极性吸附剂易吸附极性物质，非极性吸附剂易吸附非极性物质。

(2) 溶剂对吸附剂的吸附能力有影响，非极性吸附剂在极性溶剂中吸附较好，反之极性吸附剂在非极性溶剂中吸附较好，如活性炭是非极性的吸附剂，它在水溶液中吸附一些有机物质的良好吸附剂，硅胶是极性的吸附剂，它在有机溶剂中吸附极性物质较为适宜。

(3) 一定的吸附剂在某一溶剂中对不同溶质的吸附能力是不同的，如活性炭在水溶液中，对同系列的有机物的吸附量，随吸附物分子量增大而加大，活性炭吸附脂肪酸时，吸附量随碳链增长而加大；活性炭对多肽的吸附能力大于对氨基酸的吸附能力；对多糖的吸附能力大于对单糖的吸附能力等。当用硅胶在非极性溶剂中吸附脂肪酸时，吸附量则随碳链的增长而降低。

3、吸附条件

(1) 温度：吸附一般是放热的，所以只要达到了吸附平衡，升高温度会使吸附量降低。但在低温时，有些吸附过程往往短时间达不到平衡，而升高温度会使吸附速度加快，所以会出现温度高时吸附量增加的情况。对蛋白质或酶类的分子进行吸附时，情况有所不同，这可能是由于被吸附的高分子是处于伸展状态的，因此这类吸附是一个吸热过程，在这种情况下，温度升高会增加吸附量。生化物质对吸附温度的选择还要考虑它的热稳定性。对酶来讲，如果是热不稳定的，一般在0℃左右进行吸附，如果比较稳定，则可在室温下操作。

(2) pH值：溶液的pH值往往会影响吸附剂或吸附物的解离情况，进而影响吸附量，各种溶质吸附的最佳pH值，常常通过实验决定。一般说来，有机酸在酸性下、胺类在碱性下较易被非极性吸附剂所吸附。

(3) 吸附物的浓度：在吸附达到平衡时，吸附物的浓度称为平衡浓度。一般的规律是平衡浓度越大，吸附量也越大。当吸附物原始浓度较大时，用定量的吸附剂进行吸附，则平衡后溶液中吸附物的浓度会大些，但吸附剂上的吸附量也会大，所以吸附物浓度大时吸附量也大。因此用活性炭脱色和去热原时，为了避免对有效成分的吸附，往往将提取液适当稀释后再进行吸附。在用吸附法对蛋白质或酶进行分离时，常要求其浓度在1%以下，以增强吸附剂对吸附物的选择性。

应当注意的是，吸附量是指单位重量吸附剂所吸附物质的量。从分离提纯的角度考虑，还要注意被吸附物质的总量，也就是说，还应考虑吸附剂用量，吸附剂用量大时，吸附物的平衡浓度要变小，每克吸附剂所吸附物质的量也要变少，但吸附物质的总量会多些，当然，吸附用量如过多，会导致成本增高，吸附选择性差或有效成分的损失，所以吸附剂的量，应综合各种因素，由试验确定。

(4) 盐的浓度：盐类对吸附作用的影响比较复杂，有些情况下盐能阻止吸附，在低浓度盐溶液中吸附的蛋白质或酶常用高浓度的盐溶液进行洗脱，但在某些情况下，盐能促进吸附，甚至有的吸附一定要在盐的存在下才能对某种吸附物进行吸附，如硅胶对某种蛋白质吸附时，硫酸铵的存在可能使吸附量增加许多倍。正是因为盐对不同物质的吸附有不同的影响，所以盐的浓度对于控制选择性吸附很重要，在生产中也要经过试验来确定合适

的盐浓度。

(5) 其他组分的影响：当从含有两种以上组分的溶液中吸附时，根据溶质的性质，可以互相促进、干扰或互不干扰。一般说来，对混合物的吸附较纯溶质的吸附为差，当溶液中存在其他溶质时，会导致吸附一种溶质而使另一种溶质的吸附量降低，但有时也有例外，对混合物的吸附效果，反较单一组分好。

六、常用吸附剂

1、活性炭：是以骨、血、木等为原料高温碳化而成。根据其粗细程度分为粉末活性炭和颗粒活性炭，一般粉末炭的直径小于 200 目，颗粒活性炭的直径大于 140 目。粉末活性炭颗粒小，比表面积大，与吸附质接触充分，因而吸附速度快，吸附能力也大，吸附效果好，但粉末炭由于其粒度太小，回收和再利用均比较困难；颗粒活性炭比表面积小，吸附能力较差，但颗粒活性炭便于装柱使用，静态使用时也易与溶液分离。

活性炭密度分为视密度和湿密度。视密度(或称为堆密度)是活性炭及堆放间隙在内的密度.典型的活性炭视密度范围在 350~500g/ml; 真密度是去除了堆放间隙后活性炭本身的密度。活性炭自身孔隙中充满水时测得的密度称为湿密度，湿密度将决定活性炭在反冲洗过程中的膨胀或者流化程度。粒状活性炭床反冲洗排干水后的床密度也是一个非常实用的参数，因为它将决定一个活性炭滤床或者反应器所需要的活性炭量。强度对于粒状炭也很重要。在反冲洗、运输以及再生过程中，强度太小将会造成更多的损耗。由于强度不够造成过度损耗会降低活性炭使用的经济性。

活性炭的重要特征是具有发达的孔隙结构，活性炭的孔隙可分为三类，即微孔，中孔和大孔，不同孔径的孔隙有利于吸附不同直径分子。一般来说，活性炭的大孔和中孔可以被较大的吸附质所利用，而微孔可以被较小的吸附质所利用。在活性炭生产过程中，由于氧化及活化作用，在活性炭中形成了复杂的孔状结构，同时还在活性炭表面形成了复杂的含氧官能团以及碳氢化合物，包括羧基、酚羟基、醚类、酯以及环状过氧化物。这些官能团的存在及相对数量的多少，将决定活性炭的极性强弱以及吸附性能。从相似相溶原理看，具有弱极性、中性及非极性表面的活性炭对非极性的分子吸附能力比较强，而对极性分子以及离子的吸附能力比较弱。一般把活性炭的表面氧化物分成酸性的和碱性的两大类，

并按这种分类解释活性炭的吸附作用。酸性官能团有：羧基、酚羟基、醌型羧基、正内酯基、荧光型内酯基、羧酸酐基及环式过氧基等，其中羧酸基、内酯基及酚羟基被多次报导为主要酸性氧化物。对于碱性氧化物的说法有一些分歧。活性炭中氢和氧的存在对活性炭的吸附及其它特性有很大的影响。在炭化及活化的过程中，由于氢、氧与碳以化学键结合，使活性炭表面上形成各种有机官能团形式的氧化物及碳氢化合物，这些氧化物使活性炭与吸附质分子发生化学作用，显示出活性炭的选择吸附性。活性炭表面的这些氧化物主要是在活化和后处理(酸洗或碱洗)过程中产生的，活性炭在后处理时对酸、碱的吸附量，与活化温度有密切关系。因此，活性炭表面的氧化物成分主要受活化过程的影响。一般温度在300~500℃以下用湿空气制造的活性炭中，酸性氧化物占优势；而温度在800~900℃下，用空气、蒸汽或二氧化碳为活化氧化剂所制造的活性炭中，碱性氧化物占优势。温度在500~800℃之间制造的活性炭则具有酸碱两性。

酸性氧化物使活性炭具有极性，因此倾向于吸附极性较强的化合物。特别应该注意的是那些类似羧基的基团，这些带极性的基团易于吸附带有极性的水，因而阻碍了从水溶液中吸附非极性物质。但当水中含有极性更强的物质时，由于酸性基团与它们之间形成的氢键比水之间所形成的氢键强，就可能置换水而被吸附。为了避免形成更多的类似羧基的基团，妨碍吸附非极性有机物，活化温度必须控制在900℃附近。活性炭表面的金属离子部位带有正电荷，对那些带有过剩电子部位的分子有吸引力，可以提高活性炭吸附速率。

活性炭是一种吸附能力很强的非极性吸附剂，其吸附作用在水溶液中最强，在有机溶剂中较弱，吸附能力的顺序：水>乙醇>甲醇>乙酸乙酯>丙酮>氯仿。在一定条件下，活性炭对不同物质的吸附能力有所不同，一般地说，对具有极性基团的化合物吸附力较大，对芳香族化合物的吸附力大于脂肪族化合物；对分子量大的化合物的吸附力大于分子量小的化合物。活性炭吸附力虽有选择，但用量太大时，不仅能把杂质除去，同时也易使精制的物质受到损失。活性炭在酸性溶液中吸附能力大，在pH6.8以上，其吸附能力较差。有报道在pH3~5时其吸附能力最好，达到吸附平衡一般需要20~30min，根据吸附平衡的原理，活性炭可分2~3次加入吸附效果较好。活性炭是注射液生产中常用的吸附剂，在水溶液中能吸附一些色素、有味物质、酸、盐和热原等，能改善注射液的澄明度，其用量一般为液

体的 0.02%~1%。由于活性炭是一种强吸附剂，对气体的吸附力和吸附量都很大，气体分子占据了活性炭的吸附表面，会造成活性炭“中毒”，使其活力降低，因此使用前可加热烘干，以除去大部分气体。对于一般的活性炭可在 160℃ 加热干燥 4~5 小时；锦纶-活性炭受热易变形，可于 100℃ 干燥 4~5 小时。

活性炭的优点是吸附容量大、抗酸耐碱、化学稳定性好，解吸容易，在高温下进行解吸再生时其晶体结构不发生变化，热稳定性高，经多次吸附和解吸操作仍能保持原有的吸附性能。

2、磷酸钙凝胶

在蛋白质的分离、精制中，较为常用的吸附剂为磷酸钙凝胶，由于磷酸钙凝胶的制备方法不同，可制成多种形式，如磷酸钙、磷酸氢钙、羟基磷灰石。一般认为，磷酸钙对蛋白质的吸附作用主要是其中的钙离子与蛋白质负电基团结合产生的作用力，因此活性部位为钙离子。磷酸钙凝胶在生化产品中常有应用，如用磷酸钙凝胶吸附胰岛素，将胰腺搅碎，立即用含磷酸纯液提取、过滤，再向提取液中加入氯化钙，生成的磷酸钙凝胶，并利用生成的磷酸钙凝胶将胰岛素吸附，然后用酸水解吸，进一步盐析精制。又如链激酶用磷酸钙处理去除杂蛋白，取盐析得到的链激酶沉淀，捣碎，加适量蒸馏水，调 pH 至 7.2 使沉淀溶解，再用 10% 氢氧化钠调 pH 至 8.0~9.0，在充分搅拌下加入 15.2% 磷酸钠溶液，再加入 22.6% 醋酸钙溶液，使其生成磷酸钙凝胶，利用生成磷酸钙凝胶吸附杂蛋白，然后离心分离上清夜，用 10% 盐酸调 pH 至 7.2，供下一步精制用。

3、人造沸石

沸石是一种矿石，最早发现于 1756 年，瑞典的矿物学家克朗斯提（Cronstedt）发现有一类天然硅铝酸盐矿石在灼烧时会产生沸腾现象，因此命名为“沸石”。沸石是一类疏松的网架状铝硅酸盐矿物。沸石中含有移动性较大的阳离子和水分子，可进行阳离子交换。由于天然沸石所具有的离子交换和吸附性质，它可以被制成各种复合吸附剂或离子交换剂，用来处理含金属离子的废水。但是天然沸石的吸附性能往往比较差，因为其孔道比较小，吸附量也比较小。天然沸石由于其本身结构的局限使其应用受到限制，常用的是经人工处理的沸石。为改善天然沸石的吸附特性，将它的粉体和易燃性微粉按一定比例混合，

在高温下灼烧成多孔质高强度沸石颗粒，从而拓宽了其孔洞和通道，不仅增大了沸石颗粒的表面积，而且还使水溶液在沸石颗粒中的渗透性更加顺畅，提高了它对金属离子的吸附性能。因此人造沸石是一种人工合成的无机阳离子交换剂，用于细胞色素 C 的分离。

4、白陶土

白陶土为白色或类白色细粉，或易碎的块状物，加水湿润后，有类似黏土的气味，颜色加深。白陶土在水、稀酸或氢氧化钠溶液中几乎不溶，在生化产品生产中常作为某些活性物质的纯化分离吸附剂，也可作为助滤剂和除热原质的吸附剂，可吸附一些分子量较大的杂质。白陶土分为天然白陶土和酸性白陶土两种。天然白陶土的主要成分是含水的硅酸铝。新采出的白陶土含水约 50~60%，经干燥压碎后，加热至 420℃ 活化，冷却后再压碎过筛即可使用，经如此处理，白陶土具有大量微孔和较大的比表面积，能吸附大量有机杂质，将白陶土浸于水中，其 pH 值约为 6.5~7.5，即呈中性，但由于它能吸附氢离子，所以可起中和强酸的作用。

白陶土作为药用可吸附毒物，如有毒的胺类物质、食物分解产生的有机酸等，甚至可吸附细菌；在生化产品生产中，白陶土能吸附一些分子量较大的杂质，包括能导致过敏的物质，但应该注意，天然产物白陶土之间吸附能力差别很大，所含杂质也各不相同，因此商品药用白陶土或供吸附用的白陶土虽已经过处理，但如果产地不同，在吸附性能上有较大差别，所以在生产上白陶土产地和规格更换时，要经过试验。白陶土在临用前用稀盐酸冲洗一下，并用水冲洗至近中性后烘干，如此处理的白陶土吸附效果更佳。

5、氢氧化铝凝胶

在蛋白质及酶的制备中，常用的一种吸附剂是凝胶型氢氧化铝。它是一种将氨水或碱液加入铝盐所形成的一种无定形凝胶，根据制备条件不同，其含水量不同，组成也不一致。应该注意的是氢氧化铝凝胶的结构和表面状态与生成后放置的时间有关，在放置过程中氢氧化铝凝胶逐渐转变成结晶的偏氢氧化铝，同时氢氧化铝凝胶制备时陈化程度不同，凝胶的吸附能力也不同。

6、氧化铝

活性氧化铝是最常用的一种吸附剂，特别适于亲脂性成分的分离，广泛地应用在醇、

酚、生物碱、染料、甾体化合物、苷类、氨基酸、蛋白质以及维生素等物质的分离。活性氧化铝为无定形的多孔结构物质，一般由氧化铝的水合物(主要为三水合物)加热，脱水和活化制得，其活化温度随氧化铝水合物种类的不同而不同，一般为250~500℃。孔径约20Å~50Å，典型的氧化铝比表面积为200~500m²/g。活性氧化铝具有良好的机械强度，可在移动床中使用，对水具有很强的吸附能力，故主要用于液体和气体的干燥。氧化铝的活性与含水量的关系很大，在一定的温度下除去水分后以使氧化铝活化；活化了的氧化铝再引入一定量的水即可使活性降低。

活性氧化铝价廉，再生容易，活性易控制，但操作不便，手续繁琐，处理量有限，因此也限制了在工业上大规模应用。

7、硅胶

硅胶是一种坚硬无定形链状和网状结构的硅酸聚合物颗粒，是一种亲水性极性吸附剂。因其是多孔结构，比表面积可达350m²/g左右。工业上用的硅胶有球型、无定型、加工成型及粉末状四种。硅胶主要用于气体的干燥脱水，催化剂载体及烃类分离等过程。活化后的硅胶极易吸水而降低活性，一般是用前于110℃再活化0.5~1小时后使用。硅胶能吸附非极性化合物，也能吸附极性化合物。可用于芳香油、萜类、固醇类、生物碱、强心甙、蒽醌类、酸性化合物、磷脂类、脂肪类、氨基酸等的吸附分离。

硅胶的吸附作用主要是物理吸附，可以再生和反复使用。其制备是在碱金属硅酸盐（如硅酸钠）溶液中加酸，使之酸化，再加入一定量的电解质进行搅拌，即生成硅酸凝胶；或者在较浓的硅酸钠溶液中加酸或铵盐也能生成硅酸凝胶。将硅酸凝胶静置几小时使之老化，然后用热水洗去可溶性盐类，在60~70℃下烘干并在约300℃时活化，即可得硅胶。将硅酸凝胶用氯化钴溶液浸泡后再烘干和活化，可得变色硅胶，用它作干燥剂时，吸水前是蓝色，吸水后变红色，从颜色的变化可以看出吸水程度，以及是否需要再生处理。

8、滑石粉

滑石粉成分为偏硅酸镁，天然的粗品可用稀盐酸加热煮沸并洗涤以除去铁、钙、镁的化合物。滑石粉以不易起反应和吸附能力弱为特点，可作为助滤剂。有些药液，用115℃活化1小时，活化的滑石粉，趁热加入，可吸附少量多糖类杂质，效果较好，且利用滑石

粉弱的吸附性能，用大量滑石粉处理有效成分的稀溶液，有效成分损失不明显。

9、硅藻土

硅藻土是一种硅质沉积岩，主要成分是无定形的二氧化硅，是由古代硅藻及一部分放线虫类硅质遗骸所组成，其化学成分可以用 $\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 表示。矿石组分中以硅藻为主，其次是水云母和高岭石。纯净的硅藻土一般呈白色、土状，含杂质时呈灰白、黄、灰绿直至黑色，有机质含量越高，湿度越大，颜色越深。大多数硅藻土质轻、多孔、固结差、易碎裂，手捏即成粉末。硅藻土的近似密度为干燥块状 $320\sim 640\text{kg/m}^3$ ，干燥粉状 $80\sim 256\text{ kg/m}^3$ 。除氢氟酸以外，不溶于其他酸，但易溶于碱。硅藻土中的孔半径为 $5\sim 80\mu\text{m}$ ，孔隙度为 $0.43\sim 0.87\text{m}^3/\text{g}$ 。

由于硅藻土具有多孔性、低密度、比表面积大等特点，并且还具有相对不可压缩性和化学稳定性等特殊性质，且价格低廉、资源丰富。

10、聚酰胺

聚酰胺是一类化学纤维的原料，国外称尼龙，我国称锦纶，结构中含有重复单位酰胺键 (=CONH) 的高分子聚合物，酰胺基团上的 O、N 原子在酸性介质中结合质子而带正电荷，以静电引力形成吸附溶液中的阴离子，故可与酚类、酸类、醌类、黄酮类等富含酚羟基的化合物形成氢键而吸附，吸附的强度主要取决于这两种化合物中羟基的数目与位置、以及溶剂与化合物或溶剂与聚酰胺之间形成氢键的缔合能力大小。溶剂分子与聚酰胺或黄酮类化合物形成氢键缔合的能力越强，则聚酰胺对这两种化合物的吸附作用将越弱。聚酰胺层析柱即是利用此性质对各种植物中黄酮、茶多酚等进行吸附、洗脱而分离的，即所谓的“氢键吸附”学说。对聚酰胺层析的分离机理，除了“氢键吸附”学说外还有“双重层析”理论。前者不能解释当以氯仿：甲醇为洗脱液时，为何黄酮甙元比黄酮甙先洗脱下来。后者认为当用极性流动相（含水溶剂系统）洗脱时，聚酰胺作为非极性固定相，其层析行为类似反相分配层析，当用有机溶剂洗脱时，聚酰胺作为极性固定相，其层析行为类似正相分配层析。但固定相（吸附剂）的极性是由其本身结构及性质决定的，不应随洗脱液的改变而改变，况且聚酰胺层析属于吸附层析，不是分配层析。因此，“双重层析理论”也没有揭示出产生这两种相反现象的根本原因。

聚酰胺和各类化合物形成氢键的能力和溶剂的性质有密切关系。通常在碱性水溶液中，聚酰胺和其他化合物形成氢键的能力最弱；在有机溶剂中，形成氢键的能力稍强，在水中形成氢键的能力最强。

11、大孔网格聚合物吸附树脂

有些离子交换树脂可用做吸附剂，如酚醛缩合树脂很早就用做脱色，丙烯酸 二乙烯苯羧基树脂用于维生素 B12 的提取等。显然，该情况下并不发生离子交换，而是依靠树脂骨架和溶质分子之间的分子吸附，因此将大网格离子交换树脂去其功能团，而保留其多孔的骨架，其性质就和活性炭、硅胶等吸附剂相似，称为大网格聚合物吸附剂。

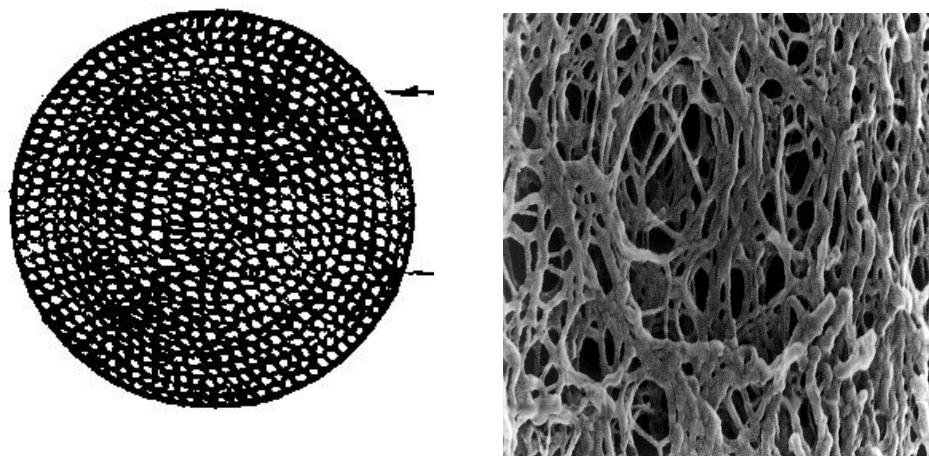
大网格吸附剂是一种非离子型共聚物，能够借助范德华力吸附各种有机物质。影响吸附能力的因素为树脂的化学结构和物理性能、溶质及溶液的性质等。如当从水溶液中吸附时，对同族化合物，一般分子量越大，极性越弱，吸附量就越大；吸附有机大分子时，孔径必须足够大，但孔径增大，吸附表面积就要减少，经验表明，孔径等于溶质分子直径 6 倍比较合适，因此，宜根据吸附物的极性和分子大小，选择具有适当极性、孔径和表面积的吸附剂。

与活性炭等经典吸附剂相比，大网格吸附剂具有选择性好、解吸容易、机械强度好、可反复使用和流体阻力较小等优点。特别是其孔隙大小、骨架结构和极性，可按照需要选择不同的原料和合成条件而改变，因此可适用于各种有机化合物。应用于抗生素工业，吸附弱电解质和非离子型抗生素，可补充离子交换树脂的不足。

大网格聚合物吸附剂的类型按骨架的极性强弱，可以分为：非极性、中等极性和极性吸附剂。非极性吸附剂系由苯乙烯和二乙烯苯聚合而成，故也称为芳香族吸附剂。中等极性吸附剂具有甲基丙烯酸酯的结构（以多功能团的甲基丙烯酸酯作为交联剂），也称为脂肪族吸附剂。

大网格吸附剂的合成方法。在聚合时，加入一种惰性组分，后者不参与聚合反应，但能和单体互溶，当用悬浮聚合合成时，它还必须不溶或微溶于水。在一般悬浮聚合中，单体混合物的液滴，被惰性介质水所包围，每一液滴可看作一个聚合的本体，但当有惰性溶剂存在时，反应机理接近于溶液聚合。于是在液滴内，逐渐形成无数凝胶微粒，四周为惰

性组分所包围，聚合结束后，利用溶剂萃取或水蒸汽蒸馏的方法将溶剂去除，因而留下了孔隙，形成大网格结构。其结构图如下：



七、吸附法的溶剂与洗脱剂

吸附色谱的溶剂与洗脱剂二者无本质区别。通常把溶解样品的液体介质叫做溶剂，把洗脱吸附柱的溶液叫做洗脱剂。二者常是同一物质，只是用途不同而已。溶剂和洗脱剂应符合以下条件：

- 1、纯度合格，因为杂质常会影响洗脱及吸附能力。
- 2、与样品或吸附剂不发生化学变化。
- 3、能溶解样品中的各成分。
- 4、溶剂被吸附剂吸附的越少越好。
- 5、黏度小，易流动，不致使洗脱太慢。
- 6、容易与目的物成分分开。

常用溶剂极性由小到大：石油醚、四氯化碳、甲苯、苯、乙醚、氯仿、乙酸乙酯、丙酮、乙醇、甲醇、水。

活性炭洗脱顺序：水、甲醇、丙酮、乙酸乙酯、氯仿。

聚酰胺洗脱顺序：水、甲醇、丙酮、氨水、二甲基甲酰胺。

大网格吸附剂对有机物质的吸附能力一般低于活性炭，解吸比较容易，最常用的是以低级醇、酮或其水溶液解吸，所选用的溶剂应符合 2 种要求：一是能使大网格聚合物吸附

剂溶胀，这样可减弱溶质与吸附剂之间的吸附力；二是容易溶解吸附物。当溶剂分子扩散到吸附中心后，应能使溶质很快溶解。对弱酸性物质可用碱来解吸，如 XAD-4 吸附酚后，可用 NaOH 溶液解吸，此时酚转变为酚钠，亲水性较强，因而吸附较差。对弱碱性物质可用酸来解吸；在高盐溶液中进行吸附时，仅用水洗就能解吸；对于易挥发溶质可用热水或蒸汽解吸。

溶剂与洗脱剂的选择，可根据样品组分的溶解度、吸附剂的性质、溶剂极性等方面来考虑，但目前还没有可用的理论原则指导，尚须通过实践来做最后决定。一般地说，对于极性溶质，极性大的溶剂洗脱能力就大，因此可利用极性小的溶剂来溶解样品，配成溶液，这样组分易被吸附，然后换用极性大的溶剂作洗脱剂，才容易把样品从吸附剂中洗出。

硅胶柱。

附录

柱层析：常用的是以硅胶或氧化铝作固定相的吸附柱。

1、柱子可以分为：加压，常压，减压三种。

压力可以增加洗脱剂的流动速度，减少产品收集的时间，但是会减低柱子的塔板数。所以其他条件相同的时候，常压柱是效率最高的，但是时间也最长。减压柱能够减少硅胶的使用量，能够节省一半甚至更多，但易使溶剂挥发及某些挥发性成份难以获得。加压柱与常压柱类似，只不过外加压力加速流动相的流速。压力的提供可以是压缩空气、双连球或者小气泵。特别适用于容易分解的样品的分离。但压力过大，会减低分离效果。

2、柱子的尺寸

应该是粗长的最好。柱子长了，相应的塔板数就高。柱子粗了，上样后样品的原点就小，利于分离。常见柱子径高比一般在 1: 5~10，硅胶量是样品量的 30~40 倍，但具体的选择要具体分析。如果所需组分和杂质分的比较开（是指在所需组分 r_f 在 0.2~0.4，杂质相差 0.1 以上），就可以少用硅胶，用小柱子（例如 200 毫克的样品，用 2cm×20cm 的柱子）；如果 r_f 相差不到 0.1，就要加大柱子。

3、无水无氧柱

适用于对氧、水敏感，易分解的产品，可以湿柱，也可以干柱。不过在样品之前至少要用溶剂把柱子饱和一次，因为溶剂和硅胶饱和时放出的热量易使产品分解。因为分离的东西比较敏感，接收瓶需要用可密封的，遵循 schlenk 操作。

无水无氧柱中常用氧化铝做固定相。因为硅胶中有大量的羟基裸露在外，很容易使样品分解，特别是金属有机化合物和含磷化合物。而氧化铝可以做成碱性、中性和酸性的，选择余地比较大，但是价格比硅胶贵。

4、湿法上样与干法上样

湿法是用流动相溶解样品，也可以用二氯甲烷、乙酸乙酯等溶解样品，但溶剂越少越好。有些样品上样后在硅胶上又会析出，可能是硅胶对样品的吸附饱和造成。有些样品溶解性差，能溶解的溶剂又不能上柱（比如 DMF、DMSO 等，会随着溶剂一起走，显色是一个很长的脱尾），这时必须用干法上柱。样品和硅胶的量以 1: 1 的量混合，旋干，不能看到明显的固体药物颗粒，上样。

5、溶剂的选择

选取便宜、安全、环保的溶剂。常用溶剂有石油醚，乙酸乙酯。也可以选用二氯甲烷作溶剂，但是，它和硅胶的吸附是一个放热过程，所以夏天时柱子里易产生气泡。

6、样品的收集

用硅胶作固定相过柱子的原理是一个吸附与解吸的平衡。所以如果样品与硅胶的吸附比较强，不容易流出。这样会发生，后面的点先出，而前面的点后出，这时可以采用氧化铝作固定相。

第九节 离子交换法

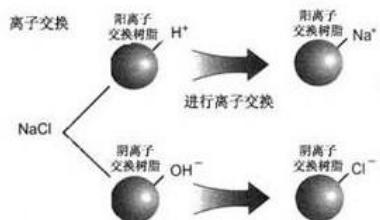
一、离子交换法的定义

离子交换法是利用溶液中各种带电粒子与离子交换剂之间结合力的差异进行物质分离的操作方法。离子交换树脂是一种具有网状立体结构的不溶于酸、碱和有机溶剂的固态高分子化合物，其化学稳定性良好，有一定孔隙度，且有离子交换能力。

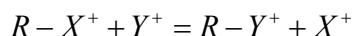
二、离子交换法的原理

离子交换树脂浸在水中，活性离子因热运动在树脂周围一定距离内运动，扩散到溶液中，溶液中的同类型离子，从溶液中扩散到骨架的网格或孔内，两种离子浓度差较大，产生交换推动力，利用浓度差推动力，使树脂上的可交换离子发生可逆交换反应，浓度差越大，交换速度越快。带电粒子与离子交换剂间的作用力是静电力，它们结合是可逆的，在

一定条件下能够结合，条件改变后也能被释放出来，其交换过程如下图：



离子交换剂是由惰性的不溶性载体（为惰性的具有三维空间网状结构的不溶性的高分子固定骨架），功能基团（与载体以共价键连接的不能移动的活性基团）和平衡离子（和功能基团以离子键连接的带相反电荷的可移动的活性离子）组成。平衡离子带正电为阳离子交换树脂，带负离子为阴离子交换树脂。



R 为交换剂的功能团和载体；X 为平衡离子；Y 为交换离子。

在实际应用中，若要进行选择性吸附，则应是目的物粒子应具有较强结合力，而其他离子没有结合力或结合力较弱，具体做法为调节 pH 值，使目的物（如蛋白质、氨基酸、核酸等两性物质）的粒子带有相当数量的电荷，而主要杂质带有相反电荷或带较弱电荷，再选用适宜的树脂进行吸附。例如调节氨基酸调 pH 为低于等电点，则带正电荷，而杂质多糖不带或带微弱电荷，进而可分离开。

三、离子交换法特点

优点：离子交换树脂无毒性，可再生、能反复使用，成本低，分离效率高，设备结构简单，工艺操作方便，应用范围广，可以用于分离、富集、纯化等。

缺点：操作比较麻烦，生产周期长，生产过程中 pH 变化大。

四、离子交换法的洗脱方法

- 1、调节 pH 值，使粒子在此 pH 之下失去电荷，甚至带相反电荷，从而洗脱下来。
- 2、用高浓度同性离子将目的物洗脱下来，对阳离子交换树脂，PK 越大即越碱，所需洗脱液的 pH 越高，同理对阴离子交换树脂 PK 越小，洗脱时所需洗脱液的 pH 越低。

五、离子交换树脂的分类与要求

1、分类

(1) 阳离子交换树脂分为强酸型阳离子交换树脂、中强酸型阳离子交换树脂和弱酸型阳离子交换树脂。强酸型阳离子交换树脂含有强酸性基团，如硫酸基、磺酸基，能在溶液中离解 H^+ 而呈强酸性，此类树脂离解能力强，使用无 pH 值限制。再生处理是用强酸使离子交换树脂的官能团恢复原来状态再次使用。中强酸型阳离子交换树脂含有磷酸基团能在水中离解出 H^+ 呈中强酸性。弱酸型阳离子交换树脂含有弱酸性官能团(羧基—COOH, 酚羟基—OH) 能在水中离解出 H^+ 呈弱酸性。树脂离解性较弱，只能在碱性、中性、微酸性下作用，pH 愈大交换能力愈强。再生处理是用酸使离子交换树脂的官能团恢复原来状态再次使用。

(2) 阴离子交换树脂分为强碱型阴离子交换树脂、中强碱型阴离子交换树脂和弱碱型阴离子交换树脂。强碱型阴离子交换树脂含有强碱型基团如季铵基，在水中离解出 OH^- ，呈强碱性，树脂离解性很强，使用无 pH 限制，再生用强碱 (NaOH) 进行。弱碱型阴离子交换树脂含有伯胺基-NH₂、仲胺基=NH、叔胺基≡N、吡啶基等，能离解出 OH^- 而呈弱碱性，树脂离解能力弱，在低 pH (1~9) 下可以使用，pH 越低，交换能力越大，可用 Na₂CO₃、NH₄OH 进行再生。中强碱型阴离子交换树脂兼有以上两类活性基团。

2、对树脂的要求：

树脂颗粒大小，对树脂交换能力、溶液流动、流失等影响较大，最适颗粒大小为 0.25~0.84mm，过小则流体阻力增大，流速下降，洗脱较难，过大，则交换速度下降；其形状多为球形，这可降低流体阻力；树脂须具有一定交联度，使其不溶于一般酸、碱及有机溶剂，交联度大小决定树脂机械强度及网状结构的疏密，交联度大，则网孔小，结构紧密，树脂机械强度大，交联度小，则网孔大，结构疏松，树脂机械强度小；树脂应有较好的化学稳定性，不易分解破坏；树脂应有一定的物理稳定性，避免或减少破损流失；为了树脂能有较大的交换容量，在制造时应使单位质量树脂所含的官能团尽可能多，这样树脂具有较大的交换容量和较好的选择性；树脂应具有化学动力学性质好，这可使树脂具有交换速度快，可逆性好，易平衡，易洗脱，易再生等优点。

3、离子交换过程

离子交换反应是在动态下进行的，不论溶液的运动情况怎样，在树脂表面上始终存在着一层薄膜，起交换的离子只能借分子扩散而通过这层薄膜。离子交换过程的机理以 732 树脂上 H^+ 交换谷氨酸离子为例：(1) 谷氨酸离子从溶液通过液膜扩散至树脂表面后，(2) 穿过树脂表面向树脂孔内部扩散至有效交换位置，(3) 谷氨酸离子再与树脂中 H^+ 离子交换；(4) H^+ 从树脂内部向树脂表面扩散后，(5) H^+ 穿过树脂表面的液膜进入水溶液，其交换过程见下图。其中步骤(1)、(5) 称为外扩散或膜扩散；(2)、(4) 称为内扩散或粒扩散；(3) 称为交换反应。一般反应速度很快，而扩散速度很慢，因此，离子交换反应的速度主要取决于扩散速度。反应速度主要取决于扩散速度。

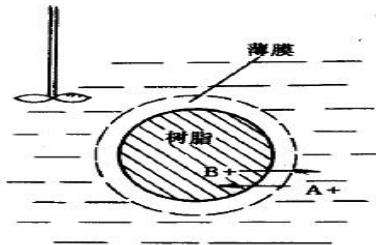


图 2-2 离子交换过程

4、影响交换速度的因素

离子交换速度是在单位时间内，溶液中 A^+ 浓度减少或 B^+ 浓度增加的量，其主要影响因素如下：

- (1) 树脂颗粒：离子的外扩散速度与树脂颗粒大小成反比，内部扩散速度与粒径倒数的高次方成正比，故粒度减小，交换速度加快。
- (2) 树脂的交联度：交联度下降，树脂易膨胀，树脂内扩散较容易，降低交联度，可提高交换速度。
- (3) 溶液流速：外扩散随溶液过柱流速的增加而增加；内扩散基本不受流速或搅拌的影响。
- (4) 溶液浓度：溶液中离子浓度低，对外扩散速度影响较大，对内扩散影响较小；离子浓度较高，对内扩散影响较大，对外扩散影响较小。
- (5) 温度：溶液温度升高，扩散速度加快，交换速度也增加。

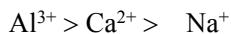
(6) 离子的大小：小离子的交换速度较快；大分子受空间阻碍，扩散速度特别慢。

(7) 离子的化合价：离子与树脂骨架间存在库仑引力，化合价越高，扩散越慢。

5、影响离子交换树脂选择性的因素

(1) 离子价数：优先选择高价离子，低价离子被吸附时较弱。

阳离子被吸附顺序：



阴离子被吸附顺序：



(2) 溶液浓度的影响：树脂对离子交换吸附的选择性，在稀溶液中选择性较大，在浓溶液中较小，因此可将溶液稀释，树脂选择吸附高价离子。

(3) 离子的水化半径：离子在水溶液中的大小应用水化半径来表征，而不是原子量，水化半径较小的离子优先吸附。

(4) 树脂物理结构的影响：交联度高对离子的选择性较强。

(5) 有机溶剂的影响：有机溶剂存在时，树脂对有机离子的选择性降低，而易吸附无机离子。

(6) 树脂与交换离子间的辅助力：能与树脂间形成辅助力（氢键、范德华力等），树脂对其吸附力就大；破坏辅助力的溶液，能将离子从树脂上洗脱出来。

六、离子交换树脂的骨架分类

1、苯乙烯型离子交换树脂：由苯乙烯和二乙烯苯经氧苯甲酰催化聚合而成，聚合后再引入所需的酸性基或碱性基。

2、丙烯酸型阳离子交换树脂：由丙烯酸甲酯和二乙烯苯以过氧化苯甲酰引发在水中聚合再水解得到，在载体聚合前引入活性集团。

3、多乙烯多胺-环氧氯丙烷树脂：将环氧氯丙烷滴入多乙烯胺中形成树脂胶，将树脂胶在透平油中分散成球形。

4、酚醛型阳离子交换树脂，如 122 树脂由水杨酸、苯酚、甲醛缩聚而成。

5、其他

七、离子交换操作方法

1、树脂的选择：根据分离目的物和主要杂质间的离解特性选择树脂，如氨基酸可离解为阳离子和阴离子，而糖醛酸只能离解为阴离子因此提取氨基酸时可选择阳离子树脂；考察目的物的分子量、浓度、稳定性、所处介质的性质及分离的具体条件和要求进行树脂选择，选择的树脂应对目的物与主要杂质的吸附力有较大差异，通常强酸、强碱的目的物选弱酸、弱碱的树脂，弱酸、弱碱的目的物选强酸、强碱的树脂。

2、树脂的处理与再生

(1) 处理：先除杂、过筛，将大颗粒的树脂粉碎，再用酒精或其它溶剂浸泡除去有机杂质，再用 1mol/L 的氢氧化钠和盐酸交替浸泡。

(2) 再生：即让使用后的树脂重新获得使用性能的处理。常先用大量的水清洗树脂表面和空隙间的杂质，再用酸、碱除去与功能团结合的杂质，使其恢复原有的静电吸附能力。

3、离子交换操作方式

(1) 静态：将树脂与交换溶液混合放入一定容器进行搅拌。此法操作简单，设备要求低，但交换不完全，不宜用于多种成分的分离。

(2) 动态：交换液以平流方式通过树脂床进行交换。此法交换完全、操作连续。

(3) 洗脱：将交换后的树脂所吸附的物质释放出来重新转入溶液的过程为洗脱。常用酸、碱、盐、溶剂等洗脱。酸、碱的洗脱为改变被吸附物的电荷或树脂活性基团的理解状态，以消除静电吸附力；盐溶液通过高浓度的带同电荷的离子与目的物竞争树脂上的活性基团，使之游离。

第十节 凝胶层析

一、凝胶层析定义

凝胶是一种具有多孔、网状结构的分子筛。利用这种凝胶分子筛对大小、形状不同的分子进行层析分离，称凝胶层析，又称凝胶过滤、凝胶渗透过滤、分子筛过滤、阻滞扩散层析、排阻层析。凝胶层析法适用于分离和提纯蛋白质、酶、多肽、激素、多糖、核酸类

等物质。分子大小彼此相差 25% 的样品，只要通过单一凝胶床就可以完全将它们分开，利用凝胶的分子筛特性，可对这些物质的溶液进行脱盐、浓缩、去热源和脱色。

二、凝胶层析原理

凝胶层析是在装有多孔物质填料的柱中进行，由于填料的颗粒含有许多大小不同的孔，使分子大小不同的溶质分子可以不同程度的往孔中扩散。凝胶是一类多孔性高分子聚合物，每个颗粒犹如一个筛子。当样品溶液通过凝胶柱时，相对分子质量较大的物质由于直径大于凝胶网孔而只能沿着凝胶颗粒间的孔隙，随着溶剂流动，因此流程较短，向前移动速度快而首先流出层析柱；反之，相对分子质量较小的物质由于直径小于凝胶网孔，可自由地进出凝胶颗粒的网孔，在向下移动过程中，它们从凝胶内扩散到胶粒孔隙后再进入另一凝胶颗粒，如此不断地进入与逸出，使流量增长，移动速率慢而最后流出层析柱。而中等大小的分子，它们也能在凝胶颗粒内外分布，部分进入颗粒，从而在大分子物质与小分子物质之间被洗脱。这样，经过层析柱，使混合物中的各物质按其分子大小不同而被分离，洗脱是大分子先流出，小分子后流出。

三、凝胶层析的特点

1、凝胶层析操作简便，所需设备简单，有时只要有一根层析柱便可进行工作，再生过程简单，可重复使用。

2、分离效果较好，重复性高。最突出的是样品回收率高，接近 100%。

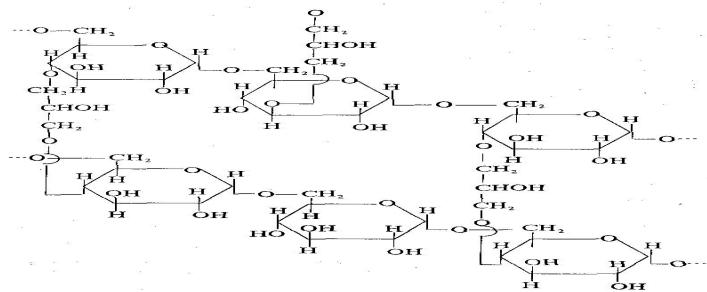
3、分离条件缓和，凝胶骨架亲水，分离过程又不涉及化学键的变化，所以对分离物的活性没有不良影响。

4、应用广泛，适用于各种生化物质，如肽类、激素、蛋白质、多糖、核酸的分离纯化、脱盐、浓缩以及分析测定等。分离的分子量范围也很宽，如 Sephadex G 类为 $10^2 \sim 10^5$ d；Sephadex G-200 类为 $10^5 \sim 10^8$ d。

5、分辨率不高，分离操作较慢，由于凝胶层析是以物质分子量的不同作为分离依据的，分子量的差异仅表现在流速的差异上，所以分离时流速必须严格把握，因而分离操作一般较慢，而且对于分子量相差不多的物质难以达到很好的分离，此外，凝胶层析要求样品粘度不宜太高，凝胶颗粒有时还有非特异吸附现象。

四、几种常用的凝胶

1、葡聚糖凝胶 (Sephadex): 具有良好的化学稳定性，是目前生化产品制备中最常用的凝胶。常见的葡聚糖凝胶为 G 类葡聚糖凝胶 (Sephadex-G)，它的最基本骨架是葡聚糖，它是一种以右旋葡萄糖为残基的多糖，分子间主要是 α -1, 6-糖苷键（约占 95%），分枝为 1, 3-糖苷键（约占 5%），以 1-氯-2, 3-环氧丙烷为交联剂将链状结构连接为三维空间的网状结构的高分子化合物，结构如下图：



葡聚糖凝胶网孔大小可通过调节交联剂和葡聚糖的配比及反应条件来控制。交联度越大，网孔越小，吸水膨胀就越小。交联度越小，网孔越大，吸水膨胀就越大。G 类葡聚糖凝胶常用 G-X 代表，X 数字既代表交联度，也代表持水量。X 数字越小，交联度越大，网孔越小，适用于分离低分子质量生化产品。X 数字越大，交联度越小，网孔越大，适用于分离高分子生化产品。X 数字也代表凝胶的持水量，如 G-25 表示 1g 干胶含水 2.5mL，G-100 表示 1g 干胶含水 10mL，依次类推，吸水量小的凝胶，达到溶胀的时间也短，如 G-25 仅用 3 小时，G-100 用三天；

葡聚糖凝胶是柱状颗粒物，化学性质稳定，不溶于水、弱酸、碱和盐溶液，低温时在 0.1mol/L 盐酸中保持 1~2h 性质不变；室温时在 0.01mol/L 盐酸中放置半年性质也不会发生改变；60℃时在 0.25mol/L 的氢氧化钠中，放置两个月性质不会改变；热稳定性好，在 120℃ 加热 30min 灭菌条件下不被破坏。湿状贮存易发霉，若长期不用，需加防腐剂。

2、聚丙烯酰胺凝胶：

聚丙烯酰胺凝胶也是一种人工合成凝胶，其商品名为生物凝胶 P (Bio-gel-P)，和交联葡聚糖一样，为颗粒状干粉，在溶剂中能自动吸水溶胀成凝胶。其由单体丙烯酰胺为材料，以亚甲基双丙烯酰胺为交联剂经四甲基乙二胺催化聚合而成，结构图如下：

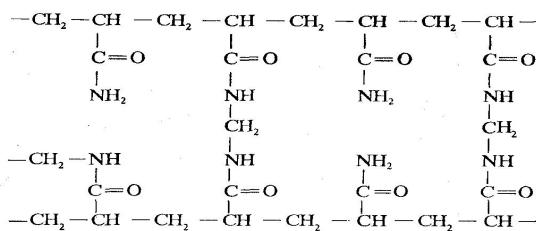


图 2-3 聚丙烯酰胺凝胶的结构

在聚丙烯酰胺凝胶的合成过程中，单体和交联剂的配比可以任意改变。以 (T) 代表 100mL 凝胶溶液中含有的单体和交联剂总克数，称为凝胶浓度。而其中交联剂占单体和交联剂总量的百分比称为交联度，以 (C) 表示，交联度越大，网孔越小，交联度越小，则网孔越大。聚丙烯酰胺凝胶全是由碳—碳骨架构成，稳定性较好，适合于做凝胶层析的载体。只有在极端 pH 条件下酰胺键才被水解为羧基，使凝胶带有一定的离子交换基团，故一般只在 pH 2~11 的范围内使用。

像 Sephadex 一样，商品聚丙烯酰胺为颗粒状的干粉，它有十分明显形成块状并粘附在一起的倾向，在溶剂中能自动溶胀成胶。其优点为由碳—碳骨架构成，完全为惰性。稳定性比葡聚糖凝胶好，洗脱时不会有凝胶物质下来；其缺点是不耐酸。遇酸时酰胺键会水解为羧基，使凝胶带有一定的离子交换基团。

3、琼脂糖凝胶 agarose gel)：天然凝胶，来源于海藻的多糖琼脂，不是共价交联，是以氢键交联。琼脂糖凝胶可以分离葡聚糖凝胶和生物胶所不能分离的大分子，使凝胶层析的分离区间扩大到大分子和病毒颗粒，其最大范围可达相对分子质量 10^8 ，但是由于琼脂有强烈的吸附作用，给使用造成了困难，后来，从琼脂中分离出两个组分，一个组分为带负电荷的琼脂果胶，含有磺酸基和羧基；另一组分叫琼脂糖，它不含有带电基团，其结构是有 β -D-吡喃半乳糖和 3, 6 脱水-L-吡喃半乳糖相结合的链状多糖。这种琼脂糖被用来进行凝胶层析，它既具有琼脂凝胶相同的分离区间，又没有吸附作用。但其稳定性远不如葡聚糖凝胶和生物胶 P，强酸强碱能引起结构破坏。最好使用条件控制在 pH 4~9 之间，温度 0~40°C，超出此范围，可能被破坏。

琼脂糖凝胶做成柱状后不再脱水干燥，否则不能再溶胀恢复原有形状，因此商品大都以含水状态供应，并应在湿态保存。一般悬浮在 10^{-3} mol/L EDTA 和 0.02% 叠氮化钠溶液中。

琼脂糖凝胶，必须在溶胀状态保存，遇脱水剂、冷冻和一些有机溶剂即破坏，丙酮和乙醇对它无影响，但其强度低、弹性小，装柱高时会导致底部压碎变形。

4、疏水性凝胶：常用的为聚甲基丙烯酸酯（Polymethacrylate）凝胶、聚苯乙烯凝胶（如 Styrogel，Bio-Beads-S），专用于分离不溶于水的有机物质。

五、凝胶色谱的操作

1、凝胶的选择

选择适宜的凝胶是取得良好分离效果的最根本的保证。选取何种凝胶及其型号、粒度，一方面要考虑凝胶的性质，包括凝胶的分离范围（渗入限与排阻限）还有它的理化稳定性、强度、非特异吸附性质等；另一方面还要注意到分离目的和样品的性质。凝胶粒度的大小对分离效果有直接的影响。一般来说，细粒凝胶柱流速低，但洗脱峰窄，分辨率高，多用于精制分离或分析等。粗粒凝胶柱流速高，但洗脱峰平坦，分辨率低，多用于粗制分离，脱盐等。下图表示在同一流速下不同粒度的 Sephadex G-25 柱的洗脱效果

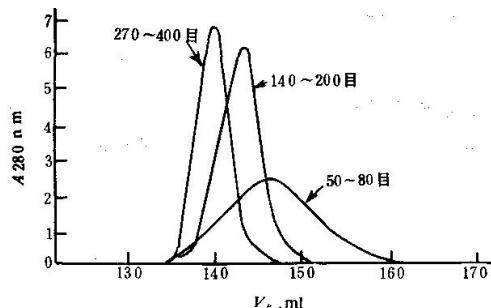


图 2-4 凝胶粒度与洗脱效果的关系图

2、装柱

一般选用细长的柱作凝胶过滤。进行脱盐时，柱高 50cm 比较合适；分级分离时，100cm 就足够了。装柱时一般是在柱内先装入约 1/3 高度的水或缓冲液，然后将溶胀好的凝胶在搅拌成稀浆后的情况下慢慢倒入柱内，使其自然沉降。如此连续操作，可以得到一个均匀的柱床。柱装得不好往往造成洗脱区带加宽，甚至使一些本来可以分开的区带重叠，如装柱时的操作压力太大，会使凝胶床压得太实，从而降低流速。新柱装好后，要用洗脱缓冲液平衡，一般用 3~5 倍体积的缓冲液在恒压下流过柱床。新装好的柱要检验其均匀性—可用带色的高分子物质如蓝色葡聚糖-2000 配成 2mg/mL 的溶液过柱，观察色带是否均匀

下降。也可以对光检查，看其是否均匀或有无气泡存在。

3、加样

由于凝胶层析的稀释作用，似乎样品浓度应尽可能大才好，但样品浓度过大往往导致粘度增大，而使层析分辨率下降。一般要求样品粘度小于 $0.01\text{Pa}\cdot\text{s}$ (帕斯卡秒)，这样才不致于对分离造成明显影响。对蛋白质类样品浓度以不大于 4% 为宜。如果样品浑浊，应先过滤或离心除去颗粒后上柱。分析用量一般为每 100mL 床体积加样品 $1\sim 2\text{mL}$ ，制备用量一般为每 100 mL 床体积加样品 $20\sim 30\text{ mL}$ ，这样可使样品的洗脱体积小于样品各组分之间的分离体积，获得较满意的分离效果。样品与柱床体积比例悬殊时分离效果好，但过少的样品量不但会造成设备和器材的浪费，降低工作效率，还会造成样品稀释。

样品上柱是凝胶层析中最关键的一步。理想的样品色带应是狭窄且平直的巨型色谱带。为了做到这一点，应尽量减少加样时样品的稀释以及样品的非平流流经凝胶层析床体。反之将造成色谱带扩散、紊乱，严重影响分离效果。

4、洗脱

为了防止柱床体积的变化，造成流速降低及重复性下降。整个洗脱过程中始终保持一定的操作压，并不超限是很必要的。流速不宜过快且要稳定。洗脱液的成分也不应改变，以防凝胶颗粒的涨缩引起柱床体积变化或流速改变。在许多情况下可以用水作洗脱剂，但为了防止非特异吸附，避免一些蛋白质在纯水中难以溶解（析出沉淀），以及蛋白质稳定性等问题的发生，常采用缓冲盐溶液进行洗脱。离子浓度至少 0.02mol/L 方可获得较好的结果，因为凝胶含有少量羧基，会吸附少量阳离子而排斥少量阴离子。洗脱用盐等介质应比较容易除去才好，通常，氨水、醋酸、甲酸铵等易挥发的物质用得较多。对一些吸附较强的物质也可采用水和有机溶剂（如水-甲醇，水-丙酮等）的混合物进行洗脱。

洗脱剂的流速对分离效果也有很大影响，下图显示了同一凝胶柱在不同流速下的洗脱曲线。由图可见较快的流速下得到的洗脱峰较宽。流速低洗脱峰窄而高。也就是说，流速较低，分辨率较高，样品稀释较轻。

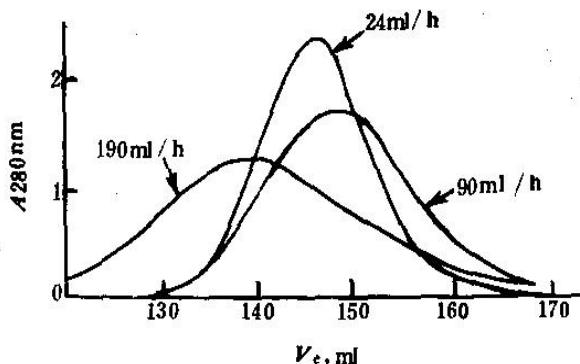


图 2-5 流速对洗脱曲线的影响

洗脱时的流速与操作压有关，与凝胶的型号和粒度也有关，在同样的操作压下洗脱时往往编号小的葡聚糖凝胶，以及颗粒粗的凝胶流速大；编号大的，粒度细的凝胶流速慢。对于某种凝胶来说，在一定范围内，操作压加大，流速加快。

5、凝胶的再生和保养

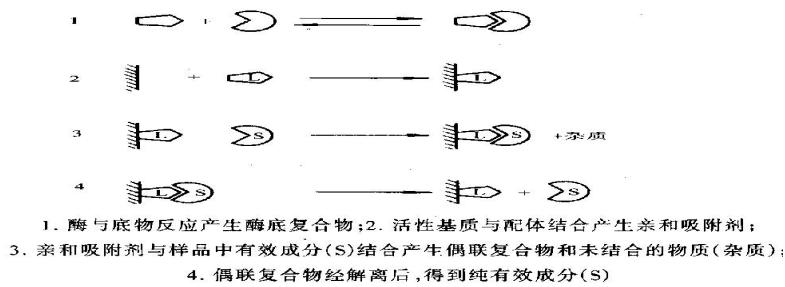
在洗脱过程中，所有组分一般都可被洗脱下来，所以装好柱后，可反复使用，无需特殊的再生处理。但多次使用后，凝胶颗粒可能逐渐沉积压紧，流速变慢。这时只需将凝胶自柱内倒出，重新填装。或使用反冲法，使凝胶松散冲起，然后自然沉降，形成新的柱床，这样流速会有所改善。

葡萄糖凝胶和琼脂糖凝胶都是碳水化合物，能被微生物（如细菌和霉菌）分解。聚丙烯酰胺凝胶本身不被微生物作用，但微生物还是能在此凝胶液中和凝胶床上生长，这样会破坏凝胶的特性，影响分离效果。为防止细菌生长和发酵，可用 0.02% 叠氮化钠、0.05% 三氯叔丁醇（仅在弱酸有效，也适用于其他离子交换剂）或 0.002% 洗必泰、0.01% 醋酸苯汞（在弱碱中有效，也适用于其他阴离子交换剂）以及 0.1mol / L 氢氧化钠溶液等作防腐剂。层析前再用水或平衡液将防腐剂洗去。

第十一节 亲和层析

一、亲和层析定义

亲和层析是利用生物大分子特异性亲和力而设计的层析技术称为亲和层析。在亲和层析中起可逆结合的特异性物质称为配基，与配基结合的层析介质称为载体。其作用机理为特异的亲和力如用不溶性淀粉提纯淀粉酶、抗原和抗体，核糖核酸与其互补的脱氧核糖核酸间的互相作用，其机理如下图。



二、亲和层析特点

- 1、待分离物质与配基专一性结合，分辨率高，操作简单，通过一次性操作即可得到较高纯度的分离物质。
- 2、具有浓缩作用，可以从含量很低的溶液中得到高浓度的样品，有的纯化倍数达几千倍。
- 3、利用生物学的特异性进行分离，所以分离条件比较温和，能够很好地保持样品原有的生物学性质
- 4、亲和吸附剂通用性差（几乎一种物质对应一种吸附剂），洗脱条件苛刻。

三、亲和层析的过程

- 1、配基固定化：选择合适的配基与不溶性的支撑载体偶联，或共价结合成具有特异亲和性的分离介质。
- 2、吸附样品：亲和层析介质选择性吸附酶或其它生物活性物质，杂质与层析间没有亲和作用，故不能被吸附而被洗涤除去。
- 3、样品洗脱：选择适宜的条件使被吸附的亲和介质上的酶或其它生物活性物质洗脱。

四、亲和层析载体

- 1、载体的要求：

- 1) 不溶于水，但具有高度亲水性。
- 2) 具有多孔网状结构和良好的流动性和渗透性。
- 3) 机械性能良好，在一定静水压下不变形。
- 4) 有足够数量的化学基团与大量的配基相偶联。
- 5) 化学惰性，无或微弱的非特异性吸附作用。
- 6) 有良好的物理和化学的稳定性。

2、几种常用的载体：

- 1) 纤维素：自然界中数量最大的大分子生物材料，取材十分方便。但由于其结构紧密、均一性差，不利于大分子的渗入。活化后常带有电荷，非特异性吸附较强，加上空间位阻等原因，其应用不如凝胶载体广泛。目前主要用于分离与核酸有关的物质，如用寡聚脱氧胸腺核苷酸纤维素作固定相分离细胞提取液中的 mRNA。市售商品有无定型微纤维、微晶纤维素、珠状纤维素。
- 2) 琼脂糖凝胶：这类载体能使吸附物质保持活性，能迅速活化并接上各种功能基团，结构疏松孔径大，流速快，载体几乎无带电基团，非专一性吸附小。
- 3) 葡聚糖凝胶：是经环氧氯丙烷交联的立体网格的多糖物质，理化性质稳定。与琼脂糖凝胶相比孔径太小，特别是经配基偶联后，凝胶膨胀度会进一步变小，所以应用受到限制。
- 4) 聚丙烯酰胺凝胶：具有网状三维空间结构。商品名为 Biogel P，为干胶，遇水溶胀为多孔凝胶，理化性质稳定，适用于稀盐、洗涤剂、盐酸胍等溶液和有机溶液，不受酶及微生物影响，具有较多可供反应的酰胺基，可制配基含量较高的亲和柱，适用于亲和力较低的亲和系统，但 pH 过高或过低可水解酰胺基。注意避免接触强氧化剂，配基偶联后会使它的网格缩小，在一定程度上限制了它的应用。
- 5) 多孔玻璃珠：化学和物理稳定性好，机械强度高，不但能抵御酶及微生物的作用，还能耐受高温灭菌和较剧烈的反应条件，但亲水性不强，对蛋白质尤其是碱性蛋白质有非特异性吸附，而且可供连接的化学活性基团较少。改良方法是用葡聚糖包被玻璃珠，则可改善其亲水性，并增加化学活性基团。

五、亲和层析配基

1、对配基的要求:

- 1) 能与活化剂的活化基团发生偶联作用，偶联后不影响配基和目标分子的专一结合特性。
- 2) 专一亲和性较强，能有效地分离目标分子。
- 3) 配基与目标分子结合后，在一定条件下能够被解吸附，且不破坏目标分子的生物活性。
- 4) 在分离过程中配基与目标分子无空间阻碍。

2、亲和配基类型:

特殊配基：如某一抗原的抗体，某一激素的受体，此类配基选择特异性最高，分离效果最好，但此类配基多为不稳定生物活性物质，偶联时损失大，价格昂贵，成本高。

通用配基：可用于一类物质的分离，如外源性凝集素为糖蛋白类的通用配基，NADH为脱氢酶类的通用配基。

常用配基有酶----底物、底物类似物、抑制剂、辅助因子（辅酶、金属离子等）；抗体----抗原、病毒、细胞、激素、维生素----受体蛋白、载体蛋白；外源凝集素----多糖化合物、糖蛋白、细胞表面受体蛋白、细胞；核酸----互补碱基链段、组蛋白、核酸聚合物、核酸结合蛋白。

3、提高吸附剂的操作容量

- 1) 在配体和基质之间引入“手臂”：在配体和基质之间，特别是在小分子的配体和基质之间，引入适当长度的“手臂”，使配体离开基质的骨架，可以减少基质的立体位阻效应，增加配体的活动度，伸入溶液的深度，从而提高吸附剂的操作容量。
- 2) 增加配体取代的程度：对一些解离常数较大的配体而言，增加配体在基质上的浓度也是增加吸附剂结合量的有效手段，在配体量一定时，随着基质活性基团的增加(通过活化时 pH 值的提高和溴化氰量的增加)偶联配体的量也相应增加。
- 3) 配体与基质以最少的键连接：在以蛋白质和多肽作为配体时，以最少的共价键连接到载体上，有利于保持蛋白质的高级结构状态，有利于保持其生物学功能（抗体）。

六、影响亲和作用的因素

- 1、离子强度：一般来说，提高离子强度，亲和作用减弱或完全破坏。
- 2、pH：在适当的 pH 下，亲和结合作用较高，在其它 pH 下，亲和作用减弱或完全破坏。
- 3、抑制氢键形成的物质：脲和盐酸胍的存在可减弱亲和作用
- 4、温度：提高温度，静电作用、氢键、配位键减弱；但是，疏水性相互作用增强
- 5、液体离子： SCN^- 、 I^- 、 ClO_4^- 的存在，疏水性相互作用减弱
- 6、螯合剂：影响配位键，使亲和作用消失

七、亲和层析的非专一性吸附

- 1、离子效应：具有离子基团的亲和吸附剂会影响蛋白质等多聚电解质的洗脱行为。
- 2、疏水基团：疏水基团与蛋白质结构中疏水区域互相吸引形成非专一性吸附。
复合亲和力（具有离子效应、疏水作用，且这两种作用互相增强）。

八、亲和层析的洗脱方法

- 1、洗脱除去杂质：样品上柱后，可用大量的平衡液即起始缓冲液洗去无亲和力的杂质蛋白，有时也可用不同的缓冲液洗涤去除；最后留在柱上的只有专一吸附的大分子物质。
- 2、洗脱有效成分：将柱上专一吸附的大分子物质洗脱下来。洗脱液要能使复合物完全分离，其具体作法可根据亲和力决定：
 - 1) 亲和力比较小时，可以连续用大体积平衡缓冲液洗脱，得到迟缓的大分子物质峰。
 - 2) 亲和力一般时，主要靠改变缓冲液的性质(如改变 pH 值或离子强度，或者同时改变 pH 值和离子强度)，使复合物之间的亲和力下降到足以分离的程度。
 - 3) 亲和力较强时，可用与配体竞争的溶液或者用蛋白质变性剂洗脱。竞争性洗脱剂的优点是专一性强，并能洗脱出和配体特异结合的大分子物质。剧烈的洗脱条件(蛋白质变性剂) 如用盐酸胍、尿素等变性试剂配制的溶液洗脱下的蛋白质等生物大分子物质；需要经过适当的处理方可恢复活性。

九、亲和层析柱的再生

当洗脱结束后，应连续用大量的洗脱液或高浓度的盐溶液彻底洗涤柱子，接着再用平

衡缓冲液使层析柱重新平衡，经过这样处理的柱子可再次上样，进行第二次亲和层析，一般亲和层析柱都可以反复使用多次

第十二节 膜分离技术

膜是指在一定流动相（液体或气体）中，有一薄层凝聚相物质，把流动相分隔成两部分，这一薄层即为膜，其厚度在 0.5mm 以下。人类对于膜现象的研究源于 1748 年，然而认识到膜的功能并用于为人类服务，却经历了 200 多年的漫长过程，我国在 1958 年开始研究离子交换膜；1965 年开始对反渗透膜进行探索；1966 年上海化工厂聚乙烯异相离子交换膜正式投产，为电渗析工业应用奠定了基础；70 年代相继对电渗析、反渗透、超滤和微滤膜及组件进行研究开发，进而进入推广应用阶段；80 年代中期我国气体分离膜的研究取得长足进步；90 年代国家科技部对无机陶瓷微滤膜的工业化技术组织了科技攻关，推进了陶瓷微滤膜的工业化进程。

一、膜的分类

- 1、按孔径不同 (or 截留分子量) :可分为微滤膜、超滤膜、纳滤膜和反渗透膜
- 2、按材料不同：可分为无机膜(微滤膜，如：陶瓷膜和金属膜)；有机膜（高分子材料做成，如醋酸纤维素 CA、聚醚砜 PES、芳香族聚酰胺、聚氟聚合物等）。
- 3、按结构不同：可分为对称膜（均相膜）即结构与方向无关；不对称膜（非均相膜）即结构与方向有关。

二、膜分离原理

膜分离技术是以选择性多孔薄膜为分离介质，使分离的溶液借助某种推动力（如：压差、浓度差、电位差等）通过膜，低分子溶质透过膜，大分子溶质被截留，以此来分离溶液中不同分子量的物质，从而达到分离、浓缩、纯化目的。

三、微孔膜过滤法

微孔膜过滤又称精密过滤，用于分离亚微米级颗粒，是目前应用最广泛的一种分离分析微细颗粒和超净除菌的一种手段。它的应用范围主要是从气相和液相中截留微粒、细菌

以及其他污染物，以达到净化、分离、浓缩的目的。特别适用于微生物、细胞碎片、微细沉淀物和其他在“微米级”范围的粒子。

1、特点：设备简单、操作方便、快速，可同时处理多个样品，分离效率高、重现性好、某些膜可与大分子结合，建立一定的分析方法。

2、孔径：孔径在 $0.01\sim0.05\mu m$ ，可截留噬菌体、较大病毒或胶体大颗粒，用于病毒分离。孔径在 $0.1\mu m$ ，可用于试剂的超净、分离沉淀和悬液、也做生物膜模拟用。孔径在 $0.2\mu m$ ，可用于制备高纯水、制剂除菌、细菌计数、空气病毒定量测定。孔径在 $0.45\mu m$ ，可用于水、汽油、电子工业的超净，注射液的无菌检查，饮水的细菌检查等。

3、微孔滤膜种类：再生纤维素膜类具有耐热、耐有机溶剂，不能在水介质中应用的特点。纤维素酯膜类应用最多，它具有耐热压灭菌、亲水性强，孔径均匀等特点。有醋酸纤维素膜、硝酸纤维素膜、混合纤维素膜；聚四氟乙烯膜类具有化学性质稳定，耐强酸、强碱、强氧化剂等特点；聚氯乙烯膜类具有稳定性不及聚四氟乙烯膜，耐较强的酸碱，不耐高温等特点；超细玻璃纤维滤膜类具有化学稳定性好，除氢氟酸和强碱外，耐受各种有机试剂。

4、微孔滤膜的性质与检测

1) 微孔滤膜孔径：需均一，常用平均孔径、公称孔径、最大孔径等指标表示孔径规格，可用气泡压力法、水流量法和细菌过滤法测定。气泡压力法，即将板放入 $3\sim5mm$ 深的水或其它试剂中，密封后引入加压空气，筒中压力增大，当膜面出现第一个气泡，记下压力，进行换算；水流量法，即膜被蒸馏水润湿，装于滤器中，下接抽气瓶，开动真空泵，计算抽滤 $100mL$ 水所需时间；细菌过滤法，即将细菌和蒸馏水混合，用膜过滤，滤液培养，观察培养液是否浑浊，常测 0.45 和 0.22 的膜。

2) 微孔滤膜孔隙率：微孔滤膜空隙总体积与滤膜总体积之比，通过湿重减干重除以膜体积可得。

3) 微孔滤膜厚度：可用螺旋测微器测厚度，常为 $120\sim150\mu m$ 。

4) 微孔滤膜阻力与流速：微孔滤膜厚度小、空隙率高、膜结构特殊，所以过滤阻力小，流速较快。

5) 微孔膜过滤设备：主要有注射剂式滤器、玻璃滤器、平板滤器、筒式滤器等类型。

四、超滤法

超滤是一种加压膜分离技术，即在一定的压力下，使小分子溶质和溶剂穿过一定孔径的特制的薄膜，而使大分子溶质不能透过，留在膜的一边，从而使大分子物质得到了部分的纯化。超滤膜系统是以超滤膜丝为过滤介质，膜两侧的压力差为驱动力的溶液分离装置。超滤膜只允许溶液中的溶剂（如水分子）、无机盐及小分子有机物透过，而将溶液中的悬浮物、胶体、蛋白质和微生物等大分子物质截留，从而达到净化和分离的目的。

1、特点

1) 超滤膜的结构特征：一般为非对称膜，由一层极薄的（ $0.1\sim1\mu\text{m}$ ）具有一定孔径的表皮层和一层较厚的（ $125\mu\text{m}$ 左右）具有海绵状或指状结构的多孔层组成，前者起分离作用，后者起支撑作用。

2) 超滤过程中溶质的截留包括：在膜表面上的机械截留（筛分）、在膜孔中的停留（阻塞）、在膜表面及膜孔内的吸附等三种方式。分子截留值：指阻留率达90%以上的最小被截留物质的分子量。表示了超滤膜所额定的截留溶质的分子量范围。截留分子量的水平多用球型分子物质测得，而截留也与物质的分子形状、化学结合力、溶液条件、膜孔径差异有关，所以相同分子量的溶质截留率不同。

3) 超滤膜种类

“各向同性膜”该膜正反两面结构相同。“各向异性膜”该膜正反两面结构不同，膜质分为两层，即功能层（具有一定孔径的多孔皮肤层，厚度约 $0.1\sim1\mu\text{m}$ ）和海面层（孔径大得多的支持层），皮肤层决定膜的选择通透性，海面层增大其机械强度。“喇叭口滤膜”其孔径为梯形圆台，正面孔径小，反面孔径大，具有较好的抗堵塞性和较高流速。

2、浓差极化

在膜分离过程中，料液中的溶剂在压力驱动下透过膜，溶质被截留，于是在膜与本体溶液界面或临近膜界面区域浓度越来越高。在浓度梯度作用下，溶质由膜面向本体溶液扩散，形成边界层，使流体阻力与局部渗透压增加，从而导致溶剂通量下降。当溶剂向膜面流动（对流）时引起溶质向膜面流动速度与浓度梯度使溶质向本体溶液扩散速度达到平衡

时，在膜面附近存在一个稳定的浓度梯度区，这一区域称为浓差极化边界层，这一现象称为浓差极化。

3、浓差极化的危害

- 1) 使膜表面溶质浓度增高，引起渗透压的增大，从而减小传质驱动力；
- 2) 当膜表面溶质浓度达到其饱和浓度时，便会在膜表面形成沉积层或凝胶层，增加透过阻力；
- 3) 膜表面沉积层或凝胶层的形成会改变膜的分离特性；
- 4) 当有机溶质在膜表面达到一定浓度有可能对膜发生溶胀或恶化膜的性能；
- 5) 严重的浓差极化导致结晶析出，阻塞流道，运行恶化，就是分离效果降低，截留率改变，通量下降。

4、减少浓差极化的方法

由浓差极化形成原理可知，减小浓差极化边界层厚度，提高溶质传质系数，均可减少浓差极化，提高膜的透液速度。方法如下：

- 1) 选择合适的膜组件结构；
- 2) 加入紊流器；
- 3) 料液横切流向设计；
- 4) 料液脉冲流动；
- 5) 螺旋流；
- 6) 提高流速；
- 7) 适当提高进料液温度以降低粘度，增大传质系数

5、超滤器：

- 1) 无搅拌式超滤装置：设备简单，膜使用面积小，浓差极化严重，滤速慢、需压力大，适用于浓缩少量稀溶液。
- 2) 搅拌或震动式超滤装置：加快膜面大分子扩散，保持流速，使用方便。
- 3) 小棒超滤器：棒心为高聚支持物，外包滤膜，用于少量浓度较稀的大分子样液，可同时处理多个样。

4) 浅道系统超滤装置：适于大分子混合物的分级分离，及细菌、病毒、热源的滤除，也用于大分子溶液的浓缩和脱盐。

5) 中空纤维系统超滤器：具有与超滤膜结构类似的中空纤维，每根纤维为一个微型管状超滤膜，滤速很高，适于工业应用。

6、影响超滤流速和选择性的因素

1) 溶质分子的大小、形状、带电性和浓度的影响：一般比重大的纤维状分子扩散性差，且在一定压力下浓缩到一定程度易在膜表面达到极限浓度而形成半固体状的凝胶层，使流速达不到极限水平；比重小的球状分子易扩散，不易形成凝胶层。在一定压力下稀溶液比浓溶液流速高。

2) 超滤膜的性质：膜孔大小、结构、吸附性，在保证分辨率的情况下，孔径大的滤膜利于提高流速；结构中异性膜不易被堵塞；应用膜时尽量选用吸附性小的。

3) 超滤装置和操作条件：增压能增加流速，但当压力增到一定程度，形成凝胶层，流速减慢，加压不起作用。搅拌可以破坏溶质形成的浓度梯度，加速溶质扩散，提高流速，但对一些敏感大分子需注意搅拌速度，防止其失活。升高温度可以降低溶液粘度，减少凝胶的形成增加流速，但易使大分子失活。

五、反渗透法

反渗透是以高分子透过性薄膜为分离介质，在超过溶液渗透压力的情况下，使溶液中的溶剂透过薄膜，同时使溶质和不溶物阻截在膜前。这一过程类似于渗透，但方向相反，即溶剂从高浓度一侧传递到低浓度的一侧，故称反渗透。

反渗透是最精密的膜法液体分离技术，它能阻挡所有溶解性盐及分子量大于 100 的有机物，但允许水分子透过，醋酸纤维素反渗透膜脱盐率一般可大于 95%，反渗透复合膜脱盐率一般大于 98%。它们广泛用于海水及苦咸水淡化，锅炉给水、工业纯水及电子级超纯水制备，饮用纯净水生产，废水处理及各种分离等过程，在离子交换前使用反渗透可大幅度地降低操作费用和废水排放量。

1、反渗透原理

渗透是指稀溶液中的溶剂（水分子）自发地透过半透膜（反渗透膜或纳滤膜）进入浓

溶液（浓水）侧的溶剂（水分子）流动现象。反渗透原理即在进水（浓溶液）侧施加操作压力以克服自然渗透压，当高于自然渗透压的操作压力施加于浓溶液侧时，水分子自然渗透的流动方向就会逆转，进水(浓溶液)中的水分子部分通过膜成为稀溶液侧的净化产水。

2、影响反渗透性能的因素

产水通量和脱除率是反渗透过程中的关键参数，针对特定系统条件，水通量和脱除率是膜的本征特性，而膜系统的水通量和脱除率则主要受压力、温度、回收率、进水含盐量和 pH 值影响。

回收率：指膜系统中给水转化成为产水或透过液的百分率。

脱盐率：通过反渗透膜从系统进水中除去总可溶性的杂质浓度的百分率。

透盐率：脱盐率的相反值，它是进水中溶解性的杂质成份透过膜的百分率。

渗透液：经过膜系统产生的净化产水。

流量：流量是指进入膜元件的进水流率，常以每小时立方米或每分钟加仑表示。

通量：以单位膜面积透过液的流率，通常以每小时每平方米升或每天每平方英尺加仑表示。

稀溶液：净化后的水溶液，为反渗透或纳滤系统的产水。

浓溶液：未透过膜的那部分溶液，如反渗透或纳滤系统的浓缩水。

六、透析法

透析是最早应用的膜分离技术，早期的膜取自动物体内，透析膜有兽类膀胱、羊皮纸、玻璃纸、硝化纤维等，人造的主要为纤维素的衍生物，日常应用的是玻璃纸或醋酸纤维、硝酸纤维。透析用于分离两类分子量差别较大的物质，即 1000 以上和以下分子量的分离，在常压下，利用分子的扩散运动来实现，多用于除去大分子溶液中的小分子物质成为盐脱。其次用来对溶液中小分子进行缓慢改变，即透析平衡，如透析结晶等。

透析膜两侧都为液体，一侧是主成分，为大分子的保留液，另一侧为纯净液，即水或缓冲液。

1、透析膜的特点：

在使用的溶剂介质中能形成具有一定孔径的分子筛样薄膜，允许小分子通过，阻挡大

分子。具有化学惰性。不与溶质溶剂反应，不溶于盐、酸、碱，且不与之反应。具有良好的物理性能，不易破碎，再生良好，可反复使用。放入 4℃的蒸馏水中保存，若长期保存可加入叠氮化钠或氯仿。

2、透析方法和装置

1) 透析方法：将透析袋底部扎紧，倒入透析液，常倒一半以防透析袋涨裂或因袋膨胀而影响透析孔径）扎紧袋口悬于装有大量纯净液的容器中。

2) 透析装置：

旋转透析器：可使膜内外液体都流动，消除膜内外的浓度差，加快透析速度。

平面透析器：用塑料框架将透析管张开再连到旋转的仪器上。

连续透析器：使溶剂连续更新，加大膜内外浓度差，提高效率。

浅流透析器：可兼用于透析和超滤。

第三章 氨基酸类药物

第一节 氨基酸类药物的基本概念

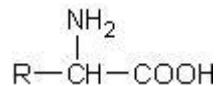
一、氨基酸类药物的基本知识

氨基酸（amino acids）是蛋白质水解的最终产物，是组成蛋白质的基本单位，在 1810 年英国化学家 Wollaston 首次从膀胱结石里分离出来一种物质，当时根据“膀胱”这个词命名为胱氨酸。在 1819 年法国化学家 Braconnot 从加酸、加热的肌肉中分离出一种白色结晶命名为亮氨酸，用同样的方法处理明胶得到一种有甜味的晶体，当时认为是糖后来发现不是糖而是可以用来制氨的含氮化合物，命名为甘氨酸，它是最简单的氨基酸。随后，从各种生物体中发现的氨基酸已有 180 多种，但是参与蛋白质组成的常见氨基酸或称基本氨基酸仍然只有二十种，直到 1986 年发现第 21 种硒代胱氨酸，最近发现第 22 种遗传基因编码的氨基酸是吡咯赖氨酸。

氨基酸是构成生物体蛋白质并同生命活动有关的最基本的物质，是在生物体内构成

蛋白质分子的基本单位，与生物的生命活动有着密切的关系，它在抗体内具有特殊的生理功能，是生物体内不可缺少的营养成分之一。氨基酸是含有氨基和羧基的一类有机化合物的统称，其氨基和羧基一般连在 α -碳上，故组成天然蛋白质的氨基酸大都为 α -氨基酸。它是具有生物功能大分子蛋白质的基本组成单位，是构成动物营养所需蛋白质的基本物质，是含有一个碱性氨基和一个酸性羧基的有机化合物。

构成蛋白质的氨基酸都是一类含有羧基并在与羧基相连的碳原子下连有氨基的有机化合物，目前自然界中尚未发现蛋白质中有氨基和羧基不连在同一个碳原子上的氨基酸。氨基酸的结构中由于 R 不同，所以氨基酸的 α -碳为不对称碳（甘氨酸除外），具有立体异构，其中组成天然蛋白质的氨基酸都为 L-氨基酸。



自 20 世纪 50 年代开始，氨基酸应用范围不断扩大，形成了一个朝气蓬勃的新兴工业体系，被称为氨基酸工业，随着氨基酸生产技术日新月异，其品种和产量也逐年增加。由于氨基酸在医疗上具有特殊的应用价值，其品种已由构成蛋白质的二十几种发展到一百多种氨基酸衍生物，在生化产品制备中占有重要的地位，且其市场需要量也日益增加。

氨基酸在医药上主要用来制备复方氨基酸输液，由多种氨基酸组成的复方制剂在现代静脉营养输液以及“要素饮食”疗法中占有非常重要的地位，对维持危重病人的营养，抢救患者生命起积极作用，成为现代医疗中不可少的药品品种之一。此外氨基酸也用作治疗药物和合成多肽药物。目前用作药物的氨基酸有一百几十种，其中包括构成蛋白质的 20 种氨基酸和非构成蛋白质的 100 多种氨基酸，如精氨酸、对治疗高氨血症、肝机能障碍等疾病颇有效果；天冬氨酸的钾镁盐可用于恢复疲劳；治疗低钾症心脏病、肝病、糖尿病等。半胱氨酸能促进毛发的生长，可用于治疗秃发症；甲酯盐酸盐可用于治疗支气管炎等；组氨酸可扩张血管，降低血压，用于心绞痛，心功能不全等疾病的治疗。

二、氨基酸的分类

- 1、蛋白质氨基酸：主要为参与构成蛋白质的氨基酸。
- 2、非蛋白质氨基酸：它们并不存在于天然蛋白质中所以称为非蛋白质氨基酸。自然界

中还有 150 多种不参与构成蛋白质的氨基酸，它们大多是基本氨基酸的衍生物，也有一些是 D-氨基酸或 β -氨基酸、 γ -氨基酸、 δ -氨基酸，这些氨基酸中有些是物质重要的代谢物前体或中间产物，如瓜氨酸和鸟氨酸是合成精氨酸的中间产物， β -丙氨酸是泛酸、辅酶 A 的前体， γ -氨基丁酸是传递神经冲动的化学介质。

3、根据氨基酸在溶液中带电状况分为酸性氨基酸、中性氨基酸及碱性氨基酸三类。

4、依 R 基团差异分类：脂肪族氨基酸、芳香族氨基酸及杂环氨基酸三类。其中 L-组氨酸、L-色氨酸、L-脯氨酸及 L-羟脯氨酸为杂环氨基酸；L-酪氨酸及 L-苯丙氨酸为芳香族氨基酸；其余均为脂肪族氨基酸。

5、必需氨基酸：必需氨基酸是人体重要的生活物质，因此在评价各种食物中蛋白质成分的营养价值时，人们格外注重其中必需氨基酸的含量。

6、非必需氨基酸：非必需氨基酸的种类较多，包括丙氨酸、精氨酸、天门冬氨酸、胱氨酸、脯氨酸、酪氨酸等。“非必需”并非人体不需要这些氨基酸，而是人体可以通过自身合成或从其他氨基酸转化而来得到它们，不一定必须从食物中摄取。有些非必需氨基酸的摄入量，还可影响必需氨基酸的需要量。例如，当膳食中半胱氨酸和酪氨酸充裕时，可分别节省对蛋氨酸和苯丙氨酸的需要。因此，半胱氨酸和酪氨酸又被称为半必需氨基酸或条件必需氨基酸。

7、初生氨基酸：微生物通过固氮作用、硝酸还原及自外界吸收氨使酮酸氨基化成相应的氨基酸，或微生物通过转氨酶作用，将一种氨基酸的氨基转移到另一种酮酸上，生成的新氨基酸也称为初生氨基酸。主要有甘氨酸、丙氨酸、天门冬氨酸等。

8、次生氨基酸：在微生物作用下，以初生氨基酸为前体转化成的其它氨基酸。如天门冬氨酸为赖氨酸、蛋氨酸、苏氨酸的前体。

三、氨基酸的理化性质

1、物理通性

1) 都是无色结晶：天然氨基酸纯品均为白色结晶性粉末，熔点约在 230℃以上，大多没有固定的熔点，熔融时分解并放出 CO₂；在有机溶剂中溶解度一般较小，都能溶于强酸和强碱溶液中，除胱氨酸、酪氨酸外，均溶于水；除脯氨酸和羟脯氨酸外，均难溶于乙醇。

和乙醚。无色晶体，在水中的溶解度各不同，取决于侧链。氨基酸能使水的介电常数增高。氨基酸的晶体是离子晶体，氨基酸是离子化合物。

2) 有酸、碱性：含二元氨基一元羧酸的氨基酸为碱性，例如赖氨酸；酸性氨基酸为一元氨基二元羧酸，例如谷氨酸；中性氨基酸为一元氨基一元羧酸，例如丙氨酸。大多数氨基酸都呈显不同程度的酸性或碱性，呈显中性的较少，所以既能与酸结合成盐，也能与碱结合成盐。

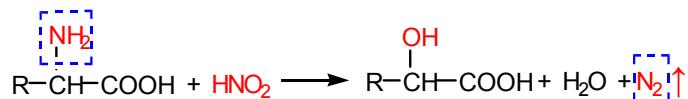
3) 由于有不对称的碳原子，呈旋光性、紫外吸收。同时由于空间的排列位置不同，又有两种构型：D型和L型，组成蛋白质的氨基酸，都属L型。20种氨基酸，除甘氨酸外，其它氨基酸的 α -碳原子均为不对称碳原子，可以有立体异构、有旋光性。氨基酸的构型也是与甘油醛构型比较而确定的，从蛋白质酶促水解得到的 α -氨基酸，都属于L型，但在生物体中(如细菌)也含有D型氨基酸。

4) 紫外吸收：构成蛋白质的20种氨基酸在可见光区都没有光吸收，但在远紫外区($<220\text{nm}$)均有光吸收。在近紫外区(220-300nm)只有酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸有吸收光的能力。可以通过测定280nm处的紫外吸收值的方法对蛋白溶液进行定量。苯丙氨酸的 $\lambda_{\text{max}}=257\text{nm}$ ；酪氨酸的 $\lambda_{\text{max}}=275\text{nm}$ ；色氨酸的 $\lambda_{\text{max}}=280\text{nm}$ 。

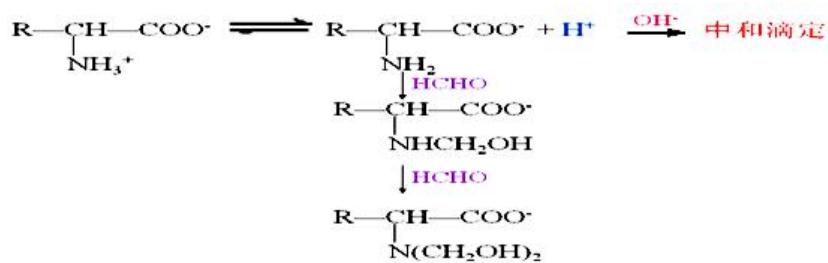
5) 氨基酸是两性电解质：同一分子上带有能释放质子的正离子基团和能接受质子的负离子基团。两性离子本身既是酸又是碱。因此它既可以和酸反应，也可以和碱反应。氨基酸在水溶液中或在晶体状态时，都以两性离子形式存在。

2、化学通性：

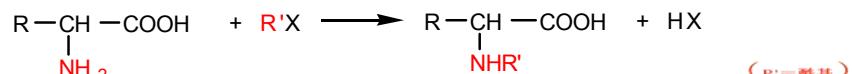
1) 与亚硝酸的反应：范斯来克法定量测定氨基酸的基本反应。



2) 与甲醛的反应：氨基酸的甲醛滴定法



3) 酰基化反应：

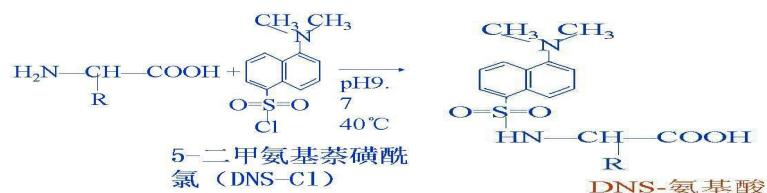


X = 卤素 (Cl、F)

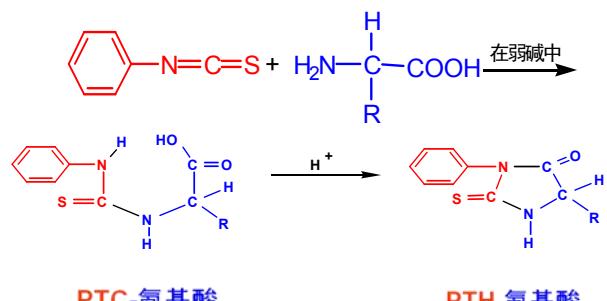
4) 与 2, 4-二硝基氟苯(DNFB, Sanger 试剂)的反应



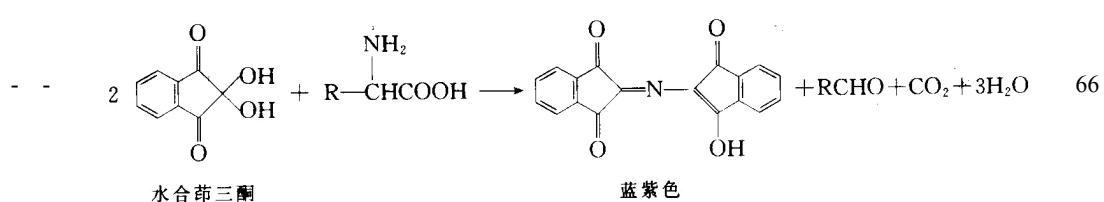
5) 与丹磺酰氯的反应



6) 与异硫氰酸苯酯 (PTC, Edman 试剂) 的反应



7) α -氨基的肽与茚三酮反应



8) 特殊基团反应:

A 酪氨酸的酚羟基可产生米伦反应: 蛋白质溶液中加入米伦试剂(亚硝酸汞、硝酸汞及硝酸的混合液), 蛋白质首先沉淀, 加热则变为红色沉淀, 此反应为酪氨酸的酚羟基所特有的反应, 因此含有酪氨酸的蛋白质均呈米伦反应。

B 精氨酸的胍基产生坂口反应: 精氨酸与 α -萘酚在碱性次溴酸钠(或次溴酸钾)中发生反应, 得到如红色产物。

C 色氨酸的吲哚基与芳醛产生红色的反应。

D 组氨酸的咪唑基产生 Pauly 反应, 即和重氮苯磺酸反应产生红色。

E 苯丙氨酸硝化后于碱性条件下产生桔黄色反应。

F 胱氨酸及半胱氨酸经酸或碱破坏后可与醋酸铅产生铅黑反应。

G 半胱氨酸在碱性条件下与亚硝基铁氰化钠反应生成紫红色化合物。

四、氨基酸及其衍生物在医药中的应用

1、氨基酸是构成蛋白质的基本组成单位, 故生物体中众多蛋白质的生物功能, 无不与构成蛋白质的氨基酸种类、数量、排列顺序及由其形成的空间构象有密切的关系。因此氨基酸对维持机体蛋白质的动态平衡有极其重要的意义。生命活动中人及动物通过消化道吸收氨基酸, 通过体内转化而维持其动态平衡, 若其动态平衡失调, 则机体代谢紊乱, 甚至引起病变。

2、许多氨基酸尚有其特定的药理效应。

1) 氨基酸的营养价值: 氨基酸为构成天然蛋白质的基本单位, 故蛋白质营养价值实际是氨基酸作用的反映。健康人靠膳食中的蛋白质获取各种氨基酸满足机体需求。缺乏蛋白质则影响机体生长及正常生理功能, 抗病力减弱而引起病变。消化道功能严重障碍者及手术后病人常因禁食无法获得足够的蛋白质, 自身蛋白质过量消耗, 致使营养不良而导致病情恶化或预后不良, 临幊上常通过直接输入氨基酸制剂改善患者营养状况, 增加治疗机会, 促进康复。

赖氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、苏氨酸、亮氨酸、异亮氨酸及缬氨酸等 8 种氨基酸, 一般饲料中缺乏赖氨酸和蛋氨酸, 如适量添加这两种氨基酸可提高饲料的营养价值,

促进鸡多产蛋与猪的生长。

2) 治疗消化道疾病的氨基酸及其衍生物

这类氨基酸及其衍生物主要有谷氨酸及其盐酸盐、谷氨酰胺、乙酰谷氨酰胺铝、甘氨酸及其铝盐、硫酸甘氨酸、维生素 U、组氨酸盐酸盐等。其中谷氨酸、谷氨酰胺、乙酰谷氨酰胺铝、维生素 U、组氨酸盐酸盐主要通过保护消化道粘膜或促进粘膜增生达到防治胃及十二指肠溃疡的作用。谷氨酸盐酸盐、甘氨酸铝盐主要通过调节胃液酸碱度来实现治疗，谷氨酸盐酸盐可提供盐酸促进胃液分泌，用于治疗胃液缺乏症、消化不良及食欲不振。甘氨酸铝盐可用于中和过多胃酸保护粘膜，用于胃酸过多症。

3) 治疗肝病的氨基酸及其衍生物

主要有精氨酸盐酸盐、磷葡精氨酸、鸟氨酸、谷氨酸钠、蛋氨酸、乙酰蛋氨酸、瓜氨酸、赖氨酸盐酸盐及天冬氨酸等。其中精氨酸、鸟氨酸、瓜氨酸是机体尿素循环中间体或重要成分，可加速肝脏解氨毒，用于外伤、灼伤、及肝功能不全所导致的高血氨症。谷氨酸可激活三羧酸循环，促进血氨下降，在 ATP 参与下，氨与谷氨酸结合为谷氨酰胺，是脑组织解氨毒的重要途径，用于治疗肝性昏迷及肝性脑病等高血氨症。蛋氨酸、乙酰蛋氨酸是体内胆碱合成的甲基提供者，促进磷脂酰胆碱合成，临幊上用于治疗慢性肝炎、肝硬化、脂肪肝等天冬氨酸有助于鸟氨酸循环，促进氨和二氧化碳形成尿素，降低血氨和二氧化碳，增强肝功能，消除疲劳，临幊上用于治疗慢性肝炎、肝硬化、高血氨症。

4) 治疗脑及神经系统疾病的氨基酸及其衍生物

主要有谷氨酸钙盐及镁盐、氢溴酸谷氨酸钠、 γ -酪氨酸、色氨酸、5-羟色氨酸、酪氨酸亚硫酸盐及左旋多巴等。谷氨酸钙盐及镁盐有维持神经肌肉正常兴奋作用，用于治疗神经衰弱及其功能症、脑外伤、脑机能衰竭及癫痫小发作。 γ -酪氨酸是中枢神经突触的抑制性递质，能激活脑内葡萄糖代谢，促进乙酰胆碱合成，恢复脑细胞功能，并有中枢性降血压作用，用于记忆障碍、语言障碍、脑外伤后遗症、癫痫等。色氨酸用于治疗神经分裂、酒精中毒，改善抑郁症，防治糙皮病。5-羟色氨酸治疗内因性抑郁症、失眠、偏头痛。左旋多巴在体内可转为多巴胺用于治疗内因性抑郁症、失眠及偏头痛

5) 用于肿瘤治疗的氨基酸及其衍生物

有偶氮丝氨酸、氯苯丙氨酸及磷乙天冬氨酸等。偶氮丝氨酸是谷氨酰胺的代谢物，用于治疗急性白血病及柯杰金氏病。氯苯丙氨酸为 5-羟色胺的生物合成抑制剂，有止泻及降温作用，用于治疗癌瘤综合症，减轻症状。以氨基酸作为载体的抗肿瘤药物，如苯丙氨酸芥子气，L-缬氨酸、L-谷氨酸、L-赖氨酸与苯二胺氮芥共结合物。利用氨基酸衍生物作为肿瘤细胞所需氨基酸的结构类似物达到抗肿瘤的目的，如 S-氨基-L-半胱氨酸。氨基酸衍生物作为酶抑制剂的抗肿瘤药物。如 N-磷酸乙酰-L-天门冬氨酸是一个天门冬氨酸转氨甲酚基酶的过渡状况抑制剂，利用这个抑制剂可中断嘧啶核苷酸的合成途径达到抗肿瘤目的。使癌细胞逆转的氨基酸衍生物。现已发现偶氮丝氨酸、E-羟基甘氨酸、N-甲基酪氨酸、N-氮乙基氨基-L-苯丙氨酸等抗肿瘤活性大于自力霉素。

6) 氨基酸衍生物还可作为抗生素和抗菌增效剂

如用长链脂肪酸酰化而成的 N-酰化氨基酸、由高级醇经酯化而成的氨基酸酯、用低级醇把 N-酰化氨基酸酯化成的 N-酰基氨基酸酯，对革兰氏阳性和革兰氏阴性菌有广谱的抗菌活性，对霉菌也有作用，广泛用作活性剂和防腐剂。再如青霉素 G 和溶菌酶中加入氨基酸衍生物，特别是加入氨基酸酯，则青霉素 G 和溶菌酶表现出强烈的抗菌力和溶菌力。

7) 其它氨基酸类药物的临床应用

胱氨酸及半胱氨酸有抗辐射作用，并能促进造血机能，增加白细胞数目，促进皮肤损伤的修复。乙酰半胱氨酸为呼吸道粘液溶解剂，适用于由粘痰阻塞而引起的呼吸困难及多种呼吸疾病而引起的咳痰困难，可促进排痰。

第二节 氨基酸类药物的生产方法

目前全世界天然氨基酸的年总产量在百万吨左右，其中产量较大者有谷氨酸、蛋氨酸及赖氨酸，其次为天门冬氨酸、苯丙氨酸及胱氨酸等。它们主要用于医药、食品、饲料及化工行业中。目前构成天然蛋白质的 20 种氨基酸的生产方法有天然蛋白质水解法、发酵法、酶转化法及化学合成法等四种方法。氨基酸的工业化生产有微生物发酵法、化学合成法和酶法。

一、水解法制备氨基酸

(一) 基本原理与过程

以毛发、血粉及废蚕丝等蛋白质为原料，通过酸、碱或酶水解成多种氨基酸混合物，经分离纯化获得各种药用氨基酸的方法称为水解法。目前用水解法生产的氨基酸有 L-胱氨酸、L-精氨酸、L-亮氨酸、L-异亮氨酸、L-组氨酸、L-脯氨酸及 L-丝氨酸等。水解法生产氨基酸的主要过程为水解、分离和结晶精制三个步骤。

1、蛋白质水解方法：目前蛋白质水解法分为酸水解法、碱水解法及酶水解法三种。

1) 酸水解法 蛋白质原料用 6~10mol / L 盐酸或 8mol / L 硫酸于 110~120℃ (回流煮沸) 水解 12~24h，除酸后即得多种氨基酸混合物。此法优点是水解迅速而彻底，产物全部为 L-型氨基酸，无消旋作用。缺点是色氨酸全部被破坏，丝氨酸及酪氨酸部分被破坏，且产生大量废酸污染环境。

2) 碱水解法 蛋白质原料经 6mol / L 氢氧化钠或 4mol / L 氢氧化钡于 100℃ 水解 6h 即得多种氨基酸混合物。该法水解迅速而彻底，且色氨酸不被破坏，但含羟基或巯基的氨基酸全部被破坏，且产生消旋作用。工业上多不采用此法。

3) 酶水解法 蛋白质原料在一定 pH 和温度条件下经蛋白水解酶作用分解成氨基酸和小肽的过程称为酶水解法。此法优点为反应条件温和，无需特殊设备，氨基酸不被破坏，无消旋作用。缺点是水解不彻底，产物中除氨基酸外，尚含较多肽类。工业上很少用该法生产氨基酸而主要用于生产水解蛋白及蛋白胨。

2、氨基酸分离方法：氨基酸分离方法较多，通常有溶解度法、等电点沉淀法、特殊试剂沉淀法、吸附法及离子交换法等。

1) 溶解度法：是依据不同氨基酸在水中或其它溶剂中的溶解度差异而进行分离的方法。胱氨酸和酪氨酸均难溶于水，但在热水中酪氨酸溶解度较大，而胱氨酸溶解度变化不大，故可将混合物中胱氨酸、酪氨酸及其它氨基酸彼此分开。

2) 特殊试剂沉淀法：系采用某些有机或无机试剂与相应氨基酸形成不溶性衍生物的分离方法。如邻二甲苯-4-磺酸能与亮氨酸形成不溶性盐沉淀，后者与氨水反应又可获得游离亮氨酸；组氨酸可与 HgCl₂ 形成不溶性汞盐沉淀，后者经处理后又可获得游离组氨酸；

精氨酸可与苯甲醛生成水不溶性苯亚甲基精氨酸沉淀，后者用盐酸除去苯甲醛即可得精氨酸。

3) 吸附法：是利用吸附剂对不同氨基酸吸附力的差异进行分离的方法。如颗粒活性炭对苯丙氨酸、酪氨酸及色氨酸的吸附力大于对其它非芳香族氨基酸的吸附力，故可从氨基酸混合液中将上述氨基酸分离出来。

4) 离子交换法：是利用离子交换剂对不同氨基酸吸附能力的差异进行分离的方法。氨基酸为两性电解质，在特定条件下，不同氨基酸的带电性质及解离状态不同，故同一种离子交换剂对不同氨基酸的吸附力不同。

5) 等电点沉淀法：是利用不同氨基酸有不同等电点，在等电点时，氨基酸分子的净电荷为零，氨基酸溶解度最小，氨基酸分子彼此吸引成大分子沉淀下来。

3、氨基酸的精制方法

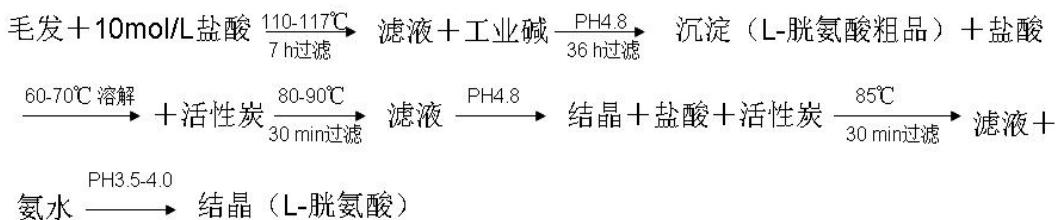
分离出的特定氨基酸中常含有少量其它杂质，需进行精制，常用的方法有结晶和重结晶技术，也可采用溶解度法或结晶与溶解度法相结合的技术。丙氨酸在稀乙醇或甲醇中溶解度较小，且 pI 为 6.0，故丙氨酸可在 pH6.0 时，用 50% 冷乙醇结晶或重结晶加以精制。

溶解度与结晶技术相结合的方法精制氨基酸。如在沸水中苯丙氨酸溶解度大于酪氨酸 100 倍，若将含少量酪氨酸的苯丙氨酸粗品溶于 15 倍体积 (w / v) 的热水中，调 pH4.0 左右，经脱色过滤可除去大部分酪氨酸；滤液浓缩至原体积的 1 / 3，加 2 倍体积 (v / v) 的 95% 乙醇，4℃ 放置，结晶。

(二) L-胱氨酸制备

1) L-胱氨酸理化性质：在稀酸中形成六角形或六角柱形晶体，分解点 258~261℃， pI 为 5.05， (α) 25D 为 -232℃。在 25℃ 水中溶解度为 0.011，在 75℃ 水中为 0.052。溶于无机酸及无机碱，在热碱液中可被分解。不溶于水、乙醇、乙醚及丙酮。可被还原为 L-半胱氨酸。由两个半胱氨酸通过二硫键连接而成。

2) 工艺路线



3) 作用与用途: L-胱氨酸具有增强造血机能、升高白细胞数目、促进皮肤损伤的修复及抗辐射作用。临幊上用于治疗辐射损伤、重金属中毒、慢性肝炎、牛皮癣及病后或产后继发性脱发。毛发中含有角蛋白, 此蛋白由各种氨基酸组成, 可被水解制备

4) 工艺过程

①水解 10mol/l HCL 加入反应罐中, 加热到 70-80℃, 加入毛发, 加热到 110~117℃水解 7h (自 100℃时计) 后出料, 玻璃布过滤, 收集滤液。

②中和 加入工业碱直至 pH4.8-5.05, 静置 36h, 涤纶布滤取沉淀, 离心甩干得 L-胱氨酸粗品。

③粗制 将粗品加入 10mol/l HCL 和水, 升温至 65~70℃, 搅拌 30min, 加活性炭 4-5% (量过大损失目的物, 过小杂质吸附不完全), 于 80~90℃保温 30min, 滤除活性炭。调滤液至 pH4.8, 静置结晶, 吸出上清液后, 底部沉淀经离心甩干得胱氨酸粗品 (II)。

④精制 中和取粗品加 1mol/l HCL 升温至 70℃, 加活性炭 3-5%, 85℃搅拌半小时, 过滤, 加 1.5 倍体积蒸馏水, 升温至 75~80℃, 搅拌下用 12% 氨水(化学纯)中和至 pH3.5~4.0, 析出结晶, 滤取胱氨酸结晶, 蒸馏水洗至无氯离子, 真空干燥得 L-胱氨酸成品。

(5) 检验 应为六角形或六角柱形白色结晶, 含量在 98.5% 以上, 干燥失重小于 0.5%, 炽灼残渣小于 0.2%, 氯化物小于 0.15%, 铁盐小于 0.001%, 重金属小于 20ppm。

二、发酵法制备氨基酸

(一) 基本原理与过程

构成动物、植物及微生物体所有蛋白质的氨基酸种类与构型均无任何差异, 但植物体内所有氨基酸皆由 CO₂、氨和水合成, 动物体除 8 种必需氨基酸需从外界摄取外, 其余非必需氨基酸均可通过体内氨基酸之间的转化或碳水化合物中间代谢物而合成, 而微生物利用碳源、氮源及盐类几乎可合成所有氨基酸。

目前绝大部分氨基酸皆可通过发酵法生产，其缺点是产物浓度低，设备投资大，工艺管理要求严格，生产周期长，成本高。

1、发酵的基本原理

生物化学中称酵母无氧呼吸过程为发酵，反应过程中电子供体与受体皆为有机物，有时电子受体为电子供体的分解产物，氧化作用不完全，最终形成还原性产物。工业上，发酵实质上是利用微生物细胞中酶的作用，将培养基中有机物转化为细胞或其它有机物的过程。发酵法中氨基酸的碳链主要来自糖代谢中间产物，大多数氨基酸均可通过以初生氨基酸为原料的微生物转化作用而产生。

2、发酵法的基本过程

1) 发酵法生产氨基酸的基本过程包括：a 培养基配制与灭菌处理，b 菌种诱变与选育，c 菌种培养，d 原料灭菌及接种发酵，e 产品提取及分离纯化等步骤。

工业中发酵法的碳源主要来自淀粉水解糖、糖蜜、甘薯粉等，氮源来自硫酸铵、尿素、豆饼水解液等。菌主为细菌其次为酵母，现代生物工程采用细胞融合技术及基因重组技术改造微生物细胞，已获得多种高产氨基酸杂种菌株及基因工程菌。如用北京棒状杆菌和钝齿棒状杆菌原生质体融合形成的杂种，其中 70% 杂种细胞产生两亲菌株所产生的氨基酸。

氨基酸发酵方式主要是液体通风深层培养法，其过程是由菌种试管培养逐级放大直至数吨至数百吨发酵罐。发酵结束，除去菌体，清液用于提取、分离纯化和精制有关氨基酸，其分离纯化、精制方法及过程与水解法相同。

（二）发酵法生产的氨基酸品种及工艺

本文仅以 L-异亮氨酸及 L-赖氨酸直接发酵法为例，说明发酵法的基本过程。

1、L-异亮氨酸（L-Isoleucine, L-Ile）的制备

1) L-异亮氨酸的结构与性质：L-Ile 存在于所有蛋白质中，为人体必需氨基酸之一，分子式为 C₆H₁₃NO₂，分子量为 131.17。L-Ile 在乙醇中形成菱形叶片状或片状晶体，分解点为 285~286°C，L-Ile 溶于热醋酸，在 20°C 乙醇中溶解度为 0.072，在 25°C 水中为 4.12，在 75°C 水中为 6.08，不溶于乙醚。

2) 工艺路线

培养液在 118-120℃灭菌 30 分钟，接菌，在 30 度下培养 60 小时得发酵液，过滤，上层液加草酸、硫酸酸化，过滤，滤液用阳离子交换树脂分离洗脱，洗脱液减压浓缩除氨气，加活性炭，过滤，滤液减压浓缩，加氨水沉淀，水洗重结晶既得。

3) 工艺过程

① 菌种培养

培养基组成：葡萄糖、尿素、玉米浆、豆饼水解液，调 PH6.5
接菌，接种一环牛肉膏斜面 AS1.998 菌种，培养 16 小时或接种 3.5%，培养 8 小时，逐级放大培养得足够菌种。

② 灭菌、发酵

发酵培养液组成：硫酸铵、豆饼水解液、玉米浆、碳酸钙、淀粉水解还原初糖浓度 11.5、pH7.2，在发酵罐中加培养液，在 118~120℃ 1.1×10^5 Pa 下灭菌 30 分钟，通冰盐水冷却至 25℃，接菌发酵 24~50 小时，并不断补充尿素和氨水

③ 除菌体、酸化

发酵结束后，发酵液加热至 100℃并维持 10min，冷却过滤，滤液加工业硫酸和草酸至 pH3.5，过滤除沉淀。

④ 离子交换、吸附分离

上述滤液每分钟以树脂量 1.5% 的流速进 H +型 732 离子交换柱 ($\Phi 40 \times 100$ cm)，以 100L 去离子水洗柱，再以 60℃、0.5mol / L 氨水按 3L/min 的流速进行洗脱，分别收集洗脱液。

⑤ 浓缩赶氨

合并 pH3~12 的洗脱液，70~80℃减压蒸馏、浓缩至粘稠状，加去离子水至原体积的 1 / 4，再浓缩至粘稠状。如此重复三次。

⑥ 脱色、浓缩、中和

上述浓缩物加去离子水至原体积的 1 / 4，搅拌均匀，加 2mol / L 盐酸调 pH3.5，加上 1% (w / v) 活性炭，70℃搅拌脱色 1h。滤除活性炭，滤液减压浓缩至适当体积，用 2mol / L 氨水调 pH6.0，5℃沉淀过夜，过滤抽，105℃烘干即得：L-异亮氨酸半成品。

⑦精制、烘干

每 10kg L-异亮氨酸半成品加 8L 浓盐酸和 20L 去离子水，加热至 80℃，搅拌溶解，加 10kg 氯化钠至饱和，加工业液碱调 pH10.5，过滤，滤液用碱调 pH 1.5，5℃放置过夜。滤取沉淀，用 80L，去离子水加热至 80℃搅拌溶解，加适量氯化钠和 1% (w / v) 活性炭，70℃搅拌脱色 1h 过滤，滤液减压浓缩至适当浓度，用氨水调 pH6.0，5℃放置结晶过夜。次日过滤收集结晶，抽干，于 105℃烘房中烘干得 L-异亮氨酸成品。

4) 检验

应为菱形叶片状或片状晶体，含量应为 98.5%~101.5%，干燥失重不超过 0.3%，炽灼残渣不大于 0.3% 氯化物不超过 0.05%，硫酸盐不超过 0.03%，铁盐不超过 0.003%，重金属不超过 0.0015%，砷盐不超过 1.5ppm。

5) 作用与用途： L-Ile 为必需氨基酸，是复方氨基酸输液的重要成份之一。

三、酶转化法制备氨基酸

(一) 基本原理及过程

酶转化法亦称为酶工程技术，实际上是在特定酶的作用下使某些化合物转化成相应氨基酸的技术。酶工程法与直接发酵法生产氨基酸的反应本质相同，皆属酶转化反应，但前者为单酶或多酶的高密度转化，而后者为多酶低密度转化。酶工程技术工艺简单，产物浓度高，转化率及生产效率较高，副产物少。固定化酶或细胞可进行连续操作，节省能源和劳务，并可长期反复使用。

(二) 酶转化法生产的氨基酸品种及工艺

目前医药工业中，用酶工程法生产的氨基酸已有十多种。DL-蛋氨酸、DL-缬氨酸、DL-苯丙氨酸、DL-色氨酸、DL-丙氨酸及 DL-苏氨酸等分别经氨基酰化酶拆分获得了相应的 L-氨基酸，并已投入了工业化生产。

固定化酶：凡限制在一定的空间范围内并能连续反复使用的酶都称为固定化酶。

通常采用的固定化方法可大体概括为四种类型：吸附法、共价偶联法、交联法和包埋法。

吸附法：这是通过载体表面和酶分子表面间的次级键相互作用而达到固定目的物的方法。

法，又可分为物理吸附和离子交换吸附。物理吸附是通过氢键、疏水键和 π —电子亲和力等物理作用力将酶固定于不溶性载体的方法。离子交换吸附是利用静电引力吸附为作用力将酶固定于不溶性载体的方法。常用的载体有：皂土、硅胶、氧化铝、磷酸钙胶和微孔玻璃等无机吸附剂，纤维素、胶原、塞洛芬以及火棉胶等有机吸附剂。最常用的交换剂有CM（羧甲基）—纤维素、DEAE（二乙基氨基乙基）—纤维素、DEAE—葡聚糖凝胶等。

离子交换剂的吸附容量一般大于物理吸附剂，约 50~150mg 蛋白 / g 载体。

共价偶联法：这是借助共价键将酶的活性非必需侧链基团和载体的功能基团进行偶联以制备固定化酶的方法。常用的载体有：纤维素、葡聚糖凝胶、琼脂糖、聚丙烯酰胺、多聚氨基酸、乙烯与顺丁烯二酸酐共聚物、聚苯乙烯、尼龙等；还有无机载体如多孔玻璃等。

交联法：利用双功能或多功能试剂在酶分子间或酶分子与惰性蛋白间、或酶分子与载体间进行交联反应以共价键制备固定化酶。

包埋法：将聚合物的单体和酶溶液混合后，再借助聚合促进剂（包括交联剂）的作用进行聚合，将酶包埋于聚合物中以达到固定化的目的。胶格包埋最常用的包埋剂是聚丙烯酰胺凝胶，它以丙烯酰胺为单体、N, N-亚甲基双丙烯酰胺为交联剂聚合而成。微囊型包埋是用直径几十到几百微米、厚约 25nm 的半透膜将酶分子进行包埋固定化的方法。脂质体包埋脂质体是指具有脂双层结构和一定包裹空间的微球体。

辅酶及偶联酶的固定化：辅酶物质的固定化一般采用载体共价偶联法。

（三）L-天冬氨酸及 L-丙氨酸的制备

1) L-天冬氨酸及 L-丙氨酸的结构与性质：L一天冬氨酸（L-Aspartic acid, Asp）的结构与性质 L-Asp 存在于所有蛋白质分子中，含两个羧基和一个氨基，为酸性氨基酸，分子式为 C₄H₇NO₄，分子量为 133.10。其纯品为白色棱形叶片状结晶，pI 为 2.77，熔点为 269-271°C，溶于水及盐酸，不溶于乙醇、乙醚，25°C时溶解度为 0.8，75°C时溶解度为 2.88，在碱中为左旋，在酸中为右旋。

L-丙氨酸（L-Alp）为中性氨基酸分子式是为 C₃H₇NO₂，在水和乙醇中形成棱形结晶，等电点为 6，分解温度为 297°C，25°C时水中溶解度为 16.65，75°C时溶解度为 28.5，不溶于丙酮、乙醚。

2) 工艺路线:

延胡索酸+NH₃+固定化天冬氨酸酶---转化液---分离得 L-Asp 粗品和分离液,

分离液+固定化 L-Asp-B-脱羧酶----转化液—浓缩结晶的粗品—精制

3) 工艺过程

①菌种培养

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) AS1.881 的培养 斜面培养基为普通肉汁培养基;

摇瓶培养基成分 (%) 为玉米浆, 反丁烯二酸, MgSO₄·7H₂O, 氨水调 pH6.0, 煮沸后过滤, 500ml 三角烧瓶中培养基装量 50~100ml。

从新鲜斜面上或液体中培养种子, 接种于摇瓶培养基中, 37℃振摇培养 24h, 逐级扩大培养至 1000~2000L 规模。培养结束后用 1mol / L HCl 调 pH5.0, 升温至 45℃并保温 1h, 冷却至室温, 转筒式高速离心机收集菌体 (含天冬氨酸酶), 备用。

德阿昆哈假单胞菌 (*Pseudomonas dacunhae*) 68 变异株的培养

斜面培养基组成 (%) 为蛋白胨, 牛肉膏, 酵母膏, NaCl, 调 pH7.0, 再加琼脂。种子培养基与斜面培养基相同, 唯独不加琼脂, 250ml 三角烧瓶中培养基装量为 40ml。摇瓶培养基组成 (%) 为 L-谷氨酸, 蛋白胨, 酪蛋白水解液, 磷酸二氯钾, MgSO₄·7H₂O, 用氨水调 pH 7.2, 500ml 三角瓶中培养基装量为 80ml。

②细胞固定

E. coli 的细胞固定: 取湿菌种悬浮于 80L 生理盐水中, 在 40℃下加入明胶溶液和戊二醛溶液, 搅拌, 放冷凝固, 5℃过夜, 切成 3-5mm 小块, 浸入戊二醛 5℃过夜, 蒸馏水洗涤滤干, 得含天冬氨酸酶的固定化 *E. coli* 备用

假单胞菌体固定: 取湿菌加生理盐水至 40L, 另取生理盐水 5% 角叉菜胶溶液 85L, 将两液在 45℃下混合, 冷却 5℃成胶, 浸于氯化钾和己二胺的磷酸缓冲液中搅拌 10 分钟, 加戊二醛, 5℃, 搅拌 30min, 取出切块, 用氯化钾洗涤既得 L--天冬氨酸-B-脱羧酶的固定化细胞

③生物反应堆的制备

将含天冬氨酸酶的固定化 *E. coli* 装填于填充床式反应器中制成生物反应堆 I 备用。

将 L-天冬氨酸-B-脱羧酶的固定化假单细胞菌装于耐压填充床反应器中制生物反应堆 II

④转化反应

将保温至 37℃ 的 1mol / L 延胡索酸铵（含 1mmol / L MgCl₂, pH8.5）底物溶液按一定空间速度（Sv）连续流过生物反应堆 I，控制达到最大转化率（>95%）为限度，收集转化液制备 L-Asp 或用于生物反应堆 II 的再转化。

当需要生产 L-丙氨酸时，向上述转化液中加磷酸吡哆醛至 0.1mmol / L 浓度，调 pH6.0，保温至 37℃，按一定空间速度流入 1.515×10⁵Pa 压力下的生物反应堆 II，控制达到最大转化率（>95%）为限，收集转化液，用于制取 L-丙氨酸。

⑤产品纯化与精制

生物反应堆 I 转化液经过滤，加 1mol/l 盐酸调 pH2.8，结晶过夜得粗品，粗品加氨水和活性炭 70℃度脱色 1 小时，过滤，5℃下结晶

生物反应堆 II 转化液经过滤，在 60~70℃下浓缩至一半，加同体积甲醇，5℃下过夜结晶得粗品，粗品加 5 倍去离子水，加活性炭 70℃下脱色 1h，过滤，加等体积甲醛，结晶。

⑥检查：

L-Asp 为棱形结晶，含量在 98.5%-101.5%，干燥失重不超过 0.2%，炽灼残渣不大于 0.1%，氯化物不超过 0.02%，铵盐不超过 0.02%，铁盐不超过 10ppm，重金属不超过 10ppm，砷盐不超过 1ppm。

L-Alp 为棱形结晶，含量在 98.5%-101.5%，干燥失重不超过 0.2%，炽灼残渣不大于 0.15%，氯化物不超过 0.05%，硫酸盐不超过 0.03%，铁盐不超过 0.003%，重金属不超过 0.0015%，砷盐不超过 1.5ppm。

⑦作用：L-Asp 有助于鸟氨酸循环，促进 CO₂生成尿素，降低血中氨和 CO₂，增强肝功能，消除疲劳。治疗慢性肝炎、肝硬化及高血氨症，同时 L-Asp 与 L-Alp 为复合氨基酸输液原料

四、化学合成法制备氨基酸

(一) 基本原理与过程

以 α -卤代羧酸、醛类、甘氨酸衍生物、异氰酸盐、乙酰氨基丙二酸二乙酯、卤代烃、 α -酮酸及某些氨基酸为原料，经氨解、水解、缩合、取代及氢化还原等化学反应合成 α -氨基酸的方法称为化学合成法。

分类：一般合成法和不对称合成法两大类。一般合成法包括卤代酸水解法、氰胺水解法、乙酰氨基丙二酸二乙酯法、异氰酸酯（盐）合成法及醛缩合法等，产物皆为 DL-型氨基酸混合物。不对称合成法包括直接合成、 α -酮酸反应及不对称催化加氢等方法，产物为 L-型氨基酸。

（二）化学合成法生产的氨基酸品种及工艺

理论上所有氨基酸皆可由化学合成法制造，但在目前，只有当采用其它方法生产很不经济时才采用化学合成法生产，如甘氨酸、DL-蛋氨酸及 DL-丙氨酸等。现仅介绍 L-脯氨酸化学合成及其分离纯化工艺。

1) 性质：存在于所有蛋白中，鸡毛中含量最高，分子式 $C_5H_9NO_2$ ，PI 为 6.3，熔点为 220-222°C，极易溶于水，不溶于乙醇及乙醚。

2) 工艺路线

L-谷氨酸+乙醇+硫酸+三乙胺 0°C (酯-----L-谷氨酸-r-乙酯+还原剂---L-脯氨酸反应液+五氯酚得沉淀---过滤沉淀+氨水过滤----得滤液加活性炭----过滤滤液加乙醚得固体

3) 工艺过程

①L-谷氨酸的酯化：

无水乙醇加 L-谷氨酸放入反应罐冷却至 0°C，加浓硫酸搅拌反应 1 小时，升温至 25°C 搅拌反应一小时，加三乙胺调 pH 8.0-8.5，搅拌 1 小时，产生白色沉淀，降温至 5°C 乙醇洗涤得 L-谷氨酸-r-乙酯。

②L-谷氨酸-r-乙酯还原

L-谷氨酸-r-乙酯加水在 5°C 下分次加入 KBH_4 (硼氢化钾) 4.3kg 升温至 20°C 搅拌 1 小时，升温至 50°C 反应 3-4 小时，冷至 0°C 盐酸调 pH 至 4，过滤的粗品溶液。

③沉淀

粗品溶液升温至 50°C 加五氯酚乙醇液，反应 5 小时，冷至 0°C 过滤得复盐沉淀。

④解析与精制

将②中滤液加氨水搅拌 7~8 小时，降温至 0℃过滤，滤液浓缩近干加去离子水溶解，过滤，滤液加活性炭 70℃下反应 1h，过滤，滤液冷却 0℃加等体积乙醚萃取，水层减压浓缩至干，沉淀加无水乙醇和乙醚，冷至 0℃滤取沉淀得 L-脯氨酸。

⑤检验

白色粉末状结晶，含量在 98.5%-101.5%，干燥失重及灼烧残渣均不超过 0.4%，氯化物不超过 0.05%，硫酸盐不超过 0.03%，铁盐不超过 0.003%，重金属不超过 0.0015%，砷盐不超过 1.5ppm

⑥作用：为复合氨基酸输液及其他药物合成原料。

第三节 氨基酸输液

多种结晶 L-氨基酸依特定比例混合制成的静脉内输注液称之为氨基酸输液。氨基酸输液可直接注入进食不足者的血液中，促进蛋白质、酶及肽类激素的合成，提高血浆蛋白浓度与组织蛋白含量，维持氮平衡，调节肌体正常代谢。

现已有含氨基酸数目为 11、14、18 及 20 种等多种输液类型，氨基酸浓度分别有 3%、5%、9%、10% 及 12% 等多种规格。有些氨基酸输液还加入山梨醇、木糖、维生素、 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 等成分，以补充能量，提高氨基酸的利用率及其营养价值，也有些氨基酸输液与右旋糖酐配伍制成较理想的代血浆。

一、氨基酸输液的组成原理与比例

输入人体的氨基酸种类、数量及比例需符合机体要求，否则利用度将下降，还会引起代谢失调、拮抗及中毒等代谢并发症。

(一) 组方原理

体内蛋白质处于连续分解与合成的动态平衡状态，故氨基酸输液以被患者的有效利用为度。目前国内外生产氨基酸输液组方多采用人乳、全蛋白、FAO、FAO-WHO 或血浆游离氨基酸模式。组方中必须含八种必需氨基酸和两种半必需氨基酸，所有氨基酸均为 L-

型。另外，组方中尚需含 5% 山梨醇或木糖醇，以补充能量、促进氨基酸的吸收和利用，同时加半胱氨酸作为稳定剂，由此方能构成优良的氨基酸输液。

(二) 处方中氨基酸的组成与比例

1、氨基酸的构型：最理想的情况是全部使用 L-氨基酸配制输液。

2、必需氨基酸与非必需氨基酸的比例

非必需氨基酸可由必需氨基酸或碳水化合物转化而来，补充非必需氨基酸可减少体内必需氨基酸的消耗。输液中必需氨基酸 (E) 与非必需氨基酸 (N) 之比 (E / N) 依具体情况而定。一般在 1: 1~1: 3 之间；必需氨基酸 (E) 占总氨基酸的 50%~75%；必需氨基酸 (E) 与总氮量 (T) 之比以 3 为宜，国内氨基酸输液的总含氮量为 0.6%~0.8%。

二、氨基酸输液的配方

氨基酸输液可参考 FAO-WHO 氨基酸代谢模式、人血浆白蛋白、全蛋蛋白质或人乳的氨基酸组成模式制订配方。

三、氨基酸输液的配制

复方氨基酸配方种类较多，配制方法亦不尽相同，但其过程均需活性炭脱色，且需维持一定 pH 范围。活性炭对芳香族氨基酸吸附力强，引起损失，使其含量下降，故配料时需将芳香族氨基酸用量增加 20% 以弥补损失，或将活性炭先用 1% 苯丙氨酸吸附饱和后再应用。输液的 pH 值一般在 4.0~6.0 为适宜，pH5.5 最佳，酸度过大或接近中性皆影响色泽和产品质量。

复方氨基酸输液配制工艺如下：

1) 稳定及难溶氨基酸的溶解：取新鲜注射用水（约全量的 2 / 3）于容器中，加温至 90°C，将亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、天冬氨酸及谷氨酸依次投入，充分搅拌溶解，停止加热，加入色氨酸搅拌溶解。

2) 加易溶氨基酸及稳定剂：投入其它易溶氨基酸及稳定剂（亚硫酸氢钠及半胱氨酸各加至全量浓度为 0.05%），搅拌溶解，迅速降至室温，加注射用水至近全量，用 10% 氢氧化钠液调 pH4.5~5.5，加注射用水至全量。

3) 脱色与灌封：上述溶液加 0.1%~0.2% (w / v) 的活性炭，搅拌 30min，过滤除活

性炭，再用分子量截留值为1万~2万的超滤膜滤器过滤，滤液分装于250ml或500ml输液瓶中，按常规操作压盖后，于105℃流动蒸气灭菌30min即得成品。

四、氨基酸输液的质量标准

复方氨基酸注射液种类较多，各自标准不同。现介绍“11种氨基酸注射液”的质量标准。本品为无色或淡黄色的澄明液体，每种氨基酸含量均应为标示量的80.0%±120.0%。其处方中每升溶液里各氨基酸的量分别为(g)：L-Leu 10.0, L-Ile 6.6, L-Phe 9.9, L-Thr 7.0, L-Val 6.4, L-Met 6.8, L-Trp 3.0, L-Lys 15.4, L-Arg 9.0, L-His 3.5及Gly 6.0。本品pH值为5.5~7.0，与茚三酮呈紫色反应，与硫酸锌及溴试剂呈淡红色反应。色氨酸采用分光光度计法测定，其余氨基酸采用氨基酸自动分析仪或高效液相色谱仪分离测定。其它如安全试验、热原及降压物质等均应符合中国药典2015年版的有关规定。

五、氨基酸输液的作用与用途

对代谢旺盛的病人及严重消耗性病人的蛋白质合成有促进作用。用于治疗肝性昏迷、消化道吸收功能障碍引起的低蛋白血症、大面积烧伤、严重创伤及感染等疾患。氨基酸输液可进入组织细胞，参与蛋白质的合成代谢，获得正氮平衡，并生成酶类、激素、抗体、结构蛋白，促进组织愈合，恢复正常生理功能。滴注速度过快时，可产生恶心、呕吐、发热等反应，应加注意。

第四章 多肽与蛋白质类药物

第一节 多肽及蛋白质类药物的性质与提纯方法

一、多肽类药物的概述

多肽类生化药物是以多肽激素和多肽细胞生长调节因子为主的一大类内源性活性成分。多肽是生化药物中非常活跃的一个领域，尤其是近年更有突飞猛进之势。动物体内已知的活性多肽主要是从内分泌腺、组织器官、分泌细胞和体液中产生获得的，但最近从植物中也分离到了一些新的活性多肽。

自然界存在的多肽，除了有些是蛋白质降解产生的活性肽段外，生物体内已知的活性多肽主要是下丘脑、垂体、胃肠道等产生的多种具有特殊生理作用的激素。从 1953 年人工合成了第一个有生物活性的多肽催产素以后，整个 20 世纪 50 年代主要研究的多肽集中在脑垂体所分泌的各种多肽激素，并取得了很大的进展。60 年代，研究的重点转移到由下丘脑所形成的激素释放因子和释放激素抑制因子，这是一类典型的神经细胞所分泌的活性肽，亦称神经肽。70 年代脑啡肽及脑中其他阿片样肽的相继发现，使神经肽的研究进入高潮，在研究脑活性肽的同时，胃肠激素的研究也十分活跃，是发展较快的一个领域。胃肠道已不仅是体内重要的消化器官，也是体内最大的分泌器官，胃肠激素已成为机体调节系统中的一个重要成分。

多肽类生化药物有调节各种各样的生理活动和生化反应的作用、具有生物活性高、分子小，结构易于改造及由无活性的蛋白质前体经酶加工剪切转化而来等特点。其中许多活性多肽是从无活性的蛋白质前体经过酶的“裁剪”转化而来的，它们中间有许多具有共同来源，具有相似的结构，甚至有些活性多肽就是由另一些具有不同的生理活性多肽转化而来的。从寻找新的生化物质角度看，研究活性多肽结构与功能的关系，有助于了解多肽中哪些氨基酸系列是活性所必需的，以便以更短的多肽来代替。用不同的氨基酸去置换活性多肽中的有关氨基酸，可以提高其生理活性，也可以通过置换某些氨基酸，改变或获得单一生理活性物质，减少临床不良反应。同时，对氨基酸排列形式、立体结构的研究，有助于设计新的活性多肽类药物。

多肽类药物（多肽类激素）是机体的特定腺体合成并释放的一种物质，通过与远程敏感细胞内或细胞表面的受体相互作用而使靶细胞发生变化。主要包括垂体多肽激素、下丘脑多肽激素、甲状腺多肽激素、胰岛多肽激素、肠胃道多肽激素和 胸腺多肽激素等。

1、多肽激素

- 1) 脑垂体多肽激素：促皮质素（ACTH），促黑激素，催产素，加压素等。
- 2) 下丘脑激素：促甲状腺激素释放激素，生长素抑制激素，促性腺激素释放激素等。
- 3) 甲状腺激素：甲状旁腺激素，降钙素等。
- 4) 胰岛激素：胰高血糖素，胰解痉多肽等。

5) 胃肠道激素：胃泌素，胆囊收缩素，肠泌素，肠血管活性肽，抑胃肽，缓激肽，P物质等。

6) 胸腺激素：胸腺素，胸腺肽，胸腺血清因子等。

2、多肽类细胞生长调节因子：表皮生长因子，转移因子，心钠素等。

3、含有多肽成分的其它物质如蜂毒、蛇毒、胎盘提取物、花粉提取物等。

二、蛋白质类药物的概述

蛋白质是生命的主要生化物质，它存在于一切细胞和细胞的各部分，在一个细胞中会有数千至数万种不同的蛋白质。可以毫不夸张地说，蛋白质参与一切生命活动的过程，它是生物体的主要结构物质。蛋白质可作为生物催化剂(酶)参与生物体的新陈代谢；蛋白质作为激素，它调节生物体的代谢过程；蛋白质又是动物体肌肉收缩和运动的执行者，是氧气和许多重要物质的载体，它还作为膜上的受体参与细胞间的通讯和交流，总之，蛋白质是生物体中最重要的一类生物大分子物质。蛋白质也是生物大分子中研究最为透彻的一类生物物质，无论是它的化学组成、结构以及结构与功能的关系都有了较深入的了解。目前已经确定了数百种蛋白质的结构，从已经得到的实验数据可知，每一种有特殊生物学功能的蛋白质都有与其功能密切相关的结构，从这一点讲，蛋白质分子都有其“个性”，揭示蛋白质结构与功能的关系，另一方面 蛋白质的“共性”是都由氨基酸组成。主要蛋白质类药物有以下几种：

1、蛋白质激素

1) 垂体蛋白激素：生长素，催乳素，促甲状腺素，促黄体生成激素，促卵泡激素等。

2) 促性腺激素：人绒毛膜促性腺激素，绝经尿促性腺激素，血清促性腺激素等。

3) 胰岛素及其它激素等。

2、血浆蛋白质：白蛋白，纤维蛋白溶酶原，血纤蛋白等。

3、蛋白质类细胞生长调节因子、干扰素等。

4、粘蛋白，硫酸糖肽，内在因子等。

5、胶原蛋白：明胶，阿胶等。

6、蛋白酶抑制剂；胰蛋白酶抑制剂，大豆胰蛋白酶抑制剂等。

7、植物凝集素，PHA，ConA 等。

三、多肽、蛋白质类药物的性质

1、理化性质

多肽是小分子，化学性质与氨基酸相似，由于组成多肽的氨基酸残基的种类和数量不同，化学性质和生物功能有很大差别。当氨基酸增加到一定数量时，因其相对分子量的增加而使化学性质倾向于蛋白质。一般肽由 2~50 个氨基酸残基组成，含有多于 50 个氨基酸残基的多肽就称为蛋白质。含 20 个以上氨基酸的多肽与蛋白质没有明显界限，无严格定义，有的以相对分子量为界，有的以热稳定性分界，有的以有无空间结构为依据来区分。通常综合多种性质而以胰岛素作为最小的蛋白质。多肽的显色反应与氨基酸相似，双缩脲反应是多肽键的特征反应，凡具有两个直接连接的肽键结构或通过一个中间碳原子相连的肽键结构的化合物，均有此反应。

蛋白质是由氨基酸组成的，所以它有许多与氨基酸相类似的化学性质，如等电点、两性离子、双缩脲反应等，但它与氨基酸有着质的区别，如有空间构型、相对分子量大，有胶体性质，有沉淀、凝固、变性等现象。

2、带电性质及等电点

蛋白质和氨基酸一样也是两性电解质，在水溶液中能解离，解离程度和生成的离子情况是由各种蛋白质分子中可解离的基团数和溶液的 pH 值所决定的。在不同 pH 值下，带不同的电荷，如分别带阳离子、阴离子及两性离子。一般在酸性溶液中带正电荷，在碱性溶液中带负电荷。当溶液的 pH 值小于等电点时，蛋白质带阳离子并向阴极移动；溶液的 pH 值大于等电点时，则蛋白质带阴离子向阳极移动。各种蛋白质具有特定的等电点，这和它所含氨基酸的种类和数量有关，也就是和蛋白质所含的酸性和碱性氨基酸的比例有关。

利用蛋白质在等电点状态容易产生沉淀的性质，在提取蛋白质时通常调节蛋白质溶液中的 pH 值至该蛋白质的等电点，这可以使该蛋白质从溶液中析出；或者在等电点状态的蛋白质溶液中加入有机溶剂，如乙醇或丙酮，它们与蛋白质争夺水分，也使蛋白质沉淀。

在生化产品制备中，常采用改变等电点的方法来延长某些蛋白质药物的疗效。例如胰

岛素在体内的作用时间是 6~8 小时，但把等电点为 5.3 的胰岛素与等电点为 12.3 的鱼精蛋白，在同一 pH 值下结合为鱼精蛋白-胰岛素络合物时，这个络合物的等电点变为 7.3，同人体体液接近，所以降解度降低，可延长胰岛素的疗效时间 24~48 小时，临幊上把这种类型的胰岛素称为长效胰岛素。

3、蛋白质的胶体性质

蛋白质是高分子化合物，在水中能形成胶体溶液，呈现布朗运动、光散射现象、电泳现象、不能透过半渗透性膜以及具有吸附能力等特征。在科研及生产中，常利用蛋白质不能透过半透膜的性质，选用一定孔径的半透膜，如羊皮纸、火棉胶、玻璃纸和肠衣等，可去掉蛋白质溶液中的小分子杂质。

4、蛋白质的沉淀作用

蛋白质颗粒由于带有电荷，并在其表面有水化层，因此蛋白质在水溶液中以稳定的胶体状态存在，当改变条件除去这些稳定因素时，就使相对稳定的蛋白质胶体转化为不稳定状态。引起蛋白质沉淀的方法很多，如在蛋白质溶液中加入适当的试剂，破坏它的水化层或者中和它的电荷，都易使蛋白质溶液变得不稳定而沉淀出来。在日常生活中，蛋白质沉淀的例子很多，如在豆浆中加入少量盐卤而析出豆腐花，热牛奶中加入稀醋酸后有蛋白质结絮而析出沉淀。盐析法和加脱水剂法是分离制备蛋白质制剂、酶制剂常用的方法，此外还可调节溶液的 pH 值，使溶液达到该蛋白质的等电点而失去电荷，蛋白质也可沉淀出来。

四、蛋白质类药物的分离与纯化

对天然蛋白质类药物，为了提高质量、产量和降低生产成本，对原料的种属，发育阶段、生物状态、来源、解剖部位、生物技术产品的宿主菌或细胞都有一定要求，使得纯化工作相对容易。

1、材料的选择原则

- 1) 材料来源丰富易得。
- 2) 有效成分含量高。
- 3) 制备工艺简单，难于分离的杂质少。
- 4) 成本低经济效益好的生物材料或微生物材料为原料。

蛋白质类药物的来源由动植物组织和微生物等材料选定后，必须尽量保持新鲜，尽快加工处理，否则冷冻保存。

2、原料选择

1) 种属：牛胰脏含胰岛素单位比猪胰脏高，牛为 4000IU / kg 胰脏，猪为 3000IU / kg 胰脏。抗原性猪比牛的低。前者与人胰岛素相比，只有 1 个氨基酸的差异，而牛有 3 个氨基酸的差异。

2) 发育生长阶段：幼年动物的胸腺比较发达，老龄后逐渐萎缩，因此胸腺原料必须采自幼龄动物。如 HCG 在妊娠妇女 60~70 天的尿中达到高峰；到妊娠 18 周已降到最低水平。然而 HMC 必须从绝经期的妇女尿中获取。肝细胞生长因子是从肝细胞分化最旺盛阶段的胎儿、胎猪或胎牛肝中获得的。若用成年动物，必须经过肝脏部分切除手术后，才能获得富含肝细胞生长因子的原料。

3) 生物状态：动物饱食后宰杀，胰脏中的胰岛素含量增加，对提取胰岛素有利，但胆囊收缩素的分泌使胆汁排空，对胆汁的收集不利。严重再生障碍性贫血症患者尿中的 EPO 含量增加。

4) 原料来源：血管舒缓素可分别从猪胰脏和猪颌下腺中提取，而稳定性以颌下腺来源为好，因其不含蛋白水解酶。

5) 原料解剖学部位：猪胰脏中，胰尾部分含激素较多，而胰头部分含消化酶较多。如分别摘取则可提高各产品的收率。胃膜素以采取全胃粘膜为好，胃蛋白酶则以采取胃底部粘膜为好，因胃底部粘膜富含消化腺。

6) 对生物技术产品宿主菌或细胞的要求：选择生物技术产品的宿主受体菌或细胞也应考虑到后处理的问题。大肠杆菌表达，由于其不能将所表达的蛋白质分泌到体外，故提取时必须破壁，增加了提取的困难，而且还可能含有毒素类有害因子。用枯草杆菌或酵母菌作宿主菌，虽可解决这一矛盾，但表达的蛋白质成分仍有缺乏糖基化等翻译及修饰的缺陷；用动物细胞和昆虫细胞表达则能比较好地解决后处理及完整表达的问题。用肿瘤细胞作宿主细胞制成的医药产品还应考虑到其安全性问题。

3、蛋白质提纯的一般方法

1) 根据蛋白质等电点的不同来纯化蛋白质

蛋白质、多肽及氨基酸都是两性电解质，在一定 pH 环境中，某一种蛋白质解离成正、负离子的趋势相等，或解离成两性离子，其净电荷为零，此时环境的 pH 值即为该蛋白质的等电点。在等电点时蛋白质性质比较稳定，其物理性质如导电性、溶解度、粘度、渗透压等皆最小，因此可以利用蛋白质等电点时溶解度最小的特性来制备或沉淀蛋白质。

两性物质的等电点会因条件不同（如在不同离子强度的不同缓冲溶液中，或含有一定的有机溶媒的溶液中）而改变。当盐存在时，蛋白质若结合了较多的阳离子，则等电点向较高的 pH 值偏移。反之，蛋白质若结合较多的阴离子，则等电点移向较低的 pH 值。用等电点法沉淀蛋白质常需配合盐析操作，而除去不需要的杂蛋白时，常需配合热变性操作。等电聚焦电泳除了用于分离蛋白质外，也可用于测定蛋白质的等电点。

2) 根据蛋白质分子形状和大小的不同来纯化蛋白质

蛋白质的一个主要特点是分子大，而且不同种类的蛋白质分子大小也不相等。由此可以用凝胶过滤法，超滤法、离心法及透析法等将蛋白质与其它小分子物质分离，也可将大小不同的蛋白质分离。需注意超滤时由于分子的形状不同，如有线性和球形，使得相同分子量的物质超滤结果不同。葡聚糖凝胶含有少量的酸性基团，故有较弱的离子交换作用，此外还有吸附作用。在纯化蛋白质时，可采用低浓度的盐溶液（0.01mol / L），或者用与待分离蛋白质相同的标准蛋白质预先使凝胶柱平衡，达到不损失所分离蛋白质的目的。

3) 根据蛋白质溶解度的不同来纯化蛋白质

蛋白质的溶解度受溶液的 pH、离子强度、溶剂的电解质性质及温度等多种因素的影响。在同一特定条件下，不同蛋白质有不同的溶解度，适当改变外界条件，可以有选择地控制某一种蛋白质的溶解度，达到分离的目的。属于这一类的分离方法有蛋白质的盐溶与盐析法、结晶法和低温有机溶剂沉淀法。乙醇和丙酮是有机溶剂沉淀法中最常用的有机溶剂，由于丙酮的介电常数小于乙醇，故丙酮沉淀能力比乙醇强。

4) 根据蛋白质电离性质的不同来纯化蛋白质

离子交换剂作为一种固定相，本身具有正离子或负离子基团，它对溶液中不同的带电

物质呈现不同的亲和力，从而使这些物质分离提纯。蛋白质、多肽或氨基酸具有能够离子化的基团，因此可使用离子交换法纯化蛋白。对蛋白质的离子交换层析，一般多用离子交换纤维和以葡聚糖凝胶、琼脂糖凝胶，聚丙烯酰胺凝胶为骨架的离子交换剂。主要是取决于其有较大的蛋白质吸附容量、较高的流速和分辨力。对已知等电点的物质，当 pH 高于其等电点时用阴离子交换树脂，当低于时用阳离子交换树脂，对不知等电点的未知物可参照电泳结果。一般在中性或偏碱性条件，电泳时向阳极移动较快的物质用阴离子交换树脂，向阴极移动或向阳极移动较慢的物质可用阳离子交换树脂。如吸附太牢固可用交换当量较小的交换剂，或改变条件降低交换剂上带电基团的离解度。

5) 根据蛋白质功能专一性的不同来纯化蛋白质。

主要手段是亲和层析法，即利用蛋白质分子能与其相应的配体进行特异性的、非共价键的可逆性结合而达到纯化的目的。如胰岛素、胰高血糖、催乳素等都可用专一性的抗体作为配基进行纯化；用亲和层析纯化某种蛋白时，有时不一定得较纯物质，原因为非专一性吸附，吸附剂上的离子基团或疏水基团非专一性的吸附一些无关的杂质固相化；金属亲和层析 IMAC 是新发展的一种亲和层析技术。蛋白质分子中的咪唑基和巯基可与一些金属元素（如 Cu²⁺, Zn²⁺）形成配位结合，使蛋白质得到分离纯化。

6) 根据蛋白质疏水基团与相应的载体基团结合来纯化蛋白质

蛋白质上有疏水区，它们主要由酪氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸等非极性的侧链密集在一起，并暴露于分子表面。这些疏水区能够与吸附剂上的疏水性基团结合，在通过降低介质的离子强度和极性等方法将蛋白质洗脱下来。用含酚基疏水基团的琼脂糖纯化重组人表皮生长因子（rhEGF），纯度可达 94%，回收率达 82%。

7) 根据蛋白质在溶剂系统中分配的不同来纯化蛋白质

这是一种以化合物在两个不相溶的液相之间进行分配为基础的分离过程，称之为逆流分溶。利用逆流分溶技术分离垂体激素、氨基酸、DNA 是很有效的。

8) 根据蛋白质受物理、化学等作用因素的影响来纯化蛋白质。

蛋白质易受 pH、温度、酸碱、金属离子、蛋白质沉淀剂，络合剂等的影响，用于各种蛋白质都存在差异，可利用这种差异来分离纯化蛋白质。白蛋白在弱酸性条件下加辛酸

钠可耐受 67℃ 的温度，而其他蛋白质将变性。球蛋白或白蛋白在碱性条件下，可以和利凡诺作用，形成络合物而与其他蛋白质分离。细胞色素 C 和胰岛素可用一定浓度的蛋白沉淀剂如三氯醋酸沉淀，而保存其活力。

9) 根据蛋白质的选择性吸附性质来纯化蛋白质

在蛋白质分离中，最广泛使用的吸附剂有结晶磷酸钙，磷酸钙凝胶，硅胶，皂土、沸石、硅藻土、活性白土、氧化铝以及活性炭等。诸如催产素、胰岛素、HCG、HMG、细胞色素 C 等都可以通过吸附层析技术进行纯化。

10) 根据酶对蛋白质的作用来纯化蛋白质

如超氧化物歧化酶（SOD）能抵抗蛋白酶的水解，可用蛋白水解酶水解其他酶从而纯化 SOD，对无胰岛素活性的胰岛素原可用酶切去其 C-肽，使其激活。 γ -球蛋白、ACTH 在分子中有活性中心，可用蛋白酶水解切去与生物活性无关的分子部分，保留活性分子片段，使产品纯化。对于无胰岛素生物活性的胰岛素原，用蛋白水解酶可切去胰岛素原分子中的 C-肽，使胰岛素激活。一些活性多肽常与其他蛋白质分子结合而不呈现活性或不能够被提取，用蛋白水解酶可以使其与其它蛋白质解离，恢复其生物活性和在溶液中的正常性质。

五、溶液中蛋白质浓度的测定

1、紫外法

由于构成蛋白质的某些氨基酸具有共轭双键，因此具有紫外吸收，常见的最大吸收波长在 280nm。

2、双缩脲法

常量双缩脲法：蛋白质在碱性条件下与铜形成紫红色化合物，在 540nm 处进行比色测含量，颜色的深浅只与蛋白含量有关与蛋白的分子量和氨基酸组成无关。

微量双缩脲法：原理相同，区别为在 310nm 下测定吸收波长，因为灵敏度高、干扰小。

3、福林—酚试剂法

此法为双缩脲法的发展，蛋白在碱性条件下与铜缩合为紫色复合物，该复合物的酪氨酸、色氨酸残基与福林试剂（磷钼酸磷钨酸）发生还原反应生成蓝色。

4、考马斯亮蓝 G-250 染色法

考马斯亮蓝 G-250 在酸性中为棕红色，当它与蛋白质通过疏水作用结合变为蓝色，可在 595nm 下比色。

此外还可以用化学反应方法，如凯氏定氮、双缩脲反应、福林-酚反应测定；也可用染色法，如氨基黑、考马斯亮蓝测定；也可用荧光激发、氯胺 T、放射性同位素计数等灵敏度较高的方法。但紫外吸收法、双缩脲法、福林-酚试剂法、考马斯亮蓝染色法仍为最常用的方法。

六、蛋白质的纯度检查

测定蛋白质的纯度是化学和物理学的概念，它和蛋白质所具有的生物活性有着更复杂的关系，蛋白质的聚合状态、辅基的存在、蛋白质的变性作用等极大地影响其生物活性，而这些因素的影响有些往往是用一般纯度检查的方法所查不出来的，纯度检查的方法有：

1、HPLC：高效液相色谱以经典的液相色谱（通常所说的柱层析、薄层层析或纸层析就是经典的液相色谱）为基础，是以高压下的液体为流动相的色谱过程。经典的液相色谱所用的固定相为大于 100um 的吸附剂（硅胶、氧化铝等），这种传统的液相色谱所用的固定相粒度大，传质扩散慢，因而柱效低，分离能力差，只能进行简单混合物的分离，而高效液相所用的固定相粒度小（5um-10um）、传质快、柱效高。因此可用高效液相色谱对蛋白进行分离，求其纯度和含量，这是蛋白质纯度检查常用的有效方法。美国药典已规定把 HPLC 用于胰岛素纯度的检测项目中。

2、电泳法：呈现单一区带。说明荷质比均一，在不同 pH 下呈单一区带，结果更可靠。

3、免疫化学法：主要有免疫扩散、免疫电泳、双向免疫电泳扩散、放射免疫分析、酶标 免疫分析等。对微量有效成分的检查意义重大

4、生物检测法：利用动物体或动物离体器官或细胞进行生物效价测定。

5、分光光度法：紫外分光光度法可用于检查核酸杂质的有无，测定 280nm 和 260nm 处吸光度值 A，并对其比值进行计算，判断核酸杂质的有无。红外分光光度法测定官能团，判断是否有其他杂质的存在，蛋白分子结构有特别能级，红外能提供分子指纹。

七、多肽与蛋白质的化学合成

多肽的合成是 50 年代开始，在有机溶剂中进行的均相反应，因此叫作液相合成法，此法在合成分子量较小的多肽时是比较成功的，但在合成更大的蛋白质时，产物还不能表现出全部活力且不能结晶，1962 年建立的固相合成的新方法，对小肽的合成是很成功的，对大分子的合成，如 124 肽的核糖核酸酶，还不能达到天然物质的全部活力。目前试图合成大的蛋白质以及建立快速简便的合成方法是多肽合成化学的特征。在多肽合成中，一般需要以下几个主要步骤：氨基保护和羧基活化；羧基保护和氨基活化；接肽和除去保护基团。

1、基团保护：要实现控制多肽合成，如 N-末端氨基酸残基的自由-NH₂、C-末端氨基酸残基的自由-COOH 以及侧链上的一些活泼基团，加以封闭或保护。待肽链形成之后，再将保护基除去。作为保护基，必须既能在接肽时起到保护作用，在接肽以后，能很容易地除去，且不引起肽链的断裂。应用最多的氨基保护剂是苄氧羰酰氯（Cbz-Cl），可用催化氢化法或钠氨法（用金属钠在液氨中处理）除去保护基，也可用叔丁氧羰酰氯（BOC-Cl）作保护剂，用稀盐酸或乙酸在室温除去保护基。羧基保护剂通常用无水乙醇或甲醇在盐酸存在下进行酯化，使羧基接上烷基。除去保护基可在常温下用氢氧化钠皂化法。有些氨基酸还有其他功能基团，在合成肽时，都要用适当的保护基团加以保护。例如组氨酸的咪唑基、丝氨酸的羟基、酪氨酸的酚基、半胱氨酸的巯基等，都可用苄基（—B₂）保护，用钠氨法除去。谷氨酸和天门冬氨酸的β-及γ-羧基可用β-及γ-苯甲酯保护，用催化氢化法除去。

2、肽的液相合成法：接肽反应除用缩合剂来完成外，还可以用分别活化参与形成肽链的氨基和羧基的方法来完成。因活化氨基的反应激烈，而且常常产生消旋化，所以，总是采用羧基活化的方法，合成肽的常规方法是从 C-端向 N-端进行。肽的合成法可分为阶梯伸长法和片段断缩合法。阶梯伸长法是将带有 R-O-CO-型保护基的氨基酸（不是肽）的羧基活化，从肽的 C-端开始每次接上一个氨基酸，逐步递增的办法。这是合成比较小的肽或肽段常采用的方法。片断缩合法是由小肽缩合成大肽的方法，为了避免消旋，常用叠氮法接肽。

3、肽的固相合成法：在固相合成中，肽链的延长是在不溶性的聚苯乙烯树脂载体上进行的。合成多肽的 C-末端先和氯甲基聚苯乙烯树脂（氯化苄酯树脂）反应形成苄酯，然

后按肽链一级结构的顺序将氨基端已被保护的氨基酸逐个加上去，使肽链延长。固相法比液相法操作简便，时间缩短，可以自动化，在我国医药工业中。人工合成催产素、促黄体生成素释放因子（LRH），不仅产量高，而且比天然产品好。

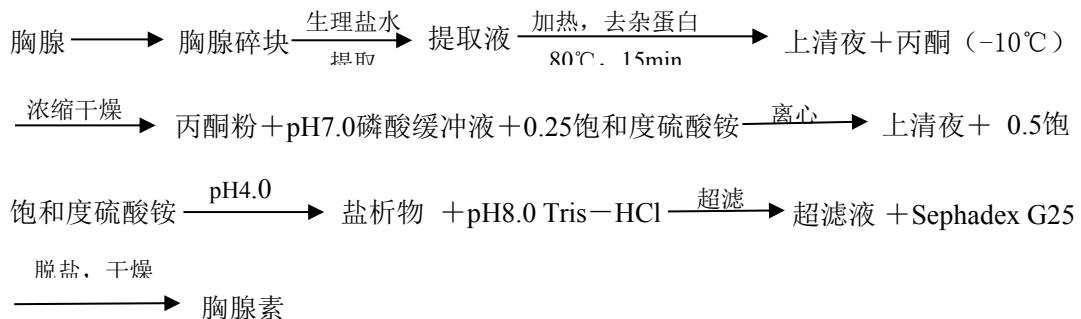
第二节 多肽及蛋白质类药物的制备工艺

一、主要多肽类药物的制备

1、胸腺素（thymocin）

1) 结构和性质 胸腺素组分 5 是由 80℃热稳定的 40-50 种多肽组成的混合物，分子量在 1000~15000 之间，等电点在 3.5~9.5 之间。胸腺素组分 5 中，胸腺 α_1 、 α_5 、 α_7 、 β_3 、 β_4 等具有调节胸腺以及淋巴细胞分化和体内外免疫反应的活性组分。连续诱导 T 细胞分化发育的各个阶段，放大并增强成熟 T 细胞对抗原或其他刺激物的反应，维持机体的免疫平衡。

2) 生产工艺



3) 工艺过程

提取：将胸腺除去脂肪绞碎，加 3 倍生理盐水，离心得提取液。

加热除杂蛋白：提取液 80℃加热 15 分钟，离心除去杂蛋白沉淀。

沉淀：上清液 4℃加入 5 倍体积的-10℃丙酮，收集沉淀，干燥后得丙酮。

分级盐析：将丙酮粉溶于 pH7.0 的磷酸盐缓冲液中，加硫酸铵至饱和度为 0.25，离心除去沉淀，上清液调 PH4.0，加硫酸铵至饱和度 0.5，得盐析物。

超滤：将盐析物溶入 PH8.0 的 Tis-HCL 缓冲液，超滤，取分子量低于 15000 的超滤液。

脱盐、干燥，超滤后经凝胶柱脱盐后进行超滤。

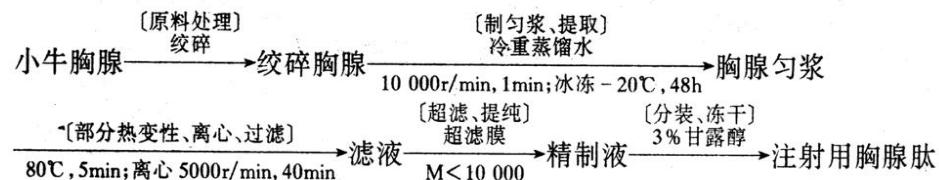
4) 作用与用途：作为免疫调节剂

- ①原发性和继发性免疫缺陷病，如反复上呼吸道感染等。
- ②自身免疫病，如肝炎，肾病，红斑狼疮，类风湿关节炎、重症肌无力等。
- ③变态反应性疾病，如支气管哮喘等。
- ④细胞免疫功能减退的中年人和老年人疾病，并可抗衰老。
- ⑤肿瘤的辅助治疗。

2、胸腺肽（Thymus peptides）

1) 结构和性质：胸腺肽中主要是分子量 9600 和 7000 左右的两类蛋白质或肽类，氨基酸组成达 15 种，必需氨基酸含量高，还含有 RNA 0.2~0.3mg / mg, DNA 0.12~0.18mg / mg。对热较稳定，加温 80℃ 生物活性不降低。经蛋白水解酶作用，生物活性消失。

2) 生产工艺



3) 检验方法：活力测定同胸腺素。分子量 10000 以下。

4) 作用与用途：胸腺肽可调节细胞免疫功能，有较好的抗衰老和抗病毒作用。无过敏反应和不良的副作用。

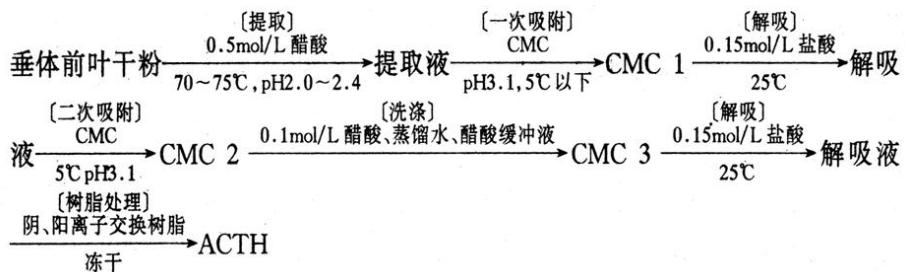
3、促皮质素（Adrenocorticotropic hormone, ACTH）

1) 结构和性质：垂体包括腺垂体和神经垂体，可分泌多种激素。促皮质素是从垂体前叶提取出来的一种多肽激素。易溶于水，等电点为 6.6。在干燥和酸性溶液中较稳定，虽经 100℃ 加热，但活力不减；在碱性溶液中容易失活。能溶解于 70% 的丙酮或 70% 的乙醇中。

ACTH 为 39 个氨基酸组成的直链多肽，种属差异仅仅表现在第 25~33 位上。ACTH

的 24 肽即 1~24 位的片段 (ACTH 1~24) 具有全部活性。这是因为 ACTH 的第 24 位氨基酸之后的部分，不参与同受体的作用，它仅维持整个多肽结构的稳定性。ACTH 可被胃蛋白酶部分水解，但仍有活力，ACTH 在溶液中存在着高度的 α -螺旋。

2) 生产工艺



3) 检验方法：ACTH 粗品 1mg 相当于 1U 以上，用小白鼠胸腺萎缩法测定；ACTH 精品 1mg 相当于 45U 以上，用去垂体大白鼠的肾上腺维生素 C 降低法测定。

4) 作用与用途：ACTH 能维持肾上腺皮质的正常功能，促进皮质激素的合成和分泌。

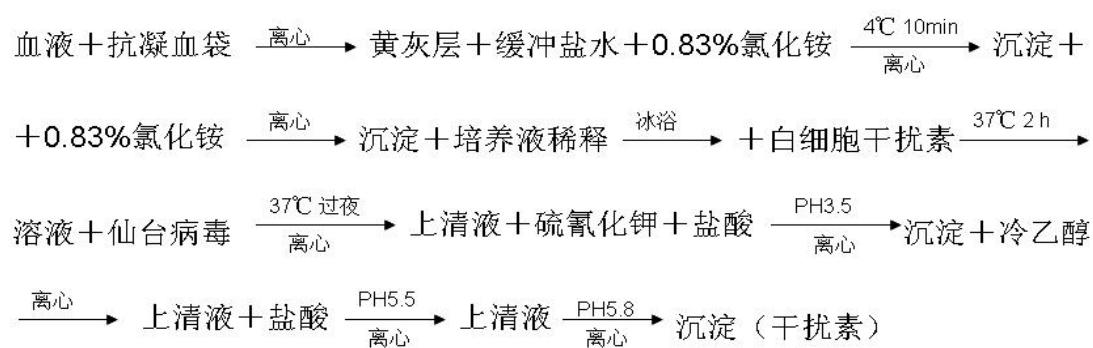
二、主要蛋白质类药物的制备

1、干扰素(interferon, IFN)

1) 结构和性质

干扰素—系指由干扰素诱导有关生物细胞所产生的一类高活性、多功能的诱生蛋白质。这类诱生蛋白质从细胞中产生和释放之后，作用于相应的其它同种生物细胞，并使其获得抗病毒和抗肿瘤等多方面的免疫力。干扰素有 α 型、 β 型和 γ 型及许多亚型，具有沉降率低，不能透析，可被胃蛋白酶、胰蛋白酶和木瓜蛋白酶破坏，不被 Dnase\Rnase 水解破坏的特性

2) 生产工艺



3) 工艺过程:

①分离灰黄层：取献血者血液（每份 400ml）采入含抗凝血剂的塑料袋内，离心后分出血浆，小心吸取黄灰层，每份血可吸 13-15ml，约为血中细胞的 40%-50%，放置 4℃冰箱过夜。

②氯化铵处理：每份灰黄层加入 30ml 缓冲盐水，再加入总体积 9 倍量的 0.83% 的氯化铵溶液，混匀，4℃ 放置 10min。然后离心 20min，收集沉淀细胞，做成悬浮液，再用氯化铵处理一次，融解残存的红细胞。取沉淀的白细胞并悬浮于培养液中，置于冰浴，取样作活细胞计数，用预温培养液稀释成 10^7 个/ml。培养液的基础成分为 Eagle's 培养基。

③起动诱生：取稀释的细胞悬浮液加入白细胞干扰素，使其最后浓度为 100 μ /ml，置 37℃ 水浴搅拌培养。

④正式诱生：起冻后的白细胞加入仙台病毒，使其最后浓度为 100-150 血凝单位/ml，在 37℃ 搅拌培养过夜。

⑤收获：次日将培养物离心 30min，吸取上清液即得粗制干扰素。

⑥纯化：将粗制人白细胞干扰素加入硫氰化钾处理等。

4) 作用与用途：由于干扰素的抗病毒、抗细胞分裂及免疫调节作用，可用于：

①病毒性疾病：普通感冒，疱疹性角膜炎，带状疱疹，水痘、慢性活动性乙型肝炎。

②恶性肿瘤：成骨肉瘤，乳腺癌，多发性骨髓瘤，黑色素瘤、淋巴瘤、白血病等。

③由于病毒引起的良性肿瘤可控制疾病发展。

2、胰岛素的制备

1) 结构和性质

胰岛素广泛存在于人和动物的胰脏中，正常人的胰脏约含有 200 万个胰岛，胰岛由 α -、 β -和 δ -三种细胞组成，其中 β -细胞制造胰岛素， α -细胞制造胰高血糖素和胰抗脂肝素， δ -细胞制造生长激素抑制因子。胰岛素在 β -细胞中开始时是以活性很弱的前体胰岛素原存在的，进而分解为胰岛素进入血液循环。胰岛素由 51 个氨基酸组成。不同种属动物的胰岛素分子结构大致相同，主要差别在 A 链二硫桥中间的第 8、9 和 10 位上的三个氨基酸及 B 链 C 末端人的是苏氨酸，猪的是丙氨酸，抗原性比其他来源的胰岛素要低。胰岛素由两条

肽链通过二硫键连接，A 链 21 个氨基酸，B 链 30 个氨基酸。

2)、工艺路线 胰岛素在弱酸下或混悬在中性缓冲液中稳定。

提取：猪胰脏绞碎，再加 2.3~2.6 倍的 86%~88% 乙醇和 5% 的草酸，提取 3 小时。

碱化：提取液用氨水调 pH 至 8.0~8.4。

酸化：在 5℃ 下，将碱化液用硫酸调 pH 至 3.6~3.8。

浓缩：将上述提取液过滤取上清夜，在 30℃ 减压浓缩至比重为 1.04~1.06 为止。

去脂：将浓缩液快速加热再快速降温，过滤得去脂液。

盐析：向去脂溶液中加入氯化钠调 pH 至 2~2.5，过滤得盐析物。

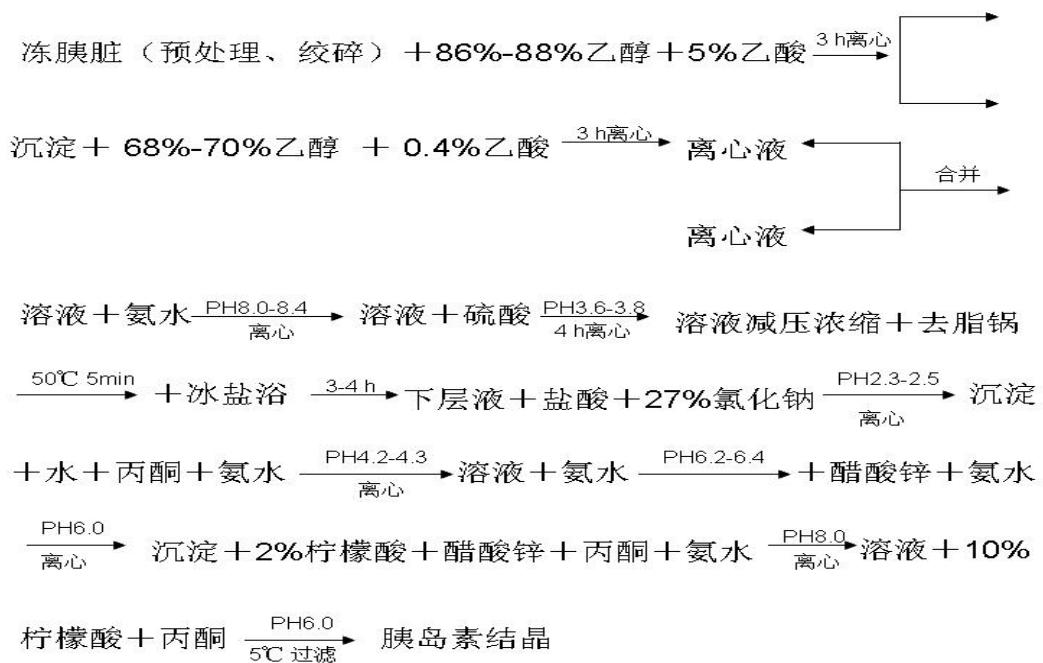
除酸性蛋白：盐析物中加入 7 倍量的蒸馏水溶解，再加 3 倍量冷丙酮，用氨水调 pH4.2~4.3，补加丙酮，使水和丙酮的比例为 7:3，搅拌后过夜，离心去除酸性蛋白沉淀。

锌沉淀：滤液用氨水调 pH6.2~6.4，加入 3.6% 醋酸锌溶液（20% 浓度），再用氨水调 pH6.0，4℃ 放置过夜，收集沉淀，冷丙酮洗涤、干燥。

除碱性蛋白、结晶：按干品重量计每克加冰冷的 2% 柠檬酸溶液 50 毫升、6.5% 的醋酸锌溶液 2 毫升、丙酮 16 毫升，用冷水稀释至 100 毫升，使充分溶解，冷至 5℃ 以下，用氨水调 pH8.0，过滤，滤液用 10% 柠檬酸溶液调 pH6.0，补加丙酮，使溶液含丙酮达 16%，慢速搅拌 3 到 5 小时，使结晶析出，再转入 5℃ 左右放置 3 到 4 天，使结晶完全，收集结晶。洗涤、干燥：用水洗涤结晶，再用丙酮、乙醚将结晶脱水，真空干燥后得到成品。

3) 生产工艺

胰岛素在弱酸下或混悬在中性缓冲液中稳定。



4)、注解

- (a) 离体后，蛋白水解酶类能分解胰岛素使之失活。因此，要立即冷冻，先在-30℃以下急冻后转入-20℃保存备用。如用液氮或干冰速冻，效果更好。在胰脏中，胰尾部分胰岛素含量较高，如单独使用可提高收率 10 %。
- (b) 胰岛素结构修饰，可对胰岛素分子进行修饰和改造，以改变某些性质，如提高降血糖能力、延长体内半衰期、抗热变性、抗蛋白水解酶的降解等。
- (c) 酶促半合成人胰岛素，经胰蛋白酶的转酰胺作用，将猪胰岛素转化为人胰岛素B30。再用离子交换层析纯化，可得到高纯度的人胰岛素。
- (d) 重组 DNA 技术制造人胰岛素，人工合成的人胰岛素克隆到大肠杆菌中生产人胰岛素。

第五章 核酸类药物的制备技术

第一节 概述

一、核酸类药物的基本知识

核酸是生物体的基本组成物质，从高等的动、植物到简单的病毒都含有核酸。它在生物的个体发育、生长、繁殖、遗传和变异等生命过程中起着极为重要的作用。脱氧核糖核酸（DNA）主要存在于细胞核的染色体中，核糖核酸（RNA）主要存在细胞的线粒体中。细胞核和细胞质中，都含有构成核酸而自由存在的单核酸和二核苷酸。各种生物含有核酸的多少不同，如谷氨酸菌含 7%--10%，面包酵母含 4%，啤酒酵母含 6%，大肠杆菌含 9%-10%。

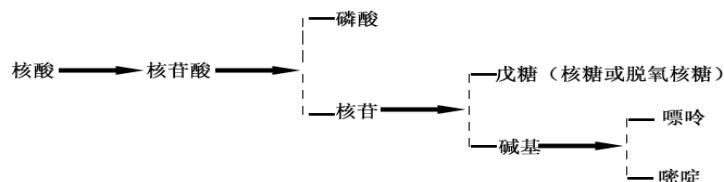
我国已经合成核糖八核苷酸和脱氧核糖十三核苷酸，在此基础上又开展了核糖十六核苷酸的合成研究工作。日本合成了核糖十二核苷酸，这方面的工作，我国是领先的。世界各国对核酸的研究和应用是非常活跃的，新的发现一个接一个地涌现出来，应用于临床的核酸及其衍生物类生化产品越来越多，并初步形成了核酸生产工业。我国每年生产核酸约 10 吨，仅是日本的百分之一，随着对核酸秘密的揭示，对生命现象认识的不断深入，利用核酸战胜危害人类健康的各种疾病，将会有新的飞跃。对生化产品制备来说，可利用合成核糖核酸的方法来研究、设计、制备治疗多种严重疾病的新生化产品。

核酸类药物可分为两类：一类为具有天然结构的核酸类物质，缺少这类物质会使机体代谢失调，发生病态，提供这类物质，有助于改善机体的物质代谢和能量平衡，加速受损组织的修复，促进缺氧组织恢复正常生理机能。临幊上用于放射病，血小板减少症，急慢性肝炎，心血管疾病，肌肉萎缩等代谢障碍。如肌苷，ATP，辅酶 A，脱氧核苷酸，肌苷酸等。第二类为自然结构碱基、核苷、核苷酸结构的类似物或聚合物，这一类核酸类药物是当今治疗病毒，肿瘤，艾滋病的重要手段，也是产生干扰素、免疫抑制的临幊药物。已经正式在临幊应用的 8 个抗病毒核苷酸类药物。

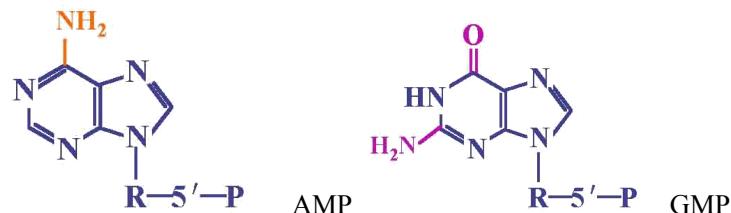
随着分子生物学和遗传工程的发展，基因治疗应运而生，得到广泛肯定。其中包括反义核酸技术，简称反义技术。根据核酸杂交原理，反义药物能与特定基因杂交，在基因水平干扰致病蛋白的产生过程，及干扰遗传信息从核酸向蛋白质的传递，传统药物主要是直接作用于致病蛋白本身，而反义药物则作用于产生蛋白的基因，因此可广泛应用于多种疾病的防治。

在 1869 年, F. Mischer 从细胞核中分离得到一种酸性物质, 即现在被称为核酸的物质。

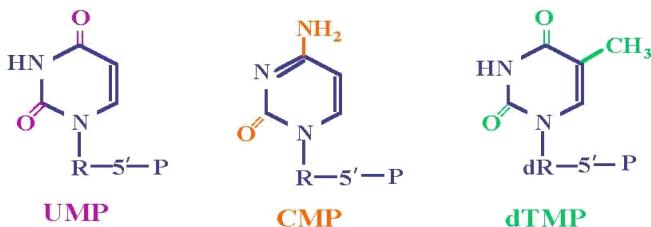
1939 年, E. Knapp 等第一次用实验方法证实核酸是生命遗传的基础物质。核酸不仅携带有各种生物所特有的遗传信息而且影响生物的蛋白质合成和脂肪、糖类的代谢。核酸是一种多聚体大分子, 它的组成单元是核苷酸, 将核苷酸中的磷酸基团去掉, 剩余部分称核苷, 核苷进一步分解可生成戊糖和碱基, 其结构图如下:



嘌呤核苷酸的结构:



嘧啶核苷酸的结构:



二、核酸类药物的一般性质

DNA 和 RNA 都是大分子化合物, 首先分子质量很大, 特别是 DNA。天然的 DNA 分子的长度可达数厘米, RNA 分子比 DNA 短, 其相对分子量也较小。DNA 为白色纤维状固体, RNA 为白色粉末。它们都微溶于水, 它们在稀碱溶液中生成盐, 核酸的钠盐比核酸更易溶于水。不溶于一般有机溶剂, 但能溶解于乙醇的水溶液, 当乙醇质量分数达到 50% 时, DNA 便沉淀析出, 增高至 75% 时, RNA 也沉淀出来。常利用二者在有机溶剂中的溶解度的差别, 从样品中将 DNA 与 RNA 分离。

大分子化合物溶液一般具有较大的黏度, DNA 在极稀的溶液里也有极大的黏度, 当

DNA 溶液受热或其他因素作用下发生变性时，其黏度降低。溶液的 pH 值对 DNA 的黏度有显著影响。核酸可被酸、碱或酶水解成为各种组分，其水解程度因水解条件而异，如 RNA 能在室温条件下被稀碱水解成核苷酸，而 DNA 对碱稳定，常利用此性质测定 RNA 的碱基组成或除去溶液中的 RNA 杂质。

三、核酸类药物的紫外吸收性质

核酸中的嘌呤和嘧啶环都具有共轭双键，因此具有独特的紫外吸收光谱，核酸紫外吸收光谱的最大吸收峰接近 260nm，常用紫外分光光度法来进行核酸的定量测定。

四、核酸类药物的变性和复性

1、变性：高温、酸、碱以及某些变性剂能破坏核酸中的氢键，使有规律的双螺旋结构变成单链的、无规律的“线团”，此作用称为核酸的变性。核酸变性并没有破坏分子中的共价键，相对分子量也不改变，引起核酸变性的因素很多，由温度升高而引起的热变性；由酸碱度改变引起的变性。如将 DNA 在稀盐溶液在 80~100°C 下加热数分钟，双螺旋结构及发生解体，两条链分开，形成无规则线团。DNA 的变性特点是爆发式的，变性作用发生在一个很窄的温度范围内，通常溶解温度的中点叫作“熔点”或解链温度，用 T_m 表示，DNA 一般在 70~85°C 之间。

2、复性：DNA 热变性后缓慢冷却，则分开的链又可恢复成为双螺旋结构，这一过程称为复性。DNA 复性后，一系列理化性质也随之恢复，出现减色效应、粘度增大、浮力密度下降，生物活性也可以得到部分恢复。

五、核酸的颜色反应及其在测定上的应用

DNA 和 RNA 经酸水解后，嘌呤易脱下形成无嘌呤的醛基化合物，或水解得到核糖和脱氧核糖，这些物质与某些酚类、苯胺类化合物结合成有色物质，可用来作定性分析或根据颜色的深浅作定量测定。定糖法虽准确性差、灵敏度低、干扰物多，但方法快速简便、不需特殊的仪器就能鉴别 DNA 和 RNA，所以也是定性鉴别和定量测定核酸、核苷酸的常用方法。

六、核酸中含磷量的测定

DNA 和 RNA 都含有一定量的磷酸，根据元素分析可知，纯的 RNA 及其核苷酸一般

含磷量为 9% , DNA 及其核苷酸含磷虽为 9.2% , 故核酸测定时, 每测得 1g 磷相当于有 11g 的核酸。此方法准确性强, 灵敏度高, 最低可测到 5 μ g/ml 的核酸, 可作为紫外法和定糖法的基准方法。由于核酸和核苷酸中的磷是有机磷, 常用测定磷的方法是测定无机磷的方法。因此, 测定时, 先将有机磷氧化成无机磷。

七、核酸分析测定时样品的预处理

用上述定磷、定糖或紫外吸收的方法测定某一生物材料中核酸或其水解物含量时, 一般要先经预处理, 去掉杂质, 避免干扰, 如酒糟酵母培养液干重的 98%以上是杂质, 经处理后, 就能将其中含量仅 1%的核酸准确地测出来。

一般要先经过二步预处理: 先将生物组织细胞在低温下磨碎成匀浆, 然后用冰冷的稀的三氯醋酸或 1%的高氯酸在低温下抽提几次, 离心, 取上清夜, 这样可去掉酸溶性小分子物质, 如含磷化合物、糖、氨基酸、核苷酸、辅酶等, 留下的沉淀为蛋白质、核酸、脂类、多糖等。再用有机溶剂如乙醇、乙醚、氯仿等抽提去掉脂溶性的磷脂等物质, 残余物为不溶于酸的废脂化合物, 其主要成分是 DNA、RNA、蛋白质、磷蛋白和少量磷化合物等, 然后可用下面两种方法进一步处理测定 DNA 和 RNA。

酸处理法: 经预处理后的核酸样品用 5% 三氯乙酸或 6%高氯酸在 90℃下抽提 15min, DNA 和 RNA 都成为酸溶性物而抽提出来, 此抽提液能用定糖法分别测定 DNA 和 RNA 的含量, 此法的优点是简便快速, 但没有把 DNA 和 RNA 分开, 干扰因素很多, 不是十分明确。

碱处理法: 经处理后的核酸样品, 用温热的稀碱液保温 18 小时, 使 RNA 降解为酸溶性的单核苷酸, 而 DNA 则不发生降解, 然后用酸中和, 再用三氯乙酸或高氯酸进行酸化, RNA 存在于上清夜中, DNA 则随着蛋白质沉淀, 此法可分别测定 DNA、RNA 的含量。

第二节 核酸类物质的分离提取及其发酵生产

一、核酸类物质的作用及用途

核酸是高分子化合物, 它与生物的生长、发育、繁殖、遗传和变异有密切关系, 又是

蛋白质合成不可缺少的物质。核酸的改变可引起一系列性状和功能的变化，如恶性肿瘤、放射病、遗传性疾病等都与核酸生物功能改变有关。从 20 世纪 50 年代开始，大量的研究表明，核酸及其降解物、衍生物具有良好的治疗作用。核苷及其衍生物干扰病毒 DNA 的合成，治疗病毒疾病。如腺苷、肌苷、尿苷、核苷酸、脱氧核苷酸、双丁酰环腺苷酸、胞二磷胆碱、核苷三磷酸等核酸组分及衍生物，是天然的代谢激活剂，有助于改善机体的物质代谢和能量代谢，加速受损组织的修复。临床广泛用于放射病、血小板减少、急慢性肝炎、血细胞减少、心血管疾病等。

1、嘌呤和嘧啶类生化产品：核酸组成中的碱基嘌呤化合物和嘧啶化合物都有较好的抗肿瘤作用，其作用机理为阻断蛋白质、核酸的生物合成，抑制癌细胞的增殖。

2、核苷类生化产品：辅酶 A 是体内乙酰化反应的辅酶，是调节糖、脂肪及蛋白质代谢的重要因子，特别是对促进乙酰胆碱的合成，降低血中的胆固醇，增加肝糖元的积存有着重要作用。用于治疗动脉硬化、脂肪肝、各种肝炎等，与腺三磷、辅酶 I 、辅酶 II 、细胞色素 c 合用，临床效果更好；腺三磷应用最广泛，临床主要用于心脏疾病、肌肉萎缩性疾病、脑出血后遗症等；肌苷用于急慢性肝炎、肝硬化、白细胞减少、血小板减少等。

3、核苷酸类生化产品：从猪、牛中提取的 RNA 制品，对治疗慢性肝炎、肝硬化和改善肝癌症状有一定疗效。免疫核糖核酸 RNA (iRNA) 是一种高度特异性的免疫触发剂，存在于免疫动物的淋巴细胞和巨噬细胞中，如把人肿瘤细胞免疫于动物，再从动物的淋巴细胞中提取 iRNA，可用于肿瘤的免疫治疗。从小牛胸腺或鱼精中提取的 DNA 制剂用于治疗精神迟缓、虚弱和抗辐射等。

核苷酸类药物的治疗效果正引起人们的重视，尤其是肿瘤疾病的治疗，实验证实肿瘤细胞摄取完整的正常细胞大分子 RNA 后，可使肿瘤细胞的功能形态向正常细胞分化转化，因此核苷酸能提高机体对病毒和肿瘤的免疫能力，临床用于治疗肿瘤、病毒感染等疾病。

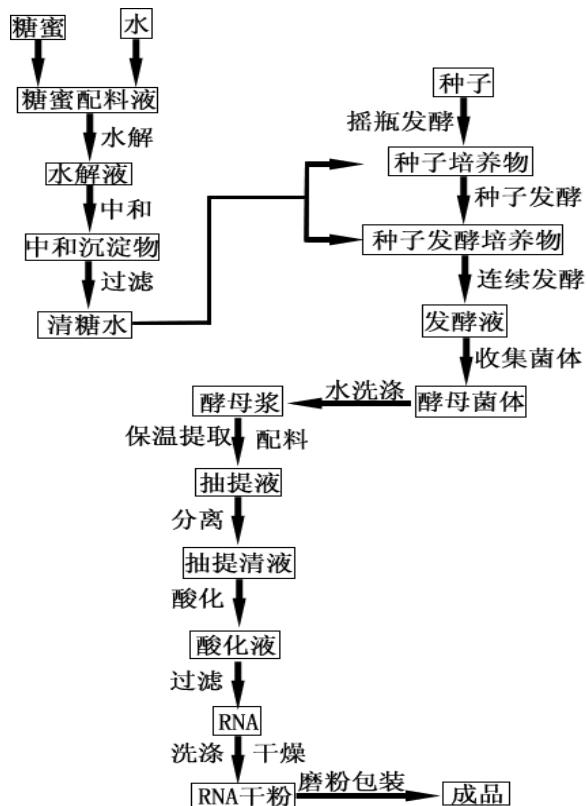
二、RNA 与 DNA 的提取与制备

(一) RNA 的提取与制备

1. 发酵法提取

从微生物中提取 RNA，是工业上最实际和有效的方法，一些最常见的菌体含有丰富的

核酸资源。通常在细菌中 RNA 占 5%~25%，在酵母中占 2.7%~15%，在霉菌中占 0.7%~28%，面包酵母含 RNA 4.1%~7.2%。酵母菌体收率高，易于提取 RNA，可以从自然界筛选并可用诱变育种的方法提高酵母的 RNA 含量，发酵法生产高含量 RNA 酵母及其 RNA 提取工艺流程如下：



2、动物组织提取

一般是先把动物组织捣碎，制成组织匀浆，用 0.14mol/l 的氯化钠溶液提取，把细胞质中的核酸和蛋白提取出来，留下含有 DNA 的细胞核物质，调节 pH 至 4.5，沉淀核酸核蛋白，再将 RNA 与蛋白质分开。

1) 乙醇沉淀法：将核糖核酸蛋白溶于碳酸氢钠溶液中，用含少量乙醇的氯仿长时间连续地震荡多次，除去蛋白质，RNA 留在水溶液中，加入乙醇使 RNA 以钠盐的形式沉淀下来。

2) 盐酸胍和去污剂分离法：在 2mol/L 的盐酸胍溶液中 38℃，大部分蛋白质溶解，再冷至 0℃左右，RNA 便从溶液中沉淀出来，将 RNA 与蛋白质分离。但是，蛋白质常除不

干净，要用氯仿法进一步处理。

3) 酚法：利用含水的酚溶液沉淀蛋白质和 DNA，经离心分离得到含有 RNA 和多糖的水相，再将水相加入乙醇，沉淀出 RNA 和多糖，沉淀溶于磷酸缓冲液中，用 2-甲氧基乙醇提取 RNA，透析，再用乙醇沉淀 RNA。

(二) DNA 的提取与制备

DNA 在生物体内与蛋白质结合成核蛋白，因此提取出脱氧核糖核蛋白后，必须将其中蛋白质除去。虽然小牛胸腺、鱼类精子和植物种子的胚等含有丰富的 DNA 是提取 DNA 的良好材料，但这些材料量少，有些材料难于得到。猪的脾、肝、肾等脏器易于大量得到，且脾脏 DNA 含量较高，得率为组织重的 0.6%，比肝脏、肾脏高 3~4 倍，因此可用此作为原料。

动物、植物组织的脱氧核糖核蛋白可溶于水或高浓度的氯化钠溶液，DNA 核蛋白在 1mol/LNaCl 溶液溶解，但在 0.14mol/LNaCl 溶液溶解度很低，而核糖核蛋白溶于 0.14mol/LNaCl 溶液中，因此利用这些性质可将脱氧核糖核蛋白与核糖核蛋白和其他杂质蛋白简单分开，分离得到核蛋白需再进一步将蛋白质除去，常用的去蛋白的方法有以下三种：

1、用含有辛醇或异戊醇的氯仿震荡蛋白溶液，使之乳化，然后离心除去变性蛋白质，此时蛋白质停留在水相及氯仿相中间，而 DNA 溶于上层水相，再用 2 倍体积 95% 冷乙醇可将 DNA 钠盐沉淀出来。

2、用 SDS（十二烷基硫酸钠）等去污剂使蛋白质变性，可以直接从生物材料中提取 DNA。

3、先用苯酚处理，然后离心分层，DNA 溶于上层水相中，或留在中间残留物中，变性的蛋白质则留在酚层内。用 SDS 和苯酚作蛋白质变性剂来分离核酸，它们同时可以破坏 DNA 酶和 RNA 酶，有利于提取。

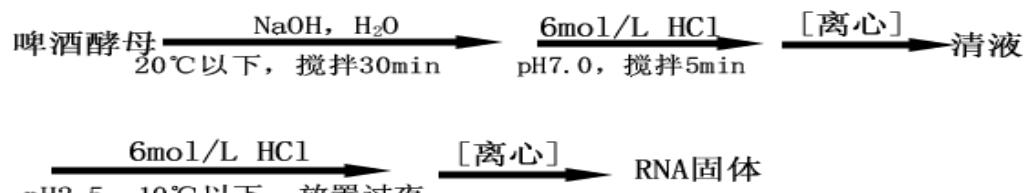
提取、纯化核酸要注意保持核酸的完整性，如果所得到的核酸已经降解，则结构与功能的研究就难以得到正确的结果。由于核酸相当不稳定，在剧烈的化学因素、物理因素和酶的作用下很容易降解，因此在制备核酸时，应防止过酸过碱和酶的降解作用。在提取过程中为了防止酶的降解，全部过程最好在 0~4℃ 下操作，必要时加入酶抑制剂，抑制酶的

降解作用，如柠檬酸盐、氟化物、砷酸盐、乙二胺四乙酸盐等可抑制 RNA 酶的活性，皂土可抑制 DNA 酶的活性。

三、核酸的提取实例

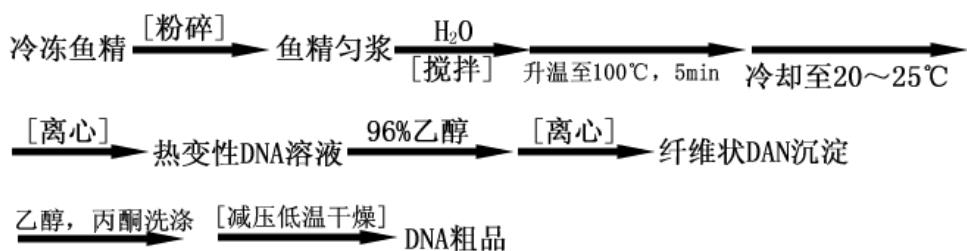
1、RNA 的提取

啤酒酵母是提取 RNA 的很好的资源。取 100g 压榨啤酒酵母(含水 70%)，加入 230ml 含 NaOH 3g 的水，20℃以下搅拌 30min。用 6mol/L HCl 调至 pH7，搅拌 15min，离心得上清液 255ml。冷至 10℃以下，6mol/L HCl 调 pH2.5，置冷过夜，离心得 RNA1.8g(纯度 80%)。



1. DNA 的提取

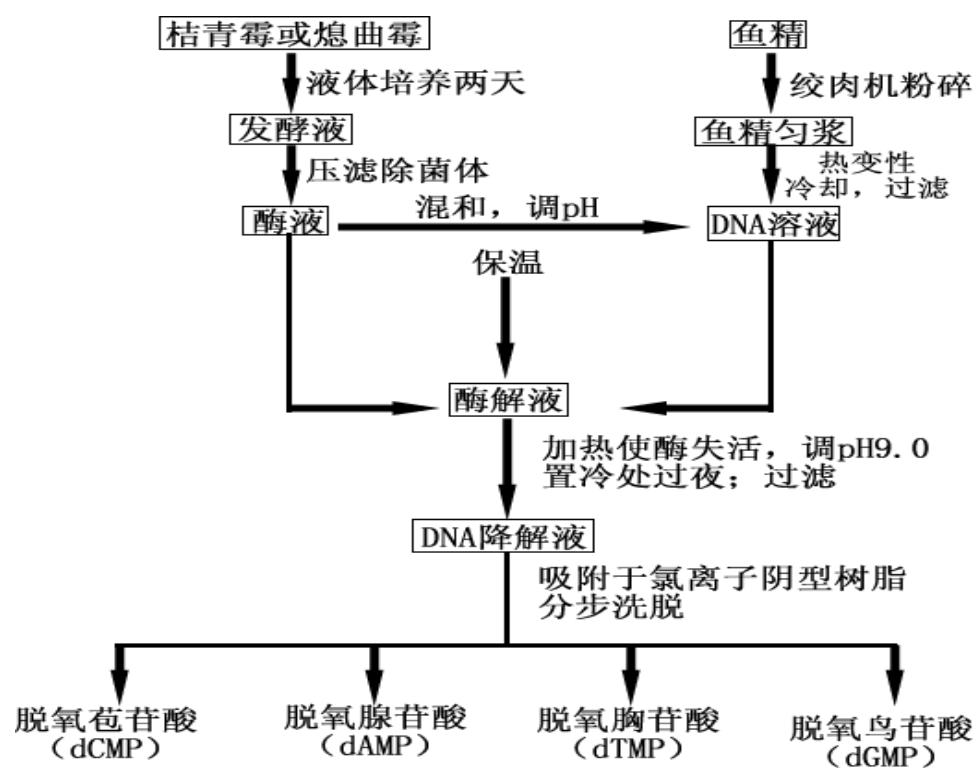
取新鲜冷冻鱼精 20kg，用绞肉机粉碎 2 次成浆，加入等体积水，搅拌均匀，倾入反应锅内，缓慢搅拌，升温至 100 °C，保温 5min，迅速冷却至 20~25 °C，离心去除鱼精蛋白等沉淀物，共获得 35L 含热变性 DNA 溶液。加乙醇沉淀，乙醇、丙酮洗涤，低温干燥，可得到固体 DNA 产品。



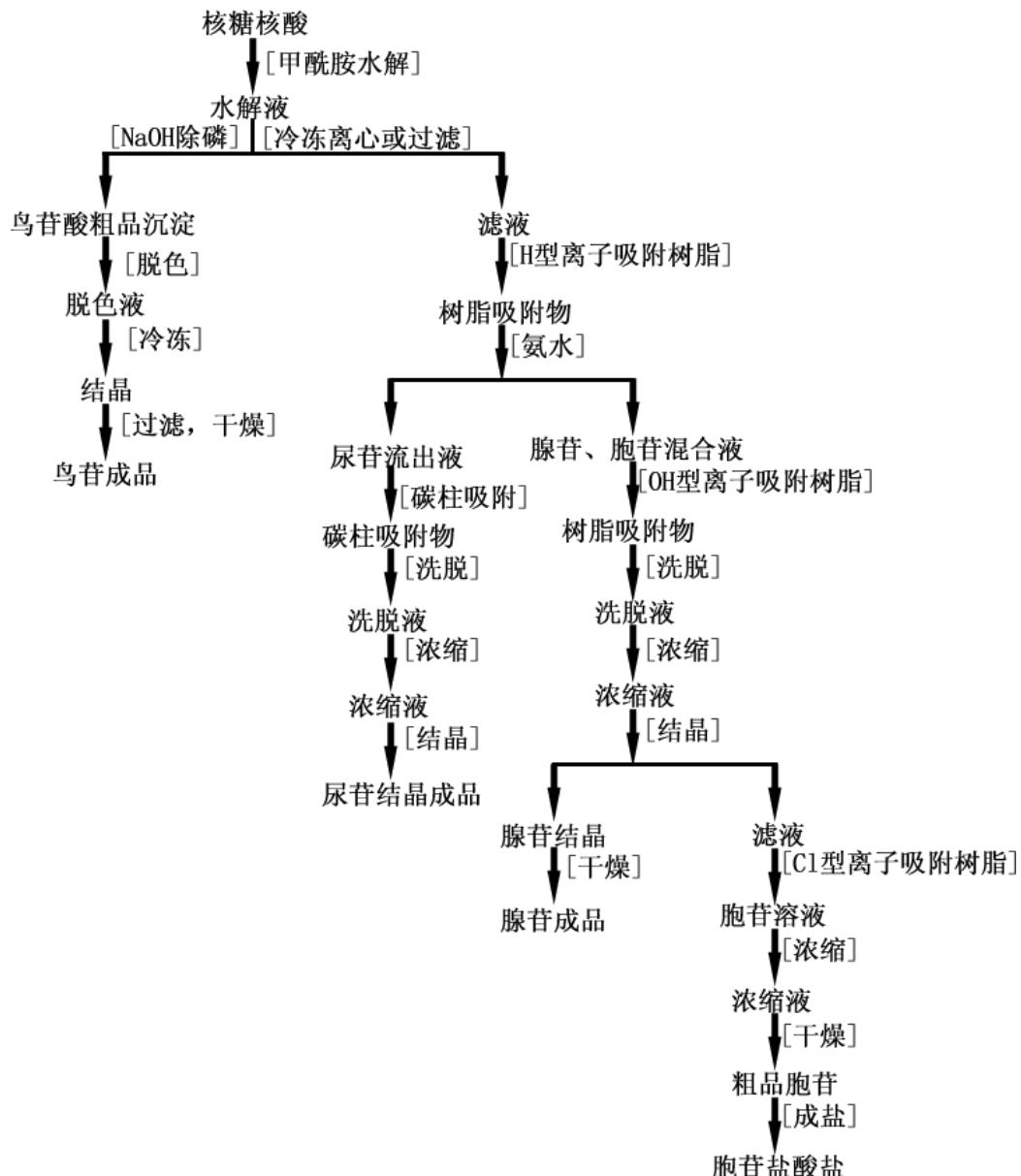
2. 具有生物活性 DNA 的制备

动物内脏加 4 倍量生理盐水经组织捣碎机捣碎 1min，匀浆于 2500rpm 离心 30min，沉淀用同样体积的生理盐水洗涤 3 次，每次洗涤后离心，将沉淀悬浮于 20 倍量的冷生理盐水中，再捣碎 3min，加入 2 倍量 5% 十二烷基磺酸钠，并搅拌 2~3 小时，在 0 °C 2500rpm 离心，在上层液中加入等体积的冷乙醇，离心即可得纤维状 DNA，再用冷乙醇和丙酮洗涤，减压低温干燥得粗品 DNA。

3、酶解法制备脱氧核糖核酸



4、RNA 化学水解法制备核苷

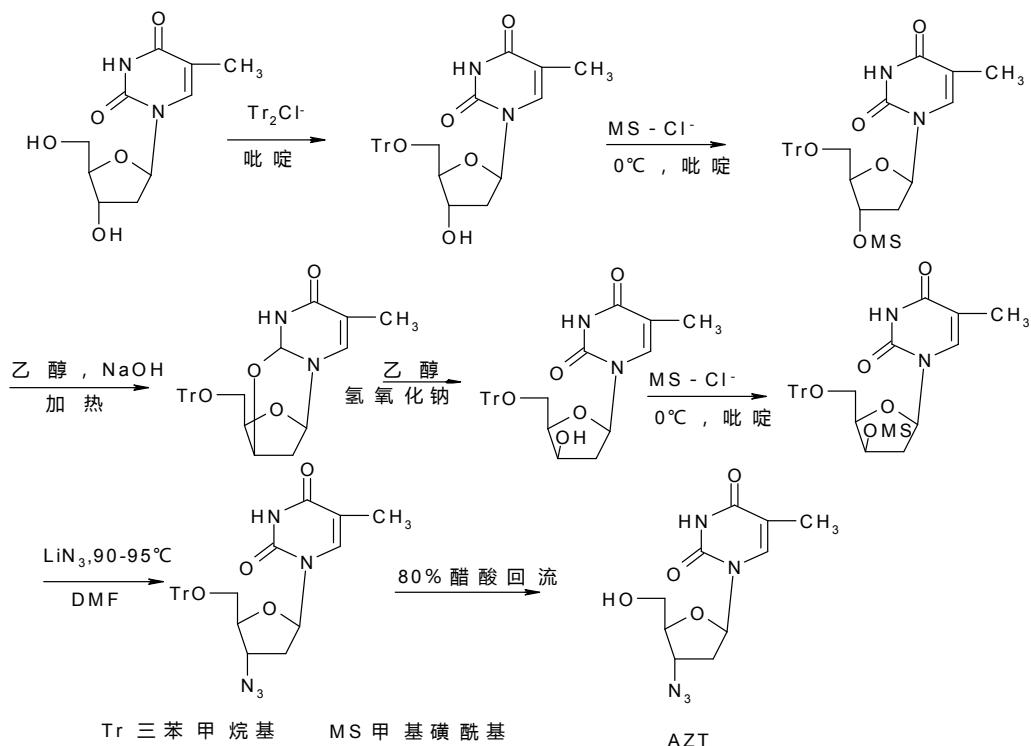


四、常用核酸药物制备

1、叠氮胸苷（AZT）

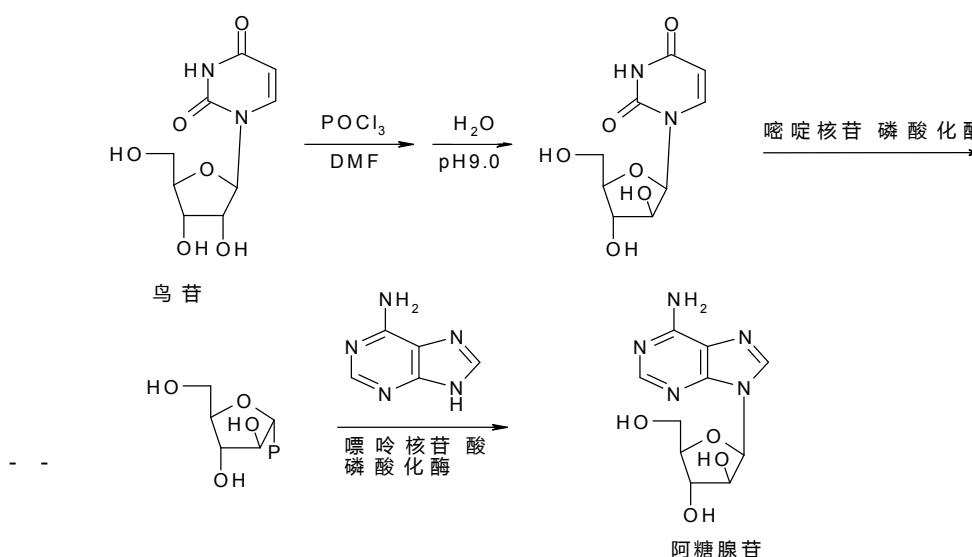
AZT 是治疗艾滋病的新药。化学名为 3' -叠氮-2' -脱氧胸腺嘧啶核苷，商品名为 Refrovir。68% 的病人临床表现为减轻症状，延长寿命的显著效果，常见副作用为贫血，白血球减少，部分病人骨髓坏死等。AZT 的药理作用是在体内经磷酸化后生成了 3' -叠氮-2' -脱氧胸腺嘧啶核苷酸，取代了正常的胸腺嘧啶核苷酸参与病毒 DNA 的合成，含有 AZT 成分 DNA 不能继续复制，从而达到阻止病毒增殖的目的。

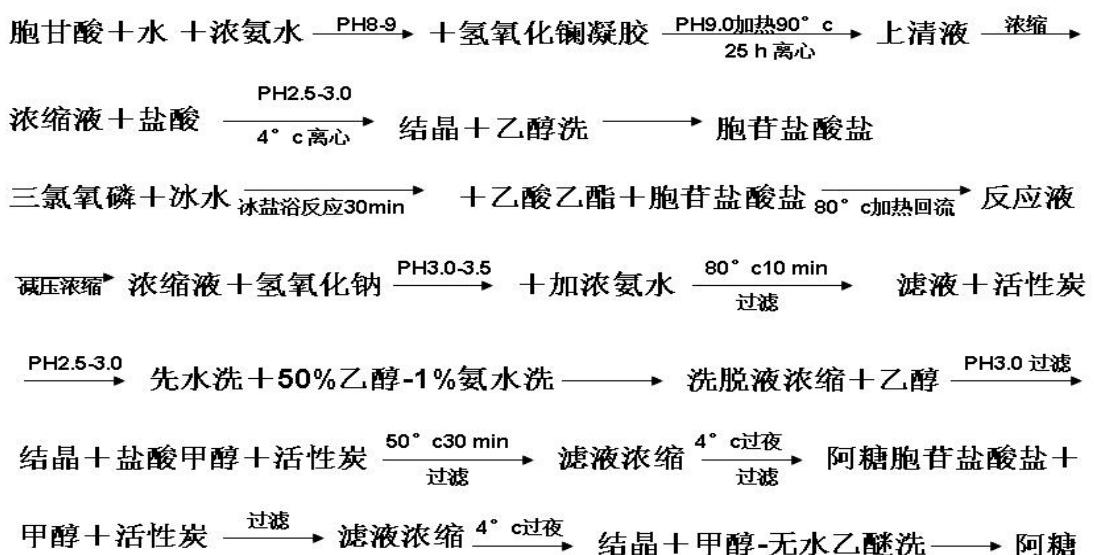
生产工艺如下：



2、阿糖腺苷

阿糖腺苷的化学名称为 9- β -D-阿拉伯呋喃糖腺嘌呤。阿糖腺苷是近年来引人注目的广谱 DNA 病毒抑制剂，对单纯疱疹 I 、 II 型，带状疱疹，巨细，牛痘等 DNA 病毒，在体内外都有明显抑制作用。阿糖腺苷在体内受激酶作用下生成阿糖腺三磷，是脱氧腺三磷（dATP）的拮抗物，从而抑制了以 dATP 为底物的病毒 DNA 聚合酶的活力。制备工艺如下：



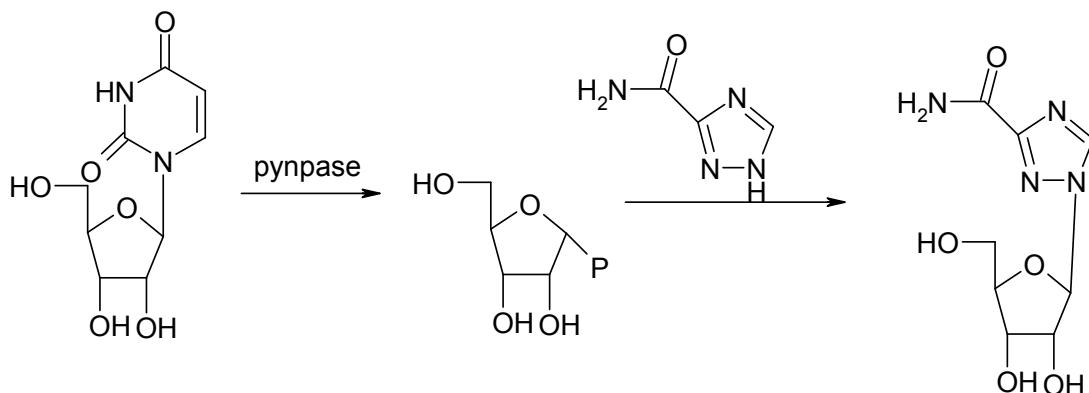


胞昔盐酸盐

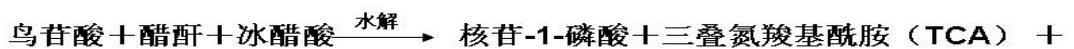
3、三氮唑核昔 (Ribavirin, 利巴韦林)

三氮唑核昔商品名为病毒唑，对 DNA 病毒，RNA 病毒都具有广泛作用。三氮唑核昔除了主要应用于小儿呼吸系统的疾病治疗以外，已用于猩红热、流感以及爱滋病的治疗，特别是在临幊上能明显改善患者症状，而且毒副作用比 AZT 小，药物价格与 AZT 相差 50 倍。在体内被磷酸化成三氮唑核昔酸，抑制肌昔酸脱氧酶阻断鸟昔酸的生物合成，从而抑制病毒 DNA 合成。

酶合成法制备是以各种核昔为底物，在嘌呤核昔磷酸化酶 (Pynpase) 催化下水解生成核糖-1-磷酸，再与 TCA 反应、直接生成三氮唑核昔，工艺如下：



制备工艺路线：



在两步反应中用同一种嘌呤核苷磷酸化酶，由于降解产物次黄嘌呤对酶比 TCA 具有更大的亲和性，致使次黄嘌呤再与核糖-1-磷酸缩合，可逆反应促使总收率仅 20%左右，这是采用菌种所产生的酶的局限性。为解决这一问题，设计了 2 种直接生产的方法，即采用前段与后段由两个不同的酶催化，即前段使用嘧啶核苷磷酸化酶（upase），后段使用嘌呤核苷磷酸化酶（Pympase），而且已经筛选到一株同时产生这两种酶的菌株，即产气肠杆菌。以尿苷或胞苷为底物时，使用产气肠杆菌，菌株经 24h 培养，经收集菌体后在 60℃ 反应 96h，可获得较高产率的三氮唑核苷。前段及后段反应均利用嘌呤核苷磷酸化酶，但注意到使用的底物含有溶解度很小的嘌呤碱基的核苷或者生成的降解产物在后阶段反应时它对酶的亲和力要比 TCA 低得多。如使用鸟苷、肌苷、黄苷为底物。

第六章 酶类药物的制备技术

第一节 概述

一、酶类药物的简介

酶是生物体内广泛存在的重要生化物质，它们不但具有各种各样的生理生化功能，而且是很重要的生化药物和保健品及工业制剂。早在几千年前，我国人民就用微生物酿酒制酱。中药的神曲，就是用面粉、杏仁、赤小豆、苍耳等调和，经发酵而制成。酶在自然界中只存在于生物体，因此酶类生化产品主要是从动物的腺体、组织和体液中制取，植物中分离的酶较少（如菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶等），微生物产生的酶非常丰富，有人推测有 1300 多种，它们繁殖快、产量高、成本低，又不受自然条件限制，是非常有前途的资源，已从微生物中制得的酶有 50 多种。有的酶始终保存在菌体细胞内叫胞内酶，在提取时应破坏细胞，使酶从细胞中释放出来；有的酶在生长过程中，不断地分泌到培养基中，

叫胞外酶，它比胞内酶容易提取，一般采用离子交换、凝胶过滤、超速离心等方法进行分离。

酶及辅酶是我国生化产品中发展较快的一类，已正式投入生产的约有二十多种，载入药典有十多种。

二、酶类药物的组成及分类

酶是生物细胞合成的，具有高效、专一催化活力的一类特殊蛋白质。它以单纯蛋白质和结合蛋白质两种类型存在。单纯蛋白质酶是由完全蛋白质构成，而结合蛋白质酶是指由蛋白质和非蛋白质部分组成。非蛋白部分与酶蛋白结合较松，极易脱落，可以透析分离的叫辅酶；而与酶蛋白部分结合较紧，不能分开的小分子部分则叫辅基。虽然酶蛋白同蛋白质在化学性质上有诸多共同之处，但酶本身具有一定的特殊性，因此在分离提取中有独特的要求。

三、酶类药物的应用

酶是生物催化剂，利用它的专一性和催化作用，能巧妙地完成许多复杂的化学反应，例如淀粉转化生产葡萄糖，应用淀粉酶转化率可达 97% 以上，在临幊上酶类生化产品的用途：

- 1、助消化酶类生化产品：如胃蛋白酶、胰酶、凝乳酶、纤维素酶和麦芽糖酶等。
- 2、消炎酶生化产品：蛋白酶用作抗炎剂已有多年的历史，至今作用机制尚未完全弄清，有的认为是直接作用于炎症时产生纤维蛋白原、活性多肽，有的认为是提高内源性抗蛋白酶的活性，促使抗炎多肽的生成。溶解粘痰作用的酶有脱氧核糖核酸酶，为良好的酶类祛痰药；胶原蛋白酶用于治疗溃疡、褥疮；木瓜凝乳蛋白酶用于治疗椎间盘突出症；胰蛋白酶还用于治疗毒蛇咬伤。
- 3、心血管疾病治疗酶类生化产品：弹性蛋白酶能降低血脂，用于防治动脉粥样硬化；激肽释放酶有扩张血管、降低血压作用；如尿激酶、链激酶、纤溶酶及蛇毒溶栓酶对溶解血栓有独特效果；凝血酶可用于止血。
- 4、抗肿瘤酶类生化产品：L-门冬酰胺酶用于治疗淋巴肉瘤和白血病。
- 5、其他酶类生化产品：超氧化物歧化酶（SOD）用于治疗类风湿性关节炎和放射病；

细胞色素 C 用于组织缺氧急救，透明质酸酶用于药物扩散剂；青霉素酶用于治疗青霉素过敏。

6、辅酶类生化产品：辅酶或辅基在酶促反应中起着递氢、递电子或基团转移作用，对酶的催化作用的化学反应方式起着决定性作用，多种酶的辅酶或辅基具有医疗价值，如辅酶 A 等广泛用于冠心病和肝病的治疗。

7、临床诊断酶类生化产品：酶还可以作为临床诊断试剂，用它测定体液内各种组分，如葡萄糖、胆固醇、三酰甘油等，具有方便、正确、快速、灵敏等优点。诊断用酶作为我国急需开发的一个新领域，受到了各方面的重视，也是生化产品制备的重要内容。

第二节 酶类药物生化产品的提取分离方法

酶的提取分离一般包括五个基本步骤：即原料的选择、酶生物原料的预处理、提取、纯化、结晶或制剂。

酶是蛋白质，所以用于提取和分离纯化蛋白质的方法都适用于酶，各种预防变性的措施也同样适用于酶。但在酶的提取分离纯化过程中，应注意工艺的特殊要求。在总的纯化要求上，蛋白质分离始终在温和条件下进行，而酶的分离，在不破坏酶的活力的限度内，可以采用“猛烈”手段，尽可能除去一切杂质。当有酶的作用底物、抑制剂等物质存在时，酶的理化性质及稳定性会有所变化，如有底物蔗糖存在时，蔗糖转化酶能经受更高的温度。这是底物对酶起保护作用，使活性中心不被破坏的主要原因。

酶具有催化活性，这是选择提纯方法和操作条件的指标，在整个酶的提取和纯化过程中，应随时测定酶的总活力和比活力，了解每一步的收率和纯度，分析和决定下一步工艺的取舍步骤。

一、酶类药物的原料选择

1、选用原料应注意以下几点：

1) 不同酶的用料选择：哪里含量高选哪，如乙酰化酶在鸽肝中含量高，凝血酶选牛血，溶菌酶用蛋清。

2) 注意不同生长发育情况及营养状况，用微生物制酶，由于菌体产量不同，故需测其活力来决定取酶阶段；用动物器官提取酶，则与动物年龄及饲养条件有关。

3) 从原料来源是否丰富考虑。

4) 从简化提纯步骤着手。

5) 如用动物组织作原料，则此动物宰杀后应立即取材。

从动物或植物中提取酶受到原料的限制，随着酶应用日益广泛和需求量的增加，工业生产重点已逐渐转向微生物。用微生物发酵法生产药用酶，不受季节、气候和地域的限制，生产周期短，产量高，成本低，能大规模生产。

2、微生物酶制剂高产菌株的选育

菌种是工业发酵生产酶制剂的重要条件，与增加品种、缩短生产周期、改进发酵和提纯工艺条件等密切相关。优良菌种的获得有三条途径：

①是从自然界分离筛选：

②是用物理或化学方法处理、诱变；

③是用基因重组与细胞融合技术。因此微生物的分离筛选是一切工作的基础。

3、微生物酶制剂生产的发酵技术：首先要合理选择培养方法、培养基、培养温度、pH 和通气量等。还要研究酶的分离提纯技术和制备工艺。

1) 原料：利用微生物生产酶制剂的主要原料为碳源和氮源，此外还有无机盐、生长因素和产酶促进剂等，如果添加少量某种物质就能明显增加酶的产量时，这类物质通称为产酶促进剂，它们大多属于酶的诱导物或表面活性剂。

固体培养法亦称麸曲培养法，该法是利用麸皮或米糠为主要原料，另外需要添加其它谷糠、豆饼等，加水拌成含水适度的半固态物料作为培养基；液体培养法是利用液体培养进行微生物的生长繁殖和产酶。根据通气（供氧）方法的不同，又分为液体表面培养和液体深层培养两种。

2) 影响酶产生的一些因素：菌种的产酶性能是决定发酵效果的重要因素，但是发酵工艺条件对产酶的影响也是十分明显的。

①温度：一般发酵温度比种子培养时略高些，这样对产酶有利。

②pH：可用糖或淀粉调节，pH低则可用氨来调节。

③通气（供氧）临界氧浓度，氧必须是溶解于培养基中的氧。

④搅拌：增加液体湍流速度，减少气泡周围液膜厚度，有利于促进细胞的新陈代谢。

⑤泡沫和消沫剂：由于培养基中蛋白质分子排在气泡表面形成一层吸附膜，聚集成泡沫层之故。

⑥添加诱导剂和抑制剂：诱导酶的合成，诱导酶是该酶作用底物或者是其类似物，抑制剂促进酶的形成，加入适量表面活性剂。

二、酶类药物生物材料的预处理

（一）动物材料的预处理

1、机械处理：用绞肉机绞，在实验室常用的是玻璃匀浆器和组织捣碎器，一般细胞并不破碎，有的酶必须细胞破碎后才能有效地提取。

2、反复冻融：冷确到-10℃左右，再缓慢溶解至室温，如此反复多次，由于细胞中冰晶的形成，及剩下液体中盐浓度的增高，能使细胞中颗粒及整个细胞破碎，从而使某些酶释放出来。

3、丙酮粉：组织经丙酮迅速脱水干燥制成丙酮粉，不仅可减少酶的变性，同时因细胞结构成分的破碎使蛋白质与脂质结合的某些化学键打开，促使某些结合酶释放到溶液中，常用的方法是将组织糜或匀浆悬浮于0.01mol/L，pH6.5的磷酸缓冲液中，在0℃下一边搅拌，一边缓慢倒入10倍体积的-15℃无水丙酮内，10min后，离心过滤取其沉淀物，反复用冷丙酮洗几次，真空干燥即得丙酮粉，丙酮粉在低温下可保存数年。

（二）微生物的预处理

若酶是胞外酶，则可除去菌体后再直接从发酵液中吸附提取酶，但对胞内酶则需将菌体细胞破壁，制成无细胞的悬液后再进行提取，菌体用生理盐水洗涤除去培养基后，应冷冻保存。

1、干燥法：因为干燥常能导致细胞自溶，增加酶的释放，从而在后处理中破壁不必太剧烈就能达到预期目的。①空气干燥25~30℃。②真空干燥还原剂作保护剂。③冷冻干燥对较敏感的酶宜用此法。

2、机械法：常用的方法有研磨法，组织匀浆法，超声波法，高压匀浆法等。

3、酶法处理：用得最多的是溶菌酶，如在 37℃，pH8.0 下对小球菌进行破壁处理，历时 15 分钟，即可提取核酸酶，也有用脱氧核糖核酸酶处理，操作与溶菌酶相同。

三、酶类药物的提取

1、水溶液法：常用稀盐溶液或缓冲液提取。一般在低温下操作，在酸性条件下稳定的酶要在酸性条件下提取，一般来说，碱性蛋白酶用酸性溶液提取，酸性蛋白酶用碱性溶液提取。盐浓度一般以等渗为好，相当于 0.15mol / L NaCl 的离子强度是最适宜于酶的提取。

2、有机溶剂法：某些结合酶如微粒体和线粒体膜的酶，由于和脂质牢固结合，为此必须除去结合的脂质且不能使酶变性，最常用的有机溶剂是丁醇。

3、表面活性剂法：表面活性剂能与蛋白质结合而分散在溶液中，故可用于提取结合酶。

4、酶制剂的工业提取法：

①发酵液的预处理及过滤：微生物发酵液的分离，过滤，发酵液中加絮凝剂或凝固剂，絮凝剂有聚丙烯酰胺、右旋糖酐和聚谷氨酸。

②酶液的脱色：活性炭、脱色树脂。

③盐析法：用得最多的是 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，在常温下不会造成酶的失活，若分级沉淀应用得当，杂蛋白杂质也较少。

④有机溶剂法：有机溶剂沉淀蛋白质的能力为丙酮 > 异丙醇 > 乙醇 > 甲醇，工业上通常采用乙醇作为沉淀剂。

⑤喷雾干燥直接制备粉末酶制剂：喷雾干燥用于干燥菌体，药用酶常用冷冻干燥。

四、酶类药物的纯化

1、杂质的除去：酶提取液中，除所需酶外，还含有大量的杂蛋白、多糖、脂类和核酸等。

1) pH 和加热沉淀法

2) 蛋白质表面变性法：利用蛋白质表面变性性质的差别，也可除去杂蛋白，加入氯

仿和乙醇进行震荡，可以除去杂蛋白。

3) 选择性变性法：利用蛋白质稳定性的不同，除去杂蛋白，甚至可用 2.5%三氯乙酸处理。

4) 核酸沉淀剂法：用核酸酶，将核酸降解成核苷酸，使粘度下降便于离心分离，或用核酸沉淀剂如三甲基十六烷基溴化铵、硫酸链霉素、聚乙烯亚胺、鱼精蛋白和二氯化锰等沉淀核酸，降低粘度。

5) 将酶与底物结合：酶和底物结合或竞争性抑制剂结合后，热稳定性大大提高，这样就可用加热法除去杂蛋白。

2、脱盐和浓缩

1) 脱盐：脱盐方法有透析和凝胶过滤。

2) 浓缩：酶的浓缩方法很多，包括冷冻干燥、离子交换、超滤、凝胶吸水、聚乙二醇吸水等。

3、酶的结晶：把酶提纯到一定纯度以后（通常纯度应达 50%以上），可使其结晶，这为研究蛋白质空间结构提供 X 射线衍射样品。

1) 酶的结晶方法：酶的结晶方法主要是缓慢地改变酶蛋白的溶解度，使其略处于过饱和状态。

①盐析法：操作要在低温下进行，加盐，缓冲液 pH 要接近酶的等电点，多数酶就可形成结晶，有时也可交替置在 4℃冰箱中和室温下来形成结晶。

②有机溶剂法：酶液中滴加有机溶剂，有时也能使酶形成结晶。一般要含少量无机盐的情况下，选择使酶稳定的 pH，缓慢地滴加有机溶剂，使用的缓冲液一般不用磷酸盐，而用氯化物或乙酸盐。

③复合结晶法：有时可以利用某些酶与有机化合物或金属离子形成复合物或盐的性质来结晶。

④透析平衡法：利用透析平衡进行结晶也是常用方法之一。

⑤等电点法

2) 结晶条件的选择

①酶的纯度：酶的纯度越高，结晶越容易形成，长成大的单晶可能性也越大，结晶对酶有明显的纯化作用。

②酶的浓度：酶的浓度越高，结晶越容易形成。

③温度：结晶的温度通常在4℃下或室温25℃下，低温条件下酶不仅溶解度低，而且不易变性。

④时间：结晶形成的时间，数小时到几个月，有的甚至需要1年或更长时间。一般来说，较大而性能好的结晶是在生长慢的情况下得到的，一般希望使微晶的形成快些，然后慢慢地改变沉淀条件，再使微晶慢慢长大。

⑤pH：调整pH可使结晶长到最佳大小，也可改变晶形。结晶溶液pH一般选择在被结晶酶的等电点附近。

⑥金属离子：许多金属离子能引起或有助于酶的结晶，在酶的结晶过程中常用金属离子有Ca²⁺、Zn²⁺、Co²⁺、Cu²⁺、Mg²⁺、Mn²⁺、Ni²⁺等。

⑦晶种：不易结晶的蛋白质和酶，有的需加入微量的晶种才能结晶。

⑧结晶器皿处理：结晶用的器皿要充分清洗、烘干，使用前用结晶母液再冲洗一次。结晶的玻璃器皿，可用硅涂料进行表面处理，以使表面光滑且不润湿，这样可减少晶核数目，形成大的结晶。

4、酶分离和纯化工作的注意事项

- 1) 防止酶蛋白变性。
- 2) 防止辅因子的流失。
- 3) 防止酶被蛋白水解酶降解。

第三节 酶类药物

早期酶制剂主要用于治疗消化道疾病，烧伤及感染引起的炎症疾病，现在国内外已广泛应用于多种疾病的治疗，其制剂品种已超过700余种。

一、胃蛋白酶的制备

胃蛋白酶广泛存在于哺乳类动物的胃液中，药用胃蛋白酶系从猪、牛、羊等家畜的胃粘膜中提取。

1、结构与性质：药用胃蛋白酶是胃液中多种蛋白水解酶的混合物，含有胃蛋白酶、组织蛋白酶、胶原酶等，为粗制的酶制剂。水溶液呈酸性，难溶于乙醇、氯仿等有机溶剂。pI 为 pH1.0，最适 pH1.5~2.0。可溶于 70% 乙醇和 pH4 的 20% 乙醇中。胃蛋白酶能水解大多数天然蛋白质底物。

2、生产工艺

1) 工艺路线：胃蛋白酶原盐酸催化激活成胃蛋白酶。常用的脱脂剂有乙醚、氯仿、四氯化碳。



2) 工艺过程：

①自溶、过滤：在夹层锅内预先加水 100L 及盐酸，加热至 50℃时，加入 200kg 猪胃粘膜，快速搅拌使酸度均匀，保持 45~48℃，消化 3~4 小时。用纱布滤去未消化的组织蛋白，收集滤液。

②脱脂、去杂质：将滤液降温至 30℃以下，静置 24~48h，使杂质沉淀除去，得到脱脂酶液。

③浓缩干燥：取脱脂酶液，在 40℃以下浓缩到原体积的 1/4，真空干燥，球磨，得到产品。

④结晶胃蛋白酶的制备：药用胃蛋白酶原粉，溶于 20% 酒精中，加 H₂SO₄ 调 pH3.0，5℃静置 20h 后过滤，加硫酸镁至饱和，进行盐析。盐析物在 pH3.8~4.0 的乙醇中溶解，过滤，滤液用硫酸调 pH 至 1.8~2.0，即析出针状胃蛋白酶。沉淀再溶于 20% pH4 的乙醇中，过滤，滤液用硫酸调 pH 至 1.8，在 20℃放置，可得板状或针状结晶。

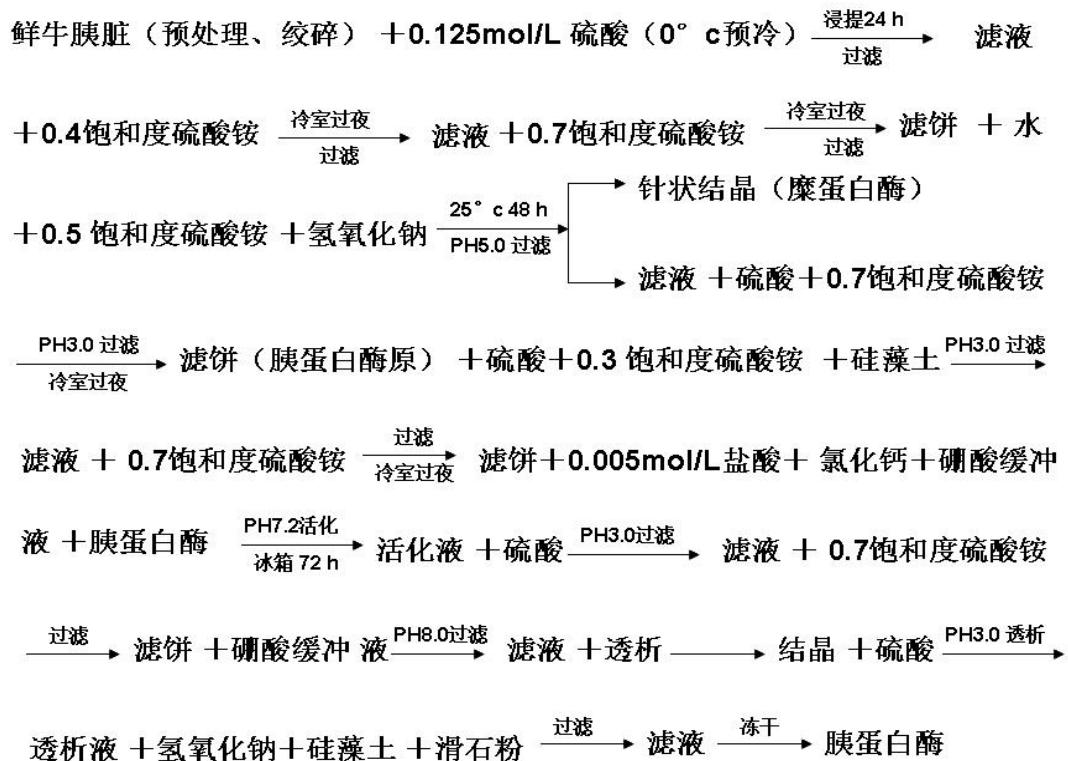
二、胰蛋白酶的制备

1、结构与性质：胰蛋白酶是从牛、羊胰脏提取、结晶得的冻干制剂，易溶于水，不溶于氯仿、乙醇、乙醚等有机溶剂；在 pH1.8 时，短时煮沸几乎不失活，在碱溶液中加热

则变性沉淀， Ca^{2+} 对其有保护和激活作用，胰蛋白酶的 pI 为 10.1。牛胰蛋白酶在肠激酶或自身催化下，释放出 6 肽，变成有活性的胰蛋白酶。胰蛋白酶分子量 24000，由 223 个氨基酸残基组成，胰蛋白酶专一作用于由碱性氨基酸精氨酸及亮氨酸羧基所组成的肽键。

2、生产工艺

1) 工艺路线：



三、尿激酶的制备

尿激酶是一种碱性蛋白酶。由肾脏产生，主要存在于人及哺乳动物的尿中。人尿平均含量 5~6 国际单位 / ml。

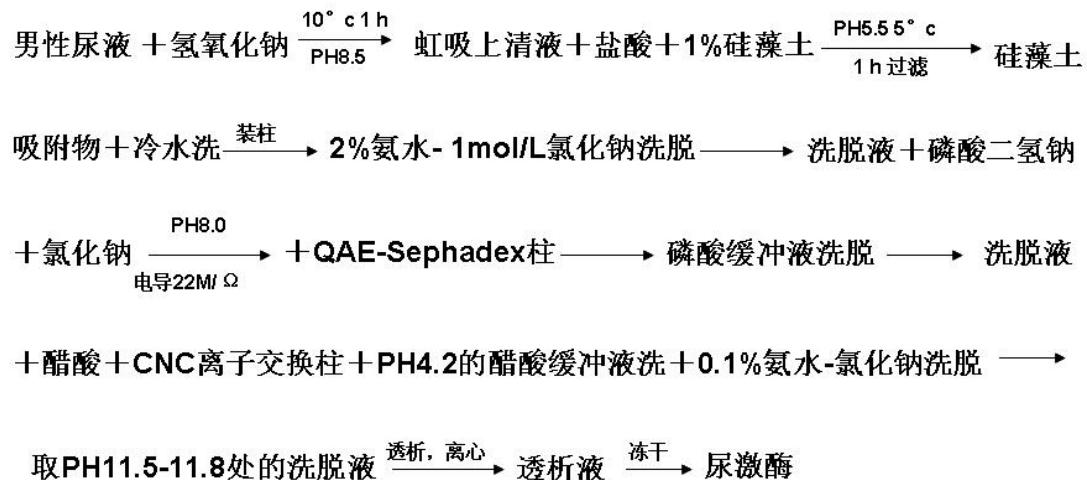
1、结构与性质

- 1) 尿激酶有多种分子量形式。尿中的尿胃蛋白酶原，在酸性条件下可以激活生成尿胃蛋白酶，把天然尿激酶降解成为尿激酶。
- 2) 尿激酶是专一性很强的蛋白水解酶，血纤维蛋白溶酶原是它唯一的天然蛋白质底物，它作用于精氨酸-缬氨酸键使纤溶酶原转为纤溶酶，尿激酶也具有酯酶活力。
- 3) 尿激酶的 pI 为 pH8~9，主要部分在 pH8.6 左右。溶液状态不稳定，冻干状态可稳

定数年，加入 1%EDTA、人血白蛋白或明胶可防止酶的表面变性作用。

2、生产工艺

1) 工艺路线：



2) 工艺过程：

- ① 收尿：收集男性尿。
- ② 沉淀处理：尿液冷至 10℃ 以下，用 NaOH 调 pH 至 8.5，静置 1h，虹吸上清液。用盐酸调至 pH5.0~5.5。
- ③ 硅藻土吸附：处理好的尿液加入 1% 尿量的硅藻土，于 5℃ 下搅拌吸附 1h。
- ④ 洗脱：硅藻土吸附物洗涤装柱，先用 0.02% 氨水加 0.1mol/L 氯化钠洗脱，当洗脱液由清变混时开始收集。
- ⑤ 除热源、去色素。
- ⑥ 浓缩。
- ⑦ 透析除盐。

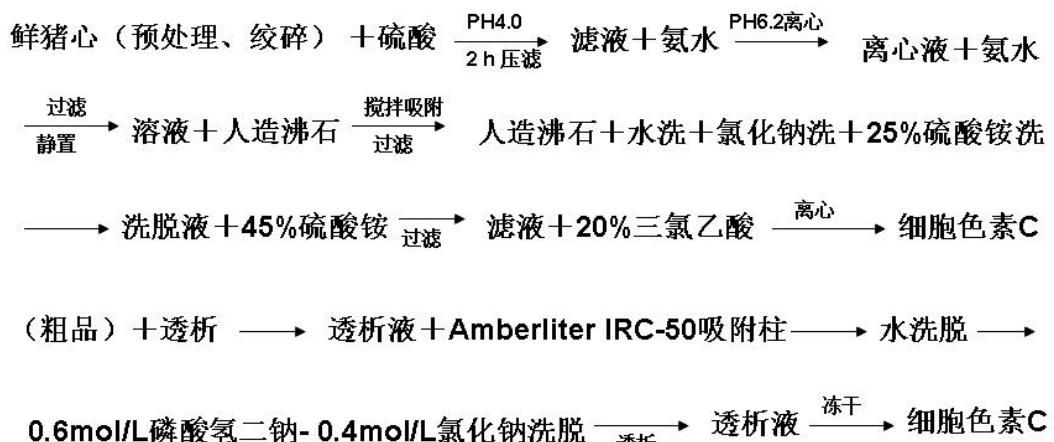
四、细胞色素的制备

细胞色素 C 存在于自然界中一切生物细胞里，其含量与组织的活动强度成正比。以哺乳动物的心肌、鸟类的胸肌和昆虫的翼肌含量最多，肝、肾次之，皮肤和肺中最少。

1、结构与性质：细胞色素 C 是含铁卟啉的结合蛋白质，铁卟啉环与蛋白质部分比例为 1:1。猪心细胞色素 C 分子量 12200。pI 为 10.2~10.8。细胞色素 C 对干燥、热和酸都

较稳定。氧化型水溶液呈深红色，在饱和硫酸铵中可溶解。还原型水溶液呈桃红色，溶解度较小。

2、生产工艺



3、工艺过程

1) 绞碎、提取、压滤：取新鲜或冷冻猪心，去血块、脂肪和肌健等，绞肉机中绞碎。称取心肌碎肉，加 1.5 倍量蒸馏水搅拌均匀，用硫酸调 pH4 左右，常温搅拌提取过滤，滤液用氨水调节 pH6.2，离心得提取液。滤渣再加等量蒸馏水同上法重复提取 1 次，合并两次提取液。

2) 中和、吸附、洗脱：提取液加氨水中和至 pH7.5，在冰箱中静止沉淀杂蛋白，吸取上层清液，每升提取液加入 10g 人造沸石，搅拌吸附 40min，静置弃去上层清液。收集吸附细胞色素 C 的人造沸石，用蒸馏水和氯化钠溶液反复洗涤，然后装柱，用 25% 硫酸铵溶液洗脱，得洗脱液。

3) 盐析、浓缩、透析：洗脱液加入固体硫酸铵达到 45% 饱和度，使杂蛋白析出，过滤。收集透明滤液，缓缓加入 20% 三氯醋酸，边加边搅拌使细胞色素 C 沉淀析出，离心收集沉淀。再将沉淀溶于蒸馏水，装入透析袋中，透析至无硫酸根为止，过滤得细胞色素 C 粗品溶液。

④吸附、洗脱、透析：粗品溶液通过处理好的 Amberite IRC-50 (NH_4^+) 树脂柱吸附，然后将树脂移入大烧杯中，水洗至澄清为止，再分别上柱，用 0.6mol/L 磷酸氢二钠与 0.4mol/L 氯化钠混合液洗脱，洗脱液用蒸馏水透析去氯离子，得细胞色素 C 精品溶液。

⑤制剂：取含相当于 1.5g 的细胞色素 C 精品液，加 200mg 亚硫酸氢钠，搅拌溶解再加双甘肽 1.5g 混合均匀，用氢氧化钠调节 pH6.4 左右，加注射用水 100ml，过滤除热原，6 号垂溶漏斗过滤，测含量，灌注，冷冻干燥，即得每支含 15mg 细胞色素 C 的制剂。

五、超氧化物歧化酶的制备

超氧化物歧化酶是一种重要的氧自由基清除剂，作为药用酶在美国、德国、澳大利亚等国已有产品。由于 SOD 能专一性去除超氧阴离子自由基，故引起国内外生化界和医药界的极大关注。目前临幊上应用集中在自身免疫性疾病上如类风湿关节炎，红斑性狼疮，皮肌炎等

1.组成性质：SOD 属金属酶，其性质不仅取决于蛋白质部分，还取决于活性中心金属离子的存在。按照金属离子的不同，SOD 有 Cu, Zn-SOD, Mn-SOD 和 Fe-SOD。SOD 是一种金属蛋白，因此它对热、pH 及在某些性质上表现出异常的稳定性。

①对热稳定性：SOD 对热稳定，天然牛血 SOD 在 75℃下加热数分钟，其酶活性丧失很小。但 SOD 对热稳定性与溶液的离子强度有关。

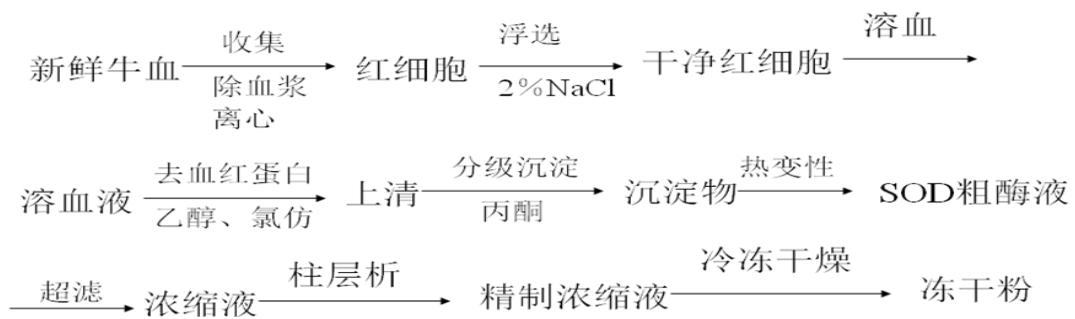
②pH 对 SOD 的影响：SOD 在 pH5.3~10.5 范围稳定。

③吸收光谱。

④金属辅基与酶活性：含金属配基 Cu 与 Zn, Zn 仅与酶分子结构有关，而与催化活性无关，而 Cu 与催化活性有关，透析法除去 Cu 则酶活性全部丧失，一旦重新加入 Cu，酶活性又可恢复。

2.生产工艺

分离纯化 SOD 常根据原料，种类和性质的差异而有所不同，牛红细胞提取 Cu, Zn-SOD 的生产工艺：



工艺过程：

- 1) 收集、浮选：取新鲜牛血，离心除去血浆。
- 2) 溶血、去血红蛋白：干净红细胞加水溶血 30min，然后加入 0.25 倍体积的乙醇和 0.15 倍体积的氯仿，搅拌 15min，离心除去血红蛋白，收集上清液。
- 3) 沉淀、加热变性：将上述上清液加入 1.2~1.5 倍体积的丙酮，产生大量絮状的沉淀，离心得沉淀物。再将沉淀物加适量水，离心除去不溶物，上清液于 60~70℃热处理 10min，离心除去沉淀得浅绿色的澄清液。
- 4) 柱层析、洗脱、超滤浓缩：将上述澄清液超滤浓缩后小心加到已用 2.5mmol/L, pH7.6 磷酸缓冲液平衡好的 DEAE—sephadex A50 柱上吸附，并用 pH7.6 的 2.5~50mmol/L 的磷酸盐缓冲液进行梯度洗脱，收集具有 SOD 活性的洗脱液。
- 5) 冷冻干燥。

第七章 糖类药物的制备技术

第一节 概述

糖是地球上存在的最丰富的一类有机化合物，也是数量最多的天然有机物。对大多数有机体来说，糖是它们最重要的“生活资料”，因为它是动物、人和许多微生物的主要能量来源，是生命的燃料。除此以外，糖还有许多其它重要的生物学功能。如淀粉和糖原是葡萄糖的临时贮存形式，即动植物的能量贮存物质；不溶性多糖——纤维素等，是植物的支撑组织和细胞壁的主要成分，甲壳动物的外骨骼也是由多糖组成。动物的结缔组织中含有许多的多糖。有些糖和蛋白质的复合物——糖蛋白，是细胞间的粘连剂，是骨关节等的润滑剂，是许多分泌物的重要成分。此外，有些糖是构成其他生物大分子的重要组成成分，如核糖和脱氧核糖。总之，糖是生物体中的一类重要生物分子。

糖是多羟基醛或多羟基酮以及可以水解产生这些化合物的物质的总称。糖是地球上最

丰富的生物分子，在各种生命形式中都具有多种功能。广义的糖可分为简单糖类和糖复合物。前者包括单糖、寡糖和多糖；后者包括糖与蛋白质、脂类等共价形成的复合物。

一、糖类药物的分类

单糖：葡萄糖、果糖、半乳糖等不能再水解的多羟基醛或多羟基酮。

低聚糖：含2~10个单糖结构的缩合物。以二糖最为多见，如蔗糖、麦芽糖、乳糖等。

多糖：含10个以上单糖结构的缩合物。如淀粉/纤维素等。

同多糖：组成单体糖基相同，例如淀粉、糖原、纤维素、几丁质。

杂多糖：组成的单体糖基有两种或两种以上。

储能多糖：淀粉、糖原等。

结构多糖：纤维素、几丁质等。

信号多糖：糖链。

还原性二糖：麦芽糖、纤维二糖、乳糖。

非还原性二糖：蔗糖、海藻糖。

来源于植物的多糖：黄芪多糖、人参多糖、刺五加多糖。

来源于动物的多糖：如肝素、透明质酸、硫酸软骨素。

来源于微生物的多糖：如猪苓多糖、灵芝多糖、香菇多糖。

二、糖类药物的作用

从微生物到高等动物的机体，都含有糖类物质。植物体中含量最丰富。多糖类药物的来源有动物、植物、微生物和海洋生物，它们在抗凝、降血脂、抗病毒、抗肿瘤、增强免疫功能和抗衰老具有较强的药理作用，在细胞内的存在方式有游离型与结合型两种。结合型多糖有糖蛋白、脂多糖。糖类在生物体中的作用有以下几个方面：合成其他物质、供作能源、充当结构性物质——纤维素。

1、低聚糖的生理功能与药理作用

1) 代热量、防止肥胖。

2) 抑制腐败细菌生长。大豆低聚糖在肠道被双歧杆菌吸收利用，被发酵降解成短链脂肪酸和一些抗菌素物质，抑制了外源致病菌和肠内固有腐败细菌的增殖，减少有毒发酵

产物及有害细菌酶的产生。

- 3) 促进肠道有益菌群的增殖：低聚果糖、低聚异麦芽糖的生理功能主要是通过促进肠道内人体有益细菌繁殖，优化菌群平衡来实现的。
- 4) 有一定的抗肿瘤活性：季铵化甲壳低聚糖对肿瘤的抑瘤率可达 54.71%。

2、多糖类具有多种生理活性：

1) 抗肿瘤和免疫促进活性：主要从多个途径激活机体免疫系统，表现为影响补体活性，促进淋巴细胞增殖，激活或提高吞噬细胞的功能。多糖的抗肿瘤作用活性是通过增强机体免疫功能来实现，增强机体的抗炎、抗氧化和抗衰老作用，如枸杞多糖、香菇多糖、云芝多糖、茯苓多糖、猪苓多糖、银耳多糖、红芪多糖、人参多糖以及海藻多糖等。

2) 抗感染作用：多糖可以提高机体组织细胞对细菌、原虫、病毒和真菌感染的抵抗力。

3) 抗病毒活性：多糖类尤其是硫酸多糖类，在结构上与细胞表面糖胺聚糖类似，竞争抑制病毒与细胞结合，同时又是许多细胞表面分子的模拟配体，能直接与细胞结合，阻碍病毒的吸附。

4) 抗凝血活性：肝素是天然抗凝剂，带有负电荷，甲壳素等也有抗凝血作用。

5) 抗氧化活性：多糖可通过提高抗氧化酶活性、清除自由基、抑制脂质过氧化，从而保护生物膜。

6) 降血脂抗动脉粥样硬化作用：类肝素、硫酸软骨素、小分子量肝素等具有降血脂、降血胆固醇，抗动脉粥样硬化作用，用于防治冠心病和动脉硬化。

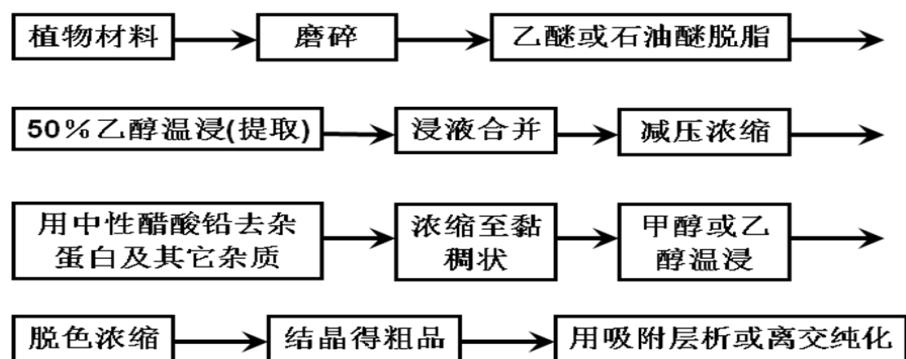
7) 抗辐射抗突变作用，抗射线的损伤，有抗氧化、防辐射作用。

总之，研究表明多糖具有广泛的生物活性而且作为药物具有低毒高效的优点，至今已报道其具有增强机体免疫功能、抗肿瘤、抗感染、抗衰老、降血糖、降血脂和刺激造血等多种生物学功效。因此多糖的研究已经成为当今学术界的一大热点。

第二节 糖类药物制备的一般方法

一、单糖类药物的制备

游离单糖及小分子寡糖易溶于冷水及温乙醇，用水或在中性条件下以 50% 乙醇，也可用 82% 乙醇，在 70~78℃ 下回流提取。溶剂用量一般为材料的 20 倍，需多次提取。植物材料磨碎经乙醚或石油醚脱脂，搅拌加碳酸钙，以 50% 乙醇温浸，浸液合并，于 40~45℃ 减压浓缩至适当体积，用中性醋酸铅去杂蛋白及其他杂质，铅离子可通 H₂S 除去，再浓缩至粘稠状。以甲醇或乙醇温浸，去不溶物如无机盐或残留蛋白质等，在脱色、结晶得粗品后纯化，工艺流程如下图：



二、多糖类药物的分离与纯化

多糖可来自动物、植物和微生物，植物体内含有水解多糖衍生物的酶，必须抑制或破坏酶的作用后，才能制取天然存在形式的多糖。使多糖免受到内原酶的作用，速冻冷藏是保存提取多糖材料的有效方法。

(一) 多糖的提取

多糖的提取过程一般包括以下四个步骤：粉碎、脱脂、溶剂浸提，除蛋白和脱色。提取多糖时，一般先需进行脱脂，以便多糖释放。脱脂是由于动物多糖及微生物的细胞内多糖在组织细胞内有脂质包围，进行多糖提取前一般需先加入醇或醚等有机溶剂进行回流脱脂。脱脂方法是将材料粉碎，用甲醇或 1:1 乙醇乙醚混合液，加热搅拌 1~3 小时，也可用石油醚脱脂。动物材料可用丙酮脱脂、脱水处理。醇液经活性炭脱色、浓缩、冷却、滴加乙醚，或置于硫酸干燥器中旋转，析出结晶。单糖或小分子寡糖也可以在提取后，用吸附层析法或离子交换法进行纯化。多糖的提取方法主要有以下几种：

1、难溶于冷水、热水，可溶于稀碱液：这一类多糖主要是不溶性胶类，如木聚精、

半乳聚糖等。用冷水浸润材料后用 0.5mol / L NaOH 提取，提取液用盐酸中和、浓缩后，加乙醇沉淀得多糖。如在稀碱中仍不易溶出者，可加入硼砂，对甘露聚糖、半乳聚糖等能形成硼酸络合物的多糖，此法可得相当纯的物质。

2、易溶于温水、难溶于冷水和乙醇：材料用冷水浸过，用热水提取，必要时可加热至 80~90℃ 搅拌提取。提取液用正丁醇与氯仿混合液除去杂蛋白（或用三氯乙酸除杂蛋白），离心除去杂蛋白后的清液，透析后用乙醇沉淀得多糖。

3、粘多糖：有些粘多糖可用水或盐溶液直接提取，但因大部分粘多糖与蛋白质结合于细胞中，因此需用酶解法或碱解法使糖-蛋白质间的结合键断裂，促使多糖释放。一般组织中存在多种粘多糖。需要对粘多糖进行分离纯化。

1) 碱解法：多糖与蛋白质结合的糖肽键对碱不稳定，故可用碱解法使糖与蛋白质分开。但若硫酸基与邻羟基处于反式结构或硫酸基在 C-3 或 C-6，此时易发生脱硫作用。这类多糖不宜用碱解法提取。

2) 酶解法：理想的工具酶是专一性低的、具有广泛水解作用的蛋白酶。鉴于蛋白酶不能断裂糖肽键及其附近的肽键，为除去长肽段，常可与碱解法合用，常用的酶抑制剂有胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和链霉菌蛋白酶及枯草杆菌蛋白酶。

（二）多糖的纯化

1、乙醇沉淀法：乙醇沉淀法是制备粘多糖的最常用手段。乙醇的加入，改变了溶液的极性，导致糖溶解度下降。向溶液中加入一定浓度的盐，如醋酸钠、醋酸钾、醋酸铵或氯化钠有助于使粘多糖从溶液中析出，盐的最终浓度 5% 即足够。使用醋酸盐的优点是在乙醇中其溶解度更大，即使在乙醇过量时，也不会发生这类盐的共沉淀。可以多次使用乙醇沉淀法脱盐，也可以用超滤法或分子筛法（SephadexG-10 或 G-15）进行多糖脱盐。沉淀物可用无水乙醇、丙酮、乙醚脱水，真空干燥即可得疏松粉末状产品。

2、分级沉淀法：分级沉淀法可分为有机溶剂法、盐析法和季铵盐沉淀法。

1) 有机溶剂法：是根据不同多糖在不同浓度低级醇、酮中具有不同溶解度的性质，向多糖溶液中从小到大按比例加入甲醇或乙醇或丙酮进行分步沉淀。

2) 盐析法：是根据不同多糖在不同盐浓度中具有不同溶解度的性质，加入不同盐析

剂使之逐步析出。常用的盐析剂有硫酸铵、氯化钠、氯化钾等，以硫酸铵效果最佳。

3) 季铵盐络合法：通过利用季铵盐能与酸性多糖成盐形成不溶的多糖化合物的性质，可实现在酸性、中性、微碱性和碱性溶液中分级沉淀分离出酸性多糖的目的。一般来说，在此沉淀法中，酸性强或相对分子质量大的多糖首先沉淀出来，所以控制季铵盐的浓度能分离各种不同的酸性多糖。粘多糖与一些阳离子表面活性剂如十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)和十六烷基氯化砒啶等能形成季铵盐络合物。这种络合物在离子强度大时可以解离，溶解，释放，使其溶解度发生明显改变时的无机盐浓度(临界盐浓度)主要取决于聚阴离子的电荷密度。粘多糖的硫酸化程度影响其电荷密度，根据其临界盐浓度的差异可以将粘多糖分离。降低pH可抑制羧基的电离，有利于增强硫酸粘多糖的选择性沉淀。季铵盐的沉淀能力受其烷基链中的-CH₂-基数的影响，还可以用不同种季铵盐的混合物作为酸性粘多糖的分离沉淀剂。应用季铵盐沉淀多糖是分级分离复杂粘多糖与从稀溶液中回收粘多糖的最有用方法之一。

3、柱层析法：柱层析法一般可以分为凝胶柱层析和离子交换柱层析。

1) 凝胶柱层析法：常用的凝胶有葡聚糖凝胶(Sephadex)和琼脂糖凝胶(Sepharose)，这类柱层析利用凝胶的网孔大小，根据多糖分子的大小和形状的不同而达到分离不同多糖组分的目的。在层析过程中，以不同浓度的盐溶液和缓冲溶液作为洗脱剂，从而使不同大小的多糖分子得到分离纯化。但此法不适合粘多糖的分离。

2) 离子交换层析法：离子交换柱层析法常用的交换介质有DEAE-纤维素、DEAE-葡聚糖凝胶(DEAE-Sephadex)、DEAE-琼脂糖凝胶(DEAE-Sepharose)。粘多糖由于具有酸性基团如糖醛酸和各种硫酸基，在溶液中以聚阴离子形式存在，因而可用阴离子交换剂进行交换吸附。吸附时可以使用低盐浓度样液，洗脱时可以逐步提高盐浓度如梯度洗脱或分步阶梯洗脱。可以依次分离透明质酸、硫酸乙酰肝素、硫酸软骨素和硫酸皮肤素与硫酸角质素和肝素。此法最常用的是DEAE-纤维素，其优点是可吸附杂质、纯化多糖，并适用于分离各种酸性、中性多糖和粘多糖。常用的洗脱剂为水、盐缓冲溶液或酸碱液。

4、除蛋白：粗多糖中往往含有蛋白质，而且许多糖成分还与蛋白形成糖蛋白的复合物，所以，对提取的多糖进行除蛋白质的处理是很有必要的。一般除蛋白质的方法有多种，

如 Sevage 法、三氟三氯乙烷法、三氯乙酸(TCA)法、酶法等。

5、脱色：含色素较高的根、茎、叶、果实类植物多糖还需要根据情况进行脱色处理。

常用的脱色方法有：吸附法、离子交换法、氧化法、金属络合物法。

1) 吸附法：主要包括 DEAE 纤维素、硅藻土、活性炭等。目前，最常用的吸附脱色材料是 DEAE 纤维素。它是一种离子交换剂，它通过离子交换的作用达到脱色的目的。同时，它还可以作为分离纯化多糖的一种技术。

2) 氧化法：主要的是过氧化氢氧化法，结合色素一般用此法去除。

此外，区带电泳法、超滤法及金属络合法等在多糖的分离纯化中也常采用。

第三节 糖类药物

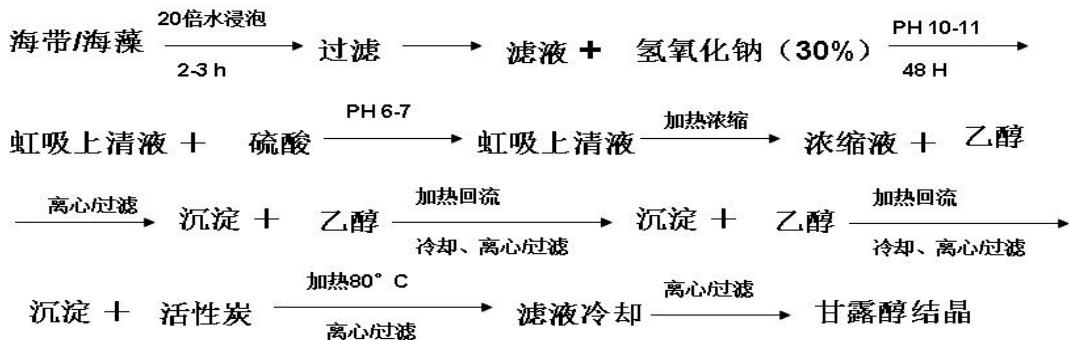
一、D-甘露醇的制备

(一) 结构与性质

甘露醇又名己六醇，为白色针状结晶，无臭，略有甜味，不潮解。易溶于水，溶于热乙醇，微溶于低级醇类、低级胺类、吡啶，不溶于有机溶剂。能提高血液渗透压，可用于脑水肿，烧伤水肿，青光眼治疗。

(二) 生产工艺

工艺路线



二、1、6—二磷酸果糖的制备

(一) 结构与性质

1、6—二磷酸果糖是果糖的磷酸脂，是葡萄糖代谢重要的中间产物，常与 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 等成盐存在。其钠盐为白色晶形粉末，易溶于水，不溶于有机溶剂。临床用于治疗心血管疾病，是急性心肌梗死、心功能不全、冠心病、休克的急救药，外科手术的辅助药。

(二) 生产工艺

工艺路线

酵母渣——加水冻融——加 FDP 酶液——加入反应物(蔗糖、 Na_2HPO_4)，30℃反应 6h——煮沸，离心去蛋白杂质——上清液——DEAE-C 阴离子交换吸附——洗脱液加入 CaCl_2 成钙盐——水溶，732[H⁺]树脂转化成 FDPH₄——NaOH 调 pH 成 FDPNa₃H——超滤，除菌去热原——FDPNa₃H 精品

三、肝素的制备

(一) 结构与性质

肝素是天然抗凝剂，是一种含有硫酸基的酸性粘多糖。肝素分子量不均一，由低、中、高三类不同分子量组成，分子量从 3000 到 37500。肝素及其钠盐为白色或灰白色粉末，无臭无味，有吸湿性，易溶于水，不溶于乙醇、丙酮、二氧六环等有机溶剂，其游离酸在乙醚中有一定溶解性。肝素分子中含有硫酸基与羧基，呈强酸性，为聚阴离子，能与阳离子反应成盐。硫酸化程度高的肝素具有较高的降脂和抗凝活性。小分子量肝素（分子量 4000~5000）具有较低的抗凝活性和较高的抗血栓形成活性。肝素系广泛分布于哺乳动物的肝、肺、心、脾、肾、胸腺、肠粘膜、肌肉和血液里。因此肝素可由猪肠粘膜、牛肺、猪肺提取。

(二) 生产工艺

生产工艺主要有盐解-季铵盐沉淀法，盐解-离子交换法和酶解-离子交换法。和其他粘多糖一起与蛋白质结合成复合物，因此肝素制备过程包括肝素蛋白质复合物的提取、解离和肝素的分离纯化两个步骤。

1、盐解-离子交换生产工艺

工艺路线：

鲜肠粘膜+氯化钠+氢氧化钠 $\xrightarrow[\text{PH9.0}]{53-55^\circ \text{ c 2 h}}$ 溶液 $\xrightarrow[\text{10 min}]{95^\circ \text{ c}}$ 冷却过滤 \longrightarrow 滤液
 +714强碱性离子交换树脂 $\xrightarrow[\text{过滤}]{\text{吸附8 h}}$ 水洗树脂 \longrightarrow 1.4mol/L氯化钠洗脱 \longrightarrow
 树脂 \longrightarrow 3mol/L氯化钠洗脱 \longrightarrow 洗脱液+95%乙醇 \longrightarrow 沉淀+1%
 氯化钠+盐酸 $\xrightarrow[\text{过滤}]{\text{PH 1.5}}$ 滤液+氢氧化钠+过氧化氢 $\xrightarrow[\text{25^\circ c 过夜}]{\text{PH 11}}$ +过氧化氢 \longrightarrow
 +盐酸+95%乙醇 \longrightarrow 沉淀+丙酮脱水 \longrightarrow 肝素

2、酶解-离子交换法

工艺路线：

鲜肠粘膜+苯酚+绞碎胰脏+40%氢氧化钠溶液 $\xrightarrow[40-45^\circ \text{ c}]{\text{PH8.5-9.0 2-3 h}}$ +氯化钠 $\xrightarrow{90^\circ \text{ c}}$
 +6mol/L盐酸(PH6.5) $\xrightarrow[20\text{min 过滤}]{90^\circ \text{ c}}$ 滤液+6mol/L氢氧化钠(PH7.0)+D-254
 强碱性离子交换树脂 $\xrightarrow{\text{吸附5 h 过滤}}$ 树脂+洗脱液+2mol/L氯化钠洗+1.2mol/L
 氯化钠洗脱 \longrightarrow 树脂+5mol/L氯化钠洗 \longrightarrow 洗脱液+95%乙醇 \longrightarrow 沉淀
 +2%氯化钠+4%高锰酸钾 $\xrightarrow[25\text{ h}]{\text{PH 8.0 加热80^\circ c}}$ +滑石粉 $\xrightarrow{\text{过滤}}$ 滤液+95%乙醇 $\xrightarrow{\text{PH6.4}}$
 +沉淀+1%氯化钠+95%乙醇 \longrightarrow 肝素沉淀

(三) 作用与用途：肝素是典型的抗凝血药，能阻止血液的凝结过程，用于防止血栓的形成。

三、硫酸软骨素的制备

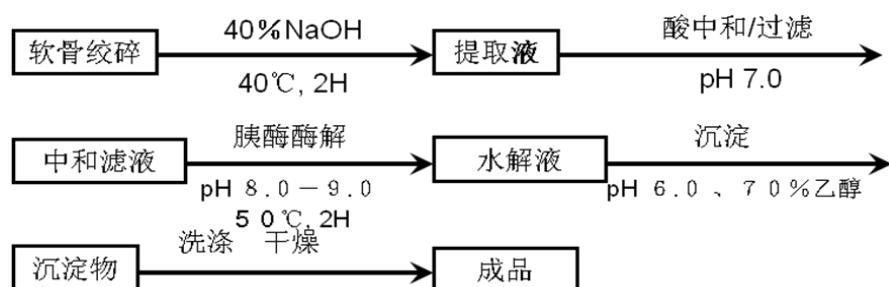
(一) 结构与性质

硫酸软骨素(CS)的药用商品名为康得灵，是从动物软骨中提取制备的酸性粘多糖，主要是硫酸软骨素A、C及各种硫酸软骨素的混合物。硫酸软骨素为白色粉末，无臭，无味，吸水性强，易溶于水而形成粘度大的溶液，不溶于乙醇、丙酮和乙醚等有机溶剂中，其盐对热较稳定，受热80℃亦不破坏。游离硫酸软骨素水溶液，遇较高温度或酸即不稳定，

主要是脱乙酰基或降解成单糖或分子量较小的多糖。硫酸软骨素广泛存在于动物的软骨、喉骨、鼻骨（猪含 41%），牛、马鼻中膈和气管（含 36%~39%）中，在骨腱、韧带、皮肤、角膜等组织中也有。鱼类软骨中含量也很高，如鲨鱼骨中含 50%~60%。在软骨中，硫酸软骨素与蛋白质结合成蛋白多糖，并与胶原蛋白结合在一起。

（二）生产工艺

提取分离方法有稀碱-酶解法、浓碱水解法、稀碱-浓盐法、酶解-树脂法。稀碱-浓盐法工艺路线：



（三）、制剂

按配方含 2% 硫酸软骨素、0.85%NaCl，称取标示量 107% 的硫酸软骨素干粉（以纯品计），加入注射用水中，使其溶胀，搅拌溶解，再加入 NaCl，调 pH5.5，加热煮沸，用布氏漏斗过滤，滤液加入 0.3%~0.5% 活性炭，加热至微沸，保持 15min，用砂棒包扎滤纸趁热过滤，滤液冷却后，补加注射用水至全量，用 3 号垂熔漏斗过滤至澄清，按每支 2ml 灌封，灭菌，即得硫酸软骨素注射液。

（四）作用与用途

硫酸软骨素，尤其是硫酸软骨素 A 能增强脂肪酶的活性，使乳糜微粒中的甘油三酯分解，使血中乳糜微粒减少而澄清，还具有抗凝和抗血栓作用，可用于冠状动脉硬化、血脂和胆固醇增高、心绞痛、心肌缺血和心肌梗塞等症。硫酸软骨素还用于防治链霉素所引起的听觉障碍症以及偏头痛、神经痛、老年肩痛、腰痛、关节炎与肝炎等。除此之外，还用作皮肤化妆品等方面。

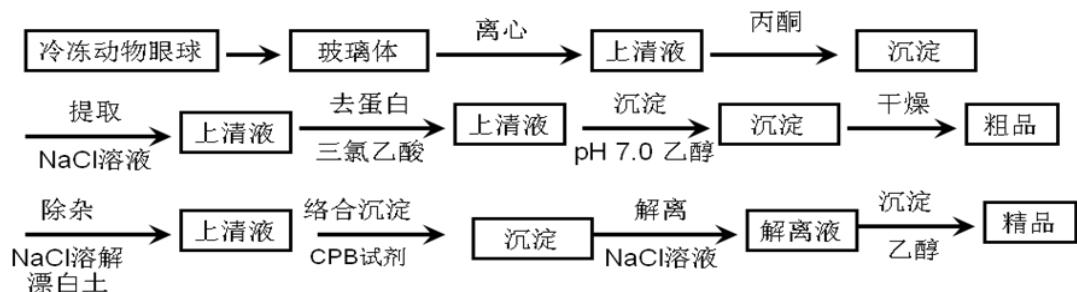
四、透明质酸的制备

（一）结构与性质

透明质酸为白色、无定形固体，无臭无味，有吸湿性，溶于水，不溶于有机溶剂，有旋光，具有较高的粘度特性。下述因素会影响透明质酸溶液的粘度，如 pH 值低于或高于 pH7.0，或有透明质酸酶存在时会引起分子中糖苷键的水解。许多还原性物质如半胱氨酸、焦性没食子酸、抗坏血酸，重金属离子和紫外线、电离辐射等也能引起分子间的解聚而造成粘度下降。

(二) 生产工艺

制备透明质酸的常用原料有公鸡冠、眼球玻璃体、人脐带、猪皮、兔皮等，工艺路线如下：



(三) 作用与用途

透明质酸具有很大粘性，对骨关节具有润滑作用。还能促进物质在皮肤中的扩散率、调节细胞表面和细胞周围的离子运动。在组织中的强力保水作用是其最重要的生理功能之一，透明质酸还有促进纤维增生、加速创伤愈合作用。透明质酸作为药物主要应用于眼科治疗手术，治疗骨关节炎、外伤性关节炎和滑囊炎以及加速伤口愈合，具有美容保健和恢复皮肤生理功能的作用。

第八章 脂类药物的制备技术

第一节 脂类的概述

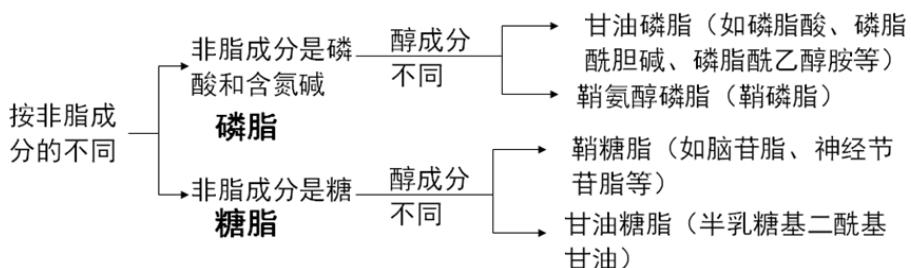
一、脂类药物的简介

脂类包括的范围很广，简单地讲脂类化合物广泛存在于生物体中的脂肪及类脂类的、能够被有机溶剂提取出来的化合物。脂类系脂肪、类脂及其衍生物的总称。脂类在化学成分与化学结构上有很大差异，但其共同物理性质是不溶或微溶于水，易溶于乙醚、氯仿、苯等非极性溶剂中，在体内以游离或结合的形式存在于组织细胞中，其中具有特定生理药理效应者称为脂类药物。

这些物质在化学成分和化学结构上也有很大差异，但是它们都有一个共同的特征，即不溶于水，而易溶于乙醚、氯仿、苯、热乙醇非极性溶剂中。用这类溶剂可将脂类化合物从细胞和组织中提取出来。脂类的这种特性，主要是由构成它的碳氢结构成分所决定的。脂类具有重要的生物学功能，它是构成生物膜的重要物质，几乎细胞所含有的全部磷脂类都集中在生物膜中。

二、脂类药物的分类

脂类生化药物分为复合脂类及简单脂类两大类，单脂是由脂肪酸（饱和、不饱和）和醇（甘油醇或高级一元醇）形成的酯；复合脂类包括与脂肪酸相结合的脂类药物，如卵磷脂及脑磷脂等，简单脂类药物为不含脂肪酸的脂类，如甾体化合物、色素类等。复合脂类是除含脂肪酸和醇外，尚有其它非脂分子的成分其分类如下：



三、脂类的结构与性质

脂肪是脂肪油的甘油三酯，天然脂肪大多数是混酸甘油脂，具有不对称结构而存在异构体。脂肪酸均溶于乙醚、氯仿、苯及热的乙醇中，分子比较小的，也溶于冷乙醇中，其丙酸、丁酸等能溶于水。常用分析脂肪皂化价的高低方法，来了解脂肪分子的大小。依据碘价的高低，可知脂肪酸的不饱和度。从乙酰价的高低，可以看出脂肪酸中所含羟基的量。

富含单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸组成的脂肪在室温下呈液态，大多为植物油，如花生油、玉米油、豆油、菜子油等。以饱和脂肪酸为主组成的脂肪在室温下呈固态，多

为动物脂肪，如牛油、羊油、猪油等。但也有例外，如深海鱼油虽然是动物脂肪，但它富含多不饱和脂肪酸，如20碳5烯酸（EPA）和22碳6烯酸（DHA），因而在室温下呈液态。

油脂保存中，由于不饱和键与酯键的存在，导致易于发生水解和氧化作用，产生“酸败”现象，导致油脂相对密度降低、碘值降低、酸值升高，其主要检测的指标为碘值和酸值。水解酸败是油脂中混有脂肪酶、水，并在适宜条件下（25-35℃，pH4.5-5），催化油脂的酯键水解，产生游离脂肪酸会导致酸值升高；氧化酸败是空气中的氧使不饱和脂肪酸的双键加氧生成过氧化物，这样会造成表征不饱和程度的碘值降低。

四、脂类药物在临床上的应用

1、胆酸类药物临床应用

胆酸类化合物是人及动物肝脏产生的甾类化合物，集中于胆囊中排入肠道，对肠道脂肪起乳化作用，促进脂肪消化吸收，同时促进肠道正常菌群繁殖，抑制致病菌生长，保持肠道正常功能，但不同胆酸又有不同药理效应及临床应用。胆酸钠可治疗胆囊炎、胆汁缺乏症及消化不良等；鹅去氧胆酸、熊去氧胆酸具有溶解胆结石，抑制胆固醇沉着、平肝、利胆、解毒作用，用于治疗胆石症，后者也用于治疗高血压，急性及慢性肝炎、肝硬化及肝中毒等；异去氧胆酸为次级胆酸，具有降低血液胆固醇、镇痉怯痰作用，可作为消炎药；牛磺鹅去氧胆酸、牛磺去氢胆酸及牛磺去氧胆酸具有抗病毒作用。

2、色素类药物临床应用

色素类药物有胆红素、胆绿素、血红素、原卟啉、血卟啉及其衍生物。胆红素是由四个吡咯环构成的线性化合物，为抗氧化剂，有清除氧自由基功能，用于消炎，也是人工牛黄的重要成分，具有解热、降压、促进红细胞再生功能；胆绿素在许多消炎药类中成药均含此成分；原卟啉具有促进细胞呼吸、改善肝脏代谢功能，用于治疗肝炎。

3、不饱和脂肪酸类药物临床应用

该类药物包括前列腺素、亚油酸、亚麻酸、花生四烯酸及二十碳五烯酸等。北极圈内的爱斯基摩人的膳食虽然以鱼、肉为主，脂肪、能量和胆固醇摄入量都很高，但冠心病、糖尿病的发生率和死亡率都远低于其它地区的人群，这主要是由于鱼油中富含EPA和

DHA，它们有降低胆固醇，增加高密度脂蛋白的作用，它们还有抑制血小板聚集、降低血黏度和扩张血管等作用，DHA 可促进脑的发育。有些植物油中含量丰富的亚麻酸在体内可以转变成 EPA 和 DHA

4、磷脂类药物临床应用

该类药物主要有卵磷脂及脑磷脂，卵磷脂具有抗动脉硬化、降低血胆固醇和总脂、护肝等作用，维持胆汁中胆固醇的溶解度，用于胆固醇结石的防治，也用于动脉粥样硬化、脂肪肝、神经衰弱及营养不良的治疗；豆磷脂更适用于抗动脉硬化，还是制备静注脂肪乳的乳化剂；脑磷脂能防止肝硬化、肝脂肪性病变及神经衰弱、还可止血。

5、固醇类药物临床应用

该类药物包括胆固醇、麦角固醇及 β -谷甾醇。正常情况下，胆固醇也是人体不可缺少的营养物质（机体细胞膜不可缺少的成分、机体多种甾体激素、人工牛黄及胆酸原料），在血液中维持一个恰当的水平。当脂质代谢发生异常或膳食胆固醇摄入量超过身体调节能力时，血液中的胆固醇浓度就会升高并逐渐在血管内壁上沉积而引起血管腔狭窄和心血管病。

6、人工牛黄临床应用

根据天然牛黄的组成而人工配制的脂类药物，其主要成分为胆红素、胆酸、猪胆酸、胆固醇及无机盐等。

五、脂类药物制备

脂类药物生产方法，在提取分离脂类化合物的过程中，要依据脂类化合物的种类、理化性质、在细胞中存在的状态来选择提取的溶剂和操作条件。

1、直接提取法：在生物体或生物转化反应体系中，有些脂类药物是以游离形式存在的，如卵磷脂、脑磷脂，亚麻油、花生四烯酸及前列腺素等。因此通常根据各种成分的溶解性质，采用相应溶剂系统从生物组织或反应体系中直接抽提出粗品，再经过各种分离纯化技术和精制方法，得到纯品。

2、水解法：在体内有些脂类药物与其它成分构成复合物，含这些成分的组织需经过水解或适当处理后再水解，然后分离纯化。如脑干中胆固醇酯经丙酮抽提，浓缩后残留物

用乙醇结晶，再用硫酸水解和结晶才能获得胆固醇。

3、机械压榨法：压榨机在 105~106Pa 压力下，将流动性较大的油从材料破碎的细胞中挤压出来（花生油、豆油）。

4、水代法：加热的条件下加大量水，剧烈搅拌，水进入细胞和蛋白质结合而将油交换出来（设备简单出油率高—小磨香油）。

5、皂化法：与酸或碱共煮或经脂酶作用时，可发生水解，碱水解时→皂化→皂化液再经酸化处理即得到高级脂肪酸，不被皂化部分如固醇等，通过皂化反应与甘油酯分开

6、有机溶剂萃取法：自然界中脂类以结合形式存在疏水结合的脂类→非极性溶剂如乙醚、氯仿、苯等萃取；生物膜结合的脂类→相对极性较强的溶剂提取，以断开蛋白质分子与脂类分子间的氢键或静电力；共价结合的脂类不能用溶剂直接提取→先用酸或碱水解，使脂类分子从复合物中分裂出来再提取。

7、化学合成或半合成法：来源于生物的某些脂类药物可以用相应有机化合物或来源于生物体的某些成分为原料，采用化学合成或半合成法制备。

8、生物转化法：发酵、动植物细胞培养及酶工程技术可统称为生物转化法。如微生物发酵法或烟草细胞培养法生产 CoQ₁₀。

六、脂类药物的分离

脂类生化药物种类较多，结构多样化，性质差异很大，通常用溶解度法及吸附分离法分离。

1、溶解度法：是根据脂类物质在不同溶剂中溶解度差异进行分离的方法，如游离胆红素在酸性条件溶于氯仿及二氯甲烷，故胆汁经碱水解及酸化后用氯仿抽提，其它物质难溶于氯仿，而胆红素则溶出，因此得以分离；又如卵磷脂溶于乙醇，不溶于丙酮，脑磷脂溶于乙醚而不溶于丙酮和乙醇，故丙酮抽提液用于制备胆固醇，不溶物用乙醇抽提得到卵磷脂，用乙醚抽提得脑磷脂。

2、吸附分离法：是根据吸附剂对各种成分吸附力差异进行分离。

3、尿素包含法：尿素呈四方晶形，当与某些脂肪族化合时，会形成脂肪族物质的六方晶形（直链脂肪酸及其酯、支链或环状化合物的分离，也应用于不饱和程度不同的酸或

酯分离)。

七、脂类药物的精制

经分离后的脂类药物中常有微量杂质，需要适当方法精制，常用的方法有结晶法，重结晶法和有机溶剂沉淀法。饱和脂肪酸室温下呈固态，可在适宜的溶剂中，置于室温或低于室温下结晶、过滤；不饱和脂肪酸熔点较低而溶解度较高，需低温下结晶。如用层析分离的 PGE2 经醋酸—己烷结晶。此外还有蒸馏法，利用不同脂类的沸点不同进行，常用于减压下分馏。

第二节 脂类生化药物

一、磷脂类药物的制备

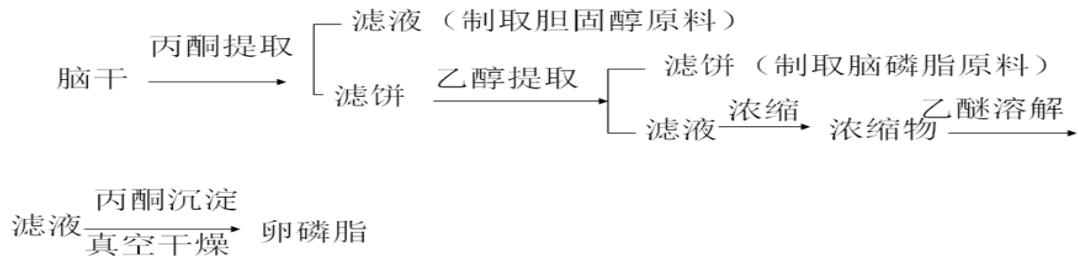
磷脂类药物中除神经磷脂等少数成分外，其结构中大多含甘油基团，如磷脂酸、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺等。

1、卵磷脂性质

卵磷脂存在于动物各组织及器官中，脑、精液、肾上腺及红血球含量最多，卵黄中含量高达 8%~10%，其在植物组织中含量甚少，唯大豆中含量甚高。卵磷脂为白色蜡状物质，无熔点，有旋光性，在空气中因不饱和脂肪酸烃链氧化而变色。极易溶于乙醚及乙醇，不溶于水，为两性电解质， pI 为 6.7，是较好的乳化剂。

2、卵磷脂制备

1) 工艺路线：



2) 工艺过程

①提取与浓缩

取动物脑干加 3 倍体积丙酮循环浸提 20~24h，过滤得滤液分离胆固醇。滤饼蒸去丙酮，加 2~3 倍体积乙醇浸提 4~5 次，每次过滤的滤饼用于制备脑磷脂。合并滤液，真空浓缩，趁热放出浓缩液。

②沉淀与干燥

上述浓缩液冷却至室温，加入半倍体积乙醚，不断搅拌，放置 2 h，使白色不溶物完全沉淀，过滤，取滤液于激烈搅拌下加入粗卵磷脂重量 1.5 倍体积的丙酮，析出沉淀，滤除溶剂，得膏状物，以丙酮洗涤两次，真空干燥后得卵磷脂成品。

3、卵磷脂应用

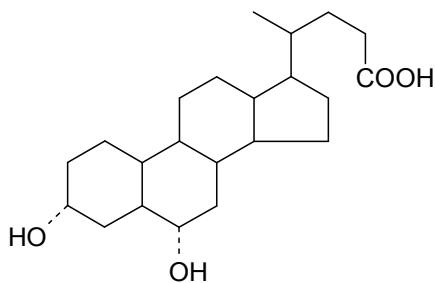
临幊上用于治疗婴儿湿疹、神经衰弱、肝炎、肝硬化及动脉粥样硬化。

二、胆酸类药物的制备

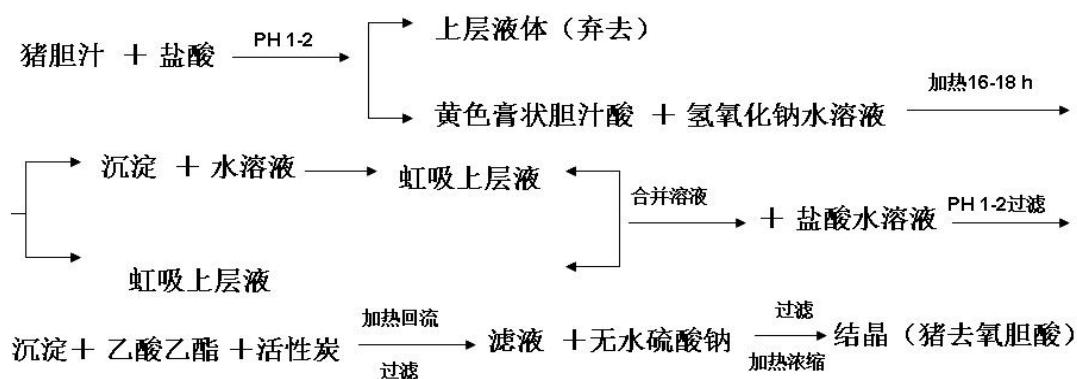
胆酸类药物大多为 24 个碳原子构成得胆烷酸。人及动物体内存在的胆酸类物质是由胆固醇经肝脏代谢产生。其中胆酸及鹅去氧胆酸为初级胆酸，在肠道菌作用下生成去氧胆酸，猪去氧胆酸及石胆酸等次级胆酸。体内胆酸类化合物在肝脏大多与甘氨酸或牛磺酸形成结合型胆酸，总称胆汁酸，经胆囊排至肠道在微生物作用下大部分分解为游离胆酸和甘氨酸或牛磺酸，一部分经粪便排出体外，大部分为肠道吸收进行肠肝循环。

猪去氧胆酸有降低血浆胆固醇作用，为降血脂药。同时也是配制人工牛黄的重要成分。

猪去氧胆酸的化学名为 $3\alpha, 6\alpha$ -二羟基- 5β -胆烷酸，是猪胆酸 ($3\alpha, 6\alpha, 7\alpha$ -三羟基- 5β -胆烷酸) 经肠道菌催化脱氧而成，分子式如下：



制备工艺

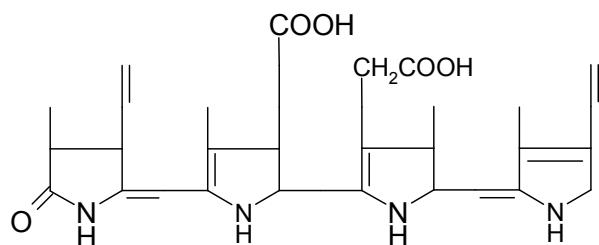


三、色素类药物的制备

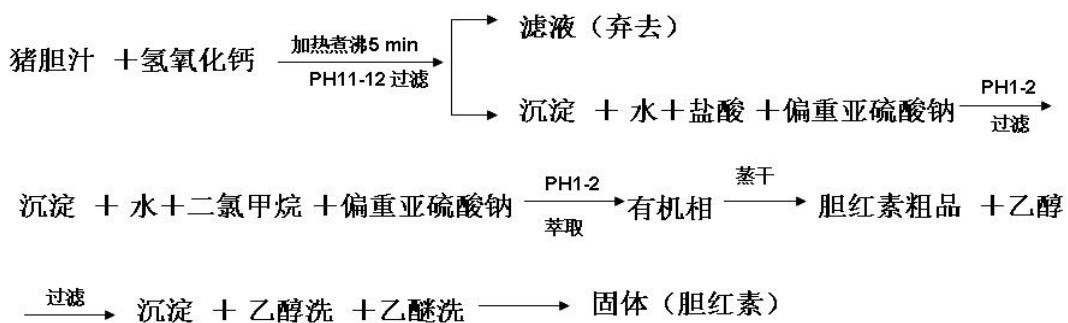
(一) 胆红素

胆红素是胆色素的一种，它是人胆汁中的主要色素，呈橙黄色。它是体内铁卟啉化合物的主要代谢产物，有毒性，可对大脑和神经系统引起不可逆的损害，但也有抗氧化剂功能，可以抑制亚油酸和磷脂的氧化。胆红素是临幊上判定黄疸的重要依据，也是肝功能的重要指标。

胆红素属于二甲川胆色素的一种胆汁色素。为红褐色的色素体，不溶于水，难溶于醇、醚、易溶于碱。最大吸收为432 nm（碱中），540 nm（氯仿中）。人和肉食动物的胆汁中含量丰富。胆红素是由红细胞中的血色素所制造的色素，红细胞有固定的寿命（正常红细胞的平均寿命约为120天），每日都会有所毁坏。此时，血色素会分解成为正铁血红素和血红素。正铁血红素在NADPH和H⁺作用下生成胆绿素、Fe³⁺离子和CO，胆绿素再在NADPH和H⁺作用下生成胆红素，其分子结构如下：



制备工艺



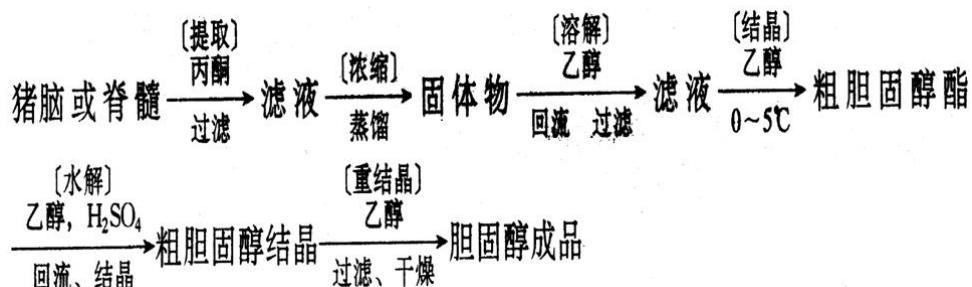
四、固醇类药物的制备

固醇类药物包括胆固醇、麦角固醇及 β -谷固醇等，均为甾体化合物。

1、胆固醇的结构与性质

胆固醇为动物细胞膜重要成分，亦为体内固醇类激素、维生素D及胆酸的前体，存在于所有组织中，脑及神经含量最高，其次肝脏、肾上腺、卵黄及羊毛脂中含量亦甚丰富，同时亦为胆结石的主要成分。胆固醇自稀醇中可形成白色闪光片状一水合物晶体，于70~80℃成为无水物。难溶于水，易溶于乙醇、氯仿、丙酮、吡啶、苯、石油醚、油脂及乙醚。

2、工艺路线：



3、用途

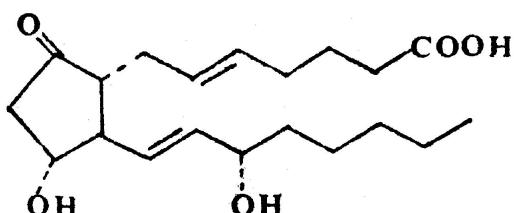
胆固醇为人工牛黄重要成分之一，也是合成维生素D₂及D₃起始材料和化妆品原料，并是药物制剂良好的表面活性剂。

五、不饱和脂肪酸类药物的制备

前列腺素为二十碳五元环前列腺烷酸的一族衍生物，共分八类。在体内PG皆由花生三烯酸、花生四烯酸及花生五烯酸等经PG合成酶转化而成，PG合成酶存在于动物组织中，如羊精囊、羊睾丸、兔肾髓质及大鼠肾髓质等，以羊精囊含量为最高。对呼吸系统、胃肠道、泌尿系统、循环体统、炎症及神经系统具有广泛的作用。

1、前列腺素 E₂ (PGE₂) 结构和性质

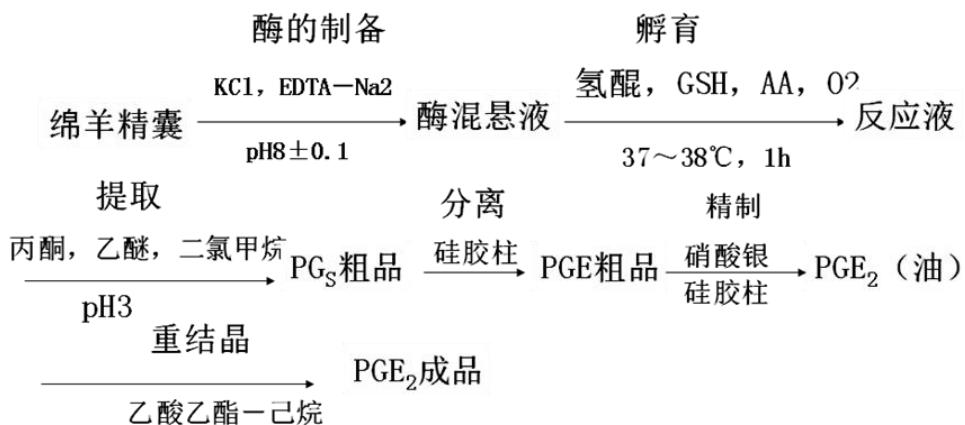
PGE₂ 为白色结晶，熔点 68~69℃，溶于醋酸乙酯、丙酮、乙醚、甲醇及乙醇等有机溶剂，不溶于水。在酸性和碱性条件下可分别异构化为 PGA₂ 和 PGB₂，后二者紫外吸收最大波长分别为 217nm 和 278nm。其结构如下：



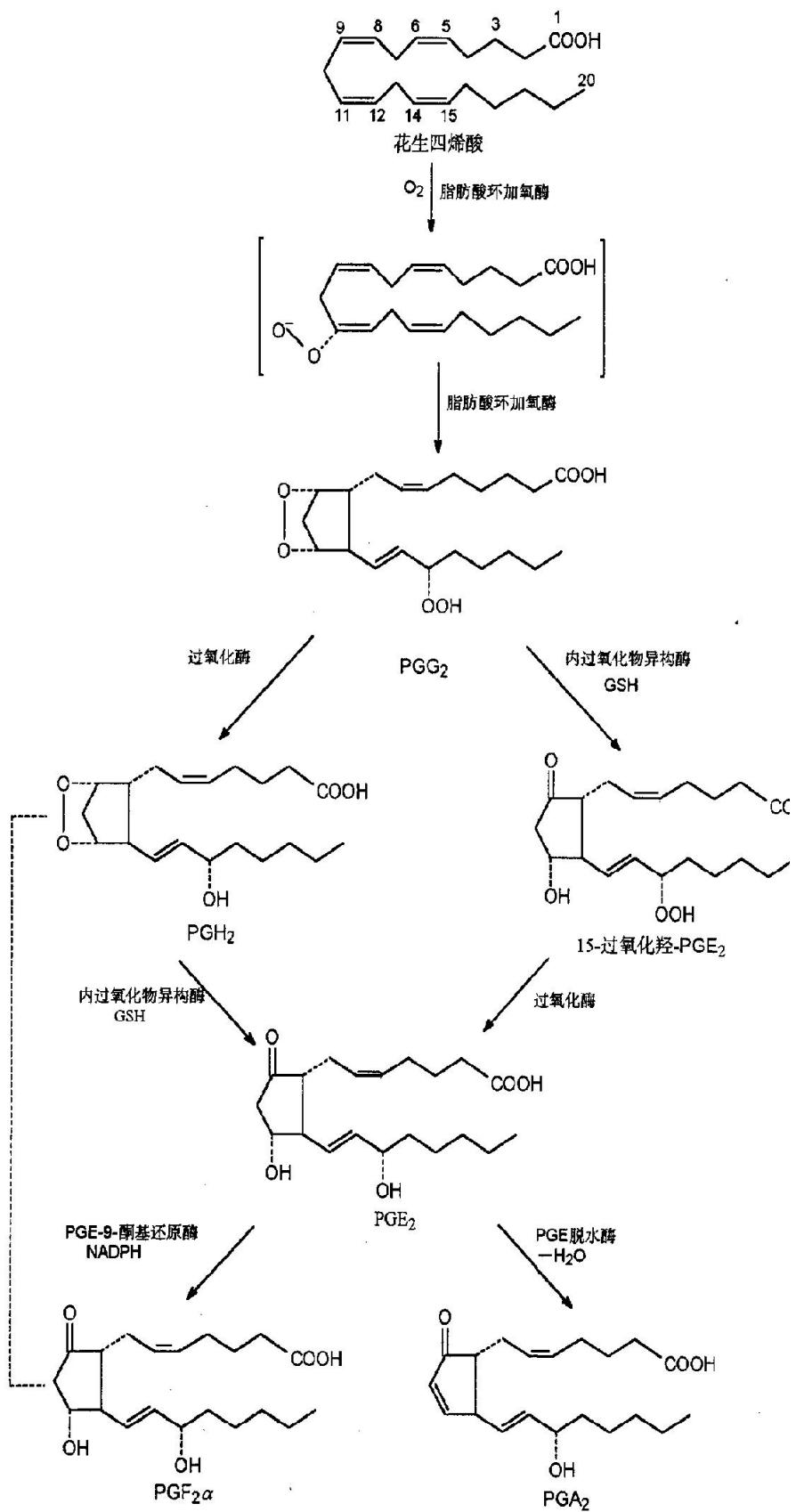
前列腺素 E₂

生产天然前列腺素的方法有生物合成法、化学合成法和半合成法。我国采用花生四烯酸为前体，从羊精囊中提取前列腺素合成酶加入谷胱甘肽、氢醌等辅助刺激剂，在充分给氧的条件下，使花生四烯酸转化成前列腺素，最后分离、提纯得 PGE₂。

半合成法工艺路线：



合成流程如下：



前列腺素的生物合成

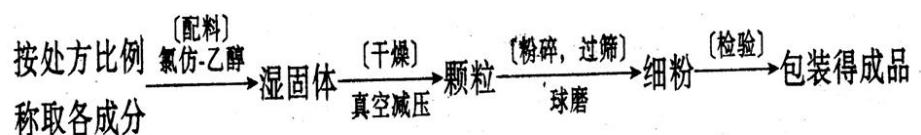
六、人工牛黄的制备

牛黄为病牛胆囊、胆管及肝管中结石，称为天然牛黄。其主要成分为胆红素、多种胆酸及胆固醇等，其次为脂肪酸、卵磷脂、钙、镁、铁、钾及钠等，此外尚有微量粘蛋白、肽类、氨基酸、胡萝卜素、锰、硫、磷、氯及维生素D等。我国自50年代以来据天然牛黄之化学组成，采用人工方法配制牛黄，称为人工牛黄。

1、人工牛黄组成（处方）：

原料名称	标准规格	比例（%）
胆红素	≥60%	0.7
胆酸	≥80%	12.5
α—猪脱氧胆酸	mp.>150℃	15.00
胆固醇	mp.>150℃	2.00
磷酸氢钙	药用	3.00
硫酸镁	药用	1.50
硫酸亚铁	药用	0.50
淀粉	含水量<4%	加至全量

2、工艺路线：



3、作用与用途：

人工牛黄是一种重要中药材，亦为生化药。有清热解毒、祛痰及定惊作用。

第九章 维生素及辅酶类药物

第一节 维生素及辅酶

一、维生素的基本概念

维生素是生物体内一类量微、化学结构各异，具有特殊功能的小分子有机化合物，它们大多需从外界摄取。维生素需求量很小，例如人每日约需维生素 A 0.8~1.7mg、维生素 B₁(硫胺素)1~2mg、维生素 B₂(核黄素)1~2mg、维生素 B₃(泛酸)3~5mg、维生素 B₆(吡哆素)2~3mg、维生素 D 0.01~0.02mg、叶酸 0.4mg、维生素 H(生物素)0.2mg、维生素 E 14~24μg、维生素 C 60~100mg 等。

1、维生素特点：

- 1) 维生素是天然食物中的一种成分，而是一种活性物质，对机体代谢起调节和整合作用。
- 2) 维生素需求量很小(毫克级)。维生素需求量很小，例如人每日约需维生素 A 0.8~1.7mg、维生素 B₁(硫胺素)1~2mg、维生素 B₂(核黄素)1~2mg、维生素 B₃(泛酸)3~5mg、维生素 B₆(吡哆素)2~3mg、维生素 D 0.01~0.02mg、叶酸 0.4mg、维生素 H(生物素)0.2mg、维生素 E 14~24μg、维生素 C 60~100mg 等。
- 3) 由于大多数维生素在体内不能合成，要从外界摄取。
- 4) 绝大多数维生素是通过辅酶或辅基的形式参与体内酶促反应体系，在代谢中起调节作用，少数维生素还具有一些特殊的生理功能。
- 5) 人体内维生素缺乏时，会发生“维生素缺乏症”，人体每日需要量是一定的，使用不当，反而会导致疾病。

2、维生素可分为脂溶性和水溶性两大类。

脂溶性：维生素 A、D、E、K、Q 和硫辛酸等。

水溶性：维生素 C、B₁、B₂、B₆、B₁₂、烟酸、泛酸、叶酸、生物素和维生素 C 等

二、维生素与辅酶、辅基的关系

大部分维生素本身就是辅酶、辅基，或者是辅酶、辅基的组成部分，在机体的代谢中起着十分重要的作用

三、维生素及辅酶类药物的生产方法

维生素及辅酶类药物在工业上大多数是通过化学合成法获得的，近年来发展起来的微生物发酵法代表着维生素生产的今后发展方向。从生物材料中直接提取的不多。近代的化学合成，常与酶促合成、酶拆分等结合在一起，以改进工艺条件，提高收率和经济效益。在实际生产中，有的维生素既用合成法又用发酵法，如维生素C、叶酸、维生素B₂等；也有既用生物提取法又用发酵法的，如辅酶Q₁₀和维生素B₁₂等。

第二节 重要维生素及辅酶类药物

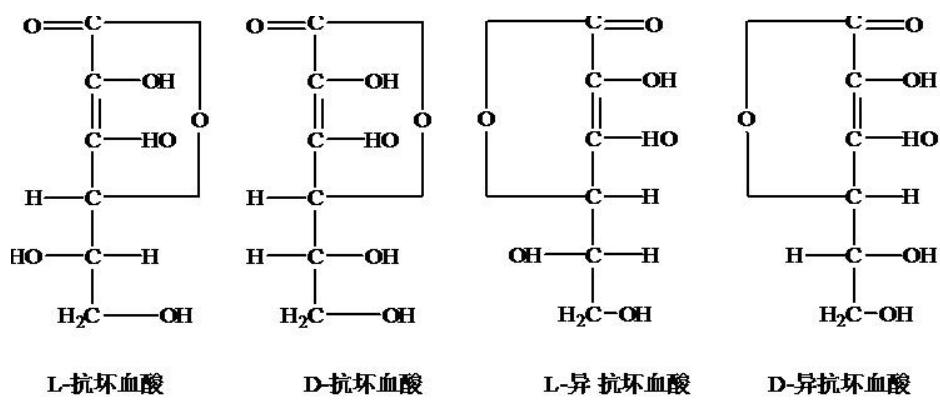
人体内维生素缺乏时，会发生一类特殊的疾病，称“维生素缺乏症”。维生素不是补品，人体每日需要一定量的维生素。维生素缺乏的临床表现是由于多种代谢功能的失调，大多数维生素是许多生化反应过程中酶的辅酶或辅基，有的维生素则在体内转变为激素。因此，可用维生素及辅酶能治疗多种疾病。

一、维生素C的制备

1、结构与性质

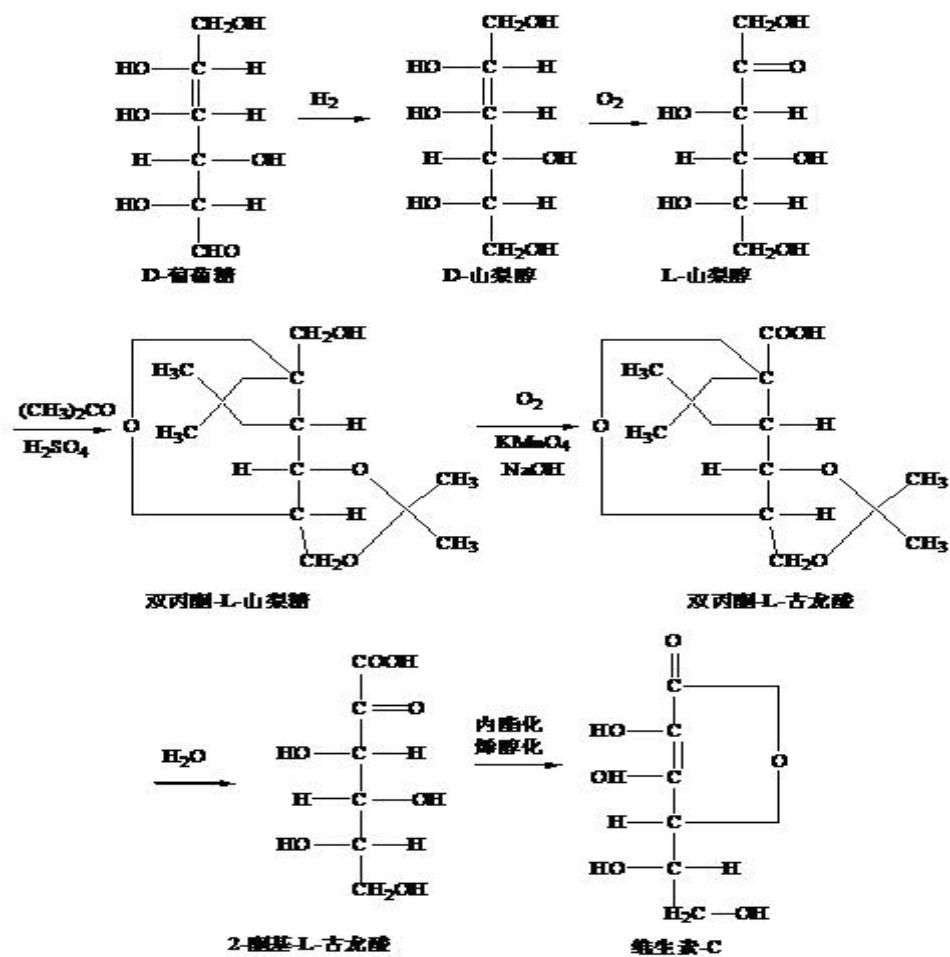
维生素C又名抗坏血酸，是细胞氧化-还原反应中的催化剂，它释放两个氢原子后变成氧化型维生素C，有供氢体存在时，脱氢抗坏血酸可以接受两个氢原子变成抗坏血酸，参与机体新陈代谢，增加机体对感染的抵抗力。用于防止坏血病和抵抗传染性疾病，促进创伤和骨折愈合，以及用作辅助药物治疗。

维生素C(多羟基不饱和内酯衍生物)分子中有两个手性碳原子，故有4种光学异构体，其中L(+)-抗坏血酸效果最好，其他三种临床效果很低或无效。

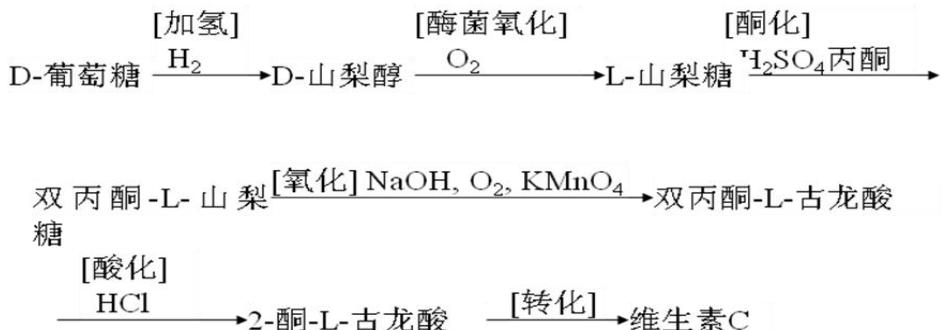


维生素 C 为白色粉末，无臭、味酸、熔点 190-192℃，易溶于水，略溶于乙醇，不溶于乙醚，氯仿及石油醚等。它是一种还原剂，易受光、热、氧等破坏，尤其在碱液中或有微量金属离子存在时，分解更快，但干燥结晶较稳定。

2、莱氏法化学合成工艺



3、工艺路线



4、工艺过程

①山梨醇发酵菌种 醋酸菌属可使山梨醇氧化成山梨糖，一般用 *A. Suboxyclans* 和 *A. Melangenum*。

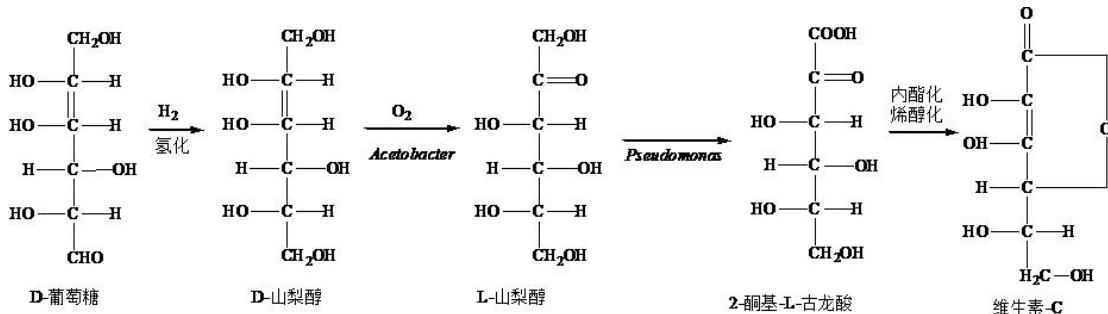
②发酵条件 温度为 26-30℃，最适 pH 为 4.4-6.8。pH 4.0 以下菌的活性受影响。用 0.5% 酵母浸膏为主要营养源，山梨醇浓度为 19.8%，通气量 1800ml/min，30℃ 培养 33h，山梨糖收率可达 97.6%。其中无机氮源不能利用，使用有机氮源。Ni²⁺、Cu²⁺ 等金属离子能阻止菌的发育，铁能妨碍发酵，为了使发酵顺利进行，需用阳离子交换树脂将山梨醇中的金属离子去掉。整个合成过程中必须保持第 4 位碳原子的构型不变；维生素 C 的总收率约 60%，

C-4 内酯化、C-2 烯醇化：

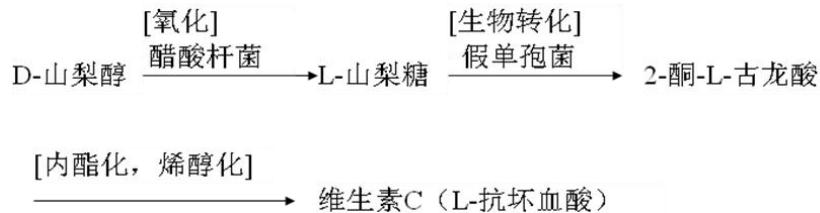
酸转化：配料比 2-酮基-L-古龙酸：38% 盐酸：丙酮 = 1: 0.4: 0.3 （质量/体积）

碱转化：先形成 2-酮基-L-古龙酸甲酯，加 NaHCO₃ 转化生成维生素 C 钠盐，经氢型离子交换树脂酸化，在 50-55℃ 下减压烘干，得粗品维生素 C。

5、两步发酵工艺



6、两步发酵工艺



7、两步发酵

1) D-山梨醇的化学合成

50%葡萄糖溶液在 75℃下加入活性炭，用石灰乳液调节 pH8.4，加镍催化剂，通氢气，压力 3.43MPa，反应温度 140℃。反应结束后，静置沉降除去催化剂，反应液经离子交换树脂、活性炭处理后，减压浓缩，得到含量 60-70%的 D-山梨醇，无色透明或微黄色透明粘稠液体，收率约 97%。

2) 2-酮-L-古龙酸的微生物发酵

第一步发酵：黑醋酸杆菌（从 D-山梨醇到 L-山梨糖）。

第二步发酵：葡萄糖酸杆菌和巨大芽孢杆菌混合培养。

发酵罐：气升式反应器，100 立方米。

3) 2-酮-L-古龙酸的分离纯化

发酵液中 2-酮-L-古龙酸 8%，杂质有菌丝体、蛋白质和悬浮的固体颗粒等。除杂操作主为加热和离心。

莱氏法是最早生产维生素 C 的方法，其以葡萄糖为原料，先经黑醋菌发酵生成 L-山梨糖，再经丙酮化及 NaClO 氧化、水解得到 2-酮-L 古龙酸钠，然后进行化学合成得到维生素 C。此法存在着很多缺陷，如生产工艺复杂、劳动强度大、生产环境恶劣、易对人体造成伤害，因此人们不断对此工艺进行改进。

两步发酵工艺中省略了酮化和 NaClO 氧化过程，简化了工艺，极大地改善了操作环境。除主料消耗山梨醇消耗较高外，其他辅料消耗较低。且多为液体反应，物料输送方便，更有利于生产连续化和操作自动化。但此法仍存在很多缺点，如占地面积大、发酵基质浓度低、在高湿高温条件下染菌机率高、设备利用率低、后续处理能耗高等问题。在未来的

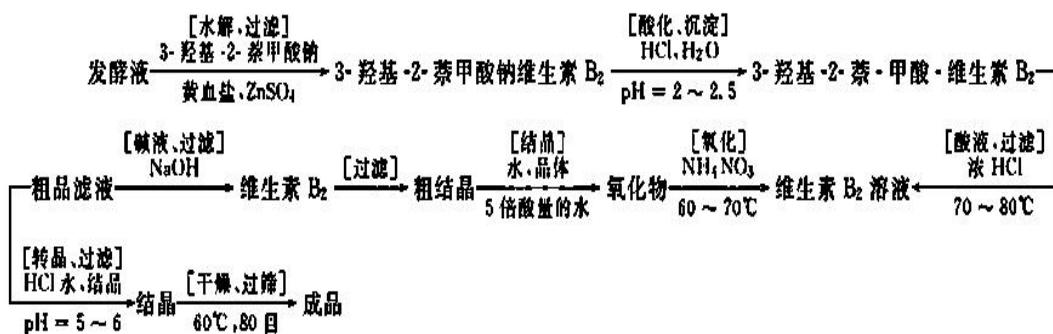
工艺优化过程中，除了进行发酵工艺改进外，更应注重优良菌种的选育。发酵液的提取工艺是维生素 C 生产行业中较为重视的问题。经过两次发酵后，发酵液的含量仅为 6%~9%，且残留有菌丝体、蛋白质和悬浮微粒等，分离提纯较为困难。传统的处理方法有加热沉淀法和化学凝聚法。针对以上两种方法中存在的缺点和不足，一种新的处理方法——超滤法在维生素生产中得以应用。此法具有操作方便、节能、不造成新的环境污染等优点。此法与加热沉淀法相比，可在常温下操作，减少了有效成分的损失；且为后步树脂交换提供了有利的条件，减少了树脂的污染，从而有利于提高树脂的使用率。与化学凝聚法相比，在处理染菌的发酵液时仍可达到较好的处理效果。随着新型膜材料技术的开发，如陶瓷膜、不锈钢膜等的应用，超滤法的应用效果会有进一步的提高。同时，国内外正在探索反渗透、纳滤等后序处理新工艺的应用完善工艺联结。

二、维生素 B₂ 的制备

1、结构与性质

纯品维生素 B₂ 为黄或橙黄色针状结晶，味微苦。熔点约 280℃，在碱性溶液中呈左旋性。微溶于水(1:3000~1:15000)，极易溶于碱性溶液，饱和水溶液的 pH 值为 6 左右，在此 pH 值下该化合物不分解，呈黄绿色荧光，在 565nm 有特征吸收峰。

2、工艺路线

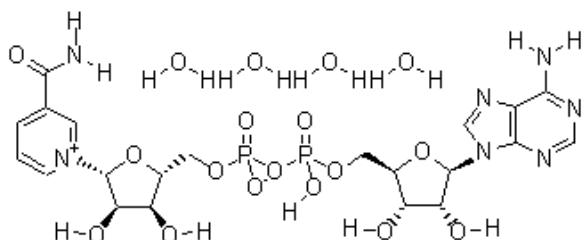


三、辅酶 I 的制备

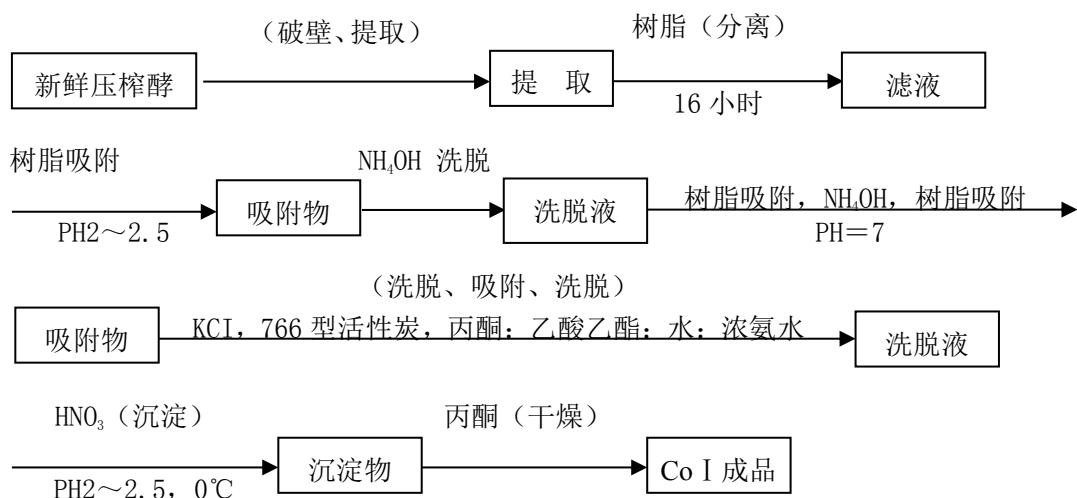
CoI 是具有较强吸湿性的白色粉末，易溶于水或生理盐水，不溶于丙酮等有机溶剂，为两性分子，等电点 pH3，在干燥状态和低温下稳定。对热不稳定，水溶液偏酸或偏碱都易破坏。在生物氧化过程中作为氢的受体或供体，起传递氢的作用，可加强体内物质的氧

化并供给能量。为两性分子，等电点 pH3。广泛存在于动植物中，如酵母、谷类、豆类、动物的肝脏、肉类等。

1、化学结构和性质



2、制备工艺



3、工艺过程

1) 破壁、提取、分离：将新鲜压榨酵母在搅拌下加入等量的沸水中，加热至 95℃保

温 5 分钟，迅速加入 2 倍酵母重量的冰块。过滤，滤饼用常水洗涤 2 次，合并滤液、洗液，

得约为酵母重量 5 倍的提取液。加入强碱性季铵 I 型阴离子交换树脂 201×7 (717)，搅拌

16 小时，过滤，收集滤液。

2) 吸附、洗脱：取滤液用浓盐酸调 pH 至 2~2.5，流经弱酸性丙烯酸系阳离子交换树脂 122 树脂柱吸附 CoA，滤液：树脂=1：0.0146 (W/W)，控制流速 6L/min。吸附完毕，用无热原水先逆流后顺流洗涤至流出液澄清为止，流速为 10L/min，再用 0.3mol/L 氢氧化铵液以 2L/min 流速进行洗脱，用量为 122 树脂的 5.5~6 倍 (V/W)。当流出液呈淡咖啡色，

经 340nm 分光测定，OD 值大于 0.05（稀释 15 倍）时，开始收集，直至流出液呈淡黄色，而 OD 值小于 0.05 时为止，得洗脱液。

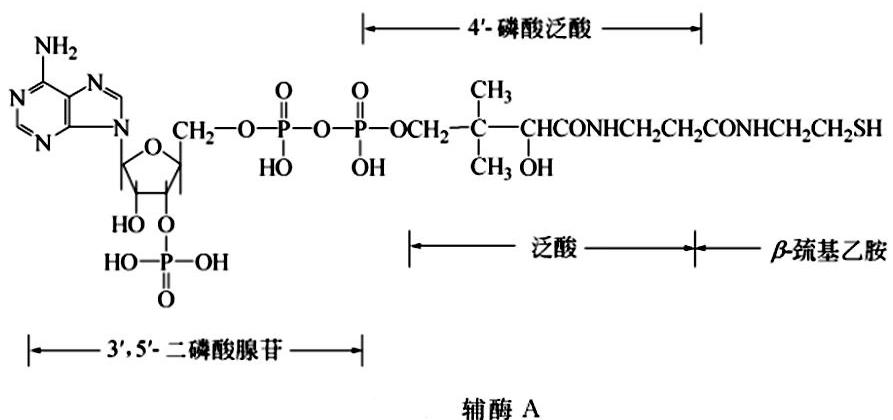
3) 中和、吸附：将强酸性苯乙烯系阳离子交换树脂 732 加至洗脱液中（按洗脱液 8~9.3L 加树脂 1Kg 计），搅拌，测 pH 应为 5~7，过滤，滤饼用无热原水洗涤，合并洗滤液，加稀氨水约 15% 左右，调 pH 至 7（不低于 7），得中和液。再将中和液流经强碱性季铵 I 型阴离子交换树脂 717，50~60 目柱进行吸附（按中和液 7L 加树脂 1Kg 计），控制流速为 1L/min，流出液呈棕色。吸附完，用无热原水以 10 L/min 流速，顺流洗涤树脂至流出液澄清无色为止。

4) 洗脱、吸附、洗脱：将 766 型活性炭 60~80 目柱与 201×7 树脂柱串联，用 0.1mol/L 氯化钾液以 1 L/min 流速洗脱树脂柱吸附物（按 1Kg 树脂需 16L 计），洗脱液立即流经活性炭柱进行吸附，吸附完后，解除两柱串联，先后用 pH9 的无热原水及 pH8 的 4% 乙醇，以 1 L/min 的流速，充分洗涤碳柱。最后用无热原水洗至中性，用丙酮：乙酸乙酯：水：浓氨水=4：1：5：0.02 的混合液洗脱，收集用 3 倍丙酮测试产生白色浑浊的流出液，得洗脱液。

5) 沉淀、干燥：上述洗脱液在搅拌下加入 30~40% 硝酸调至 pH2~2.5，过滤，置于冷库，冰冻沉淀过夜。过滤沉降物，用 95% 冷丙酮洗涤滤饼 2~3 次，滤干，滤饼置五氧化二磷真空干燥器中干燥，即得 Co I。收集回收率 73.4g/t 的酵母废水，折合压榨新鲜酵母半吨。

四、辅酶 A 的制备

近年已实现应用产氨短杆菌细胞作为多酶酶原，以泛酸钠、腺嘌呤核苷、一磷酸腺苷(AMP)、半胱氨酸、无机磷为底物，以少量的 ATP 及 Mg²⁺为辅助因子，于 pH=7.5、37℃ 下通风搅拌 4~6h，合成 CoA，收率达底物总量的 80% 以上，为了充分发挥这一工艺的优点，采用固定化细胞技术制成固定细胞反复使用，可进一步降低成本。其分子式如下图：



制备工艺：



第十章 发酵法与抗生素类药物的制备

第一节 概述

发酵来自拉丁语发泡，当时是指酒精发酵时产生二氧化碳的现象，是用来描述酵母菌作用于果汁或麦芽汁产生气泡的现象，巴斯德认为发酵是酵母菌在无氧呼吸，如酒精发酵是在厌氧条件下向菌体提供能量，并得到原材料的分解产物酒精和二氧化碳。但近年来发

现不仅有厌气菌发酵还有好气菌发酵。

发酵：泛指利用微生物生产有用产品的过程。

一、发酵微生物法的发展阶段

1、天然发酵时期

在自然科学发源以前人们就酿造酒、酱油、醋等，我国在夏禹时期就有酿酒的记录，《周礼》中就有关于酱油的酿造，埃及 6000 年前就有酿啤酒的记录。

2、纯培养技术的建立

300 年前人们发现细菌，200 年前发现发酵的原理，认识到发酵是由微生物引起的。

法国 Buchner 兄弟发现制药酵母与砂共碾后，加糖加防腐剂仍能发酵，意识到，没有生命也能发酵。19 世纪，应用固体培养基分离法，逐渐建立微生物纯分离培养技术，使得发酵管理技术得以改进，使酱油、酒等发酵物变质现象大减。是发酵微生物发展的第一个转折点。

3、通气搅拌技术（深层培养技术）的建立

二十世纪中叶随着青霉素的发现和抗生素工业的兴起，由于这些产品需要好气性发酵，因此建立深层发酵技术，是发酵微生物发展的第二个转折点

4、代谢控制发酵技术的建立

1957 年日本用发酵法生产谷氨酸后，氨基酸发酵生产相继投产，引入了代谢控制发酵技术（以动态生物化学和微生物学为基础，将微生物进行人工诱变，得到适合于生产的某种产品的突变株，再在有控制的条件下培养，即能选择性的大量生产人们所需菌株。），是发酵微生物发展的第三个转折点。

5、酶法转化

1952 年在甾体分子的碳 11 上加羟基，大大简化可的松类激素的合成，甾体微生物加氧反应推动甾体药物的研究和发展，开辟了新的生物转化领域。

二、发酵产物的类型

发酵产物的主要类型包括：微生物菌体、代谢产物、酶。

第二节 发酵工业的菌种与发酵方式

一、发酵工业对菌种的要求

- 1、生产力：能在廉价的培养基上迅速生长，所需的代谢产物的产量高，其它类似代谢产物少。
- 2、操作性：培养条件简单，发酵易控制，产品易分离。
- 3、稳定性：抗噬菌体能力强，菌种纯粹，遗传性状稳定、不易变异退化。
- 4、安全性：非病源菌，不产有害生物活性物质或毒素。
- 5、菌种：菌种纯，遗传性能稳定，不易变异退化。
- 6、菌种对需添加的前体有耐受能力，且不能将前体作为一般碳源利用。

二、高产菌的选育

1、方法：从自然界中获得新菌种、诱变育种、杂交育种、原生质体融合、基因工程。

1) 从自然界中获得新菌种

来源：土壤、空气、动植物等，严重污染的水域，极端环境等。

采集程序：采样→预处理→富集培养→筛选→鉴定→野生型菌株。

2) 诱变育种

物理诱变剂：紫外线、X-射线、 γ -射线等。

化学诱变剂：氮芥、亚硝酸、5-氟尿嘧啶等。

3) 杂交育种：借助有性重组，使不同菌株的遗传物质得以交换。

4) 原生质体融合育种：借助原生质融合技术实现遗传物质的交换。

5) 基因工程育种：DNA 体外重组技术定向育种，技术含量高，应用面广。

2、选育要求：

(1) 选育不需要诱导物的组成型产生菌。组成酶是指微生物中总是适量存在的有些酶，它们是不依赖于酶底物或底物的结构类似物的存在而合成的酶，如葡萄糖转化为丙酮酸过程中的各种酶。诱导酶是指适应性酶，是依赖于某种底物或底物的结构类似物的存在而合成的酶。诱导酶的生产需要诱导物，而且受到诱导物的种类、数量以及分解产物的影响。

响，诱导物有时又比较昂贵。

(2) 筛选抗反馈阻遏和抗反馈抑制的突变菌株，如结构基因突变，使结构酶无结合能力但有催化活性；末端产物的积累调节基因或操纵基因突变产生的阻遏蛋白与终产物不能结合，或结合但不发生作用。

(3) 选育营养缺陷型突变株。

(4) 筛选负变菌株的回复突变株。

(5) 筛选细胞膜通透性改变的突变株。

(6) 筛选抗生素抗性的突变株。

三、菌种的保藏

1、目的：保证菌种经过较长时间后仍保持生活能力，防止被杂菌污染，形态特征和生理形状尽可能不发生变异。

2、原理：根据微生物的生理、生化特性，人工创造条件（如干燥、低温、缺氧、缺乏营养等）使微生物代谢活动处于不活泼状态，使其存活且得以延续。在进行保藏时最好是选用菌种的休眠体，如芽孢、孢子。通过保藏可以减少微生物的新陈代谢，降低菌种变异的几率。

3、菌种保藏三要素

1) 典型菌种的优良纯种的休眠体。

2) 创造有利于种子休眠的环境（低温、干燥、缺氧、避光、缺少营养）。

3) 尽可能采用多种不同的手段保藏同一菌株。

4、菌种保藏的常用方法

常用方法：斜面低温保藏法、石蜡油封存法、砂土管保藏法、麸皮保藏法、甘油悬液保藏法、冷冻真空干燥保藏法、液氮超低温保藏法和宿主保藏法，其各自特点如下：

方法名称	主要特点	适用范围	保藏期
斜面低温	传代培养，4℃保藏	短期保藏。	1-6月

保藏			
石蜡油封存	石蜡油隔绝空气, 室温或 4℃	中短期保藏; 不适用于能分解烃类的菌种。	1-2 年
砂土管保藏	沙土管作载体, 干燥器中抽真空, 室温或 4℃保藏	产孢子微生物和芽孢细菌的长期保藏; 不适用对干燥敏感的微生物	1-10 年
麸皮保藏	麸皮作载体, 干燥, 4℃保藏	产孢子霉菌和某些放线菌, 工厂多采用此法	1 年
甘油悬液保藏	悬浮于 10-15%甘油中, 需低温冰箱	基因工程菌	1 年
冷冻真空干燥保藏	用保护剂制备悬液, 快速冻结, 减压抽真空, 需冻干机	各类微生物	5-15 年
液氮超低温保藏	保护剂, 超低温 (-196℃), 需超低温液氮设备	各类微生物	15 年以上
宿主保藏	与培养基混合直接低温保存	专性活细胞寄生微生物	

5、菌种保藏机构

ATCC (美国典型菌种保藏中心)

CMCC (中国医学微生物菌种保藏管理中心)

NBRC (日本技术评价研究所生物资源中心)

四、菌种的扩大培养

在发酵生产过程中，种子制备过程大致可分为两个阶段：实验室种子制备阶段和生产车间种子制备阶段。

1) 实验室种子制备阶段

产孢子能力强的微生物：固体培养基培养孢子，孢子作为种子罐的种子培养。

产孢子弱或发芽慢的微生物：液体培养基培养菌体，菌体作为种子罐的种子培养。

2) 生产车间种子的制备

种子罐的级数：指制备种子需逐级扩大培养的次数，分为：一级种子、二级种子和三级种子。

一级种子：孢子或菌丝→小种罐培养→一级种子（谷氨酸）

二级种子：一级种→较大种罐培养→二级种子（青霉素）

三级种子：二级种→大种罐培养→三级种子（链霉素）

种子罐级数的优缺点：

种子罐级数少：简化工艺及控制；染菌机率低；发酵波动小；消毒等工作量小。

种子罐级数多：变异机率高；工艺控制复杂；工作量大，一般2-4级。

五、发酵的培养基

1、培养基：是人工配制的供微生物或动植物细胞生长、繁殖、代谢和合成人们所需产物的营养物质和原料。广义上讲，凡是支持微生物或动植物细胞生长和繁殖的介质或材料都可作培养基的原料。

2、培养基的类型

1) 按组分：

①合成培养基：成分明确、稳定，多用于研究和育种，不适合大规模生产。

②天然培养基：天然动植物产品，营养丰富、价格低廉、适于工业生产。

2) 按物理状态分：

①固体培养基：适合菌种的培养和保存。

②液体培养基：适合发酵工业大规模使用。

③半固体培养基

3) 按用途分:

①孢子培养基: 供菌种繁殖孢子用的, 常采用固体培养基。培养基营养不需太丰富, 无机盐浓度适当, 培养基的 pH 值要适中, 常用麸皮培养基、小米培养基、大米培养基、玉米培养基。

②种子培养基: 种子培养基是供孢子萌发和菌种生长繁殖用的培养基, 营养成分要求比较丰富、完全、易被菌体利用。营养成分有葡萄糖、糊精、蛋白胨、玉米浆、酵母粉、硫酸铵等。

③发酵培养基: 发酵培养基是供菌种生长、繁殖和合成产物用的培养基。应注意碳氮源速效和迟效的相互搭配, 少用速效营养, 多加迟效营养, 比例适宜。

3、发酵培养基的组成

1) 基本营养源:

A、碳源:

碳源种类: 糖类、油脂、有机酸、低碳醇等。

工业常用碳源: 淀粉、淀粉水解糖、糖蜜、秸秆等。

B、氮源:

有机氮: 黄豆/棉子饼粉、玉米浆、蛋白胨和尿素等。

无机氮: 铵盐、硝酸盐和氨水等。

C、无机盐和微量元素

作用: 构成菌体成分; 作为酶的组成或激活剂; 调渗透压、pH、电位等。

常用的无机盐和微量元素: P、Mg、S、Fe、Na、Cl、Zn、Co、Mn 等。

D、水:

作用: 良好溶剂, 热导好; 运输介质; 维持细胞形态; 水合、脱水作用。

常用的水源: 深井水、自来水及地表水。

水质的控制: pH 值、溶解氧、可溶性固体、污染程度以及矿物质组成和含量等。

E、生长因子

F、发酵调节剂

前体：指直接被微生物在生物合成时结合到产物分子中去，其自身的结构并没有多大变化，但是产物的产量却因加入该化合物有较大的提高。

产物合成促进剂和抑制剂：指那些既非营养物质又不是前体，但加入后却能提高产物产量的添加物。抑制剂是指在发酵过程中会抑制某些代谢途径的进行，同时会使另一代谢途径活跃，从而获得人们所需的某种产物或是正常代谢的某一代谢中间产物积累起来。

生长因子：那些对微生物生长不可缺少的微量有机物质，微生物不能通过普通的碳源、氮源合成这些物质，需另外添加，包括维生素、氨基酸、嘌呤碱和嘧啶碱及其衍生物。

2) 培养基选择原则：

- ① 产物或菌体得率大的
- ② 降低产品的分离提纯成本
- ③ 生产能力最高的
- ④ 副产品生成最少
- ⑤ 原料质量稳定，供应充足
- ⑥ 工艺过程较易进行

3) 培养基组成配比的影响

- ① 氮源过多：菌体生长旺盛，pH 值偏高，不利于代谢产物积累。
- ② 氮源不足：菌体繁殖量过少，影响产量。
- ③ 碳源过多：pH 值偏低。
- ④ 碳源不足：易引起菌体衰老和自溶。

六、常用的灭菌方法

1、化学物质灭菌：所用试剂有甲醛、苯酚、高锰酸钾、新洁尔灭、乙醇、过氧乙酸、漂白粉等。适用范围为生产环境或小型器具。不适用于培养基的灭菌。

2、辐射灭菌：用于灭菌的射线包括紫外线、X 射线、 γ 射线，其中以紫外线最常用。紫外线主要用于无菌室、培养间等空间的灭菌。

3、过滤介质灭菌：主要用于澄清液体及气体的除菌。

4、加热灭菌：干热灭菌中常用火焰灭菌，主要用于金属接种工具、试管口、锥形瓶口、接种移液管和滴管外部及无用的污染物或实验动物的尸体等灭菌。操作为金属小镊子、小刀、玻璃涂棒、载玻片、盖玻片灭菌时，应先将其浸泡在 75% 酒精溶液中，使用时从酒精溶液中拿出来，迅速通过火焰，瞬间灼烧灭菌。湿热灭菌是利用饱和蒸汽灭菌。广泛用于工业生产中大量培养基、设备、管路及阀门的灭菌。

七、发酵的方法

1、按对氧的需求不同分类：静置发酵和通气发酵。其中通气发酵包括浅盘液体发酵、浅盘固体发酵、深层液体发酵、深层固体发酵。

2、按物料与产物进出方式不同分类：

1) 分批发酵：

分批发酵又称为分批培养，是指在一个密闭系统内投入有限数量的营养物质后，接入少量的微生物菌种进行培养，使微生物生长繁殖，在特定的条件下只完成一个生长周期的微生物培养方法。也指在发酵过程中，除了不断进行通气（好氧发酵）和为调节发酵液的 pH 而加入酸碱溶液外，与外界没有其它物料交换的一种发酵方式。培养基的量一次性加入，产品一次性收获，是目前广泛采用的一种发酵方式。其优点是：① 对温度的要求低，工艺操作简单；② 比较容易解决杂菌污染和菌种退化等问题；③ 对营养物的利用效率较高，产物浓度也比连续发酵高。缺点是：① 人力、物力、动力消耗较大；② 生产周期较短，由于分批发酵时菌体有一定的生长规律，都要经历延滞期、对数生长期、稳定期和衰亡期，而且每批发酵都要经菌种扩大发酵、设备冲洗、灭菌等阶段；③ 生产效率低，生产上常以体积生产率（以每小时每升发酵物中代谢产物的 g 数来表示）来计算效率，在分批发酵过程中，必须计算全过程的生产率，即时间不仅包括发酵时间，而且也包括放料、洗罐、加料、灭菌等时间。

2) 补料分批发酵

补料分批发酵 又称“流加发酵”，是指在微生物分批发酵过程中，以某种方式向发酵系统中补加一定物料，但并不连续地向外放出发酵液的发酵技术，是介于分批发酵和连续发酵之间的一种发酵技术。其优点有① 可以解除底物的抑制、产物的反馈抑制和分解代

谢物阻遏作用。当代谢产物收率或其生产速率明显地受某种底物组分浓度影响（如用醋酸、甲醇、苯酚等作为发酵基组分而存在底物浓度的抑制）时，采用补料分批技术比分批发酵有利；② 可以减少菌体生长量，提高有用产物的转化率；③ 菌种的变异及杂菌污染问题易控制；④ 便于自动化控制。

3) 连续发酵

连续发酵是指以一定的速度向发酵罐内添加新鲜培养基，同时以相同速度流出培养液，从而使发酵罐内的液量维持恒定的发酵过程。其优点① 可以提高设备的利用率和单位时间产量，只保持一个期的稳定状态；② 发酵中各参数趋于恒值，便于自动控制；③ 易于分期控制，可以在不同的罐中控制不同的条件。其缺点① 对设备的合理性和加料设备的精确性要求甚高；② 营养成分的利用较分批发酵差，产物浓度比分批发酵低；③ 杂菌污染的机会较多，菌种易因变异而发生退化。

第三节 发酵的影响因素

一、菌种简介

发酵是利用微生物来生产产品，因此菌种至关重要。现在工业上用于生产青霉素的微生物主要是青霉菌，生产味精的微生物是棒状杆菌，生产柠檬酸的微生物主要是黑曲霉。这是因为每一种微生物的代谢特征不同，它们产生特定产物的能力也不同。为了利用发酵生产所需的产物，不是随便拿来一个菌种就行。直接从自然界分离到的微生物不一定具有生产特定产物的能力，须在实验室里对几百株、数千株微生物进行筛选。即使得到了产生特定产物能力的菌株，其生产和性能也不见得能够满足生产的需要，还须经过诱变选育得到高产、性能优良的菌种。即使利用基因工程构建的具有特殊生产能力的工程菌，都还要对其进行仔细研究，全面了解产生产物的规律、影响菌株产生产物的各种因素和它们之间的关系，以及控制办法，并在实验室里进行验证和扩大规模的验证，才能够用于生产。在大规模工业生产上有了优良的生产菌种还不够，必须通过适当的措施提供足够量的种子。

二、发酵培养基对微生物生长的影响

现在大规模工业发酵产品的生产，多采用液体培养基进行深层发酵。使用的培养基必须满足微生物细胞生长、繁殖的需要，因为没有大量的细胞就不可能产生大量的产物；但是细胞的过分生长会消耗大量的营养物，有时又会影响细胞的生产能力，会使产物的产量和产率下降。使用的培养基还必须有利于微生物大量合成产物。因此，培养基的组成十分关键。

三、纯种发酵与灭菌对微生物生长的影响

现代发酵工业绝大多数采用纯种发酵，可以保证高产及生产过程和产品质量的稳定。污染是发酵工业的大敌，它会使发酵失败，造成巨大损失。因此，灭菌和无菌操作成为发酵工业的重要环节。

发酵涉及到的设备，如发酵罐、空气过滤系统、管道、阀门、取样设备等均必须用 120 °C 以上的高压蒸汽进行彻底灭菌，把存在的所有微生物杀死。配制好的培养基在进入发酵罐之前要加热到 120 °C 以上，进行灭菌，或进入时采用连续高温灭菌的方法进行灭菌，即将与发酵关联的所有系统进行灭菌，然后使系统降温到发酵温度后，接入种子，开始发酵。只有这样才能保证接入的菌种不受污染，进行正常发酵。如果灭菌不彻底，哪怕有很少量的杂菌没有被杀死，也会在发酵过程中大量繁殖，造成污染，使发酵失败。

四、温度对微生物生长的影响

温度主要是通过影响微生物细胞内生物大分子的活性来影响微生物的生命活动。一方面，随着温度的升高，细胞内的酶反应速度加快；另一方面，随着温度的进一步增高，生物活性物质（蛋白质，核酸等）发生变性，细胞功能下降，甚至死亡。所以，每种微生物都有最适生长温度。作为整体，微生物可在-10~95 °C 范围中生长，极端下限为-30 °C，极端上限为 105~300 °C。但对于某一种特定的微生物来说，则只能在一定的温度范围内生长。温度下限和上限分别称为微生物的最低和最高生长温度。当低于或高于最低或最高生长温度，微生物就停止生长，甚至死亡。

需要指出的是，微生物不同的生理活动需要在不同的温度条件下进行，所以，生长速率、发酵速度、代谢产物积累速度的最适温度往往不在同一温度下。例如，乳酸链球菌在

34 ℃时繁殖速度最快，25~30 ℃时细胞产量最高，40 ℃时发酵速度最快，30 ℃时乳酸产量最高。其他微生物也有类似特点。

在较高温度下，细胞分裂虽然较快，但维持时间不长，容易老化；相反，在较低温度下，细胞分裂虽然较慢，但维持时间长，细胞的总产量反而较高。

同样，发酵速度与代谢产物积累之间也有类似关系。研究不同微生物在生长或积累代谢产物阶段时的最适温度，采用变温发酵，对提高发酵生产效率具有重要意义。

五、pH 对微生物生长的影响

培养基的 pH 对微生物生长的影响主要是引起细胞膜电荷变化，以及影响营养物离子化程度，从而影响微生物对营养物的吸收；pH 也会影响生物活性物质，如酶的活性。

与温度对微生物的影响类似，微生物存在最低生长 pH、最适生长 pH 和最高生长 pH。不同微生物对环境 pH 适应的范围不同。一般微生物生长的最适 pH 在 4.0~9.0 范围内。真菌生长的范围宽，细菌较窄（3~4pH 单位），细菌、放线菌一般适应于中性偏碱性环境，而酵母、霉菌适应于偏酸性环境。最适生长 pH 偏酸性的微生物，称为嗜酸性微生物；其中不能在中性环境生长的称专性嗜酸微生物，如乳酸杆菌和假单胞杆菌；既能适应酸性，也能在中性环境中生长的称兼性嗜酸菌；最适生长 pH 偏碱性的称嗜碱性微生物，如链霉菌。

同一种微生物在不同的生长阶段和不同生理生化过程中，对环境 pH 也有不同要求。如丙酮丁醇梭菌在 pH 为 5.5~7.0 时，以菌体生长繁殖为主；pH 为 4.3~5.3 时，才进行丙酮丁醇发酵。

同一种微生物由于培养环境 pH 不同，可能积累不同的代谢产物。如黑曲霉在 pH 为 2~3 的环境中发酵蔗糖，产物以柠檬酸为主，只产极少量的草酸；当 pH 接近中性时，则大量产生草酸，而柠檬酸产量很低。又如酵母菌在最适 pH 时，进行乙醇发酵，不产生甘油和醋酸；如果环境 pH 大于 8，发酵产物除乙醇外，还有甘油和醋酸。因此，在发酵过程中，根据不同目的，采用不同 pH 发酵，可以控制产物和生产效率。

大多数微生物能分解糖，产生酸性物质，造成 pH 下降。少数微生物能分解尿素成氨，使环境 pH 上升，蛋白质脱羧反应也会使 pH 上升。所以，微生物的代谢活动会改变环境

pH，影响其生存。pH 变化的程度与培养基的 C/N 比有关，C/N 比高，则 pH 下降明显；反之，pH 有可能会上升。有时为了控制发酵液的 pH 需要通过加入酸碱进行调节。

六、溶氧对发酵的影响

工业上大部分为好氧发酵，如抗生素、氨基酸、维生素、多糖、有机酸（细菌发酵生产乳酸例外）等发酵均需要往发酵液中通入无菌空气，以满足微生物生长代谢过程对氧的需求；而酒精、丙酮、丁醇和乳酸的细菌发酵为厌氧发酵，发酵过程不需要氧。

对于好氧发酵的工业生产，如何保证发酵液中氧的供给，满足微生物对氧的需求，使氧的供、需矛盾不会成为生产的限制因素，是稳定和提高生产、降低成本的关键之一。在发酵过程中氧的供给够不够，只凭通气量的大小是难以确定的。由于发酵过程随着微生物的繁殖、营养物的消耗和代谢产物的积累，发酵液的物理、化学和生物学性质均会发生改变，这时尽管通气量不变，氧在培养基中的溶解速度和浓度均会发生变化。为了了解和掌握氧对发酵的影响，最简单而有效的办法是就地测定发酵液中的氧浓度，从氧浓度的变化情况了解氧的供需规律和它的变化对生产的影响。微生物在不同发酵阶段，因其生长、代谢水平的变化，对氧的需求量也有变化。因此，控制发酵液的溶氧可以达到提高生产水平的目的。发酵液中溶氧浓度可以通过控制通气量、罐压、搅拌速度等控制氧的溶解速度和浓度。

可以看出，发酵过程对周围环境的物理和化学条件十分敏感，任何一种微生物发酵均需要适当的温度、pH、溶解氧、营养物等，保证最适的发酵条件是发酵成功获得高产产品的关键

七、发酵产生的泡沫

泡沫是气体被分散在少量液体中的胶体体系。泡沫间被一层液膜隔开而彼此不相连通。发酵过程中所遇到的泡沫，其分散相是无菌空气和代谢气体，连续相是发酵液。

1、泡沫的类型

一类存在于发酵液的液面上，这类泡沫气相所占比例特别大，并且泡沫与它下面的液体之间有能分辩的界线。如在某些稀薄的前期发酵液或种子培养液中所见到的。

另一种泡沫是出现在粘稠的菌丝发酵液当中，这种泡沫分散很细，而且很均匀，也较

稳定。泡沫与液体间没有明显的波面界限，在鼓泡的发酵液中气体分散相占的比例由下而上地逐渐增加。

2、泡沫产生的原因

由外界引进的气流被机械地分散形成（通风、搅拌）或发酵过程中产生的气体聚结生成（发泡性物质）。

3、泡沫对发酵的不利影响

1) 降低生产能力：在发酵罐中，为了容纳泡沫，防止溢出而降低装量。

2) 引起原料浪费：如果设备容积不能留有容纳泡沫的余地，气泡会引起原料流失，造成浪费。

3) 影响菌的呼吸：如果气泡稳定，不破碎，那么随着微生物的呼吸，气泡中充满二氧化碳，而且又不能与空气中氧进行交换，这样就影响了菌的呼吸。

4) 引起染菌：由于泡沫增多而引起逃液，于是在排气管中粘上培养基，就会长菌。

随着时间延长，杂菌会长入发酵罐而造成染菌。大量泡沫由罐顶进一步渗到轴封，轴封处的润滑油可起点消泡作用，从轴封处落下的泡沫往往引起杂菌污染。

4、常用消泡剂的种类

1) 天然油脂：常用的有玉米油、米糠油、豆油、棉子油、鱼油及猪油等。

2) 聚醚类：在生产上应用较多的是聚氧丙烯甘油和聚氧乙烯氧丙烯甘油(又称泡敌)。

3) 高级醇类：十八醇是较常用的一种，可以单独或与载体一起使用。据报道，它与冷榨猪油一起控制青霉素发酵的泡沫，效果较好。聚二醇具有消沫效果持久的特点，尤其适用于霉菌发酵。

4) 硅酮类：硅酮类消沫剂主要是聚二甲基硅氧烷及其衍生物。

第四节 发酵产物的提取

一、发酵液的预处理

1、预处理目的

除去可溶性杂质、除掉大分子降低粘度，有些目的物为胞内物质需要细胞破碎后再提

取。

2、发酵液的预处理

1) 加水稀释法和加热法

加水稀释法能降低液体粘度，但会增加悬浮液的体积，加大后继过程的处理任务，而且，单从过滤操作看，稀释后过滤速率提高的百分比必须大于加水比才能认为有效，即若加水1倍，则稀释后液体的粘度必须下降50%以上才能有效提高过滤速率。

加热法是发酵液预处理最简单最常用的方法，加热可有效降低液体粘度，提高过滤速率。同时，在适当温度和受热时间下可使蛋白质凝聚，形成较大颗粒的凝聚物，进一步改善了发酵液的过滤特性。

2) 调节 pH 值

调节 pH 值可以改善发酵液吸附性质和使蛋白变性，对于加入离子型絮凝剂的发酵液，调节 pH 可改变絮凝剂的电离度，从而改变分子链的伸展状态。

3) 加入反应剂

改善过滤性能较好的方法是加入一些反应剂，它们能相互作用，或和某些溶解性盐类发生反应生成不溶解的沉淀。生成的沉淀能防止菌丝体粘结，使菌丝具有块状结构，沉淀本身即可作为助滤剂，并且还能使胶状物和悬浮物凝固。例如发酵液中有不溶解的多糖存在，则最好用酶将它转化为单糖，以提高过滤速度。加入淀粉酶后，能使过滤速度加快。在发酵液中加入某些盐类，可除去高价无机离子。如除去钙离子，可加入草酸钠，生成的草酸钙能促进蛋白质凝固，提高溶液质量。除去镁离子，可加入三聚磷酸钠，它与镁离子形成不溶性络合物。用磷酸盐处理，也能大大降低钙离子和镁离子的浓度。除去铁离子，可加入黄血盐，使其形成普鲁士蓝沉淀。

二、发酵目的物的提取纯化

1、分离纯化的注意事项

- 1) 条件温和，必须保持产物生理活性。
- 2) 能够达到要求的纯度，要选择合适的分离技术。
- 3) 收率高，目的产物的量和活性必须有较高收率。

- 4) 生产成本尽量降低。
- 5) 工艺过程尽可能缩短和简化。
- 6) 分离快速，以提高生产能力。
- 7) 生产中所产生废物尽可能少并能够处理。
- 8) 实验过程能成功进行放大。

2、分离纯化的方法

- 1) 沉淀分离法：沉淀是物理环境的变化引起溶质的溶解度降低，生成固体凝聚物的现象。沉淀法简单、成本低、使用广泛，一般作为初步分离的手段。沉淀法的分类：等电点沉淀法、盐析法、有机溶剂沉淀法、生成盐复合物沉淀法、热变性及酸碱变性沉淀法等。
- 2) 吸附法：利用吸附剂与杂质、色素物质、有毒物质、产品之间分子引力的差异，从而起到分离的作用。

①吸附法的目的：

将产品吸附浓缩于吸附剂上或将杂质、色素等需要从发酵液中去除的物质吸附于吸附剂上。

②吸附法的类型：

物理吸附：吸附剂和吸附物通过分子力(范德华力)产生的吸附。

化学吸附：化学吸附是由于吸附剂在吸附物之间的电子转移，通过化学键作用而产生的，属于库仑力范围。

离子交换吸附：吸附剂表面如为极性分子或离子所组成则它会吸引溶液中带相反电荷的离子而形成双电层。这种吸附又称为极性吸附。

③吸附法的优、缺点：

优点：可不用或少用有机溶剂；操作简单、安全、设备简单；生产过程中 pH 变化小，适用于稳定性差的生化物质。

缺点：选择性差、收率不太高、特别是无机吸附剂性能不稳定，不能连续操作，劳动强度大，有些不环保。

3) 离子交换法

离子交换剂通常是一种不溶性高分子化合物，它的分子中含有可解离的基团，这些基团在水溶液中能与溶液中的其它阳离子或阴离子起交换作用。交换反应都是平衡反应，但在层析柱上进行时，由于连续添加新的交换溶液，平衡不断按正方向进行，所以可以把离子交换剂上的原子离子全部洗脱下来，同时溶液中的离子全部被交换并吸附在树脂上。如果有两种以上的成分被交换吸着在离子交换剂上，用洗脱液洗脱时，其被洗脱的能力则决定于各自洗脱反应的平衡常数。

离子交换反应是可逆反应，溶液和树脂中的离子之间浓度差推动他们之间的交换，浓度差越大，交换速率就越快，达到一定程度则形成离子交换平衡状态，一定条件下离子交换反应的方向和限度，这就是离子交换平衡的问题，即离子交换热力学。

离子交换反应在动态下进行，因此，离子交换的效果除受离子浓度和选择系数的影响外，还要受离子从溶液中进入树脂表面和在树脂内部的扩散过程的影响，这个影响因素就是离子交换速率的影响，离子交换反应的历程和达到平衡的时间，这就是离子交换速率的问题，即离子交换动力学。

离子交换过程有两个阶段——吸附和解吸附。吸附在离子交换剂上的物质可以通过改变 pH 使吸附的物质失去电荷而达到解离但更多的是通过增加离子强度，使加入的离子与被吸附物质竞争离子交换剂上的电荷位置，使被吸附物质与离子交换剂解开。不同物质与离子交换剂之间形成电键数目不同，即亲和力大小有差异，因此只要选择适当的洗脱条件便可将混合物中的组分逐个洗脱下来，达到分离纯化的目的。

4) 萃取与浸取分离法

萃取是利用溶质组分在两个互不混溶的液相中竞争性溶解和分配性质上的差异来进行分离操作。溶剂萃取的目标是将目标物质从第一个液相中依靠更强大的溶解力抽提到第二个液相中。

浸取是用某种溶剂把有用物质从固体原料中提取到溶液中的过程，也叫做浸出。溶剂从固体颗粒中浸取可溶性物质的过程包括以下步骤：①溶剂从溶剂主体传递到固体颗粒的表面；②溶剂扩散渗入固体内部和内部微孔隙内；③溶质溶解进入溶剂；④通过固体微孔隙通道中的溶液扩散至固体表面并进一步进入溶剂主体；以上步骤都会影响浸取速

率，所以受影响的因素包括分子扩散中的诸多因素。

5) 膜分离法

1748 年法国学者 Abbe Nollet 首次提出了膜分离现象，经过近二个世纪的摸索、研究，20 世纪 50 年代膜分离技术才逐渐发展成为一门新兴高技术边缘学科。1963 年第一个膜渗析器的诞生开创了膜分离技术的新纪元，二、三十年来得到了迅猛的发展。在各个工业领域及科研中得到大规模应用，出现了各种有价值的微滤、超滤、纳米滤和反渗透等分离膜。膜分离法的优点有：①适用范围广；②膜分离过程为物理过程，不需加入化学试剂；③膜分离技术分离装置简单，占地面积小，系统集成容易；④膜分离过程系统简单、操作容易，且易控制，便于维修，有利于生产自动化的推广与普及。

第五节 抗生素的制备工艺

抗生素早期一般被认为来源于微生物，且主要作用于细菌感染。故认为抗生素是微生物在代谢过程中产生的，在低浓度下就能抑制微生物的生长和活动，甚至杀死各种微生物的化学物质，由于抗生素的这种杀菌能力，我们曾经把这类物质叫做抗菌素。随着抗生素研究和生产的发展，新的抗生素的来源正在扩大。可以是微生物、植物（如蒜素、常山碱、黄连素、长春花碱、鱼腥草素等）、动物（如鱼素、红血球素等）。但抗生素的工业化生产主要是来自微生物的大量发酵法，微生物是抗生素舞台上的主角。作用对象主要有病毒、细菌、真菌、原生动物、寄生虫、藻类、肿瘤细胞等，因此不能把抗生素仅仅作为抗菌药物。

我国在 1953 年 5 月 1 日，建立了第一个生产青霉素的抗生素工厂（上海第三制药厂）；1958 年 6 月 3 日，最大的抗生素联合企业建成投产（华北制药厂，石家庄）。我国是抗生素使用大国，也是抗生素生产大国，年产抗生素原料大约 21 万吨，出口 3 万吨，其余自用（包括医疗与农业使用），人均年消费量 138 克左右（美国仅 13 克）。

一、抗生素的分类

可根据生物来源、作用对象、化学结构、作用机制、生物合成途径等方面对抗生素进

行分类。

1、根据抗生素的生物来源分类 (生物学家)

1) 放线菌产生的抗生素：如链霉素、四环类（如四环素）、大环内酯类（如红霉素）、多烯类（如制霉菌素）、放线菌素类（如放线菌素 D）等，其中链霉菌属最多，诺卡氏菌属、小单孢菌次之。

2) 真菌产生的抗生素：如青霉菌属和头孢菌属等分别产生一些很重要的抗生素（青霉素、灰黄霉素、头孢菌素）。

3) 细菌产生的抗生素：如多粘杆菌、枯草杆菌、芽孢杆菌等，如多粘菌素。

4) 植物或动物产生的抗生素：从被子植物蒜中制得的蒜素；从动物脏器中制得的鱼素等。

2、根据抗生素的作用对象分类 (医生、病理学家)

1) 广谱抗生素：如氨苄青霉素既抑制 G+，又抑制 G-。

2) 抗 G+的抗生素：如青霉素。

3) 抗 G-的抗生素：如链霉素。

3) 抗真菌的抗生素：如制霉菌素。

4) 抗病毒的抗生素：如四环类抗生素对立克次氏体及较大病毒有一定作用。

5) 抗癌的抗生素：如阿霉素。

3、根据抗生素的化学结构分类 (化学家)

1) β -内酰胺类抗生素：包括青霉素类，头孢菌素类等。

2) 氨基糖苷类抗生素：包括链霉素、庆大霉素等。

3) 大环内脂类抗生素：如红霉素、麦迪加霉素。

4) 四环类抗生素：如四环素、土霉素。

5) 多肽类抗生素：如多粘菌素、杆菌肽。

6) 蒽环类抗生素：如阿霉素、柔红霉素。

7) 喹诺酮类抗生素：如环丙沙星、诺氟沙星。

4、根据抗生素的作用机制分类

- 1) 抑制细胞壁合成的抗生素：如青霉素。
- 2) 影响细胞膜功能的抗生素：多烯类抗生素。
- 3) 抑制病原菌蛋白质合成的抗生素：四环素。
- 4) 抑制核酸合成的抗生素：如影响 DNA 结构和功能的丝裂霉素 C。
- 5) 抑制生物能作用的抗生素：如抑制电子转移的抗霉素。

此种分类的优点是便于进行理论研究，有助于了解抗生素影响病原体新陈代谢的哪些环节，从而找出治疗的规律，使抗生素的使用更为合理。

5、根据抗生素的合成途径分类

- 1) 氨基酸、肽类衍生物抗生素：如青霉素类、头孢菌素等寡肽抗生素。
- 2) 糖类衍生物抗生素：如链霉素等糖苷类抗生素。
- 3) 以乙酸、丙酸为单位的衍生物抗生素：红霉素等丙酸衍生物。

二、抗生素的剂量表示法

抗生素应用时剂量小，因此除重量外，常用特定的效价单位表示：

- 1) 稀释单位：无法制得纯品，最初表示方法，一定基于稀释法定的基准单位。一个青霉素的效价单位：能在 50mL 肉汤培养基中完全抑制金黄色葡萄球菌标准菌株的发育的最小青霉素剂量。一个链霉素效价单位：能在 1mL 肉汤培养基中完全抑制大肠杆菌 (ATCC9637) 发育的最小剂量。
- 2) 重量单位：以抗生素的有效成分的重量作为抗生素的基准单位，大多数使用此单位。

一般定义 $1\text{mg}=1400$ 单位，对于各种酸、碱、盐，指定其中的一个，如链霉素、氯霉素等以游离碱计，又如金霉素、氯霉素以盐酸盐计。

例 1： 1mg 硫酸链霉素的效价= 1400×580.1 (链霉素碱的分子量) / 728.1 (硫酸链霉素的分子量) = 798U (实际上使用的要求必须大于 720U)

例 2： 1mg 青霉素 G 钠盐，可抑制 83300ml 中的金黄色葡萄球菌的生长，有多少单位？

解： $83300/50=1667\text{U}$, $1\text{U}=0.6\mu\text{g}$

三、抗生素的体外抗菌作用

判断药物有无抗菌作用及其抗菌作用的强弱，有体外和体内两种试验方法。一般先进行体外抗菌试验，若发现药物有抗菌作用，可再进行体内抗菌试验。体外抗菌试验主要用于筛选抗菌药物或测定细菌对药物的敏感性，所以也称为药敏试验，常用最低抑菌浓度（MIC minimum inhibitory concentration）表示，是指药物完全抑制某种微生物的最低浓度。

1) 抑菌、杀菌作用

抑菌作用：抗生素存在时细菌的繁殖受到抑制，去除抗生素后，对细菌的抑制作用消失。杀菌作用：对细菌的不可逆损害，导致死亡。

2) 菌种的最低药物敏感度测定

最小抑菌浓度（MIC）：培养 24h 以最低浓度无菌体生长者，用来表示抗生素的抗菌活性作用，单位是 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

最小杀菌浓度（MBC）：次代继续孵化 24h 以最低浓度无菌生长者。即当药物浓度在稍高于 MIC 值浓度下的抑菌作用是不可逆的，称为杀菌作用。最低抑菌浓度与最低杀菌浓度可以相同，也可以有所不同。最低杀菌浓度的确定即依次将未见细菌生长的各管培养物各吸取 0.1mL 涂布于合适的琼脂培养基平板上，在规定的温度下培养 18~24h，平板上的菌落数小于 5 个的最小稀释度的药物浓度即为最低杀菌浓度。

3) 抗菌谱：某种抗生素所能抑制或杀灭病原体的范围，称之为该种抗生素的抗菌谱。

四、抗生素的生产过程

1、产生菌种

1) 菌种：来源于自然界，得到能产生抗生素的微生物，经分离、选育和纯化后的物质。

2) 保藏：冷冻干燥法制备后，以超低温，即在液氮冰箱(-190°C~-196°C)内保藏。

3) 复壮：一般生产用菌株经多次移植往往会发生变异而退化，故必须经常进行菌种选育和纯化以提高其生产能力。

2、孢子制备

1) 条件：生产用的菌株须经纯化和生产能力的检验，若符合规定，才能用来制备种

子。

2) 孢子制备：将保藏的处于休眠状态的孢子，在严格的无菌条件下，将其接种到经灭菌过的固体斜面培养基上，在一定温度下培养 5-7 日或 7 日以上，这样培养出来的孢子数量还是有限的。

3) 扩大培养：必要时可进一步用扁瓶在固体培养基(如小米、大米、玉米粒或麸皮)上扩大培养。

3、种子制备

1) 目的：使孢子发芽、繁殖以获得足够数量的菌丝，并接种到发酵罐中；

2) 方法：可用摇瓶培养后再接入种子罐进行逐级扩大培养或直接将孢子接入种子罐逐级放大培养。

3) 扩大培养：级数通常为二级。

4、培养基的配制

在抗生素发酵生产中，由于各菌种的生理生化特性不一样，采用的工艺不同，所需的培养基组成亦各异。即使同一菌种，在种子培养阶段和不同发酵时期，其营养要求也不完全一样。培养基主要成分包括碳源、氮源、无机盐类(包括微量元素)和前体等。

5、发酵

1) 发酵时间：根据抗生素品种和发酵工艺而定。

2) 溶氧：在整个发酵过程中，需不断通无菌空气并搅拌，以维持一定罐压或溶氧。

3) 控制灌温：在罐的夹层或试管中需通冷却水以维持一定罐温。

4) 消泡：加泡沫剂以控制泡沫，必要时还加入酸、碱以调节发酵液的 pH。

5) 检测指标：定时取样进行生化分析、镜检和无菌试验。分析或控制的参数有菌丝形态和浓度、残糖量、氨基氮、抗生素含量、溶解氧、pH、通气量、搅拌转速和液面控制等。

6、发酵液的过滤和预处理

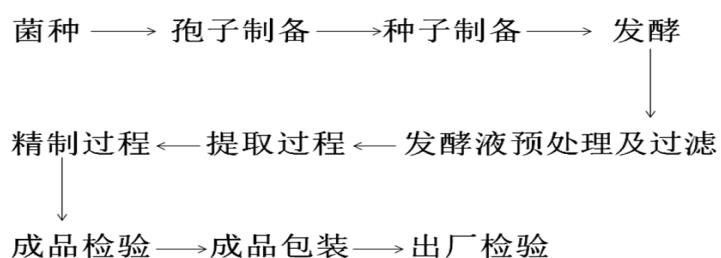
1) 目的：分离菌丝、去除杂质；多数抗生素品种在生产过程中，当发酵结束时，抗生素存在于发酵液中；个别品种当发酵结束时抗生素大量残存在菌丝之中，在此情况下，发

酵液的预处理应当包括使抗生素从菌丝中析出，使其转入发酵液。

2)预处理：去除高价无机离子和蛋白质。草酸及磷酸去除高价离子钙、镁，还能促使蛋白质凝固；黄血盐有利于去除铁离子；硫酸锌有利于凝固蛋白质；等电点法、加热法、絮凝法去除蛋白。

3)过滤：去除固体物及菌体。板框过滤机、鼓式真空过滤机、自动出渣离心机、倾析器等。

工艺过程如下



五、青霉素的制备

1、简介

20世纪40年代以前，人类一直未能掌握一种能高效治疗细菌性感染且副作用小的药物。那时流行着许多传染病，如猩红热、白喉、脑膜炎、淋病、梅毒等，严重地威胁着人们的生命。为了改变这种局面，科研人员进行了长期探索，然而在这方面所取得的突破性进展却源自一个意外发现。亚历山大·弗莱明由于一次幸运的过失而发现了青霉素。在1928年夏弗莱明外出度假回来后，无意间注意到一个与空气意外接触过的金黄色葡萄球菌培养皿中长出了一团青绿色霉菌。在用显微镜观察这只培养皿时弗莱明发现，霉菌周围的葡萄球菌菌落已被溶解。这意味着霉菌的某种分泌物能抑制葡萄球菌。鉴定表明，该霉菌为青霉菌，因此弗莱明将其分泌的抑菌物质称为青霉素。此后，在长达四年的时间里，弗莱明对这种特异青霉菌进行了全面的专门研究。然而遗憾的是，由于弗莱明不懂生化技术，无法把青霉素提取出来。而在当时的技术条件下，即使对于专门的生化学家来说，提取青霉素也是一个重大的难题。但是弗莱明并没有失掉信心，他坚信青霉素拯救生命的价值。因此，他继续将青霉菌菌株一代代地培养，并于1939年毫不犹豫地将菌种提供给准备系统研究青霉素的英国 Florey 和 Chain，他们进一步研究此菌，并从培养液中制出了干燥的青

霉素制品。经实验和临床试验证明，它毒性很小，并对一些革兰氏阳性菌所引起的许多疾病有卓越疗效

青霉素是人类发明的第一种抗生素，也是全球销量最大的抗生素。青霉素是一种高效、低毒、临床应用广泛的重要抗生素。它的研制成功大大增强了人类抵抗细菌性感染的能力，带动了抗生素家族的诞生。1953年，我国第一批青霉素的诞生揭开了我国生产抗生素的历史；到2001年，我国青霉素的产量已经占据了全球的60%的市场份额，目前我国是全球最大的青霉素生产国家。

2、青霉素的发酵法制备

1) 菌种的选择：最早期用点青霉素，产量低，后发现产黄青霉素，现在用wisconsin菌株

2) 发酵：利用三级发酵法培养足够发酵的菌株。

发酵条件下青霉素的生长过程：

第1期：分生孢子萌发，形成芽管，原生质未分化，具有小泡。

第2期：菌丝繁殖，原生质体具有嗜碱性，类脂肪小颗粒。

第3期：形成脂肪包涵体，机理贮藏物，没有空泡，嗜碱性很强。

第4期：脂肪包涵体形成小滴并减少，中小空泡，原生质体嗜碱性减弱，开始产生抗生素。

第5期：形成大空泡，有中性染色大颗粒，菌丝呈桶状，脂肪包涵体消失，青霉素产量最高。

第6期：出现个别自溶细胞，细胞内无颗粒，仍然桶状。释放游离氨，pH上升。

第7期：菌丝完全自溶，仅有空细胞壁。

1—4期为菌丝生长期，3期的菌体适宜为种子。4—5期为生产期，生产能力最强，

3) 发酵工艺控制

①基质浓度：在分批发酵中，常常因为前期基质浓度过高，对生物合成酶系产生阻遏或对菌丝生长产生抑制（如葡萄糖和镁的阻遏或抑制，苯乙酸的生长抑制），而后期基质浓度低限制了菌丝生长和产物合成。所以，在青霉素发酵中通常采用补料分批操作法，

以维持一定的最适浓度。

②温度：青霉素发酵的最适温度随所用菌株的不同可能稍有差别，但一般认为应在25℃左右。温度过高将明显降低发酵产率，同时增加葡萄糖的维持消耗，降低葡萄糖至青霉素的转化率。对菌丝生长和青霉素合成来说，最适温度是不一样的，一般前者略高于后者，故有的发酵过程在菌丝生长阶段采用较高的温度，以缩短生长时间，到达生产阶段后便适当降低温度，以利于青霉素的合成。

③培养基成分的控制：

A、碳源：发酵中常用乳酸或葡萄糖，也可采用葡萄糖母液、糖蜜等。其中乳糖最为便宜，但因货源较少，很多国家采用葡萄糖代替。但当葡萄糖浓度超过一定限度时，会过分加速菌体的呼吸，以至培养基中的溶解氧不能满足需要，使一些中间代谢物不能完全氧化而积累在菌体或培养基中，导致pH下降，影响某些酶的活性，从而抑制微生物的生长和产物的合成。

B、氮源：主要有机氮源为玉米浆、棉籽饼粉、花生饼粉、酵母粉、蛋白胨等。玉米浆为较理想的氮源，含固体量少，有利于通气及氧的传递，因而利用率较高。固体有机氮源原料一般需粉碎至200目以下的细度。有机氮源还可以提供一部分有机磷，供菌体生长。无机氮如硝酸盐、尿素、硫酸铵等可适量使用。

C、无机盐-碳酸钙用来中和发酵过程中产生的杂酸，并控制发酵液的pH值，为菌体提供营养的无机磷源一般采用磷酸二氢钾。另外加入硫代硫酸钠或硫酸钠以提供青霉素分子中所需的硫。由于现在还有一些工厂采用铁罐发酵，在发酵过程中铁离子便逐渐进入发酵液。发酵时间愈长，则铁离子愈多。铁离子在50μg/ml以上便会影响青霉素的合成。采用铁络合剂以抑制铁离子的影响，但实际对青霉素产量并无改进。所以青霉素的发酵罐采用不锈钢制造为宜，其他重金属离子如铜、汞、锌等能催化青霉素的分解反应。

④pH值、溶氧：青霉素在合理的Ph(6.8~7.2)和溶氧(>30%)下，生产和发酵才会达到最高效率。在罐的夹层或蛇管中需通冷却水以维持一定罐温。在整个发酵过程中，需不断通无菌空气和搅拌，以维持一定罐压或溶氧，在深层发酵培养液中应保证含氧量不低于30%。

⑤菌丝浓度等：在葡萄糖限制生长的条件下，青霉素比生产速率与产生菌菌丝的比生长速率之间呈一定关系，而其它的如菌丝形态等亦会有所影响。

⑥泡沫的控制：在发酵过程中产生大量泡沫，可以用天然油脂，如豆油、玉米油等或用化学合成消泡剂“泡敌”来消泡，应当控制其用量并要少量多次加入，尤其在发酵前期不宜多用，否则会影响菌体的呼吸代谢，加消沫剂以控制泡沫，必要时还加入酸、碱以调节发酵液的 pH。

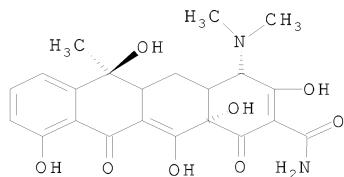
4) 青霉素的提取纯化

先将发酵液冷却，进行预处理除去蛋白类杂质防治乳化，再萃取纯化利用游离态青霉素溶于有机溶剂，而其盐溶于水的特性，进行反复萃取达到纯化，具体操作为预处理完的发酵液调 pH 值到 1.8-2.2，加乙酸丁酯或戊酸丁酯萃取，分离有机层，加水，调 pH6.8-7.2，加水，萃取，要水层，水层再调 pH2.0-2.2，加乙酸丁酯萃取，乙酸丁酯层加活性炭搅拌吸附 20min 过滤，滤液加乙酸钾的乙醇溶液，冷却放置得结晶，再用乙醇，乙酸丁酯洗脱，干燥得目的物。

六、四环素的制备

1、简介

四环素是从放线菌金色链丛菌 (*Streptomyces aureofaciens*) 的培养液等分离出来的抗菌物质，对革兰氏阳性菌、阴性菌、立克次体、滤过性病毒、螺旋体属乃至原虫类都有很好的抑制作用，是一种广谱抗菌素，对结核菌、变形菌等则无效。其作用机制是与核蛋白的 30S 亚单位结合，从而阻止氨酰基-tRNA 进入 A 位，阻止核糖核蛋白体结合。



2、四环素的发酵法制备

(1) 菌种的选择：1984 年筛选出金色链霉菌，其原始菌柱发酵单位为 165UI/ml，随后进行选育、优化，现发酵单位已达到 30000UI/mL。

(2) 培养基：

氮源：黄豆饼粉、花生饼粉、玉米浆、蛋白胨、硫酸铵及氨水等。

碳源：葡萄糖、饴糖、淀粉酶解液等。

其他：无机磷、硫酸镁、碳酸钙和溴化钠（抑氯剂）。

（3）发酵条件

温度：据菌丝的生长特征采用分段培养，即 31℃-30℃-29℃，前期温度高利于菌丝繁殖，中期降温可以减缓产生菌的代谢速度，使菌丝自溶期延迟。

pH 值：一般生长期需控制在 6.0-6.8 之间，四环素合成期应控制在 5.8-6.0 之间。

氧的需求量：此发酵为好氧发酵，四环素产生菌对发酵液中的溶氧量十分敏感，尤其是对数生长期，要求每分钟的通气量控制在 1:1（空气与发酵液的体积比）。

（4）四环素的提取纯化

先将发酵液冷却，进行预处理除去蛋白类杂质防治乳化，再萃取纯化利用游离态四环素溶于有机溶剂，而其盐溶于水的特性，进行反复萃取达到纯化，具体操作为预处理完的发酵液加草酸调 pH 值到 1.7-2.8，过滤，滤液加氨水调 pH 值到 4.8，产生结晶，过滤，结晶加正丁醇，加 3% 盐酸进行萃取，取正丁醇萃取液，加甲醇，加活性炭，搅拌，过滤，滤液冷却结晶得四环素。

七、土霉素的制备

土霉素具有广谱抗病原微生物作用，为快速抑菌剂，高浓度时对某些细菌呈杀菌作用。其作用机制在于药物能特异性地与核糖体 30S 亚基的 A 位置结合，阻止氨基酰-tRNA 在该位置上的联结，从而抑制肽链的增长和影响细菌或其他病原微生物的蛋白质合成。土霉素对金黄色葡萄球菌、肺炎球菌、化脓性链球菌、淋球菌、脑膜炎球菌、大肠杆菌、产气杆菌、志贺菌属、耶尔森菌、单核细胞李斯特菌等有较强抗菌活性；此外，土霉素对立克次体、支原体、衣原体、放线菌等也有较强作用。

1、菌种：龟裂链霉菌，菌落灰白色，后期生皱褶，呈龟裂状，菌丝呈树枝状分枝，白色，孢子灰白色、柱形。

2、生产工艺流程

砂土管孢子——→ 斜面孢子 $\xrightarrow[4\text{-}5\text{ 天}]{37^\circ\text{C}}$ 一级种子 $\xrightarrow[30\text{-}32\text{ h}]{32\pm0.5^\circ\text{C}}$

二级种子 $\xrightarrow[24\text{-}26\text{ h}]{31\pm0.5^\circ\text{C}}$ 发酵 $\xrightarrow[160\text{ h}]{32^\circ\text{C}-31\pm0.5^\circ\text{C}-32^\circ\text{C}}$ 提取

2、 制备方法：

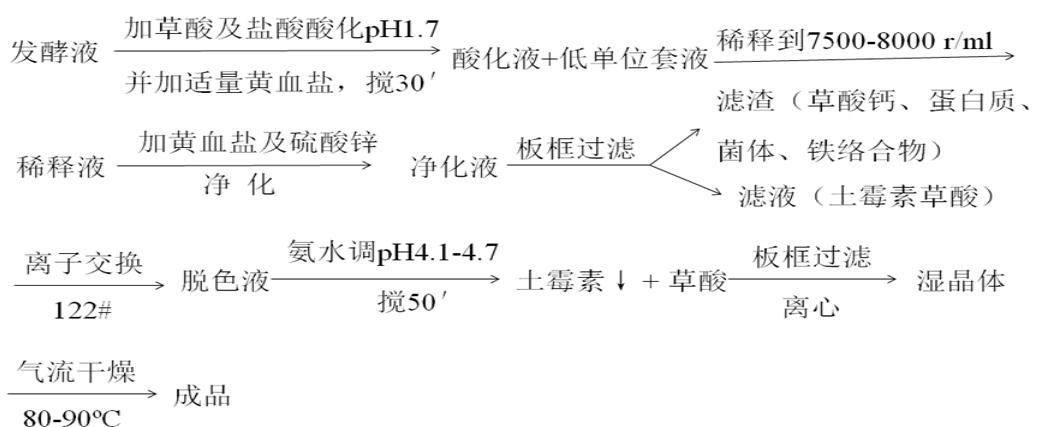
1) 砂土管：黄沙与土为 1: 1 比例，沙和土都经处理，水洗至中性，烘干，研细，过筛处理的，每管装一定量的砂土，塞好棉塞包好，121℃高压蒸汽灭菌后再用 160 ℃干热灭菌 2h，每支砂土管加 0.3mL 孢子悬浮液，包好，放入装有干燥剂的真空干燥剂内抽干 6-12 h，轻轻敲打使其均匀，放入装有干燥剂的密闭瓶内，0-4℃贮藏。

2) 斜面：用 250 ml 茄子瓶加麸皮 4%，麦粉 2%，琼脂 2% 制备。

3) 发酵：15%接种量，培养基为淀粉经 α -淀粉酶液化构成碳源；黄豆饼粉，硫铵构成氮源；加入无机盐 (KH₂PO₄, NaCl, CaCO₃, CoCl₂)；加入生长因子酵母粉，玉米浆。采用中间补料，延长抗生素分泌期，是提高抗生素产量的重要方法。土毒素生产过程采用补糖与补氨，以保证其在分泌期有足够的养料。总糖在前期 0-80 h 占 6.5-8%；中期 80-120 h 占 5-6.5 %；后期 120-140 h 占 4-5 %；末期 140 h 后占 4%。补氨同时为调 pH, pH=6.0-6.3，放罐前 8 h 停止通氨，整个过程通氨水总量 350-400 升。

4) 预处理：土霉素能和发酵液中钙盐、镁盐，某些有机胺、蛋白质形成不溶性化合物，积聚在体内。预处理目的为使部分土霉素溶液解出来，使蛋白质（菌丝）沉淀，使 Fe³⁺沉淀出来。

4) 提取工艺

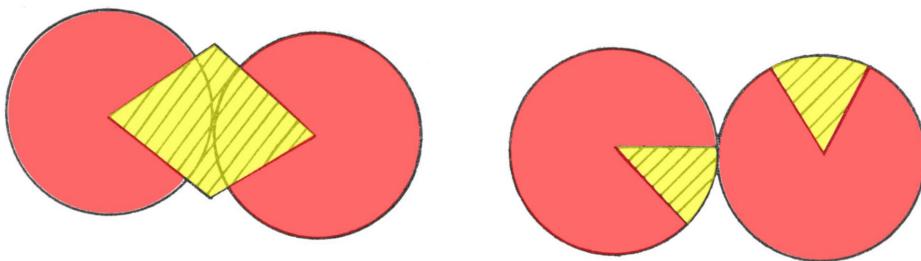


第十一章 酶工程制备生物药物

第一节 概述

酶是由生物体活细胞产生的，是一种具有催化活性和高度专一性的生物催化剂，主要包括蛋白质和核酸。常见的酶有氧化还原酶类、转移酶类、水解酶类、裂合酶类、异构酶类和合成酶类等。

酶是一种生物催化剂，在催化活性上与无机催化剂类似，酶在催化反应时，其本身不发生化学改变，只是催化反应的进行，此外，酶在催化反应时，仅改变反应速度，并不改变反应的平衡。酶催化反应的动力学机理是降低反应的活化能，具有邻近效应和定向效应。邻近效应指A和B两个底物分子结合在酶分子的结合部位上，两分子的反应基团相互靠近，从而降低了两分子进入过渡态所需要的能量，或说增加了两分子反应基团的发生反应的空间机率。定向效应是 A、B两个分子进入过渡态，两分子的反应基团需要按一定的方向重叠或交叉，这一方向稍有偏离，反应就难以进行或增加很大能量才能进行，这种酶活性部位赋予底物的这一方向性即定向效应。如下图所示：



反应分子轨道交叉，有极性的方向性，
方向正确，因而能进行反应。

反应分子轨道交叉（靠近）
但不定向，不利于反应的进行。

邻近定向效应示意图

酶的活性中心是其发挥催化功能的重要部位，构成酶活性中心的氨基酸在一级结构

上，呈分散状态，这些氨基酸是通过酶蛋白的二、三、四级结构使得其在空间上彼此集中，构成一个特定的与酶活性表达有关区域，这个特定区域即酶的活性中心，换句话说，酶的活性中心是酶分子上的与底物结合并催化反应的特定基团或特定区域。酶活性中心包括两部分，其一是底物结合部位，其二是催化部位。例如溶菌酶由129个AA构成，而构成活性中心的AA有：Glu35，Asp52，Try62，Asp101(Gly101)。

1894年，E.Fisher提出酶与底物作用的锁钥学说，以解释酶与底物之间的专一性问题，其基本含义是：酶与底物分子或底物分子的一部分之间，在结构上有严格的互补对应关系，当底物与酶结合时就像钥匙和锁那样契合对应。在1958年，Koshland提出了诱导契合学说，其主要内涵是：当酶与底物分子接近时，酶蛋白受底物分子的诱导，其构象发生有利于与底物分子结合或催化的变化，酶与底物在此基础上互补契合，以发挥酶的催化功能。

一、酶的特性

- 1、酶的分子量很大，酶由氨基酸组成。
- 2、酶是两性电解质，在等电点易沉淀，酶在电场中能像其他蛋白质一样泳动。
- 3、导致蛋白质变性的因素，如紫外线、热、表面活性剂、重金属、蛋白质沉淀剂等，都能使酶失活。
- 4、酶能被蛋白酶水解而丧失活性。此外，最直接的证据是对所有已经高度纯化的酶进行一级结构分析，结果都表明酶是蛋白质。

二、酶的分类

- 1、单纯酶：其成分只有蛋白质，其活性取决于它的蛋白质结构。
- 2、结合酶：其成分包含蛋白质和辅助因子（辅酶和辅基），二者结合后才有活性。

三、酶催化作用的特点

- 1、酶的催化效率高。酶的催化效率比没有催化剂催化的反应高 10^8 倍~ 10^{20} 倍，比一般催化剂催化的反应高 10^7 倍~ 10^{13} 倍。
- 2、酶的专一性强。酶对底物及催化的反应有严格的选择性，一种酶只催化一种反应或一类反应。许多细胞内的酶只作用于一种特定的底物，发生一定的化学反应，这种对底物高度的特异性和选择性称为酶的专一性。

3、酶具有可调性。酶的调控机制复杂，可以从酶的合成和酶的活性进行调节。

4、酶的不稳定性。酶的催化作用一般在常温、常压、接近中性pH等较温和的条件下进行。由于大多数酶都是蛋白质，具有蛋白质的结构和生物学特性，因此在高温、高压、强酸、强碱或紫外线等不利的物理或化学条件下，容易使酶蛋白变性而失去催化活性。

四、酶工程简介

酶工程是酶学、微生物学与生物化工等学科有机结合而产生的新兴边缘学科，也是现代生物技术的重要组成，是一项利用酶、含酶细胞器或细胞作为生物催化剂来完成重要化学反应，并将相应底物转化成有用物质的应用型生物高新技术。

1、酶工程的核心内容

酶工程的核心内容主要包括酶的分离、提纯及大批量生产；酶和细胞的固定化、酶反应器的研究；酶的分子改造与化学修饰；有机相中酶反应的研究；酶的抑制剂的开发及其应用研究；模拟酶、合成酶的研究；抗体酶、核酸酶的研究；酶的定向进化技术；酶的应用等。

2、酶工程的应用范围

- (1) 酶工程可用于对生物宝库中存在天然酶的开发和生产。
- (2) 酶工程可用于自然酶的分离纯化及鉴定技术。
- (3) 酶工程可用于酶的固定化技术（酶和细胞固定化），固定化酶技术是酶工程的核心。实际上有了酶的固定化技术，酶在工业生产中的利用价值才真正得以体现。
- (4) 酶工程可用于酶反应器的研制和应用。
- (5) 酶工程可与其他生物技术领域的交叉和渗透。

3、酶工程的发展

尽管人类19世纪前后才建立起酶的概念，但酶的催化作用却很早就为人们的生活所利用，如在人类游牧生活时期，就已会利用动物的胃液来凝固牛乳，在4000多年前就已掌握的酿酒和制酱技术，这都是酶作用的结果。1897年以后，Bucher发现酶的细胞外作用现象，从而导致了酶的商品化生产，最初的商品酶制剂主要以动植物为原料提取，如从牛胃中提取凝乳酶、从胰脏中提取胰酶、从血液中提取凝血酶、从植物材料中提取淀粉酶等。第二

次世界大战以后，随着微生物培养技术、发酵工业和设备的渐渐完善，利用微生物来获得商品化酶制剂已形成规模化产业，并开辟了广阔的市场。20世纪90年代，随着基因工程的广泛介入，一些原来只能由动物或植物生产的酶，经过酶基因重组，可以在微生物上表达。由于在发酵过程中很容易对微生物进行控制，因此“基因工程+发酵工艺+先进的发酵设备”可以算是酶工业的第三次飞跃。

第二节 酶的固定化

一、游离酶的缺点

1、酶的稳定性较差

除了某些耐高温的酶，如 α -淀粉酶、Taq酶等；和胃蛋白酶等可以耐受较低的pH条件以外，大多数的酶在高温、强酸、强碱和重金属离子等外界因素影响下，都容易变性失活。

2、酶的一次性使用

酶一般都是在溶液中与底物反应，这样酶在反应系统中，与底物和产物混在一起，反应结束后，即使酶仍有很高的活力，也难于回收利用。这种一次性使用酶的方式，不仅使生产成本提高，而且难于连续化生产。

3、产物的分离纯化较困难

酶反应后成为杂质与产物混在一起，无疑给产物的进一步分离纯化带来一定的困难。

二、固定化酶的发展史

酶的固定化是克服游离酶缺点的方法之一，其在50年代开始，1953年德国的 Grubhofer 和 Schleith 采用聚氨基苯乙烯树脂为载体与羧肽酶、淀粉酶、胃蛋白酶、核糖核酸酶等结合，制成固定化酶。在60年代后期固定化技术迅速发展，1969年千田一郎首次在工业生产规模应用固定化氨基酰化酶从DL-氨基酸连续生产L-氨基酸，实现了酶应用史上的一大变革。在1971年召开的第一次国际酶工程学术会议上，确定固定化酶的统一英文名称Immobilized enzyme。随着固定化技术的发展，出现固定化菌体，1973年，日本首次在工业上应用固定化大肠杆菌菌体中的天门冬氨酸酶，由反丁烯二酸连续生产L-天门冬氨酸。在固定化酶和

固定化菌体的基础上，70年代后期出现了固定化细胞技术，1976年，法国首次用固定化酵母细胞生产啤酒和酒精，1978年日本用固定化枯草杆菌生产淀粉酶，开始了用固定化细胞生产酶的先例。1982年，日本首次研究用固定化原生质体生产谷氨酸，取得进展。固定化原生质体由于解除了细胞壁的障碍，更有利于胞内物质的分泌，这为胞内酶生产技术路线的变革提供了新的方向。

固定化酶是被局限于某一特定区域上的、并保留了它们的催化活力，可以反复、连续使用的酶。可分成以下类型：固定化酶即经提取和分离纯化后的酶；固定化菌体(死细胞)即包含酶菌体或菌体碎片；固定化细胞是指被限制自由移动的细胞，即细胞受到物理化学等因素约束或限制在一定空间范围内，但细胞仍保留催化活性并具有能被反复或连续使用的活力。

三、固定化酶的基本概念

1、固定化酶：指在一定空间范围内呈闭锁状态存在的酶，能连续地进行反应，反应后的酶可以回收重复利用。包括酶与不溶性载体结合的“固相酶”“水不溶性酶”及包埋在凝胶或超滤装置中的酶。

2、固定化细胞（原生质体）：指被限制自由移动的细胞，即细胞受到物理化学等因素约束或限制在一定空间范围内，但细胞仍保留催化活性并具有能被反复或连续使用的活力。

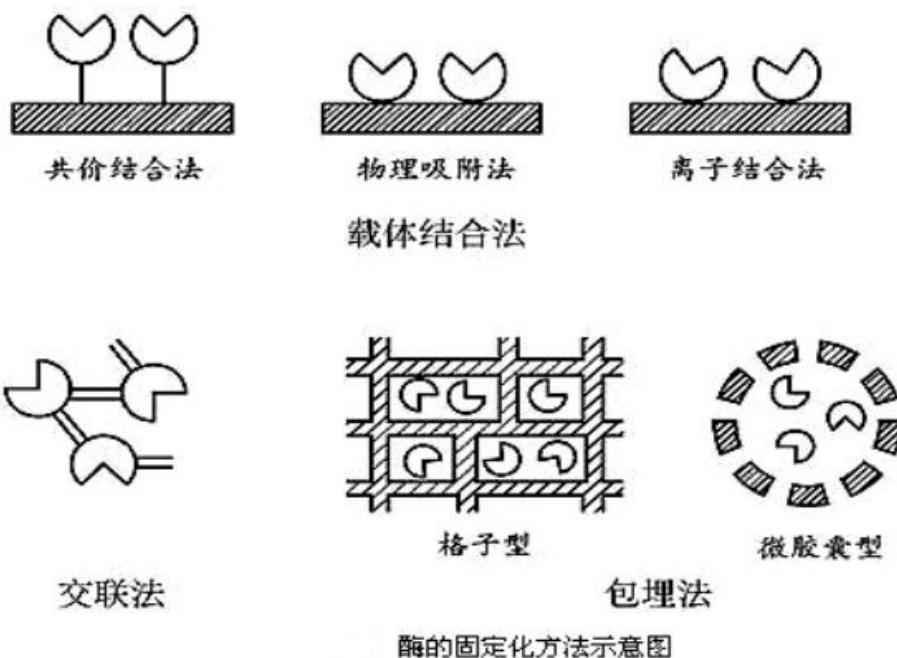
四、固定化酶的优点与缺点

1、优点：增加了酶的稳定性；能降低酶的总体费用；不溶于水，易于产物回收，并可重复使用；使反应过程的连续操作成为可能；反应产物也易于提取纯化；有利于过程设计和优化；

2、缺点：固定化过程中往往会引起酶的失活；固定化酶在化学催化反应中存在空间位阻；首次投入成本高。

五、固定化酶的制备方法

常用的固定化酶制备方法有吸附法、包埋法、载体（共价）偶联法和交联法，如下图所示：



1、吸附法：利用各种固体吸附剂将酶或含酶菌体吸附在其表面上，而使酶固定化的
方法。

1) 物理吸附法：是利用酶和载体间的非特异性物理吸附作用将酶固定在载体表面。

吸附力：范德华力、氢键、疏水作用、静电作用。

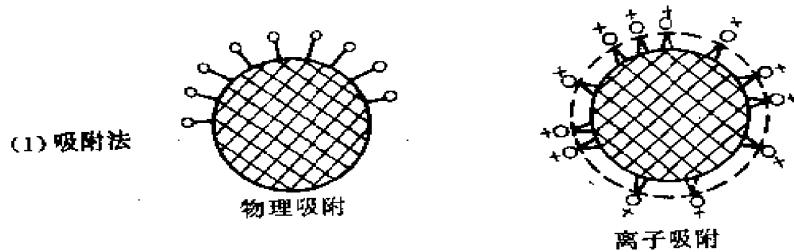
特点：酶分子的构象很少或基本不发生变化，固定化酶活力较高；酶易从载体脱落。

载体：纤维素、琼脂糖、活性炭、沸石及硅胶等。

2) 离子交换吸附：利用含有离子交换基团的固相载体（如具有交换基团的葡聚糖凝
胶或纤维素）与酶蛋白分子的带电基团互相吸引（靠离子键）而形成络合物。

优点：制作简单，处理条件缓和，酶蛋白的活性中心和高级结构破坏较少，可以制得
活力较高的固定化酶。

缺点：离子键结合较松散，如在高离子强度下进行反应时，酶与载体易分开。



2、包埋法

包埋法是将酶包埋在凝胶的微小空格内或埋于半透膜的微型胶束内，但底物仍能渗入到里面与酶接触的方法。

1) 包埋法使用的多孔载体主要有：琼脂、琼脂糖、海藻酸钠、角叉菜胶、明胶、聚丙烯酰胺、光交联树脂、聚酰胺、火棉胶等。

2) 包埋法的优、缺点

优点：利用此法制得的固定化酶，由于酶分子仅仅是被包埋起来，而未受到化学作用。酶蛋白几乎不起变化。

缺点：酶被包埋在内部，对大分子底物很难发生催化作用。所以用包埋法制备的酶，一般只适用于小分子底物。

3) 包埋法的分类：胶格包埋、脂质体和微囊包埋。微囊包埋是将酶包埋在半透性聚合体膜内，包括界面聚合法、液体干燥法、分相法等。

胶格包埋是将酶或含酶菌体包埋在凝胶细微网格中，制成一定形状的固定化酶，也称为网格型包埋法。微囊包埋是将酶包埋在各种高分子聚合物制成的小球内，制成固定化酶。由于固定化形成的酶小球直径一般只有几微米至几百微米，所以也称为微囊化法。

3、载体（共价）偶联法

共价法就是使酶蛋白的非必需基团（-NH₂, -OH, -COOH, -SH, 酚基, 吲哚基, 吲哚基）通过共价键和不溶性载体形成不可逆的联接。要使载体与酶形成共价键，必需首先使载体活化，接上一活泼基团，再与酶反应。

1) 用于共价法固定的酶蛋白上的功能基团

- A、氨基-赖氨酸上的 ϵ -氨基以及多肽链N末端氨基酸上的 α - 氨基。
- B、羧基-双羧基氨基酸:门冬氨酸和谷氨酸上的游离羧基，以及多肽链末端的 α - 羧基。
- C、酪氨酸上的苯酚环。
- D、半胱氨酸上的巯基。
- E、羟基-丝氨酸，苏氨酸以及酪氨酸上的羟基。
- F、组氨酸上的咪唑基。
- G、色氨酸上的吲哚基。

2) 一般认为共价法的特点如下

- ① 酶和载体的结合比较牢固，酶不易脱落。故使用的半衰期较长。
- ② 制备条件复杂，反应剧烈，易引起酶蛋白高级结构发生变化。
- ③ 制备得到的固定化酶，活力回收一般在50%左右。
- ④ 载体不会引起蛋白质的变性，经得起一定的pH、浓度的改变。

3) 常用载体

- A、天然高分子。如纤维素，葡聚糖凝胶（Sephadex），琼脂糖（Agarose Sepharose），卡那胶，淀粉以及它们的衍生物。
- B、人工合成的高聚物，如聚丙烯酰胺，聚苯乙烯，聚乙烯醇，氨基酸共聚物等。
- C、无机载体，如多孔玻璃，硅胶等。

4) 技术要点

- A、将所选用的载体上的有关基团活化，然后和酶蛋白上有关基团发生偶联反应。
- B、在选用的载体上接上一个双功能试剂，然后将酶蛋白和双功能试剂偶联。

4、交联法

交联法：借助双功能试剂使酶分子之间发生交联作用，制成网状结构的固定化酶的方法。

常用的双功能试剂：戊二醛、己二胺、顺丁烯二酸酐、双偶氮苯等。其中应用最广泛的是戊二醛，戊二醛有两个醛基，这两个醛基都可与酶或蛋白质的游离氨基反应，形成希

夫 (Schiff) 碱，而使酶或菌体蛋白交联，制成固定化酶或固定化菌体。

特点：交联法制备的固定化酶或固定化菌体结合牢固，可以长时间使用。但由于交联反应条件较激烈，酶分子的多个基团被交联，致使酶活力损失较大，而且制备成的固定化酶或固定化菌体的颗粒较小，给使用带来不便。为此，可将交联法与吸附法或包埋法联合使用，以取长补短。

5、固定化酶的形状：颗粒、线条、薄膜和酶管等。其中颗粒占主要，主要用于工业生产，薄膜主要用于酶电极。

6、影响固定化酶性质的因素

①酶本身的变化，主要是由于活性中心的氨基酸残基、高级结构和电荷状态等发生了变化。

②载体的影响：分配效应；空间障碍效应；扩散限制效应

③ 固定化方法的影响

7、固定化酶的性质

①固定化后酶活力的改变

在多数情况下，酶固定化后的活力比天然酶小，其专一性也会发生改变。固定化酶的活力低于等摩尔原酶的活力的原因可能是：

A、酶分子在固定化过程中，空间构象会有所变化，甚至影响了活性中心的氨基酸

B、固定化后，酶分子空间自由度受到限制（空间位阻），会直接影响到活性中心对底物的定位作用。

C、固定化后，内扩散阻力使底物分子与活性中心的接近受阻。

D、固定化后，包埋时酶被高分子物质半透膜包围，大分子底物不能透过膜与酶接近。

②固定化对酶稳定性的影响

A、热稳定性提高：大多数酶是由蛋白质组成的，一般对热不稳定。固定化酶耐热性提高，使酶最适温度提高，酶催化反应能在较高温度下进行，加快反应速度，提高酶作用效率，最适宜温度改变。

B、对各种有机溶剂的稳定性提高，使本来不能在有机溶剂中进行的酶反应成为可能。

C、对pH、蛋白酶、贮存和操作条件的稳定性提高：固定化酶稳定性提高的原因可能有：固定化后酶分子与载体多点连接，可防止酶分子伸展变形；酶活力的缓慢释放；抑制酶的自降解。将酶与固态载体结合后，由于酶失去了分子间相互作用的机会，从而抑制了降解。

③最适pH变化

固定化酶的最适pH变化后，对底物作用的最适pH和酶活力-pH曲线常常发生偏移，曲线偏移的原因是微环境表面电荷性质的影响。载体带负电荷，pH向碱性方向移动；载体带正电荷，pH向酸性方向移动。

④最适温度的变化

一般情况下，固定化后的酶的最适作用温度与游离酶差别不大，但有时由于固定化方法和载体的影响，固定化酶的最适作用温度可能降低，也可能升高，须加以注意，最适温度提高是有利的，可以降低酶的失活速率。

⑤底物特异性

对于作用于小分子底物的酶，变化不明显；但对于可作用于小分子底物又可作用于大分子底物的酶来说，由于载体空间位阻作用，大分子底物难以接近酶分子而使催化速度大大降低，如固定在羧甲基纤维素上的胰蛋白酶，对二肽或多肽作用保持不变，对酪蛋白的作用仅为游离酶的3%左右。

8、评价固定化酶的指标

①酶活定义（IU）：在特定条件下，每一分钟催化一个微摩尔底物转化为产物的酶量定义为1个酶活单位。

②酶比活定义（游离）：每毫克酶蛋白或酶RNA（DNA）所具有的酶活力单位。

③固定化酶的比活：每（克）干固定化酶所具有的酶活力单位。或：单位面积（cm²）的酶活力单位表示（酶膜、酶管、酶板）。

④操作半衰期：衡量稳定性的指标。连续测活条件下固定化酶活力下降为最初活力一半所需要的时间（t_{1/2}）。

⑤相对酶活力：具有相同酶蛋白（或RNA）量的固定化酶活力与游离酶活力的比值称

为相对酶活力。

$$\text{酶结合效率} = \frac{\text{加入的总的酶活力} - \text{未结合的酶活力}}{\text{加入的总的酶活力}} \times 100\%$$

$$\text{酶活力回收率} = \frac{\text{固定化酶总活力}}{\text{被固定化游离酶总活力}} \times 100\%$$

9、固定化酶的活力测定方法

①振荡测定法：称取一定量的固定化酶，加入一定量的底物溶液，一边振荡或搅拌，一边进行催化反应，取出一定量的反应液进行酶活力测定。

②酶柱测定法：将一定量的固定化酶装进具有恒温装置的反应柱中，让底物溶液以一定的流速流过酶柱，收集流出的反应液，测定其中产物的生成量或底物的消耗量。

③连续测定法：利用连续分光光度法等测定方法可以对固定化酶反应液进行连续测定，从而测定固定化酶的酶活力。

六、固定化酶操作的注意事项

活性中心：保护酶的催化作用，并使酶的活性中心的氨基酸基团固有的高级结构不受到损害，在制备固定化酶时，需要在非常严密的条件下进行。

功能基团：如游离的氨基、羧基、半胱氨酸的巯基、组氨酸的咪唑基、酪氨酸的酚基、丝氨酸和苏氨酸的羟基等，当这些功能基团位于酶的活性中心时，要求不参与酶的固定化结合。

酶的高级结构：要避免用高温、强酸、强碱等处理，而且有机溶剂、高浓度的盐也会使酶变性、失活，因此，操作应尽量在非常温和的条件下进行。

第三节 酶工程制备药物

一、6-氨基青霉烷酸的制备

1、介绍

白色或微黄色结晶粉末。熔点208-209℃（分解）。微溶于水，不溶于乙酸丁酯、乙醇或丙酮。遇碱分解，对酸较稳定。6-氨基青霉烷酸具有抑菌能力小，可引入不同的侧链，

而获得各种不同药效的青霉素。它是生产半合抗青霉素类抗生素氨苄钠和阿莫西林的重要中间体。

2、制备工艺：

1) 大肠杆菌的培养

菌种：大肠杆菌*E.coli D816*（产青霉素酰化酶）。

培养条件：28℃，170r/min振荡培养15 h，培养基为肉汤琼脂培养基。

2) *E.coli D816*固定化

菌体100kg放入40℃培养罐中，加入50L10%明胶溶液，搅拌，加入25%戊二醛5L，搅拌均匀，转移到搪瓷盘中，使之厚度为3-5cm，直径2mm左右的颗粒状固定化*E.coli D816*，用水洗，0.3mol/L的磷酸缓冲液洗，抽干，备用。

3) 固定化*E.coli*反应堆的制备

将固定化*E.coli* 装于带有保温夹套的填充床反应器中，即成为固定化*E.coli*反应堆，反应器的规格为70cm×160cm。

4) 转化反应

取20kg青霉素G钾盐，加如1000L配料罐中，加入磷酸缓冲液（PH7.5），升温40℃，维持PH7.5~7.8范围，70L/min流速使霉素钾通过*E.coli*反应堆循环转化3~4 h。

5) 6-氨基青霉烷酸的提取

转化液过滤，滤液薄膜浓缩至100L，冷却至室温，加50L乙酸丁酯搅拌10~15min，取下层水，加1%活性炭，70℃搅拌30 min，过滤除活性炭，滤液用盐酸调pH4.0左右，5℃结晶，抽滤，烘干，得6-氨基青霉烷酸。

二、5-复合单核苷酸的制备

1、介绍

5-复合单核苷酸可用于治疗白血球下降、血小板减少以及肝功能失调等疾病。核糖核酸经磷酸二脂酶作用，可分解为腺苷、胞苷、尿苷、鸟苷等磷酸化合物。

2、制备工艺：

1) 5-磷酸二酯酶的制备

取麦芽根加9-10倍的水，加盐酸调pH5.2，30℃浸泡15-20 h，压去渣，过滤，滤液冷却5℃，加冷工业乙醇，静置3 h后，离心沉淀丙酮、乙醚清洗，干燥粉碎，备用。

2) 固定化5-磷酸二酯酶的制备

取5-磷酸二酯酶0.2kg，加1.5%硫酸铵溶解，得酶液。取ABXE-纤维素40kg，加冷水50L，加1mol/L盐酸和5%亚硝酸钠10L，反应150min，抽滤，滤饼加入酶液，搅拌，加碳酸钠调pH8.0，搅拌30min，冷水洗，抽滤，即得固定化5-磷酸二酯酶。

3) 转化反应

取RNA2kg，加入预热至60-70℃的360L的0.001mol/L的氯化锌溶液，用1mol/L的氢氧化钠调pH5.0-5.5，过滤，滤液加热至70℃，加入固定化5-磷酸二酯酶，搅拌1-2h，紫外法测定转化率，转化完后过滤，滤液待用。

4) 5-复合单核苷酸的分离纯化

转化液加盐酸调pH至3.0，过滤除沉淀，滤液加氢氧化钠调pH7.0，上样阴离子交换树脂吸附，去离子水洗，3%氯化钠洗，1-1.2L/min流速洗脱，当pH为7.0时开始收集洗脱液，洗脱液薄膜浓缩，加活性炭煮沸10min，过滤，滤膜过滤，灌封，得5-复合单核苷酸的注射液。

第十二章 生化产品的保存与质量分析

第一节 生化产品保存的一般方法

一、生化产品保存的目的与前提条件

目的：保证生化产品质量、提高生产的经济效益。

前提：对生物材料与生化产品变质的一般规律以及产品的理化性质有足够的了解，在创造最佳保藏条件。

二、生化产品保存的一般方法

1、密闭保存

物品（药品）放在密封的容器内贮藏，以防止风化、吸潮、挥发或者进入异物。

2、低温保存

对热敏感的药物如蛋白、核酸类大分子具有加热变性的特点，有些药物在加热条件下水解速度、氧化速度易于加速。

3、固体干燥保存

水分易于引起药物的不稳定，如加速药物的水解变性，造成微生物的感染腐败等。

4、避光保存

有些物品，尤其是化学物品，在阳光下放置会放生化学反应，会分解消失，可用棕色包装避光。

5、添加稳定剂

如添加防腐剂（山梨酸）、抗氧化剂（亚硫酸钠、硫代硫酸钠、维生素 C 和脂溶性抗氧化剂维生素 E、没食子酸等）。

三、各类生化产品的保存方法

（一）蛋白质与酶类药物

1、低温保存

蛋白溶液常在-5~-10℃甚至-20℃下冰冻保存，通常蛋白质纯度越高越稳定性越差，对热越敏感，如鸟肝丙酮酸羧化酶在25℃左右才稳定，反复冻融易变性。

2、适宜 pH 条件

大多数蛋白类药物在较窄的 pH 范围稳定，超出此范围易于发生变性。酸性蛋白质的 pH 范围常在2~6，中性蛋白质的 pH 范围常在6~9，碱性蛋白质的 pH 范围常在5~10.5。

3、高浓度保存

蛋白质溶液易受水化作用影响，保存浓度太稀易出现亚基解离、表面变性的现象，蛋白浓度至少大于1%，长期保存时最好加入防腐剂和少量的底物或酶抑制剂增强其稳定性。

（二）核酸类药物保存方法

1、浓盐溶液中保存

水或稀电解质溶液可以断裂核酸的次级键如氢键，造成空间构象破坏，因此核酸类药

物最好在高浓度盐溶液保存。

2、稳定的 pH 条件下保存

过酸或过碱都会造成碱基上的次级键解离，稳定性下降，因此 DNA 通常在 pH4~11 保存，RNA 常在酸性条件下保存。

3、低温保存

DNA 的变性温度在 70~85℃，其变性温度与 G-C 含量有关，含量越高变性温度越高。RNA 的保存温度在 0~4℃，小分子的 RNA 保存温度应更低。

（三）脂类药物的保存方法

油脂在空气中暴露太久就会产生难闻的臭味，此为“酸败”，酸败主要是由于水解和氧化引起的，当酸败产生时会造成油脂的比重下降、碘值降低和酸值上升。碘值表示油脂中不饱和程度的一种指标。指 100g 物质中所能加成碘的克数。主要用于油脂、脂肪酸、蜡及聚酯类等物质的测定。不饱和程度愈大，碘值愈高。酸值，指中和脂肪、脂肪油或其他类似物质 1 克中含有的游离脂肪酸所需氢氧化钾的重量（毫克数）。比重也称相对密度，固体和液体的比重是该物质（完全密实状态）的密度与在标准大气压，3.98℃时纯 H₂O 下的密度（999.972 kg/m³）的比值。

1、水解酸败

由于油脂中混有脂肪酶，因此在水和适宜的条件下（25~35℃，pH4.5~5），脂肪酶催化油脂中的不饱和双键水解，产生游离的脂肪酸。含水的油脂易于长菌，进而易于产生脂肪酶和脂肪氧化酶，所以除水除菌有利于油脂的保存，其主要方法是加热除水灭菌。

2、氧化酸败

空气中的氧会使不饱和脂肪酸的双键氧化生成过氧化物，过氧化物再分解会产生有特殊气味和味道的低分子游离酸、醛、酮等。因此不饱和度越高越易氧化酸败，尤其油脂中含有某些金属离子如铁、铜等，这可以加速氧化酸败，同时光照和加温也会加速氧化酸败。因此油脂储存最好在避光、低温、密闭的条件下保存，如需长时间保存需加抗氧化剂和增效剂来增强抗氧化效果，延缓或阻止油脂的氧化酸败。

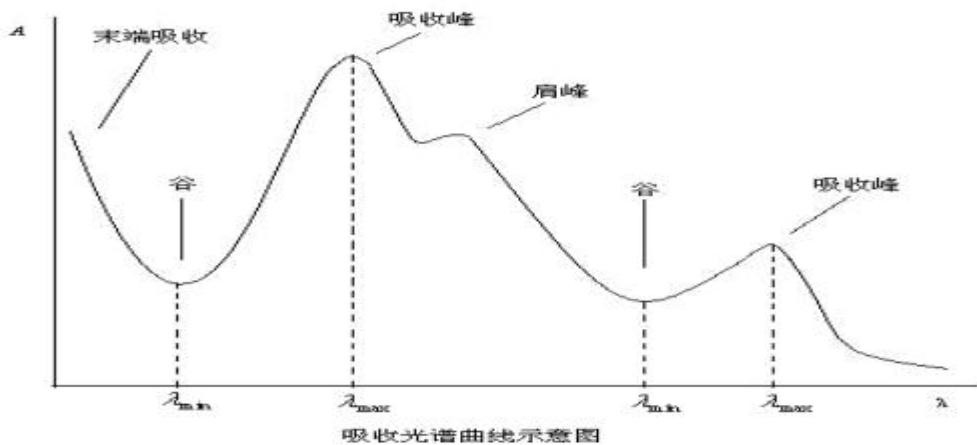
第二节 生化药物的质量分析

一、仪器分析方法

1、紫外可见分光光度法

紫外-可见吸收光谱的产生原理是分子（或离子）受到光照射时能够吸收具有一定能量的光量子，然后分子（或离子）由能量较低的基态能级 E_1 跃迁到能量较高的激发态能级 E_2 ，物质对光具有的选择性吸收即为紫外-可见吸收光谱。

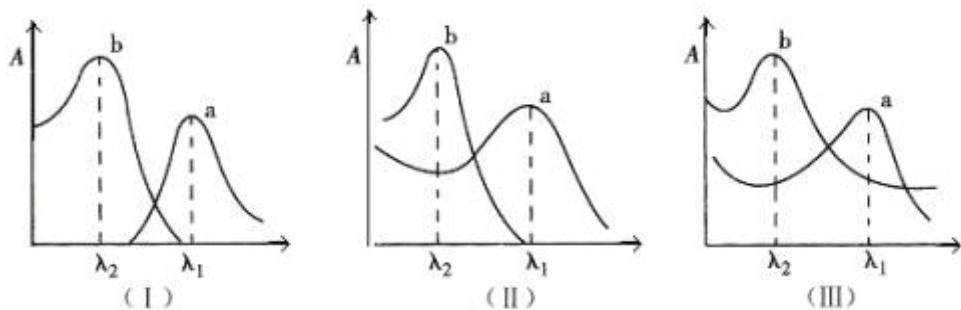
2、全波长扫描如下图所示



3、紫外-可见分光光度计

基本结构：光源—单色器—吸收池—检测器—显示器

4、波长的选择



混合组分吸收光谱相互重叠的三种情况示意图

5、高效液相色谱法

高效液相色谱法 (High Performance Liquid Chromatography HPLC) 又称“高压液相色谱”、“高速液相色谱”、“高分离度液相色谱”、“近代柱色谱”等。高效液相色谱是色谱法的一个重要分支，以液体为流动相，采用高压输液系统，将具有不同极性的单一溶剂或不同比例的混合溶剂、缓冲液等流动相泵入装有固定相的色谱柱，在柱内各成分被分离后，进入检测器进行检测，从而实现对试样的分析。

二、化学分析方法

1、滴定法：酸碱滴定法、络合滴定法、沉淀滴定法、氧化还原滴定法

2、重量法：脂类药物常用的测定方法

三、纯度测定方法

1、电泳法

(1) 电泳：指带电粒子或离子在电场作用下的定向移动，依据带电粒子在电场作用下迁移行为不同进行分离的技术称为电泳

(2) 电泳法：指带电荷的供试品（蛋白质、核苷酸等）在惰性支持介质（如纸、醋酸纤维素、琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶等）中，在电场的作用下，向其对应的电极方向按各自的速度进行泳动，使组分分离成狭窄的区带，用适宜的检测方法记录其电泳区带图谱或计算其含量(%)的方法。

电泳法分离、检测蛋白质混合样品，主要是根据各蛋白质组分的分子大小和形状以及

所带净电荷多少等因素所造成的电泳迁移率的差别。

2、电泳法分类

1) 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)

聚丙烯酰胺凝胶为网状结构，具有分子筛效应。它有两种形式：非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Native-PAGE) 及 SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE)。非变性聚丙烯酰胺凝胶，在电泳的过程中，蛋白质能够保持完整状态，并依据蛋白质的分子量大小、蛋白质的形状及其所附带的电荷量而逐渐呈梯度分开。而 SDS-PAGE 仅根据蛋白质亚基分子量的不同就可以分开蛋白质。该技术最初由 Shapiro 于 1967 年建立，他们发现在样品介质和丙烯酰胺凝胶中加入离子去污剂和强还原剂 (SDS 即十二烷基硫酸钠) 后，蛋白质亚基的电泳迁移率主要取决于亚基分子量的大小 (可以忽略电荷因素)。

2) 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, 简称 SDS) 是一种阴离子去污剂，它能破坏蛋白质分子之间以及与其他物质分子之间的非共价键，使蛋白质变性而改变原有的空间构象。特别是在强还原剂，如巯基乙醇存在下，由于蛋白质分子内的二硫键被还原剂打开，不易再氧化，这就保证了蛋白质分子与 SDS 充分结合。蛋白质-SDS 复合物在水溶液中的形状，近似于雪茄烟形的长椭圆棒。不同蛋白质的 SDS 复合物的短轴长度都一样，约为 1.8nm，而长轴则随蛋白质的分子量成正比变化。这样的蛋白质-SDS 复合物在凝胶中的迁移率，不再受蛋白质原有电荷和形状的影响，而只是椭圆棒的长度，也就是蛋白质分子量的函数。带负电荷的蛋白质-SDS 复合物由于结合了大量的 SDS，使蛋白质丧失了原有的电荷状态，形成了仅保持原有分子大小为特征的负离子团块，从而降低或消除了各种蛋白质分子之间天然的电荷差异。SDS-PAGE 是对蛋白质进行量化，比较及特殊鉴定的一种经济、快速、而且可重复的电泳方法。

3) 等电点聚焦电泳

等电聚焦电泳技术 (isoelectric focusing, IEF) 是 1980 年慕尼黑工业大学食品科学和化学分析研究所的 Radola B J 发展起来，并经国外一些种子检验实验室改进的一种非常实用的电泳技术，广泛应用于生物学的各个领域。

该方法是利用蛋白质具有两性解离及等电点的特征，加入有 pH 梯度的凝胶介质中，在电场内经过一定时间后，各组分将分别聚焦在各自等电点相应的 pH 位置上，形成分离的蛋白质区带。主要特点是：灵敏度及分辨率高、重复性好，特别适用于大批量纯度检测和真实性鉴定以及遗传多样性等群体生物学领域的研究。

基本原理为在等电点聚焦电泳的电泳中具有 pH 梯度的介质其分布是从阳极到阴极，pH 值逐渐增大。如前所述，蛋白质分子具有两性解离及等电点的特征，这样在碱性区域蛋白质分子带负电荷向阳极移动，直至某一 pH 位点时失去电荷而停止移动，此处介质的 pH 恰好等于聚焦蛋白质分子的等电点 (pl)。同理，位于酸性区域的蛋白质分子带正电荷向阴极移动，直到它们的等电点上聚焦为止。可见在该方法中，等电点是蛋白质组分的特性量度，将等电点不同的蛋白质混合物加入有 pH 梯度的凝胶介质中，在电场内经过一定时间后，各组分将分别聚焦在各自等电点相应的 pH 位置上，形成分离的蛋白质区带。

IEF 是一种简便、快速、高效的分离分析方法，特别适用于氨基酸、多肽、蛋白质、酶类和抗体等的分离分析，能够满足组分定量、杂质检出、质量控制、临床诊断等方面的要求。目前等电点聚焦电泳主要用于两性电解质样品等电点的测定，两性电解质样品的分析、分离和制备，在同功酶的鉴定及蛋白质的微量分析(10~50 μ g)上应用尤为广泛。随着生命科学的发展，特别是人类基因组计划(HGP)全面完成之后所谓“后基因组”时代的来临，对复杂生命体系的准确表征和分析就显得日益紧迫，其中蛋白质组研究是一个极其重要的部分。

参考文献

- [1] 吴梧桐. 生物制药工艺学. 第3版. 中国医药科技出版社. 2006
- [2] 辛秀兰. 现代生物制药工艺学. 第2版. 化学工业出版社
- [3] 颜方贵. 发酵微生物学. 第1版. 中国农业出版社. 1999