



生化分离介质的 制备与应用

**Bioseparation Media :
Preparations and Applications**

王佳兴 苏志国 马光辉 主编



化学工业出版社



生化分离介质的 制备与应用

**Bioseparation Media :
Preparations and Applications**

王佳兴 苏志国 马光辉 主编



化学工业出版社

· 北京 ·

内 容 提 要

本书全面介绍了层析技术的核心问题——层析介质,总结了近年来生化领域中分离介质的合成及应用成果,也兼顾了层析工艺及介质的发展现状和发展趋势。

本书主要阐述了凝胶过滤层析、离子交换层析、疏水层析、亲和层析等分离介质的合成和应用实例,并介绍了层析操作过程中的注意事项,列举了不同类分离介质的商品牌号及性能,同时也对我国生化分离介质的研究成果作了介绍。本书还介绍了分离介质母体——基球的合成方法,并引入了新兴的可制备均一粒径基球的膜乳化-悬浮聚合技术;最后,本书介绍了柱层析新工艺,如扩张床、分子印迹、灌注色谱以及柱层析用于蛋白质折叠复性等新兴的分离介质及分离技术,内容全面、新颖,实用参考性强。另外,本书各章附有大量的文献资料,以供读者择需参考。

本书适用于从事生化分离领域及分离介质研究的科研人员以及相关领域工业生产的工程技术人员,对于相关专业的师生也有很好的参考价值。

图书在版编目(CIP)数据

生化分离介质的制备与应用/王佳兴,苏志国,马光辉
主编. —北京:化学工业出版社,2008.7

ISBN 978-7-122-03334-5

I. 生… II. ①王…②苏…③马… III. 生物化学-分
离-介质-制备 IV. TQ033

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 096216 号

责任编辑:梁静丽 郎红旗 傅四周
责任校对:宋 玮

文字编辑:周 倜
装帧设计:史利平

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)

印 刷:北京市彩桥印刷有限责任公司

装 订:北京市顺板装订厂

787mm×1092mm 1/16 印张18 $\frac{3}{4}$ 字数521千字 2008年9月北京第1版第1次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

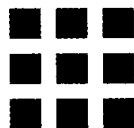
网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价:59.00 元

版权所有 违者必究

前言



随着生物技术的发展，生物产品的产业化日益成为备受人们关注的问题。在生物制品的生产过程中，制品的分离纯化是其重要的组成部分，也关系着生物制品产业化的前景。各类生化物质，特别是活性大分子的分离纯化已成为目前至关重要的问题。层析技术是分离纯化中对复杂混合物分离效率较高且应用广泛的一类分离方法。层析分离技术具有分离效率高、选择性好、条件温和等优点，适用于多组分复杂混合物的分离，因此受到越来越广泛的关注。

日益发展的层析技术，种类不断增多，用途日益广泛。层析技术的核心为层析介质，即层析柱中使用的填料。填料又称固定相或分离介质，它在层析分离技术中是矛盾的主要方面。在液相色谱中，无论是哪一种层析方法，分离介质的性能都是影响分离效果的首要因素。近年来经典的层析介质更新换代，性能不断改进，已成为具有高通透性、高分辨率、高机械强度的高效分离介质；新型分离介质不断涌现，具有新型功能基团的离子交换剂、螯合介质已用于生化领域；亲和层析的基体种类、配基类型日益增多，这些表明层析介质取得了长足进展。在生化分离应用领域中，不但包含有传统的以天然多糖为骨架的分离介质，还包括以刚性的合成高聚物为骨架的介质，各具特色的新型介质也不断涌现。层析介质的发展趋势可以认为是以天然大分子为母体的介质不断地改进合成工艺，提高性能，使老产品更新换代，同时成功地开发以合成高聚物为骨架的具有优异性能的新一代产品。层析介质的发展近年来呈现了一个新的飞跃，目前用于生化领域的层析介质品种型号已达几百种。

本书总结了近年来生化领域中分离介质的合成及应用方面的进展，不但介绍了国外的系列产品，对我国科技工作者的科研成果也做了系统整理及评述。本书的目的之一，是希望通过本书使从事生化产业的人员进一步了解国内外分离介质的基本概况及生化领域中各种层析技术的应用；有利于生化分离工艺中介质的使用者对分离介质的种类、结构、性能、使用方法有更全面的了解，以便于有效地选择和应用介质，提高介质的使用效果，提高生物制品的产量和质量；有利于介质的研发者进一步了解生化分离领域对层析工艺及分离介质各方面性能的需求，以便研制出更有效的新型介质；期望本书成为层析技术使用者与分离介质研发者之间的桥梁，能起到沟通的作用。我国是一个离子交换树脂生产大国，无论产量、质量及生产装备都达到了国际先进水平，并有相当数量的民族品牌销往五大洲四五十个国家。在这个基础上应进一步开发生化分离介质，开拓新的生化应用领域，为新兴的生化产业提供物质基础，成为生化下游技术中强有力的支撑产业。本书的目的之二，是希望广大的离子交换树脂行业的同仁对生化分离工艺及分离介质有全面的了解，以便在原有基础上进一步涉入新领域，改变产品结构，提升企业效益，发挥产业优势，成为生化领域中强有力的支撑产业。本书的目的之三，是希望成为通用型树脂的合成、生产与生化分离技术研究之间的桥梁。通过多种桥梁作用达到生化应用与合成的沟通，通用型树脂与生化分离介质的沟通、协调作用，以进一步促进生化分离工程的发展。本书介绍了多种分离介质的合成路线、基本性能及使用方法，并提供了大量的国内外产品的信息、产品牌号及性能，大量的图表、资料和参考文献，希望能起到案头工具书的作用，这是本书的目的之四。

本书在汇集国内外近年来分离介质发展状况的同时，也介绍了编者所在实验室——中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室积累的介质合成及分离工艺方面的新经验和新技术。本实验室成立于1995年，以生物技术的发展为研究重点，以生物反应、生物分离、生物剂型的基础理论和应用技术为主要研究内容。多年来在生化分离方面累积了成功的经验，不但进行分离过程研究，还对分离介质进行了全方位的研发。在引进先进成果的基础上进行自主再创新，出现了多种有自主知识产权的新型分离介质及分离工艺。同时，一支年轻的从事分离介质及分离工艺的科研队伍已经形成。重点实验室开发的新产品及新技术在国家生化工程技术研究中心（北京）进行了工业化生产，转化为生产力，部分产品已经面市，并获得了广泛应用。

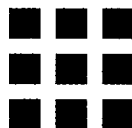
本书涵盖了凝胶过滤层析、离子交换层析、疏水层析、亲和层析、吸附树脂等多种分离介质的制备及应用情况，并对我国科技工作者研究的生化层析介质做了大量的介绍。还介绍了20世纪90年代新兴的可制备均一粒径的膜乳化-悬浮聚合技术，分子印迹分离介质、扩张床分离介质、灌注色谱分离介质的制备及应用，对柱层析用于蛋白质折叠复性等新型的分离介质及分离技术也有详述。书中还附有大量的文献资料，供读者择需参考。我们相信，本书对从事生化分离领域及分离介质研究的专家、学者、研究人员和工业生产的工程技术人员将有所裨益，对其他领域的读者也有一定的参考价值。

本书由王佳兴、苏志国、马光辉主编。参加编写的人员还有姚红娟、周炜清、吴颀、孟庆强、赵岚、雷建都、巩方玲、瞿欢欢、曲剑波、郝东霞、毕彩霞、周青竹、卫强、张岳玲、王连艳等提供了大量的照片、资料，对此深表谢意。

本书力图向读者介绍层析分离的大致轮廓、分离介质的整体概况、可应用的各种层析技术、可采用的相关信息。但面对这一蓬勃发展的领域，编写者深感学识的不足，也由于时间紧迫，书中疏漏之处，恳请专家、同行及读者批评指正。

编者
2008年3月

目 录



第一章 绪论	1
第一节 柱层析工艺在生物化工中的应用	1
一、柱层析在分离纯化工艺中具有的优点	2
二、层析工艺的种类	3
三、层析工艺的应用	4
第二节 生化分离介质应具备的特性	5
一、生化分离介质应具备的基本条件	6
二、生化分离介质的结构特点	7
第三节 生化分离介质的分类	8
一、依据母体骨架基质分类	8
二、依据层析的分离原理分类	9
参考文献	10
第二章 分离介质母体——基球的合成	11
第一节 悬浮聚合法制备珠体	11
一、悬浮聚合法	12
二、单体	12
三、交联剂	13
四、正相悬浮聚合分散剂种类	15
五、反相悬浮聚合工艺中分散剂的种类及用量	17
六、悬浮聚合工艺条件	18
第二节 多孔珠体的制备	19
一、多孔珠体的概念	20
二、孔结构的表征	20
三、聚合过程中的孔结构	23
四、高比表面积珠体的合成方法	25
五、大孔珠体的应用	26
第三节 膜乳化-悬浮聚合法制备单分散聚合物微球	27
一、膜乳化原理、装置与微球的粒度分布	27
二、膜结构对分散液滴的影响	29
三、连续相与分散相的影响	30
四、操作条件的影响	31
五、乳化过程中新乳化粒子形成的原因及解决办法	32
第四节 微球的其他制备方法	33
一、分散聚合法	34
二、种子溶胀聚合法	37
三、蒸馏-沉淀聚合法	39
参考文献	40

第三章 凝胶过滤层析介质	44
第一节 凝胶过滤层析概述	44
一、凝胶过滤层析的优点	44
二、凝胶过滤层析的基本原理	44
三、凝胶过滤层析介质的特征参数	45
四、凝胶过滤层析工艺的常用参数	45
第二节 凝胶过滤层析介质的制备	47
一、凝胶过滤层析介质应具备的条件	48
二、凝胶过滤层析介质的骨架分类	48
三、多糖类凝胶过滤层析介质的合成	49
四、合成高聚物珠体的制备	53
第三节 凝胶过滤层析介质的主要商品牌号	55
一、葡聚糖系列	56
二、琼脂糖系列	58
三、Superdex™系列	60
四、聚丙烯酰胺系列	61
五、Sephacryl™系列	61
六、聚乙烯醇系列	62
七、Bio-Beads S-X 系列	63
八、丙烯酸酯系列	63
第四节 凝胶过滤层析的应用	63
一、凝胶过滤层析的分离方式	63
二、凝胶过滤层析介质的选择	64
三、凝胶过滤层析柱的选择	66
四、凝胶过滤层析操作中应注意的事项	66
五、凝胶过滤层析的应用实例	68
参考文献	72
第四章 离子交换层析介质	74
第一节 离子交换层析概述	74
一、离子交换层析法	74
二、离子交换层析介质的结构、分类及命名	74
三、离子交换基本原理	76
四、生物大分子的带电性	77
五、生化用离子交换剂的特点	77
六、离子交换层析的操作方式	79
七、离子交换层析中常用的几个参数	80
第二节 高聚物骨架离子交换层析介质的制备	80
一、离子交换剂功能基团的种类	80
二、苯乙烯系列离子交换树脂的制备	82
三、生化专用苯乙烯系列离子交换剂的制备	86
四、丙烯酸(酯)系列离子交换树脂的制备	88
五、丙烯腈系列离子交换树脂的制备	92

六、聚乙烯醇系列离子交换树脂的制备	93
七、缩聚型离子交换树脂的制备	93
八、螯合树脂的制备	95
第三节 多糖骨架离子交换层析介质的合成及牌号	99
一、多糖系列离子交换剂的合成路线	99
二、多糖系列离子交换剂的制备	100
三、纤维素类离子交换剂的主要牌号	105
四、葡聚糖系列离子交换层析介质的主要牌号	106
五、琼脂糖系列离子交换层析介质的主要牌号	107
第四节 离子交换层析的应用	110
一、离子交换剂的选择	110
二、离子交换层析操作中应注意的问题	111
三、离子交换层析应用实例	115
参考文献	124
第五章 疏水层析介质	129
第一节 疏水层析概述	129
一、疏水作用原理	129
二、疏水层析的优点	131
三、疏水层析与反相层析的区别	132
第二节 疏水层析分离工艺的影响因素	133
一、分离介质结构对疏水层析的影响	134
二、流动相盐溶液对蛋白分离的影响	135
三、pH 值对疏水层析的影响	136
四、温度对疏水层析的影响	137
五、添加剂对疏水层析的影响	137
六、蛋白质的疏水性对疏水层析的影响	137
第三节 疏水层析分离介质的制备	138
一、疏水层析分离介质的基本结构	138
二、多孔硅胶疏水层析分离介质的制备	139
三、溴化氰活化合成多糖类疏水层析分离介质	140
四、环氧活化中间体制备多糖类疏水层析分离介质	143
五、直接偶联法制备多糖类疏水层析分离介质	148
六、以合成高聚物骨架为母体制备疏水层析分离介质	150
七、以壳聚糖为母体合成疏水层析分离介质	151
八、配基密度的测定	151
九、常用疏水层析分离介质的商品牌号	152
第四节 疏水层析分离介质的应用	153
一、疏水层析分离介质的稳定性	154
二、疏水层析分离介质的选择	155
三、疏水层析操作中应注意的事项	156
四、疏水层析的应用实例	158
参考文献	160

第六章 亲和层析介质	163
第一节 亲和层析概述	163
一、亲和层析发展历史	163
二、亲和层析的原理	164
三、亲和层析介质的组成	165
第二节 亲和层析介质的制备	171
一、溴化氰活化及偶联法	171
二、环氧活化及偶联法	173
三、高碘酸盐活化及偶联法	176
四、 <i>N</i> -羟基琥珀酰亚胺活化及偶联法	177
五、三嗪活化及偶联法	177
六、甲苯磺酰氯活化及偶联法	177
七、丁二烯砜活化及偶联法	178
八、苯醌活化及偶联法	178
九、其他的活化及偶联法	178
十、亲和层析介质的商品牌号	179
第三节 亲和层析的类型	183
一、生物亲和层析	183
二、免疫亲和层析	185
三、固定化金属亲和层析	186
四、拟生物亲和层析	195
参考文献	199
第七章 吸附树脂	204
第一节 吸附树脂概述	204
一、吸附树脂结构特征	204
二、吸附树脂的分类	205
三、影响吸附树脂性能的因素	206
四、吸附树脂的吸附机理	207
五、吸附树脂的吸附方程	209
六、吸附树脂的特点	209
第二节 吸附树脂的外观、形态结构及孔结构参数的测定	210
一、吸附树脂的外观及形态结构	210
二、吸附树脂孔结构参数的测定	211
三、吸附树脂孔结构测定应注意的问题	213
第三节 吸附树脂的制备	215
一、影响吸附树脂孔结构的因素	216
二、通用型吸附树脂的制备	220
三、超高比表面积吸附树脂的合成	222
四、极性吸附树脂的制备	230
五、缩聚型吸附树脂的制备	235
六、碳化树脂的制备	235
七、吸附树脂的商品牌号	237

第四节 吸附树脂的应用	241
一、吸附树脂使用前的预处理	241
二、吸附树脂的安全性及纯度	242
三、吸附树脂应用中的影响因素	245
四、吸附树脂使用中的污染及复苏	248
五、吸附树脂的应用实例	248
参考文献	252
第八章 柱层析新工艺及新介质	255
第一节 扩张床吸附技术	255
一、扩张床吸附技术简介	255
二、扩张床的特性	256
三、扩张床的操作	257
四、膨胀吸附柱的基本性能	257
五、扩张床吸附剂	258
六、扩张床吸附技术应用	264
第二节 分子印迹技术	264
一、分子印迹聚合物的特点	265
二、影响分子印迹聚合物性能的因素	265
三、分子印迹聚合物的制备	267
四、分子印迹聚合物的应用	268
第三节 灌注色谱技术	268
一、灌注色谱及其介质的特点	268
二、灌注色谱原理	270
三、灌注色谱介质的种类	271
四、灌注色谱介质的制备	273
五、灌注色谱的应用	275
第四节 柱层析法进行蛋白质折叠复性	276
一、柱层析法进行蛋白质复性的优点	277
二、柱层析法进行变性蛋白质复性过程中应关注的问题	278
三、不同柱层析法进行蛋白质复性举例	280
参考文献	286

第一章 绪 论



液相色谱法广泛用于各类物质的分离纯化,从无机小分子的分离到生物大分子的纯化,都已成为一种有利、有力的分离工具。由于液相色谱具有使用条件温和、活性物质收率高等优点,已成为生物大分子分离纯化的一种重要工具^[1]。色谱法通常采用柱式操作,将固定相装入柱中,将含有不同成分的流动相通过层析柱,根据固定相与各种物质的相互作用的不同、结合牢固程度的不同,达到物质间分离的目的。色谱法最早作为分析的手段,进行微量物质的分析分离。随着制药工业、有机合成工业的不断发展,以获得纯品为目的的色谱,即制备色谱得到了迅速发展。制备色谱中不仅有大规模的中低压色谱,也有高压下操作的高效液相色谱。目前制备色谱已获广泛应用,在制药工业中填装几百升固定相的大层析柱耸立在生产车间。色谱法不仅作为分析的手段,而且在食品、冶金、化学工业、生物制品等多种制备产业中,已成为一个独立的操作单元。通常,中低压色谱操作又称为柱层析操作,柱中的固定相称为分离介质。

在生物化工领域柱层析法是分离纯化的一种重要方法,在多肽、蛋白质及天然生物制品的分离纯化工艺中早已获得应用。近年来为适应生物技术制品产业化的新要求,制备色谱获得蓬勃发展,生物医药制品的制备柱内径已达 1.5m,分离介质达几百升甚至几千升,柱体积为几十立方米,制品的年产量达万吨级的大柱层析已在制药工业中连续运转。柱层析不但在分子生物学中显示出优异的性能,而且在生物工程下游技术中也发挥越来越重要的作用,它已走出实验室投入到大规模的工业化生产中。目前柱层析法在生物技术领域的广阔范围内已成为有力、高效的重要分离纯化工具。

第一节 柱层析工艺在生物化工中的应用

无论是天然产物有效成分的提取分离还是通过生物技术手段制备的产品,都要进行提取、分离、纯化才能得到目标产物。大部分生物医药产品如酶、多肽、蛋白质、核苷酸等物质,都是从微生物或动植物体内提取,或采用发酵、细胞、基因工程等现代生物技术生产和制造的,有时甚至需要采用多种技术才能制备出性能优良的产品。各种生物技术产品迅猛增长,生物技术产品的市场每年以 35%~50% 的速度增长,世界各国都对此表现了极大的兴趣。在现代生物技术的发展中,生物制药的下游分离纯化过程是生物制品产业化的制约环节。因为产品的分子量大、分子结构复杂、稳定性低,尤其是质粒和病毒等超大分子,易于变性失活,收率低;由于分子较大,因此扩散系数低,传质速率慢;目标产物的浓度含量低,且与杂质结构性能相似,增加了分离难度;目标产物的质量要求严格,有严格的质量控制,基于以上因素增加了生物制品分离纯化的难度。因此下游分离纯化技术关系到生物制药产品产业化的前景。在生物技术领域中,生物制药由于成本低、安全可靠等优点,使之具有很强的生命力和成长性。生物制药产业已成为当前世界医药市场中的一个新的增长点。国际生物药品市场呈现出投资热、战略联盟日趋频繁、新药品不断涌现等蓬勃发展的特点。在所有生物技术产品的生产过程中,分离纯化加工技术成为重要的关键步骤。在各个制备过程中,几乎都要进行分离和纯化,以去除复杂基体中的各种杂质,保留和回收有效组分。20 世纪 70 年代以来,随着基因工程的迅速发展,出现了许多基因重组的药用蛋白,如干扰素、白介素及人粒细胞集落因子等,这些蛋白只

有达到相当高的纯度时才能为人所用。发酵液的后处理技术或下游过程 (downstream processing), 成为提取分离纯化高纯度的、符合药典规定的各种微生物代谢产物, 即微生物医药的关键的工艺过程。各种生物制品后处理的费用占产品成本的很大比例, 对抗生素而言, 约为发酵部分的 4 倍; 有机酸及氨基酸生产中的 1.5 倍; 生物大分子药物的分离纯化制约着其产业化, 对分离技术的要求更高一些, 基因工程药物的分离纯化后处理可占整个生产成本的 70% 以上^[12]。在目前的微生物药物的生产中往往还要采用多种技术的集成分离技术, 以达药典标准, 纯度可达 98%。近年来由于重组 DNA 和杂交瘤技术的发展, 出现了一些分子结构复杂的大分子, 而从重组微生物或动物细胞培养液中提取药物比传统产品的提取困难得多。因为培养液中有效成分的含量很低, 而杂质的含量却很高。同时对产品纯度的要求很高, 如对蛋白质类药物, 要求杂质的含量不超过 100×10^{-6} , 因为某些核酸的致癌性, 一次剂量中核酸含量不能超过 10pg。由于新药物的不断出现, 同时对产品质量的安全性等要求, 对分离纯化工艺提出了更高的要求。

一、柱层析在分离纯化工艺中具有的优点

1. 应用范围广泛

层析技术应用范围广泛, 它可以分离从小分子到大分子; 从无机分子到有机分子; 从天然物质到合成物质; 从一般物质到具有生物活性的物质, 几乎所有类型的物质都可以采用适当的层析方法进行分离纯化。对于生物大分子, 首先对于目标产物进行结构分析, 根据目标产物的结构和性能, 选用适合的分离机理, 优化分离过程操作, 减少过程步骤, 提高分离过程效率, 可以得到满意的分离纯化效果。对于复杂的体系可以将多种不同分离原理的层析进行合理组合, 建立系统的集成化分离纯化工艺, 缩短操作时间, 提高生产效率, 可以有利于生物制品的产业化。

2. 选择性好、分离效率高

选择性好、分离效率高, 尤其适用于多组分的复杂体系中各成分的分离。对于分离纯化难度较大的基因工程产品, 层析技术也可得到广泛应用。基因产品样品组分复杂、目标产物含量低、对于产品质量的要求高, 对于某些药用蛋白纯度需达到 99.99% 以上, 必须使用选择性好、分辨率高的工艺。选取适当的分离工艺及分离介质可以得到高纯度的产品。层析技术具有多样性、分离介质品种繁多, 为多种物质的分离纯化提供了有利条件。基因工程技术发展前景广阔, 层析技术已成为基因工程产品产业化不可缺少的手段, 在今后的发展中也有广阔的前景。

3. 条件温和, 适用于活性生物大分子分离

可以根据各种分离对象的结构、性能, 采用不同的分离机理的介质及分离条件进行多组分分离。通常, 层析方法条件温和, 适用于活性大分子的分离纯化。天然蛋白质具有生物活性, 在蛋白质的分离纯化过程中, 如果蛋白质的分子构象发生变化, 就会使其生物活性减低, 甚至由于三维结构的改变而完全丧失。而层析技术在分离过程中, 可以维持蛋白质的结构不发生明显的变化, 因此可以获取较高的活性回收率。这点成为层析技术在蛋白质分离中获得广泛应用的重要原因。而且, 近年来还利用柱层析技术在分离纯化的同时, 进行蛋白质的复性应用, 更开拓了层析技术新的应用领域。

4. 适用于各种规模操作

层析技术可适用于不同规模的操作。柱层析操作, 既可以进行灵敏准确的微量分析分离, 也可用于精确、高纯度的大规模生产, 年产量数吨级的产品可源源不断地产出。目前有分离介质仅为 1mL 的分离柱, 也有几千升柱体积的工业生产使用的巨型柱。只要确定适合的操作参数, 易于放大至工业规模操作。

5. 层析分离的种类多, 利于集成工艺分离纯化生化制品

层析技术多种多样, 在分离纯化工艺中适合采用不同分离原理的多种组合工艺, 发挥各种层析技术的特长, 方便、简捷地衔接, 有利于成为分辨率高、产品回收率高、柱的负载量大、应用范围广等综合效益高的下游技术。层析技术可以根据目标产物的特征、体系的复杂情况, 制定适合的工艺路线, 达到简单、高选择性、高收率、高纯度的基本要求, 成为生物下游工程中的重要支撑技术。由于层析技术的发展, 目前不但可以处理多种料液, 对于菌体发酵液或细胞匀浆液及含有部分悬浮物的料液, 也可直接进入膨胀床回收其中的目标产物, 从而削减离心或过滤等预处理过程, 提高目标产物的收率, 降低分离纯化过程的成本。这种新的技术还可以将层析与细胞破碎或发酵过程相耦合, 提高生物下游加工过程的效率。

6. 易进行自动化、程序化操作

层析操作有利于自动化操作及生产工艺的在线检测。各种过程, 尤其是大容量操作, 易于建立自动化、程序化操作, 可快速高效地分离纯化目标产物。生产线中可设置产品性能的在线检测, 以利于保障产品的质量。

二、层析工艺的种类

由于柱层析具有众多的优点及广泛的应用性, 因此它已在工业生产中成为一个独立的操作单元, 成为工业生产中一个有力的工艺过程。被分离物质的品种繁多、结构各异, 因此在选择分离方法及分离介质种类时要根据具体情况进行确定, 以达到最佳的经济效益。通常生物技术下游处理程序, 可概括为三步: 初级处理、中级纯化、最终精制。各阶段达到的目的不同, 被处理的料液也不相同。初级处理阶段, 往往料液的成分复杂而且处理料液量较大, 且含有多种杂质, 目标产物的浓度有时很低, 这阶段主要对目标产物进行提取、分离, 达到浓缩的目的。因此适合选用工作容量大、抗污染、使用寿命长, 且价格低廉的分离方法及分离介质。对于已初步分离出的物质, 应进行中级纯化, 适合选用选择性强、容量大的分离方法及分离介质。最终精制阶段, 往往料液量比较小, 且杂质含量相对少, 但要求得到的目标产物的纯度很高, 因此必须选用高选择性、高分辨率的分离方法及分离介质。由此可见, 根据各阶段的特点要采用不同的分离纯化方法, 以达到协同的高效、快速、经济的目的。层析分离有多种分离原理的不同类型的分离方法, 因此在下游处理中有较大的选择范围。如在预处理阶段, 样品的特征是体积大、杂质含量高、黏度高、有颗粒存在, 此时要求在最快的速度下处理大量样品, 所以一般采用吸附性的介质, 如离子交换或疏水层析进行对目标产物的提取分离。为得到最终纯净的高纯度的产品, 此时以去除仅存的少量污染物、异构体或多聚体等为目的, 可以采用高分辨率、高回收率的凝胶过滤工艺。柱层析种类很多, 是各类层析工艺的总称, 根据不同的分类方法有人认为可分为四五十种, 层析工艺中可选用的生化分离介质的品种型号可达一百多种, 层析工艺的分离原理、分离方法及特点与应用见表 1-1。

表 1-1 层析工艺的分离原理、分离方法及特点与应用

分离原理	分离方法	分离特点	应 用
分子大小	凝胶过滤层析	①在分级方法中, 分辨率为中等, 但脱盐效果甚佳; ②条件温和, 不稳定的生物分子也适用, 活性物质回收率高, 几乎可达 100%; ③流速很低, 但脱盐速度较快; ④容量较小, 上样量不大于层析柱体积的 10%; ⑤工艺重现性好	适用于大规模纯化的最后步骤, 但脱盐处理可在纯化工艺的任何阶段进行
电荷	离子交换层析	①通常分辨率较高; ②选择适合的介质可获得较快的流速及高回收率; ③样品体积不受限制	适用于大量样品处理, 可在分离初期及中期阶段使用, 不宜在高盐含量条件下工作

续表

分离原理	分离方法	分离特点	应用
分子的疏水性	疏水层析	①分辨率高； ②速度较快； ③容量高，样品体积不受限制； ④适用于高盐条件	适用于分离的任何阶段，尤其是样品溶液的离子强度高时，如盐析、离子交换后
特异性	亲和层析	①分辨率非常高； ②流速较快，样品体积不受限制	适用于分离的任何阶段，尤其是样品体积大，含量低而杂质含量高的条件
等电点	等电聚焦	①分辨率高； ②流速较快； ③柱的大小限制样品体积	适用于分离的后阶段

三、层析工艺的应用

层析法是利用物质在两相中的分配系数（由物理化学性质，如溶解度、蒸气压、吸附能力、离子交换能力、亲和能力及分子大小等决定）的微小差异进行分离的方法。当互不相溶的两相做相对运动时，被测物质在两相之间进行连续多次分配，这样原来微小的分配差异被不断放大，从而使各组分得到分离。层析法分离效率高，能将各种性质相似的组分彼此分离。因此层析法是蛋白质分离提纯中最方便有效的方法之一。但由于生物分子的复杂性，仅从宏观的过程优化策略难以满足生物分离的苛刻要求，必须要从分子水平探讨分离机理，有效地了解分离过程实质，从微观本质上设计合理、定向的分离过程，就会更有效地设计高分离效果的方案，达到事半功倍的效果。

在进行生化制品的分离纯化时往往采用集成工艺，即各种层析工艺的联合应用。为获取良好的效果，在选择分离纯化方法时应遵循下列原则。

1. 根据目标产物选取适合的工艺路线

对于原料广泛、产值较低的产品，可选用简单的分离提取方法。一些天然产物的有效成分，可采用一步层析方法，如中草药有效成分的提取分离，可以利用大孔吸附树脂或离子交换层析对提取液进行分离纯化，即可得到相应的产品。而对于产品纯度要求高、体系复杂的重组蛋白的纯化，通常必须采用多种技术、多种层析进行多步纯化，即所谓的集成工艺。各种工艺路线都要以工艺过程尽量简便、生产成本低、易于操作、可进行规模生产为基点。

2. 对于复杂体系，高附加值目标产物的分离纯化往往选用集成工艺

复杂体系中的目标产物必须经过多种不同处理后，才能得到高纯度产品。首先要根据目标产物的结构、性能，选择不同分离纯化机理的层析方法，然后，合理组合各层析技术的顺序，联合使用。选择的原则是：前面应选择能除去含量最多杂质的方法；尽量选择高效的分离方法；应将最费时、成本高的分离纯化方法安排在最后阶段。如对于等电点处于极端区域（ $pI \leq 5$ 或 $pI \geq 8$ ）的重组蛋白，应根据其特点，首先选用离子交换层析进行分离，这样很容易除去几乎所有的杂蛋白。而对于重组蛋白特异性的配体、抗体等应首选亲和层析纯化方法。在各种层析技术的集成使用中，凝胶过滤往往在处理的后期阶段使用。由此可见，首先对被分离的目标产物进行全面了解，根据其不同的特性，选用不同原理的层析方法进行分离纯化处理，或采用多种工艺的联合操作，才能收到优良的效果。

3. 层析分离规模化、产业化

在进行全面工艺设计之前，必须考虑分离纯化过程的规模化、产业化。因为一些实验室方法在工程上有时难以实施，如实验室或进行检测时可使用价格昂贵的分离介质，或采用冗长的工艺路线，都难以实现工业化生产。为了能进行规模生产，必须采用工艺路线短、操作易于自

动化、程序化的流程。目前一些分离系统都配有适合的操作程序软件,便于工业规模生产。在分离工艺的小试中要确立适用于工业生产规模的参数,如流速、阶段洗脱等参数的确立,只有能适用于规模化才能被生产采用。目前不但常规离子交换、大孔吸附等层析工艺以几百升、几千升规模的柱用于生产。生化专用分离介质也有千升床体积的柱矗立于生化分离车间。生物制药行业已经拥有介质容量在3000~4000L的层析柱进行生产。由此可见,层析技术已不限于分析用的小层析柱,而是已成为当前生化制品生产中的重要手段,成为生化技术的重要下游支撑产业。

随着层析工艺的应用范围不断扩大,对产品的纯度和收率的不断提高,对分离介质提出了更高的要求,高选择性、高分辨率、高收率、高使用寿命及廉价等成为对介质的基本要求。在层析技术不断发展的同时,也促进了分离介质的快速发展。分离介质的新产品不断涌现,老产品不断更新换代焕发青春以满足市场的需求。层析介质性能的改进,使低压层析的分辨率和分离速度等方面获明显地改进,在极低反压下可进行高分辨率和高流速分离。新型介质的出现,改变了常规的层析操作,可以将含有悬浮杂质的料液直接进入层析柱,经一步操作即可达到萃取、浓缩及纯化的目的,避免了过滤、澄清等繁杂的工序。新型介质的出现,降低了生物制品的生产成本。层析工艺促进了生化制品的工业化进程,也逐步成为生化产品的重要生产制备工艺,为更多的生化制品的产业化提供了物质保障。

第二节 生化分离介质应具备的特性

随着生物技术的发展出现了许多以柱层析为基础的系统装置。1982年出现了快速蛋白质液相色谱系统(fast protein liquid chromatography, FPLC)^[2,3],这是为纯化各种生物分子而设计的专用系统及用于中低压的Äkta色谱装置,FPLC采用凝胶过滤、离子交换、等电聚焦、亲和层析、疏水层析等多种层析技术对种类繁多的生物大分子进行分离纯化^[4~8],用该系统纯化的生物物质已超过400种。

生物分离技术是涉及生物化学、化学工程及材料科学等多学科互相交叉的综合性学科。由于生物大分子在分子结构、理化性质及生物活性等方面的复杂性和多样性,要求生物分离技术必须要适应生物大分子的特点才能得到发展和提高。层析技术同样必须适应生物大分子的各种特殊性能,由于其广泛性和多样性,使得层析技术成为生物大分子分离纯化的关键技术。而层析分离介质是层析技术发展的核心,所以分离介质的发展成为各国关注的焦点,也获得了快速的发展。随着应用规模的不断扩大,为使生物产品生产过程处于最佳监管状态,达到世界卫生组织(WHO)标准,又出现了多种全自动生产规模层析标准系统。新系统的最大特点是其核心部分(即层析分离单元)能“在位清洗”,保证了系统能在无菌条件下工作,且清洗方便。在液相色谱中,无论是哪一种层析方法,分离介质的性能都是影响分离效果的首要因素。为了满足近年生物技术以制备产品为目的的需求,出现了多种生化层析分离介质,经典的凝胶过滤层析介质性能不断改进,已成为具有高通透性、高分辨率、高机械强度的新型凝胶过滤层析介质;具有新型功能基团的离子交换剂、螯合介质已用于生化领域;特种离子交换剂-缓冲离子交换剂用于聚焦色谱、亲和层析的基体和配基种类日益增多。自20世纪90年代以来为了进一步提高生物制品的收率,简化分离程序,出现了“扩张床吸附技术”,此工艺的特点是用大密度的扩张床吸附剂,通过一步纯化,便能达到萃取、浓缩及初步纯化的目的。该工艺不但简化了工艺,还大大提高了产物的收率,已用于工业生产实践中。根据生化分离的特异性特点,分子印迹新型介质及手性分离介质已成为层析介质中的新宠。新型刚性的以合成大分子为骨架的介质不断发展,美国、日本、德国等国设计研究各具特色的新型介质不断涌现。层析介质的发展趋势可以认为是以天然大分子为母体的介质不断地进行合成工艺改进、提高性能,使老产品更新换代,同时大力开发以合成高聚物为骨架的具有优异性能的新一代产品,层析介质近年出

现了一个新的飞跃。目前用于生化分离的层析介质品种型号已达 100 多种,我国研制的新型介质不断出现并用于生产实践中。

任何模式的柱层析都是利用目标分子在分离介质与流动相之间的特殊相互作用而得到分离的。分离介质是柱层析的核心部分,因此介质的研究、选择和应用是各种层析方法建立和发展的依据。各种分离介质都需进行化学结构及物理、化学性质的表征和分离性能的评价,目的在于进行层析工艺的设计以发挥其最大的效用。确定分离原理后,介质成为决定因素。柱层析已广泛用于工业生产的很多领域,在水处理、湿法冶金、化学工业、医药等工业领域不断地扩展应用范围。20 世纪 60 年代分离介质获得了蓬勃发展,使其在生物领域不断获得新的应用。由于分离对象的不同,对分离介质的要求不同,生化分离的目标产物不是简单的小分子,而是结构较复杂的分子量较大的分子,往往还是具有生物活性的大分子,因此对分离介质提出了特殊的要求。

一、生化分离介质应具备的基本条件

1. 粒度适合及粒径分布均匀的微球

介质的外观和粒径可以通过光学显微镜进行观测,目前合成的介质,无论多糖类还是合成大分子系列,绝大部分为珠状体。无论外观如何都需要有均匀的粒径,介质的粒度和粒径分布是影响色谱动力学的重要因素。在给定操作压力及生产能力的条件下,所需的床层高度几乎正比于介质颗粒直径的平方,而柱直径几乎不受影响^[9]。因此,减小介质粒径可降低柱长度和床体积,这就意味着降低投资和分离成本。对于售价极高的介质尤为重要,在现代工业制备层析中(modern industrial preparative chromatography, MIPC),大规模制备装置大部分采用大内径柱和小颗粒介质的短床层。粒径是分离介质的一个不可缺少的指标。介质的外观与粒径可以通过显微镜观测后加以统计得到分布范围,有些电镜配有图像分析功能,计算机可以简便地测定粒度分布,如采用粒度分布仪则更加方便。被分离的目标产物不同、层析方法不同、使用的规模不同,可选用介质的粒径范围也不相同。生化专用介质粒径范围在 5~350 μm ,合成的大孔吸附树脂的粒径范围在 150~590 μm (美国标准筛 100~300 目)。

生化专用介质的粒径通常较小,如常用的琼脂糖系列,粒径范围为 45~165 μm ,粗颗粒为 150~300 μm ,聚苯乙烯系列生化专用介质的粒径范围为 5~30 μm 。介质的粒径小,有利于生物大分子的粒扩散,扩散系数较小的大分子易于到达功能基团位置,进行结合,可以提高吸附速率,在动态吸附中提高容量。在高压条件下,通常使用粒径小的介质,但对于工业制备色谱不推荐使用小于 20 μm 的介质,因为粒径过细,会增加柱的反压,影响流速,降低生产效率。粒度分布均匀可提高分辨率,可以得到一个对称性很好的分离峰,并可在较高流速下进行分离,减小分离床体的阻力,提高分离效率。随着合成技术的进步,单分散性的多种骨架基球已经相继面市并在色谱分离领域获得广泛应用。

2. 介质要具有与生物大分子的相容性,而无非特异性吸附

因为生物大分子多为亲水性物质,且大部分在水溶性的缓冲液中进行分离提取,与生物大分子的相容性可以有效地保持大分子的生物活性。介质要求尽量减少非特异性吸附,不产生不可逆的非特异性吸附,这样才能避免目标蛋白变性。减少介质的非特异性吸附,不但可以提高目标产物的纯度,还可以保持介质的高分离容量,延长使用寿命。对于凝胶过滤层析介质,这点更为重要,因为凝胶过滤只根据被分离物质的尺寸进行分离,不能有目标产物与介质的相互作用。

3. 介质骨架具有适当的孔径及孔分布

层析介质大多数是具有孔隙度的珠体,即使薄壳型介质其表面涂层也有孔隙。介质珠体的孔结构可分为微孔(<10nm)、中孔(10~30nm)、大孔(30~100nm)及超大孔(>100nm)等不同孔径的母体结构,也有报道孔径大于 1000nm 的合成技术^[10,11]。在分离过程中介质孔

的存在有利于分子的传质过程,目标产物分子易于到达介质的活性中心,如蛋白质、酶和多肽等生物大分子,相对分子质量一般在几万至百万,病毒和质粒的相对分子质量可达几百万至千万,这些庞大的分子在液体中的扩散系数通常比小分子小1~2个数量级,甚至2~3个数量级,为使这类分子能接近介质的活性中心,必须要有适当的孔径。因此多孔结构的介质在生化分离中获得广泛应用。凝胶过滤层析,对孔的要求更加严格,要求孔分布范围很窄,才能根据目标产物分子的大小进行分离。

孔径及孔分布可采用压汞法、色谱法、BET法等进行测定,但这些测定方法都适用于干态珠体,对于不宜制备成干态的介质可用标准子质量物质进行测定。

4. 具有优良的化学稳定性

在柱层析分离中介质的化学结构直接影响选择性和分离效果等重要因素。这要求介质不但有稳定的骨架结构,还要有不易脱落的稳定的功能基团。因为分离体系复杂,除常用的溶剂及缓冲液外,有时还要使用复性剂、表面活性剂及分离伴侣等物质,这些物质不能影响介质的活性中心,才能使介质在长期的应用中有稳定的分离性能、维持操作参数的可持续性和重现性。功能基团的脱落、骨架大分子的降解等这些结构的不稳定性,不但影响介质的使用寿命,还会对目标产物的纯度产生严重的影响。为确保食品及药物的安全,美国FDA规定了聚合物分离材料在食品及医药工业中的应用安全性及纯度要求。自1993年以来,美国、欧洲及日本等分别建立了相关的卫生法。化学稳定性也直接影响介质的使用寿命,即直接影响生化制品的制造成本。

5. 优良的物理机械稳定性,便于进行清洗、消毒及再生操作

为确保制品的卫生标准,生化分离介质在使用过程中往往要进行消毒灭菌,介质要在湿态、适当的形态下,在高压灭菌器中于120℃维持30min,可达到灭菌目的。采用1mol/L的氢氧化钠处理介质也可达到消毒灭菌的目的。介质使用过程中除吸附分离外,还要进行洗脱、清洗和再生工艺,而且介质在柱中还会相互摩擦,必须有优良的物理稳定性才能有较长的使用寿命。

二、生化分离介质的结构特点

随着应用规模的不断扩大,为使生化产品生产过程处于最佳管理状态,为了满足近年生物技术以制备产品为目的的需求,对分离介质的结构提出了更高的要求,主要有以下几方面。

1. 有刚性及半刚性的骨架,优良的水力学通透性,较高的动态工作容量

介质骨架的刚性直接影响其水力学通透性。对于以天然多糖为骨架的介质以其高亲水性及与生物大分子相容性的优点,在生化分离中占有重要地位。但这类介质的骨架结构原为软基质,易于变形,甚至结块,难以提高流动相的流速,并使分辨率降低,在应用上受到限制。经过合成工艺的改进,美国通用电器公司医疗集团(GE Healthcare公司,最早的瑞典Pharmacia公司)生产了半刚性的多糖分离介质。目前适用于高流速的多糖骨架基体的介质已用于大规模的分纯化制备色谱中,甚至可满足高压液相色谱的要求。高聚物合成介质多数为刚性母体结构,可在高流速下高负载量分离生物大分子。分离介质必须要易于装柱、具有较高的动态工作容量、流速较快、有利于工业生产,这是对介质结构的首要要求。

2. 生化分离介质有适宜的功能基团密度

色谱分离过程是目标产物分子与流动相、固定相相互作用的过程,根据不同的分离模式需求不同的分离介质。不同化学结构的分离介质是通过对母体结构(基球)的化学改性而制备的。优良的生化分离介质不但要具有适当的化学修饰,还要在其表面及内表面有适当的功能基团密度。这点与一般分离介质有明显的区别,在小分子的分离过程中,无论哪种分离模式,都是小分子个数与功能基团之间是1:1的对应关系。而每个生物大分子上通常具有多个活性点(多个带电点、多个疏水区、多个特异结合点等),它与介质的作用不是单点吸附,