

动物生化制药学

商业部脏器生化制药情报中心站 编著

人 民 卫 生 出 版 社

动物生化制药学

张 天 民 吴 梧 桐 主 编
王 友 同 陆 得 璋

张天民 吴梧桐 王友同 陆得璋
吴多汉 许敦复 项翊源 陈鹤歧 编 写
胡克俊 宋剑南 吴文俊

人 民 卫 生 出 版 社

动物生化制药学

商业部脏器生化制药情报中心站 编著

人民卫生出版社出版
(北京市崇文区天坛西里10号)

四川新华印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

787×1092毫米16开本 24印张 4插页 559千字

1981年 月第1版第1次印刷

印数：1—7,650

统一书号：14048·3945 定价：2.30元

前 言

动物生化药物，是从动物的器官、腺体、体液、分泌物以及其他组织中提取得到的。这类药物的成分多属于生物大分子，现在大多不能用合成的方法生产，在临床应用上一般都具有针对性强、毒副作用小、疗效好、容易为人体吸收和代谢等特点。生化药物与合成药物、中药材同为当前防病治病的三大药源之一。近年来不但在我国有了很大的发展，而且在国际上也是发展很快的。

本书是根据国务院关于发展我国脏器生化制药的文件精神，在商业部冷藏局的组织下，由脏器生化制药情报中心站主持编著的。参加编写的有南京药学院、山东医学院从事本专业教学和科研的教师以及上海医药工业研究院，南京、武汉、天津、杭州、开封、洛阳、泰州等生化制药厂的工程技术人员。本书主要是总结了我国动物生化制药的科研成果和生产经验，并结合理论进行了阐述，内容包括动物生化制药的一般原理和方法；氨基酸、多肽、蛋白质、酶、辅酶、核酸、粘多糖、脂类、肝胆及其他组织制剂等生化药物的制造原理、工艺过程和主要检验方法；生化制药常用的近代技术以及国际上动物生化制药的发展趋势；也编入了一些常用生化制药技术数据。本书除参阅了国内有关单位所提供的资料外，还参阅了国外有关文献，在资料的采用上力求新颖，以博人之长，补己之短，希望能在我国生化制药现代化方面起一定作用。本书可供生化制药工作者阅读。对药学、医务、生化工作者和大专院校有关专业师生也有一定的参考价值。

在本书编写过程中得到了莱阳、杭州生化制药厂的大力支持，山东医学院生化制药班学员协助抄写，杨小康同志绘制插图，一并致谢。

由于动物生化制药在我国是新兴工业，尚处于发展阶段，加之编者水平所限，本书难免会存在一些缺点和错误，欢迎读者批评指正。

商业部脏器生化制药情报中心站

一九八〇年六月

目 录

第一章 动物生化制药的一般原理

和方法 1

- 第一节 提取原理 2
- 第二节 盐析法 5
- 第三节 有机溶剂分级沉淀法 9
- 第四节 等电点沉淀法 12
- 第五节 结晶和再结晶作用 13
- 第六节 酶解法 16
- 第七节 透析法 18
- 第八节 吸附法 21
- 第九节 灭菌法 25
- 第十节 pH 测定与自动控制 29
- 第十一节 冷冻干燥 34

第二章 氨基酸类药物 47

- 第一节 氨基酸的化学及其在医药上的应用 47
- 第二节 氨基酸的生产方法 54
 - 一、提取法概述 54
 - 二、胱氨酸的制备 55
 - 三、半胱氨酸盐酸盐的制备 57
 - 四、碱性氨基酸的制备 58
 - 五、碱性氨基酸注射液的制备 63
- 第三节 水解蛋白注射液 63
- 第四节 氨基酸输液 68

第三章 多肽和蛋白质类药物 77

- 第一节 多肽和蛋白质化学 77
- 第二节 垂体激素 85
 - 一、垂体激素概述 85
 - 二、促皮质素 86
 - 三、促黄体激素和促卵泡激素 89
 - 四、缩宫素 90
 - 五、垂体后叶注射液 93
- 第三节 胰岛素 94
- 第四节 胃膜素 103
- 第五节 明胶 106

第六节 人胎盘血丙种球蛋白、

白蛋白 110

第七节 其他多肽和蛋白质类药物

..... 115

第四章 酶类药物 122

第一节 酶类药物的一般提取方

法 122

第二节 主要胰脏酶类药物 125

- 一、胰酶 125
- 二、胰蛋白酶 128
- 三、 α -糜蛋白酶 131
- 四、结晶糜胰蛋白酶 135
- 五、弹性蛋白酶 139
- 六、激肽释放酶 142

第三节 胰蛋白酶抑制剂 149

第四节 其他酶类药物 153

- 一、胃蛋白酶 153
- 二、玻璃酸酶 155
- 三、细胞色素 C 158
- 四、尿激酶 165
- 五、溶菌酶 170

第五节 辅酶类药物 174

- 一、辅酶 Q_{10} 175
- 二、辅酶 A 180

第五章 核酸与核苷酸类药物 187

第一节 概述 187

第二节 核糖核酸 192

第三节 脱氧核苷酸钠注射液 196

第四节 三磷酸腺苷 198

第五节 核酸-氨基酸片 202

第六章 粘多糖类药物 207

第一节 粘多糖的化学和一般提

取纯化方法 207

第二节 硫酸软骨素 215

第三节 肝素 223

第四节 冠心舒·····	233
第七章 脂类药物 ·····	239
第一节 磷脂类药物·····	239
第二节 前列腺素·····	244
第三节 胆汁酸类药物·····	256
第八章 肝、胆制剂及其他组织提	
取制剂·····	267
第一节 肝制剂·····	267
一、肝注射液·····	267
二、肝水解物注射液·····	269
三、肝制剂的进展·····	271
四、主要肝制剂的种类·····	272
第二节 胆汁制剂·····	273
一、人工牛黄·····	273
二、抗菌痢片·····	280
第三节 热藏大脑组织液·····	281
第四节 骨宁注射液·····	282
第五节 眼生素和眼宁注射液·····	287
第六节 脾注射液·····	292
第九章 几种近代生化技术在动物	
生化制药中的应用·····	296
第一节 电泳技术·····	297
第二节 等电聚焦技术·····	305
第三节 离子交换技术·····	311
第四节 凝胶过滤技术·····	322

第五节 超滤技术·····	328
第六节 亲和层析技术·····	334
第七节 固定化酶技术·····	337
第十章 动物生化药物的发展趋势	
和展望·····	344
附录 ·····	348
表 1 一些主要生物物质的分子	
量及吸收系数·····	348
表 2 一些蛋白质的物理性质·····	349
表 3 一些重要生化试剂的分子	
量和 pK 值·····	349
表 4 制备较低浓度乙醇 1 升所	
需较高浓度乙醇及水的用量表·····	351
表 5 硫酸铵饱和度计算表·····	352
表 6 常用酸、碱的比重、百分	
浓度和当量浓度·····	352
表 7 常用缓冲溶液配制方法·····	353
表 8 各种离子交换剂的特性表·····	357
表 9 各类分子筛的特性·····	360
表 10 部分国家药典收载的主要	
动物生化药物·····	362
表 11 常用动物生化药物名词	
(英汉对照)·····	364
索引·····	1

第一章 动物生化制药的一般原理和方法

生物化学药物（简称生化药物）是指从动物、植物和微生物等生物体提取分离所得的用于预防、治疗和诊断疾病的物质，也包括用生物合成和化学合成制得的存在于生物体内且具有一定生理功能的物质。它们是氨基酸、多肽、蛋白质、酶及辅酶、激素、维生素、多糖、脂类、核酸及其降解物等。在治疗疾病中，它们能起到调节、补充、恢复和维持机体正常功能的作用。如糖尿病人因胰脏中 β 细胞分泌胰岛素的功能减退，使血糖水平升高，注射胰岛素后即可使患者在短时间内恢复血糖为正常水平；水解蛋白或复方氨基酸输液可以及时补充营养，增强机体抵抗力，挽救病人生命；动脉血栓的垂危病人，注射尿激酶，可使局部组织的血液畅通，恢复机体功能；白血病患者给予天冬酰胺酶治疗，可以缓解病情等。

动物来源的生化药物，即动物生化药物，是从动物的组织、器官、腺体、体液、分泌物以及胎盘、骨、毛、皮、角和蹄甲等所提取的药物，也可称为脏器生化药物。这里“脏器”一词，乃指广义而言，包括来自动物的各个部分。这类药物的成分多数属于生物大分子，现在大都还不能用合成的方法生产。其中部分制剂，含有多种生理活性物质，它们所起的协同作用，可增强疗效。这种来自动物的药物一般具有毒性低、副作用少、容易为人体吸收等特点。

利用内脏器官防治疾病，在我国具有悠久的历史。自古以来，就有利用脏器治疗疾病的丰富实践。牛黄、胆、紫河车、鸡内金等历来就是经常采用的药物。李时珍《本草纲目》所记载的1892种药物中就有动物药物444种。国外也早就利用脏器治病。过去由于多数制品有效成分不明确，故有脏器制剂之称。

在本世纪二十年代，对动物各种脏器的有效成分已有所了解，甲状腺素及胰岛素等已用于临床，但这类药物的品种不多。四十年代至五十年代，相继发现了肾上腺皮质激素和脑垂体激素等对机体的重要作用，使这类药物的品种日益增加。六十年代以来，从生物体分离和提纯酶的技术日趋成熟，开始了酶制剂在医药上的应用，尿激酶、激肽释放酶、溶菌酶、糜蛋白酶等成为具有独特疗效的药物。现代生化技术的发展，使从动物来源的药物大多数已能进行分离和提纯，故脏器制剂名称已逐渐不用，而称为动物生化药物或脏器生化药物。

在国内外，新的生化药物不断增加。据不完全统计：国外市场上，六十年代期间生化药物有100余种；至七十年代就增加至140余种；目前正在研究的约有180种。估计至八十年代，销售品种将达200余种。生化药物因具有独特的医疗价值，已成为不可忽视的一类药物。动物生化药物已成为防病治病的重要药源之一。

下面介绍动物生化制药的一般原理和方法。

第一节 提取原理 [1~3]

一、基本概念

利用一种溶剂对不同物质的不同的溶解度，从混合物中分离出一种或几种组分的过程称为提取 (Extraction, 也称萃取或抽提)。用冷溶剂从固体物质提取的过程可称为浸渍 (Maceration); 而用热溶剂者可称为浸提 (Digestion, 也称浸煮)。被处理的混合物，无论是固体或是液体，在经过溶剂处理后，必须有一部分不混溶，而选择性地溶解要提取的成分，即其易溶部分要被溶出成为溶液，从而达到分离的目的。

提取分为两类：一为对固体的提取，也称液-固提取，被处理的物料为固体；另一为对液体的提取 (习惯上多称萃取)，也称液-液提取，被处理的物料为液体。在对固体的提取中，溶质首先溶解于溶剂，然后由两相的界面扩散到溶剂的主体。在对液体的提取中，溶剂与被处理的溶液互不混溶或部分混溶，但溶剂对于溶液中的组分却有选择性的溶解能力，因而可经由两液相间的界面，由一相扩散到另一相。

由提取而得到的物质是溶液。为了获得所需组分还需作进一步的处理，用蒸发、沉淀、结晶或干燥等方法以除去提取时所用的溶剂。此溶剂，除水外通常都回收重用。

综上所述，提取的过程包括三个阶段：使被提取的混合物与溶剂紧密接触；分离所得溶液；由溶液中分离要提取的物质并回收溶剂。

二、影响提取的因素

从动物材料中提取生化物质，不论用水为溶剂或用有机溶剂提取，多是液-固提取。影响这种提取的因素很多，主要有被提取物在固相-液相的分配比，提取过程中固-液间的充分平衡、提取次数、溶剂与原料的比例和两相分离时固相中残留液相的量。此外，还受搅拌情况、液体流动速度以及原料颗粒大小等影响。

一般说，提取所用液体的量为原料体积的 1~5 倍。体积大些，有利于提高收率，但工作量较大。提取时间一般为 1~24 小时，不同产品相差较大。

除上述外，下面几个因素对提取的影响，应该注意。

(一) 温度

一般说，温度升高有利于提取的进行，因为可以增加物质的溶解度和溶解速度。对耐热成分，加热提取是一种常用的方法。但温度对一些物质的活性影响是很大的，尤其在水溶液里，蛋白质、酶和核酸等生物大分子更容易受热而变性。

一般酶的提取要求在 0~10℃ 进行，但有的酶在短时间 (如 15~30 分钟) 以较高温度 (35~40℃) 处理时，由于组织的自溶作用而促进提取。对于那些能耐受较高温度的酶，提高温度使杂蛋白变性，有利于该酶的提取纯化。

在提取核酸类物质时，一般在低温进行，以抑制某些酶的作用，防止生物大分子的降解。用有机溶剂提取时，低温能减少有机溶剂引起的蛋白质和酶的变性作用。脂类药物的提取除必要外一般应避免加热，以防止脂类的氧化、聚合或水解，一般在室温进行。糖类的提取一般也在室温。

(二) 氢离子浓度

一般来说蛋白质在接近中性的 pH 时比较稳定。提取蛋白质或酶时应尽量采用缓冲溶液,用酸或碱时浓度宜小, pH 值一般控制在 4~9。一般偏向碱性比较容易引起蛋白质的变性,加上酶与其他物质的离子键结合,常能在酸性 (pH 3~6) 解离,所以酸性提取占多数。在酸水中,还会发生细胞破壁作用,这有利于胞内酶的提取。

从蛋白质或酶的溶解度考虑,提取应避免在等电点的 pH 进行。等电点在酸性范围的可用碱提取;而等电点在碱性范围的可用酸提取。提取时应注意酸碱对生化药物活性的影响。

对于一些多糖类化合物,则在碱性范围内提取较好,因此在此条件下多糖较稳定。

(三) 盐浓度

低浓度的盐可以增加蛋白质的溶解度,称为“盐溶作用”。对于不溶于无盐水的蛋白质如某些球蛋白,盐溶作用特别明显。对一些产品,提取时采用一定浓度的氯化钠溶液(如自胸腺提取胸腺素等),就是利用盐溶作用。盐的存在,有利于组织中的一些和蛋白质结合在一起的粘多糖游离出来,称为盐解。

在某些情况下,用蒸馏水提取反而比盐溶液有效,这可能是低渗破坏了膜结构的关系。

常用的盐溶液有 0.15M 氯化钠、0.02~0.05M 磷酸盐缓冲液和 0.02~0.05M 焦磷酸钠缓冲液。焦磷酸钠缓冲液的优点是缓冲 pH 范围大、对氢键和离子键有较强的解离能力,能结合二价离子和对某些酶有保护作用。

有时采用柠檬酸缓冲液使提取维持在酸性范围,它具有焦磷酸钠缓冲液的类似优点。

三、提取用溶剂(或溶液)

(一) 用酸、碱、盐溶液提取

除脂类化合物外,多数生化物质能溶解于水,一般小分子物质较大分子物质溶解度大。利用稀酸、稀碱、稀盐或适当的缓冲液,一般能将生化物质有效地提取出来。

对膜蛋白、核蛋白等较难提取的蛋白质,必要时可用高浓度的盐类、尿素或盐酸胍为提取剂。蛋白质或酶在这种溶液里处于松散状态,一旦改用缓冲液,又能形成其折叠结构,并恢复其生物活性。

(二) 用表面活性剂提取

表面活性剂是一类具有极性基和疏水基的两亲性物质 (Amphiphiles),在水溶液与油液(不溶于水的液体)、气体以及疏水性固体的界面上浓度增大。其极性基倾向于水溶液侧,而疏水基倾向于另一侧。由于这种性质,表面活性剂具有乳化、分散和增溶作用,所以某些生化物质的提取可用到它。

常用的表面活性剂有脂肪酸盐 ($R-COONa$)、高级醇硫酸酯盐 ($R-OSO_3Na$)、烷基苯磺酸盐 ($R-C_6H_4-SO_3Na$)、胆汁酸盐、烷基氨基酸 ($R-NH-CH_2-COOH$)、长链季铵盐和吐温 (Tween, 商品名) 等。

(三) 用有机溶剂提取

对脂类生化物质的制备,主要是用有机溶剂把它们从组织中提取出来。常用的有机溶剂有甲醇、乙醇、丙酮、丁醇、醋酸乙酯等有极性的溶剂以及乙醚、氯仿、苯等非极

性溶剂。具有一定极性的溶剂既有极性基（亲水基），又有疏水基，是广义上的表面活性剂。甲醇、乙醇、丙酮能与水混溶，同时又有一定的亲脂性，对某些蛋白质和脂类起增溶作用。乙醚、氯仿、苯是脂类物质很好的溶剂。在选用有机溶剂时，一般采用极性物质易溶于极性溶剂中，非极性物质易溶于非极性溶剂中的原则。

与细胞颗粒结构如线粒体等结合的酶，有的是和脂类物质紧密络合，难以提取，往往采用丁醇为溶剂，效果较好。丁醇在水中有一定的溶解度，对细胞膜上磷脂蛋白的溶解能力强，能迅速透入酶的脂类物质络合物中。

提取时有机溶剂选择适当，能顺利地分别提出所需的生化物质，充分利用原材料。

在生化物质提取前，常常用丙酮处理原材料或半制成品，这多数是为了脱水和脱脂，做成的丙酮粉便于保存，并可使细胞结构松散，有利于提取。

在提取蛋白质或酶时，有时利用有机溶剂促使某些蛋白质和酶变性或抑制某些酶的活性。例如，从胰脏提取某些蛋白质时，用一定浓度的乙醇，可抑制一些蛋白水解酶的活性，避免所需成分的水解。

从动物原料提取多肽时，常用一定浓度的酸性丙酮进行。在此介质中多种蛋白质不溶解，可减少杂蛋白的溶出。

四、液-液提取

在动物生化制药中，有时要用有机溶剂对动物材料的水溶液提取，这包括用有机溶剂对水溶液进行脱脂。影响这种液-液提取的因素有被提取物在两相的分配比和有机溶剂的用量等。

增加有机溶剂用量，虽然可以提高效率，但溶质浓度降低，往往不利于下一步分离工作的进行，且消耗溶剂较多。故在实际工作中，常采取分次加入溶剂，连续多次提取的方法。

用有机溶剂对水溶液中酸性物质的提取，宜在酸性条件下进行；对水溶液中碱性物质的提取，宜在碱性条件下进行；对水溶液中两性物质的提取，则使水溶液的pH值在该两性物质的等电点为宜。

在水溶液中加入较大的盐，可使生化物质在水中的溶解度降低，促使它转入有机溶剂，有利于提取的进行。盐的存在还能减少水在有机溶剂中的溶解度，即减少提取液中水分的含量。

液-液提取时，常发生乳化作用，使有机溶剂和水相分层困难。去乳化的方法，常用的有：离心或过滤分离；轻轻搅动；改变两相的比例；加热；加电解质（氯化钠、氢氧化钠、盐酸、高价正离子等）等。

五、提取液的分离

提取所得到的溶液，需与固体或另一液体分离。溶液与固体的分离，一般处理方法有三种：自然沉降、过滤、离心。自然沉降是在液体介质中，固体自然下沉而分离的过程。当混悬液处理量较大，且固体和液体的比重悬殊时，可用此法。沉降分层后，可用虹吸等方法将液体部分移去。过滤系利用多孔材料阻留固体，而使液体通过，达到固体与液体分离的过程。离心是利用旋转运动的离心力进行分离物料的一种操作，其中通过

过滤介质分离液体和固体者为离心过滤；利用液体比重的大小分离出不同比重的液体者为离心分离；利用液固两相比重的差异进行沉降分离者为离心沉降。

离心操作中所需离心力的大小，目前多用相对离心力（RCF）表示^[4]。在离心场中作用于颗粒的力相当于地球重力场重量的倍数，称为相对离心力。可以证明：

$$RCF = 0.00001117rN^2$$

式中 r 为从旋转轴至颗粒的半径距离，以厘米计； N 为转速，即每分转数。例如，当 $r = 19.7$ 厘米， $N = 3000$ 转/分时，

$$RCF = 0.00001117 \times 19.7 \times 3000^2 = 1980 \times G$$

相对离心力是作用于物体拉力强度的量度，是力大于重力的倍数。 G 是相对离心力的实用标记， $1980 \times G$ 即指离心力大于重力的倍数是 1980。有的文献中用“ g ”代“ G ”，如上例则写成“ $1980 \times g$ ”或“ $1980g$ ”。

第二节 盐析法^[3,5~7]

生物物质的特点是成分复杂，大多含有蛋白质，有的成分含量虽低但活性强。蛋白质一般存在于复杂混合物中，有时这种混合物中的蛋白质数目相对较少而以其中之一为主，但在另外情况，特别是来源于动物的原料，蛋白质的数目可以很大。在所有蛋白质混合物中，几乎都存在脂类、糖类、核酸类以及其他有机物，同时有不同的无机离子；而这些可以是游离的，也可以是以不同紧密程度与蛋白质结合的。从混合物中分离蛋白质，既需从非蛋白质物质中分离（特别是能与蛋白质结合的物质），也要从其他蛋白质中分离。进行这种分离所用方法有多种。根据物质溶解度的不同可用盐析法、有机溶剂分级沉淀法和等电点沉淀法等。

一、基本原理

盐析是利用不同物质在高浓度的盐溶液中溶解度有不同程度的降低来进行的。因此，通过向含蛋白质的粗提液中加入不同浓度的盐就可使蛋白质分别从溶液中沉淀出来，以达到分离、提纯的目的。这种在溶液（一般是高分子溶液）中加入大量的盐使原溶解的物质析出沉淀的过程，称为盐析。盐析作用的主要原因是由于大量盐的溶入，使高分子物质去水化，从而降低了溶解度。

应该注意，高浓度的盐才能降低蛋白质的溶解度，并使之沉淀。少量盐离子的加入，增加了水溶液的极性，减弱了蛋白质分子间的作用力，从而促使溶解（盐溶作用）。但当加入的盐浓度达到一定程度后，再继续加盐，蛋白质的溶解度就转为降低，并可自溶液中以固体状态析出。这主要是由于高浓度的盐的离子水化，降低了水的浓度，使蛋白质发生去水化作用（还包括因分子电荷减少而导致的去水化），破坏了其水化膜，使易于凝聚沉淀。

二、影响盐析的因素

（一）离子强度

盐对蛋白质溶解度的影响，不但和盐的离子在溶液中的摩尔浓度 C_i 有关，而且和离子所带电荷（或价数） Z_i 有关。理论和实践都证明：这两个因素以离子强度 $I = \frac{1}{2} \sum C_i Z_i^2$ 的关系影响蛋白质的溶解度 S 。离子强度越大，蛋白质的溶解度越小。

（二）蛋白质的性质

各种蛋白质的结构和性质不同，盐析沉淀要求的离子强度也不同。例如血浆中的蛋白质，纤维蛋白原最易析出，硫酸铵的饱和度达到 20% 即可；饱和度增加到 28~33% 时，优球蛋白析出；饱和度再增加至 33~50% 时，拟球蛋白析出；饱和度大于 50% 时，白蛋白析出。

硫酸铵的饱和度是指饱和硫酸铵溶液的体积占混合后溶液总体积的百分数。例如，一体积的含蛋白溶液加一体积饱和硫酸铵溶液时，饱和度为 50% 或 0.50，三体积的含蛋白溶液加一体积饱和硫酸铵溶液时，饱和度为 25% 或 0.25。

（三）蛋白质的浓度

在盐析蛋白质时，溶液中蛋白质的浓度对沉淀有双重影响，既影响沉淀极限，又影响其它蛋白质的共沉作用。例如，在沉淀血清球蛋白时，如果将它的浓度从 0.5% 递增至 3.0%，则所需硫酸铵的饱和度的最低极限从 29% 递减至 24%。由此可知，蛋白质浓度越高，所需盐的饱和度极限越低。但蛋白质浓度越高时，其他蛋白质的共沉作用也越强，这在一般情况下是不希望发生的。所以当溶液浓度太大时，就应进行适当稀释（例如可稀释到 3.0% 左右）。也就是说，宁可多消费一些盐，也不希望发生严重的共沉作用。

（四）氢离子浓度

溶液的 pH 值距蛋白质的等电点越近，蛋白质沉淀所需的盐浓度越小，即盐析沉淀蛋白质时，溶液的 pH 值在接近其等电点时最易析出。此性质适合于大部分蛋白质。但因蛋白质的等电点与介质中盐的种类和浓度有关，尤其在盐析的情况下，盐的浓度一般较大，会对等电点产生较大影响。在生产中，还要考虑 pH 值对不同蛋白质共沉的影响，对具体问题进行观察研究，找出 pH 值与溶解度的实际关系，选择合适的 pH 值来进行盐析。

有的蛋白质可能有两个溶解度最低的 pH 值。例如马的一氧化碳血红蛋白在 pH 6.6 显示一个最低溶解度，这与等电点相当；在浓硫酸铵存在下，另一溶解度最低的 pH 值为 5.4，据认为这是由于生成血红蛋白硫酸盐的结果。

（五）温度

温度升高一般可使蛋白质较易盐析出来，但也有相反的情况。某些蛋白质如血红蛋白、肌红蛋白和血清蛋白等在室温时较在 0℃ 更易被盐析沉淀。温度下降引起溶解度减小的则有胃蛋白酶等。

蛋白质可从逐渐升高温度的硫酸铵溶液中结晶出来，就是根据溶解度降低的原理。在蛋白质的分级沉淀时，温度变化引起各种蛋白质溶解度的变化是不相同的，所以在不同温度下，逐渐增加盐浓度所引起的各种蛋白质分级沉淀顺序，也是有变化的。这在实际操作中应加以注意。

盐析一般可在室温下进行。当处理对温度敏感的蛋白质或酶时，盐析操作要在低温下（如 4℃ 左右）进行。

三、溶解度与离子强度的关系式

在浓盐溶液中进行盐析时，蛋白质的溶解度 S 与盐的离子强度 I 的关系，可用下式表示：

$$\log S = \beta - K_s I$$

式中 K_s 为盐析常数，其值与盐和蛋白质的性质有关。用一定的盐对一定的蛋白质盐析时为常数，与 pH 值和温度无关。 K_s 值越大，说明溶解度越容易变小，即盐析能力越强。表 1-1 列出几种蛋白质的盐析常数。

表 1-1 盐析常数

(溶解度，克/升；离子强度，摩尔/升)

蛋白质	氯化钠	硫酸镁	硫酸铵	硫酸钠	磷酸钾
血红蛋白(马)		0.33	0.71	0.76	1.00
肌红蛋白(马)			0.94		
卵白蛋白			1.22		
纤维蛋白原	1.07		1.46		2.16

从表 1-1 可以看出，负离子价数较高的盐（如硫酸盐）的 K_s 值常较一价者高，但正离子价数高时（如镁离子） K_s 反而降低。因此，硫酸铵及钠盐常用来作盐析用。磷酸盐的盐析作用较强，但由于它的溶解度低，且溶解度受温度影响较大，所以应用不如硫酸盐广泛。

用一定的盐对某种蛋白质盐析时，在一定的 pH 值与温度条件下， β 也是一个常数。所以 $\log S$ 与 I 呈直线关系， β 为直线在纵轴的外推截距。

β 值随 pH 值不同而改变，显示出在浓盐溶液中蛋白质的电离情况与溶解度的关系。在等电点时， β 常有最小值。温度升高一般引起 β 值的降低。 β 值越小，表示溶解度越低，即盐析效果越好。

在一定的 pH 值及温度下，改变盐的 I 值，可以进行分段盐析。例如，在胸腺素的生产工艺中，有一工序是先加硫酸铵使其饱和度为 0.25，盐析除去杂质，分离后于上清液再加入硫酸铵使饱和度达 0.50，收集盐析物，即可达部分提纯的目的。粗提时常用这种分段盐析法。

不同蛋白质对 pH 值和温度的不同反应，在其盐析实践中也很重要。在一定的 I 值下，改变 pH 值和温度，也可以进行分段盐析。对粗品的进一步分离，特别是使蛋白质或酶结晶时，常用此法。

四、盐的使用

硫酸铵是盐析最常用的盐。其优点除盐析能力较大外，是其饱和溶液的浓度大，而且溶解度受温度影响很小（见表 1-2）。它一般不会引起蛋白质明显变性。缺点是它的缓冲能力差，浓硫酸铵溶液的 pH 值常在 4.5~5.5 之间，在使用前有时需要用氨水调 pH 。

表 1-2 硫酸铵的饱和溶液

温 度	0	10	20	25	30
1000克水中摩尔数	5.35	5.53	5.73	5.82	5.91
1000克水中克数	706.95	730.73	757.16	769.05	780.95
1000毫升水中克数	706.86	730.53	755.82	766.80	777.55
1000毫升溶液中摩尔数	3.90	3.97	4.06	4.10	4.13
1000毫升溶液中克数	514.72	525.05	536.34	541.24	545.88
重量百分率	41.42	42.22	43.09	43.47	43.85
比重	1.2428	1.2436	1.2447	1.2450	1.2449

配制饱和硫酸铵溶液时，应使达到真正的饱和。每公斤水可加一定纯度的硫酸铵 800~850 克。因在近饱和时溶解较慢，可适当加温（50℃左右）促其溶解，冷却后使用。用时根据要沉淀的蛋白质不同，pH 要求也就不同，可以浓氨水或浓硫酸调整。饱和硫酸铵溶液的 pH 值测定，因是浓盐溶液，误差很大。可取少量的蒸馏水稀释 10 倍以上再进行测定，虽然也不准确，但比直接测浓溶液好。

可用加入预先配好的饱和硫酸铵溶液的方法进行盐析。在实验室和小规模生产时，或所要求达到的盐浓度不太高时，用此法较好，可防止局部浓度过高。根据蛋白质沉淀所要求的饱和度 S 不同，用下式可求出体积为 V 的含蛋白质溶液，应加饱和硫酸铵的体积 X：

$$X = V \cdot \frac{S}{1 - S}$$

用此式时，100%饱和度以 1 计。如体积为 V 的蛋白质溶液中已有一定饱和度 S_1 的盐，为了进行分段盐析需增高饱和度至 S_2 时，可用下式计算所需饱和硫酸铵溶液的体积 X：

$$X = V \cdot \frac{S_2 - S_1}{1 - S_2}$$

严格说来，由于混合两种浓度不同的硫酸铵溶液时体积的变化，上式不是完全准确的，但误差常在 2% 以下，一般应用已足够。此法快速简便，具有重复性，适合于生产。

当蛋白质溶液体积较大，或所需要达到的饱和度较高，如加入饱和溶液则增加总体积甚大，以致使蛋白质的浓度大为降低时，以加入固体硫酸铵比较适当。所需硫酸铵的重量，虽然也可以通过计算得知，但不甚方便，一般可从硫酸铵饱和度计算表（附录表 5）查得。例如，要把 50% 饱和度的溶液，提高到 80% 饱和度，每升溶液需加入硫酸铵的量可从表查得为 214 克。

作为蛋白质的沉淀剂，硫酸钠的优点是不含氮，不影响用定氮法测定蛋白质的含量。它的缺点是在 30℃ 以下溶解度太小，但随温度变化溶解度改变很大，必须在 30℃ 以上且近恒温（如 37℃）的条件下操作。

磷酸盐也是较好的蛋白质沉淀剂，因缓冲作用较强，可用作一定 pH 和离子强度的缓冲液。在中性或碱性溶液中可采用能形成较高浓度的磷酸钾，在酸性溶液中则磷酸钠

溶解度较大。

其它象氯化钠等也有时使用，可利用其盐析能力较小，达到使不同蛋白质分离的目的。另外，产品中不引进含氮的离子。

凡是直接加固体盐的情况，都应事先研碎，徐缓地分步加入，并不断搅拌。

五、盐析工艺的制定

对于动物生化药物的制备，如果要采用盐析工艺，除可查阅有关文献资料参照设计外，还可经过试验，找出合适的工艺路线和操作方法。除本节前面所述的有关问题外，以下几点也应注意。

(一) 对要分离的物质，首先应了解在什么离子强度下，其溶解度开始随离子强度的增高而降低，并符合盐析关系式。

(二) 可将试样分成若干份，每份加入盐，其量依次递增，分别收集沉淀，测定其性质和含量；或同一试液逐渐加入盐，依次收集每一盐浓度下的沉淀，测定其性质、含量。如此反复试验，依其结果制定工艺。

(三) 还可用不同浓度的试样，进行以上试验，找出适合的试样浓度。如上所述，蛋白质浓度大时，容易盐析，但有时发生共沉淀。这就要将溶液稀释后再进行分级分离。但有时也会产生相反结果，即稀释后反而更不易分离。过分稀释还会造成收率偏低、用盐量增加和成本增高，且硫酸铵浓度增加将使离心困难。

(四) 经过一次分级沉淀得到的蛋白质或酶，是否能进行第二次盐析纯化，存在各种不同情况，也要靠试验确定。

(五) 盐析时蛋白质沉淀析出需一定时间，一般至少要1小时左右才能分离，有时需要更长时间。具体时间的确定，开始时也要经过试验。低盐浓度易离心不易过滤，高盐浓度则反之。在粗制阶段，如盐浓度不高，自然过滤的效果往往比抽滤好。

第三节 有机溶剂分级沉淀法 [3,7]

蛋白质、酶、核酸、粘多糖等生物大分子的水溶液，在逐渐加入乙醇、丙酮等有机溶剂后，这些生化物质的溶解度可不同程度地明显降低，从溶液里分别沉淀出来。这种有机溶剂分级沉淀法也是目前常用的一种方法。它的优点是分辨能力比盐析法高，溶剂易于除去且可回收，缺点是易使某些蛋白质或酶等变性。

一、基本原理

生物大分子的沉淀和溶解，与溶剂的介电常数有关。相距为 r 的两个点电荷 q_1 和 q_2 互相作用的静电力 F 可以下式表示：

$$F = \frac{q_1 q_2}{K r^2}$$

K 由介质的本性决定，称为介电常数，在真空中定为1。介电常数表示介质对带有相反电荷的微粒之间的静电引力与在真空中对比减弱的倍数。蛋白质等是极性分子，其分子间有静电引力，水也是极性分子，能减弱蛋白质等分子间的作用力，使蛋白质等较易溶解，是蛋白质等极性物质的较好溶剂。几种溶剂的介电常数和其他有关物理常数见表

1-3. 对离子或极性化合物，一种好的溶剂必须是一种极性物质。溶剂的极性大小用介电常数表示很方便。水有高的介电常数值，同时对极性化合物而言具有好的溶剂性能。乙醇的介电常数较低，对极性化合物而言是一种较差的溶剂。介电常数很低的液体，如己烷等对极性溶质可以说不具溶剂的作用。

在蛋白质、酶、核酸、粘多糖类等极性物质的水溶液中加入与水混溶的有机溶剂可降低介电常数（见表1-4）和生物大分子的溶解度而使溶质沉淀。在一定条件下，一种溶质只能在一比较狭窄的有机溶剂浓度范围内沉淀出来，因而可以利用不同浓度进行分级分离，较易达到提纯的目的。有机溶剂对蛋白质等的变性可以用降低温度的方法进行有效的控制。冷乙醇法制备丙种球蛋白就是根据这个原理。

表1-3 几种溶剂的介电常数和
其他物理常数

物质(S)	K	沸点 (°C)	密度 ²⁰	溶解度 S/水 水/S
己烷	1.9	68.7	0.699	不 溶
四氯化碳	2.2	76.7	1.584	0.05 0.03
苯	2.3	80.1	0.874	0.07 0.06
二硫化碳	2.6	46.3	1.263	0.25 0.01
乙醚	4.3	34.5	0.719	8.43 1.2
氯仿	4.8	61.2	1.489	0.5 0.1
醋酸乙酯	6.0	77.0	0.902	10 3.3
丙酮	22	56.5	0.788	任 溶
乙醇	27	78.5	0.798	任 溶
甲醇	35	64.7	0.792	任 溶
水	81	100		

表1-4 有机溶剂和一些溶质对水介电常数的影响
(约 20°C 时的值)

液 体	介电常数	液 体	介电常数
水	80	2.5M 甘氨酸	137
20% 乙醇	70	2.5M 尿素	84
40% 乙醇	60	5M 尿素	91
60% 乙醇	48		
100% 乙醇	24		

由表1-4还可看出，甘氨酸水溶液的介电常数比水大得多。此因甘氨酸是一极性较强的偶极离子（甘氨酸的离子小， $-\text{COO}^-$ 带负电， $-\text{NH}_3^+$ 带正电），在它的水溶液中蛋白质等颗粒间的静电引力降低，溶解反而较易。在蛋白质等溶液中加入甘氨酸，可使稳定，即和加入有机溶剂起相反的作用。双甘氨酸对蛋白质等溶解度和稳定性的增加也很明显，也用作蛋白质等药物注射液的稳定剂。因为蛋白质分子本身也是偶极离子，所以许多分离出的蛋白质在浓度较大时稳定。在很稀的水溶液中，蛋白质分子间的静电引力增加，有时会沉淀析出并导致变性，其作用与有机溶剂沉淀相似。

二、操作方法和注意事项

(一) 有机溶剂的选择

乙醇和丙酮是两种最常用的有机溶剂。由表1-3可知，丙酮比乙醇的介电常数小些，沉淀的能力较强。根据一般经验，如30~40%左右乙醇沉淀的物质，改用丙酮时浓度可减少10%左右，即用20~30%的丙酮；70~80%左右乙醇沉淀的物质，改用丙酮时

浓度可减少 20% 左右, 即用 50~60% 的丙酮。乙醇在生化药物制备中使用最普遍, 甲醇引起蛋白质变性的可能性比乙醇小。

(二) 加入溶剂体积的计算

需加入有机溶剂的体积 X , 可按下式计算:

$$X = V \frac{S_2 - S_1}{100 - S_2}$$

式中: V = 原溶液的体积;

S_1 = 原溶液中有机溶剂的浓度 (体积百分浓度, 100% 时以 100 计);

S_2 = 需要的有机溶剂的浓度 (体积百分浓度)。

如果所使用的有机溶剂不是 100%, 而是 95%, 则公式中的 100 改为 95, 其他溶剂浓度类推。

按上式计算, 未考虑两液体混溶引起体积的变化, 实际上等体积的乙醇和水混溶, 体积可能减小到为两者体积之和的 95%。所以按计算加入的体积, 一般比实际所需的略为偏高。如果要求精确, 则可以摩尔为单位来说明和计算。有时也可按加入的体积计而不提出百分浓度数, 例如可按加入多少倍乙醇即可。

在分级沉淀中, 第一次沉淀时, 有机溶剂加完后, 应继续搅拌一定时间。已析出的沉淀如有变性可能应及时分离, 并迅速用水或缓冲溶液溶解, 使有机溶剂稀释。母液再继续加有机溶剂到预定的另一浓度, 以沉淀另一部分溶质。

(三) 温度的控制

有机溶剂沉淀的操作过程宜在低温进行, 而且最好在同一温度下进行, 才能保证工艺的稳定。如果沉淀放置与分离时温度改变, 会引起已沉淀的物质溶解或另一些物质沉淀。这对分离要求高的产品的提纯是不利的。还可以利用不同温度下有机溶剂的分级沉淀, 分离不同物质。

加入的有机溶剂温度要预冷到比操作温度更低, 因乙醇等有机溶剂与水混溶时要放热。在加入有机溶剂时搅拌要均匀, 速度要适当, 可避免局部浓度过高而导致蛋白质或酶的变性, 也可避免局部温度过高而产生的类似影响。

(四) 离子强度和 pH 值的影响

离子强度在有机溶剂和水的混合液中是一个特别重要的因素。有时, 当离子强度很小时, 物质不能沉淀, 如补加少量电解质即可解决。一般可用醋酸铵、醋酸钠或氯化钠等, 以在溶剂中能溶解且不影响提取药物的质量为原则进行选用。

当盐的离子强度达到一定程度的大小时, 能增加蛋白质或酶在有机溶剂中的溶解度。盐的浓度太大 (如 0.1~0.2M 以上), 就要用更多的有机溶剂来进行沉淀, 并可能使盐在加入有机溶剂后部分析出。一般认为离子强度在 0.05 或稍低为好, 既能使沉淀迅速形成, 又能对蛋白质或酶起一定的保护作用, 防止变性。由盐析法沉淀制得的蛋白质或酶, 再用有机溶剂沉淀法进一步精制时, 往往事先须经过除盐。

pH 值影响蛋白质等在有机溶剂中的溶解度。蛋白质等的分级沉淀更应严格控制 pH。为了防止蛋白质之间的相互作用, 选择 pH 应使大部分蛋白质带有相同的净电荷。用 0.01~0.05M 缓冲液来控制蛋白质溶液的 pH, 可以使有机溶剂沉淀达到较好效果。

一种盐对不同蛋白质可有不同的影响, 可以利用这一点进行沉淀分离。进一步更能