

生化制药学

林元藻 王凤山 王转花 主编
张天民 主审

人民卫生出版社

生化制药学

主编 林元藻 王凤山 王转花

主审 张天民

编者 (以姓氏笔画为序)

王凤山 王转花 刘晓辉

杨 红 张天民 陆幸妍

陈耕夫 林元藻 姬胜利

人民卫生出版社

图书在版编目(CIP)数据

生化制药学/林元藻等主编. —北京:人民卫生出版社,1998

ISBN 7-117-02893-9

I. 生… II. 林… III. 药物-生产工艺 IV. TQ460.6

中国版本图书馆CIP数据核字(98)第02716号

生化制药学

主编 林元藻 等

人民卫生出版社出版发行
(100078 北京市丰台区方庄芳群园3区3号楼)

机械工业出版社京丰印刷厂印刷

新华书店经销

787×1092 16开本 27 $\frac{3}{4}$ 印张 648千字
1998年6月第1版 1998年6月第1版第1次印刷
印数: 00 001—3 000
ISBN 7-117-02893-9/R·2894 定价: 35.50元
(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

前 言

生化制药学是一门以生化药物为研究对象的工艺学。随着现代生物技术的迅速发展,许多具有独特药理作用和治疗效果的生化药物被研制和开发利用,使生化制药学在制药领域发挥着越来越重要的作用,在技术上成为制药工业的一个独立体系。

目前,生化药物已从传统的由生物体提取发展到用先进生化分离技术和现代生物技术制备,品种也从天然结构的活性分子向其衍生物或类似物发展。为促进生化药物的研究和开发,加强理论与实践的联系,系统总结生化制药的成果与经验,探讨其发展趋势,我们编写了这本《生化制药学》。

本书共分十章。首先介绍了生化制药学的研究内容、生化药物的概念、现状及其发展趋势,生化药物在医药工业中的地位,生化制药的基本技术。然后比较系统地分章论述了氨基酸类药物、多肽与蛋白质类药物、核酸类药物、酶类药物、多糖类药物、脂质类药物、动物器官或组织提取制剂的化学组成与性质、生产工艺、检验方法、药理作用与临床应用。对当前比较重要和成熟的基因工程药物也做了较为系统的阐述。本书内容力求体现科学性、先进性和实用性。对所选生化药物注意其代表性和重要性,对制备工艺本着科学性、准确性及在工业生产中有可操作性的原则予以收载,有些制备工艺是编者多年的实践积累。对药品的质量、检验力求按相应品种的最新标准编写,同时对其药理作用与临床应用也给予客观扼要的介绍。

本书可作为大专院校生化制药及相关专业教材,并供有关科研工作者及生产技术人员参考。

本书在编写过程中,承蒙山西大学袁静明教授和广东药学院赖慕贤教授对部分章节提出改进意见,特此致谢。

本书虽数易其稿,但仍可能有疏漏或不足之处,诚望读者在使用本书时多提宝贵意见,使其日臻完善,则作者不胜感谢。

编 者

1997年10月

目 录

第一章 绪论	(1)
第一节 生化制药学的研究内容	(1)
第二节 生化药物的现状及其发展趋势	(1)
第三节 生化药物在我国医药工业中的地位.....	(3)
第二章 生化制药的基本技术	(5)
第一节 原料的选择和处理以及有效成分的提取	(6)
第二节 盐析法	(10)
第三节 有机溶剂分级沉淀法	(13)
第四节 等电点沉淀法	(16)
第五节 膜分离法	(16)
第六节 结晶和再结晶作用	(22)
第七节 吸附法	(24)
第八节 离子交换层析	(32)
第九节 凝胶层析	(41)
第十节 亲和层析	(52)
第十一节 离心技术.....	(58)
第三章 氨基酸类药物	(63)
第一节 概述	(63)
第二节 氨基酸类药物的一般制备方法	(65)
第三节 胱氨酸	(68)
第四节 半胱氨酸	(70)
第五节 蛋氨酸	(72)
第六节 精氨酸	(75)
第七节 赖氨酸	(77)
第八节 天冬氨酸	(79)
第九节 苏氨酸	(81)
第十节 亮氨酸	(83)
第十一节 异亮氨酸.....	(85)
第十二节 水解蛋白.....	(87)

第十三节	氨基酸输液	(91)
第四章	多肽和蛋白质类药物	(97)
第一节	概述	(97)
第二节	多肽和蛋白质分离纯化的一般方法	(101)
第三节	胸腺素	(107)
第四节	缩宫素	(109)
第五节	胰蛋白酶抑制剂	(111)
第六节	杀菌肽	(115)
第七节	胰岛素	(116)
第八节	胃膜素	(121)
第九节	明胶	(123)
第十节	绒促性素	(126)
第五章	核酸类药物	(130)
第一节	概述	(130)
第二节	核酸类药物的一般制备方法	(132)
第三节	6-氨基嘌呤	(138)
第四节	6-巯基嘌呤	(142)
第五节	肌苷	(144)
第六节	阿糖胞苷与环胞苷	(146)
第七节	阿糖腺苷	(150)
第八节	叠氮胸苷	(152)
第九节	三氮唑核苷	(153)
第十节	腺嘌呤核苷三磷酸	(156)
第十一节	胞嘧啶核苷三磷酸	(162)
第十二节	鸟嘌呤核苷三磷酸	(163)
第十三节	免疫核糖核酸	(164)
第十四节	聚肌胞	(168)
第十五节	转移因子	(171)
第十六节	胞二磷胆碱	(173)
第十七节	双丁酰环磷酸腺苷	(175)
第十八节	辅酶 A	(178)
第六章	酶类药物	(183)
第一节	概述	(183)

第二节	酶类药物的一般制备方法	(186)
第三节	胰酶	(191)
第四节	胃蛋白酶	(195)
第五节	胰蛋白酶	(199)
第六节	糜蛋白酶	(203)
第七节	超氧化物歧化酶	(207)
第八节	玻璃酸酶	(211)
第九节	溶菌酶	(215)
第十节	细胞色素 C	(219)
第十一节	尿酸酶	(223)
第十二节	降纤酶	(227)
第十三节	弹性蛋白酶	(231)
第十四节	激肽释放酶	(233)
第十五节	凝血酶	(237)
第七章	多糖类药物	(241)
第一节	概述	(241)
第二节	粘多糖的化学和一般分离纯化方法	(243)
第三节	壳多糖和脱乙酰壳多糖	(249)
第四节	玻璃酸	(252)
第五节	硫酸软骨素	(257)
第六节	肝素	(261)
第七节	低分子肝素	(266)
第八节	冠心舒	(270)
第八章	脂质类药物	(274)
第一节	概述	(274)
第二节	胆汁酸的化学	(276)
第三节	鹅去氧胆酸	(279)
第四节	熊去氧胆酸	(281)
第五节	去氢胆酸	(284)
第六节	人工牛黄	(286)
第七节	磷脂	(293)
第八节	前列腺素	(298)
第九节	鱼油多不饱和脂肪酸	(303)
第十节	辅酶 Q ₁₀	(307)

第九章 动物器官或组织提取制剂	(313)
第一节 概述	(313)
第二节 肝制剂	(315)
第三节 脑制剂	(323)
第四节 眼制剂	(327)
第五节 骨制剂	(334)
第六节 鹿茸制剂	(337)
第七节 蹄甲制剂	(339)
第八节 胎盘制剂	(343)
第十章 现代生物技术药物	(347)
第一节 概述	(347)
第二节 基因克隆和表达的基本步骤	(349)
第三节 提高真核基因在大肠杆菌中表达效率的方法	(355)
第四节 非大肠杆菌基因工程系统	(358)
第五节 工程菌或细胞的培养和预处理	(366)
第六节 基因工程产物的纯化工艺设计	(373)
第七节 人胰岛素	(378)
第八节 人生长激素	(382)
第九节 干扰素	(386)
第十节 白介素	(397)
第十一节 红细胞生成素	(409)
第十二节 集落刺激因子	(412)
第十三节 组织纤溶酶原激活剂	(415)
第十四节 肿瘤坏死因子	(419)
第十五节 人表皮生长因子	(422)
第十六节 成纤维细胞生长因子	(425)
第十七节 胰岛素样生长因子	(427)
第十八节 人神经营养因子	(432)

第一章 绪 论

第一节 生化制药学的研究内容

生化药物(biochemical drug)是从生物体分离纯化所得,用于预防、治疗和诊断疾病的生化基本物质,以及用化学合成、微生物合成或现代生物技术制得的这类物质。生化药物有两个基本特点:其一,它来自生物体;其二,它是生物体中的基本生化成分。这是生化药物定义的基本依据。作为生化药物的生化基本物质,主要是氨基酸、肽、蛋白质、酶及辅酶、多糖、脂质、核酸及其降解产物。这些成分均具有生物活性或生理功能。

由于各学科的发展、交叉和渗透,并受习惯的影响,药物的分类没有也不可能有严格的界限。生化药物来源于生物体,即来自动物、植物和微生物,但生化药物不包括抗生素,不包括疫苗、菌苗、类毒素、抗毒素等生物制品(biological product),也不包括从植物中提取、纯化所得的一些物质如生物碱、一些有机酸等,从中药提取的生物活性物质,习惯上仍多属中药的范围。

来自生物体的生化基本物质,有的能用化学合成制取,如缩宫素等;有的能用微生物合成制得,如辅酶 A 等;有的能用现代生物技术生产,如重组人胰岛素等,都可属生化药物的范围。还可通过半合成的方法,制得生化基本物质的衍生物或类似物,如化学修饰的药用酶等,一般也属生化药物。

现代生物技术是一种手段,可用于各类药物的研制,如采用深层发酵技术研制中药冬虫夏草,细胞培养生产黄连素,基因工程生产乙型肝炎病毒疫苗等生物制品及人生长激素等生化药物。生化药物的重要发展方向之一,即利用现代生物技术进行研究和开发。

随着药物研制的发展,对药物的分类也会有所调整和补充。例如:随着现代生物技术用于药物的生产日趋增多,可将这类产品称为生物工程药物(biotechnology drug);作为现代生物技术主体的基因工程,用以生产的药物可称为基因工程药物。

所谓生物药物(biopharmaceutics)则包括生化药物和生物制品。

《生化制药学》的主要研究内容是生化制药的工艺学,它涉及生化药物的来源、结构、性质、制造原理、工艺过程、操作技术和质量控制,并对生化药物的药理作用和临床应用作简单介绍。

第二节 生化药物的现状及其发展趋势

我国的生化制药,经历了几个发展阶段。解放前,生化药物品种很少,几乎全靠进

11. 新中国成立后, 国家重视了生化药物生产。50 年代中后期, 作为生猪综合利用, 以猪脏器为原料大量生产蛋白质类、酶类和肝制剂等初级产品, 一般称脏器生化制药。70 年代后期以来, 我国生化制药工业进入新的发展阶段。生产的品种多是用现代生化技术提取纯化、有效成分清楚、疗效确切的药品, 其生产所使用的原料已远远超越了脏器的范围。随着技术的发展, 生化制药的产品更具特色: 有的高效, 适于急救; 有的副作用小可长期使用, 适合于疾病的预防和辅助治疗; 有的成本低廉, 使用方便, 有利推广。

一、现状

中国药典 1995 年版收载的生化药物有抑肽酶、谷氨酸、肝素钠、明胶、细胞色素 C、玻璃酸酶、胰酶、熊去氧胆酸、缩宫素、绒膜促性激素、糜蛋白酶、去氢胆酸、甘氨酸、丝氨酸、异亮氨酸、尿激酶、胃蛋白酶、亮氨酸、盐酸赖氨酸、鹅去氧胆酸、缬氨酸和凝血酶等 30 余个品种。1989 年卫生部颁布的生化药物标准有三磷酸腺苷二钠、肌苷、肝素钙、胃膜素、盐酸精氨酸、弹性酶、辅酶 A、辅酶 Q₁₀、硫酸软骨素、溶菌酶、糜蛋白酶等。还有一些卫生部分别批准的生化药物, 如新一代人工牛黄、蛇毒中提取的蛋白水解酶——降纤酶、眼科和骨科用药玻璃酸钠、对胶原蛋白有特异水解作用的酶——胶原酶、由蚯蚓中提取的抗栓酶——蚓激酶、对肝细胞生长有促进作用的促肝细胞生长素、用于脑血管疾病的脑活素国内同类型产品等。另外, 还有多种地方标准的生化药物将上升为卫生部标准, 再评价的工作正在进行。对原料药和单方制剂, 主要组分清楚, 疗效确切, 临床常用, 安全有效, 生产正常, 质量稳定, 质量标准可控或可提高者, 即可能上部标准。对复方制剂, 处方的依据应合理, 疗效、安全性、生产、稳定性、标准等要求同单方制剂。不符合上述条件的一些地方标准生化药物, 将停止生产。

中国药典 2000 年版收载的生化药物将在 1995 年版的基础上, 进一步改进和提高标准的内在质量, 争取做到: 形成以国家标准为主体的标准体系, 将我国安全有效、临床常用、标准完善且稳定生产的药物尽量收入; 标准的主要方面达到发达国家水平, 部分品种标准具有本国特色。对现行版药典中的一些疗效不明确, 临床少用或多年不生产的品种, 将进行调整和删除。将结合地方标准品种再评价及升部标准工作, 选出好的品种作为新增品种的来源之一。新药转正品种中, 特别是一类新药, 有可能进入药典。通过进一步加强现行部标准的提高工作, 可争取更多的品种收入药典。综上所述, 通过质量标准的不断提高, 以国家药典为主, 部颁标准为辅, 是发展的趋势。因此, 提高生化药物的质量以进入国家药典或部颁标准是目前面临的主要问题之一。

二、发展趋势

传统的从动物的脏器、组织、体液等制取生化药物在过去和现在均占主导地位, 在将来相当长的时间内仍是研究开发的主要方面。但随着现代生物技术的研究与应用日趋成熟, 生物技术在生化制药领域将发挥越来越重要的作用, 其发展趋势主要表现在以下几个方面:

(1) 制取天然来源少、过去难以获得的生物活性物质: 目前已发现的蛋白质-多肽类激素有 50 多种, 细胞因子 100 多种, 许多都是机体调控代谢和生理功能的重要物质, 但有些因来源困难以致无法作为药物使用。应用基因工程技术, 可以解决这个问题。近 10

年来,利用基因工程表达的医药产品已达 150 多种,其中已有数十种具有生产的可能性,有的正在生产。

(2) 发展蛋白质工程药物:广义地说,天然存在的生化药物都可以认为是新药的先导化合物。人类根据其对物质结构与功能关系的了解,借助电子计算机学的发展,将分子生物学、基础医药学、药物化学、药理学等知识综合起来,进行新型药物的电子计算机辅助分子设计,就能制成以万计的新化合物,定向进行筛选,将大大提高新药研制成功的机率。

在发展蛋白质工程药物方面,已成功地完成了许多工作。如白介素-2,由于其 125 位的半胱氨酸,有可能与其它半胱氨酸形成不必要的二硫键,而产生异构体和聚合体,从而降低了纯度,增大了副作用。将 125 位的半胱氨酸以丝氨酸取代,则成为一种新型的白介素-2,其生物活性、稳定性等都比原白介素-2 要好,临床应用副作用小,可较大剂量使用,增强了疗效。组织纤溶酶原激活剂分子中的一个半胱氨酸改换为丝氨酸后,半衰期延长数倍,已用于临床。

人类大约有 10 万个基因序列将于 2005 年左右被基本阐明,其中约 10% 有可能用作蛋白质类药物的开发,在这个基础上又能产生许多新的化合物。

(3) 大分子物质片断的制取和化学修饰:大分子蛋白质在临床应用上往往受限,而其生物活性并非整个大分子所必需,取其具有活性的片断和化学修饰的工作已在进行并将得到进一步发展。

尿激酶原缺其 N 端 143 个氨基酸后的低分子衍生物,其溶栓能力与尿激酶原相同,但副作用较低,活性受抑制少。将粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 N 端 1~11 位氨基酸删除,其生物活性有明显提高,受体亲和活性增强。

将两种物质的有效片段结合在一起以改善其作用,也是一种可取的方法。组织纤溶酶原激活剂与尿激酶原分子上不同的功能域通过基因重组技术结合在一起,半衰期延长约 10 倍,溶栓能力提高数倍。

酶的活性片段的制取,是目前酶研究中的一个重要方向。在酶的化学修饰方面,如聚乙二醇、脂肪酸类、糖类修饰超氧化物歧化酶已进入实用阶段,修饰后的酶在稳定性、半衰期和免疫原性等方面得到改善。

(4) 发展大分子药物的制剂:现代生物技术的发展,使大分子蛋白质、多肽、多糖等类药物以较快的速度进入新药的行列,发展更好的剂型是目前很需要加强的一项工作。对大分子药物的各种剂型,除注射剂外,还有粘膜吸收、透皮给药、脂质体、气雾剂等,包括不同情况的控释系统,大分子药物的稳定剂、促透剂、吸收促进剂等都有待于深入研究。

第三节 生化药物在我国医药工业中的地位

我国生化制药工业自 50 年代建立以来,尤其在近几年,得到了快速发展,取得了显著的成绩,主要表现在以下几个方面:

(1) 生产迅速增长:生化制药工业经历了从粗加工到精加工,从加工原料到制剂生产,在生产管理、质量监督、科学技术、人才培养等方面逐步形成相对独立的体系,已

成为我国的一大制药行业。生化制药业 1995 年总产值比 1994 年增长 32.4%，在医药行业中是增长最快的一部分。目前胰岛素最高年产量比 1990 年增长 42%，肝素钠、细胞色素 C 和人工牛黄等也大幅度增长。

(2) 生产技术不断提高：我国的生化制药企业大都起步较晚，基础较差。近年来，生化制药企业在技术改造方面加强了力度，改造了数十个企业的注射剂或片剂车间，更新了关键性设备。同时，还新建了一批较高水平的生化制药企业，使整个行业的面貌有了大的改观，生化药物生产技术迈上了个新台阶，为进一步发展打下了较好的基础。

(3) 产品结构逐步优化，质量不断提高：过去多年来，我国生化制药曾停留在对天然资源的综合利用上，生产的药物品种不够多，其质量标准水平较低。近十年来，加强了科研工作，成功地开发出了一批新的生化药物，使生化药物结构发生了质的变化。同时，对于一批疗效确切但质量标准低的产品，通过整顿，提高了质量标准和临床疗效，增强了竞争能力。例如尿激酶，由于提高了质量，不仅不由国外大量进口，已向国外出口；降纤酶的质量标准也达到国际先进水平；人工牛黄制定了新的标准，更为接近天然牛黄的成分，疗效有了提高。总之，生化药物的结构与质量标准已开始向国际化发展，不断提高竞争能力，创造更大的经济效益和社会效益。

(4) 产业结构改变，规模经济占主导地位：生化制药企业最初多为附属厂，随着经济改革的深化，市场经济的建立，生化制药产业的结构也在不断变化。原来的附属厂已有相当一部分独立出来，得到较快的发展。同时，出现了一批合资生化制药企业。80 年代只有少数几家产值较高的企业，而现在 30% 以上的企业产值较高，这 30% 的企业产值占全行业总产值的 50% 以上，充分发挥了规模经济的优势，占了主导地位。实现规模效益是生化制药厂的发展方向。

几年来，我国生化制药行业虽然得到了很大的发展，但其总体水平还是比较低的，还有不少问题，宏观调控乏力，低水平重复严重，部分企业设备水平低，技术改造任务艰巨等，这些都困扰着生化制药行业的进一步发展。

生化制药是医药产业的重要组成部分，与其它医药产业同样担负着保护人民健康、保护生产力的责任，需要更好更快地发展。面向 21 世纪，对生化制药产业来说，面临着很好的发展机遇。生化药物在儿童发育和老年人的保健中将发挥更重要的作用，在国内、国际市场上都有广阔的前景，一定会有更大的发展。

参 考 文 献

1. 张天民等. 中国生化药物杂志, 1995, 16(5): 240
2. 吴文俊等. 药物生物技术, 1997, 增刊: 149
3. 储上官. 中国生化药物杂志, 1996, 17(5): 226

(山东医科大学 张天民)

第二章 生化制药的基本技术

生化制药是将动物、植物或微生物机体内的生物活性物质在使其结构和功能不遭破坏的前提下,采用多种生化分离方法提取、纯化的工艺过程。它涉及物理、化学、生物学等多种学科的基本原理和技术手段,随着人们对许多生物活性物质如蛋白质、酶、核酸等在机体内功能的不断认识,促进了生化分离技术的更新和发展。生化分离技术可分为生化分离分析和生化分离制备两个方面,前者主要对生物体内各组分分离后加以定性、定量分析,它不一定把某组分从混合物中分离出来,而后者则主要是为了获得生物体内某一单纯组分。

在生化制药工作中,从不同的原料制备纯度较高和活性较强的大分子目的物一般包括六个阶段:①原料的选择和预处理;②组织及细胞的破碎;③从破碎细胞中提取有效成份,制成粗品;④采用多种生化技术从粗品中将目的物精制出来;⑤干燥及保存;⑥制剂。

以上各阶段在不同的生化药物制备中,根据所选材料的不同,可灵活取舍选择使用,如从发酵液中分离胞外酶,则可省去细胞破碎步骤,离心过滤去菌体后,直接进行分离纯化即可。分离、纯化是生化制药过程中相当复杂和重要的环节。对于异类物质,如欲提纯核酸类物质时混杂有蛋白质和多糖,提纯蛋白质和酶时混杂有核酸,往往用专一性的酶降解、有机溶剂提取等方法便可除去;小分子物质的干扰可通过液相与固相的相互转化在制备过程中除去。而对于同类物质,如酶和杂蛋白、RNA 和 DNA 等结构类似、性质相差较小的活性大分子而言,分离纯化更加复杂,通常需几种方法结合进行,方可达到预期的目的。目前用于生化药物分离纯化的方法很多,根据各技术的作用原理可概括为五类:

- (1) 根据分子大小和形状不同进行分离,如凝胶过滤法、透析和超滤法、密度梯度离心法等。
- (2) 根据分子的带电性质进行分离,如离子交换层析法、电泳法、等电聚焦法。
- (3) 根据分子极性大小及溶解度不同进行分离,如等电点沉淀法、盐析法、有机溶剂沉淀法、逆流分配法等。
- (4) 根据配体特异性进行分离,如亲和层析法。
- (5) 根据物质吸附性质不同进行分离,如选择性吸附和吸附层析法。

生物物质的分离大都在液相中进行,分离中使用较多的各种层析、电泳、超滤、盐析、有机溶剂沉淀等方法主要是根据物质的带电状态、分子大小、溶解度等原理而设计的。每一种方法均要求在特定的条件下发挥作用,因此在相同或相似条件下应避免连续使用同一种方法,而应注意各种方法的交叉使用,这样对于除去大量理化性质相近的杂质较为有利。如纯化某一两性物质时,前一步已利用了该物质的阴离子性质,使用了阴离子层析法,下一步提纯时则应选用阳离子层析法或电泳分离,便可取得较好的分离效

果。另外，在安排纯化方法顺序时，还应考虑到有利于减少工序，提高效率。如在盐析后采用吸附法，必然因离子过多而影响吸附效果，如再增加透析除盐，则又使操作复杂化。如倒过来先吸附后盐析，吸附洗脱时的含盐洗脱液即可直接进行脱盐，这样不仅使操作过程简化，而且也比较合理。有关各类生化药物的制备过程及纯化各步骤的交叉组合、优劣评价将在本书各章、节中介绍，这里不再赘述。

第一节 原料的选择和处理以及有效成分的提取

一、原料的选择和预处理

用于生化制药的原材料应根据实验和生产目的来选择。从工业生产角度上考虑，一般应注意以下几个方面：①材料来源丰富，有效成分含量较高；②制备工艺简单易行，难于分离的杂质较少；③成本低，经济效益较好。

当然，以上几个方面的条件很难同时具备，有时材料来源丰富但有效成分的含量不高，或者材料来源、含量都很理想，但材料中杂质太多，难以通过几步分离方法除去，以致影响了产品的质量和收率。工业规模生产上，首先要考虑的是工艺简化，提高效率，因此当含量和来源都比较理想，但分离纯化过程繁琐时，一般选择含量略低的原料，控制适当的操作，则容易得到纯品。只要根据具体情况，抓住主要矛盾决定取舍，全面分析，综合考虑，便可达到预期的目的。

选材时，根据目的物的分布，除选择富含有效成分的生物品种外，还应注意植物的季节性、微生物的生长期和动物的生理状态之间的差异。在微生物生长对数期，酶和核酸含量较高，可获得高产量；提取胸腺素应选用幼年动物胸腺为原料；提取胃蛋白酶只能选用胃为原料；制备肝素，应以猪的肠粘膜为原料。另外动物的营养状况、产地等对有效成分的含量也有影响。因此，生物材料所含的生化药物和分布情况并不是一成不变的，实验和生产中必须因时因地和分离纯化的目的要求而具体解决。应在前人工作的基础上，不断总结和积累自己的实践经验，选择合适的材料，保证后续步骤的成功。

材料选定之后，通常要进行预处理。动物组织先要剔除结缔组织包括脂肪组织等非活性部分，并立即速冻，以避免腐败、变质及微生物污染；胆汁由胆囊剥离出后不可在空气中久置，以防止胆红素氧化；酶原提取要及时，防止酶原激活转变为酶；植物种子应先行去壳除脂；微生物需将菌体和发酵液分离。总之，从不同的分离目的出发，一旦采集到新鲜的材料后，常应立即进行提取。如不能马上提取，则应选择速冻、冻干、有机溶剂脱水、制成“丙酮粉”或浸入丙酮或甘油中保存，防止有效成分降解、失活。

二、组织细胞的破碎及其碎片的分离

组织和细胞破碎的方法很多，有机械法、物理因素法、化学法和酶解法等。生产中应根据实际条件、材料性质和产品要求进行选择。

(一) 机械法

主要通过机械力的作用使组织和细胞破碎如动物组织、植物种子、叶片等材料可选用组织捣碎机(10000r/min)、匀浆器等将其破碎，工业上对于上述材料常用的有胶体磨、

球磨机、粉碎机、绞肉机、击碎机等。这些粉碎设备有的由于旋转刀片的机械切力很大，在制备一些大分子药物如核酸时则很少使用，而多用各种类型的压榨器和匀浆器，在高压下使细胞通过小孔隙而被挤碎，尤其在微生物发酵工业上多用此类细胞破碎器。

(二) 物理因素法

在生化制药中，通过各种物理因素也可使组织细胞破碎。

1. 反复冻融法 将样品在 -15°C 以下冻结，使之凝固，再缓慢地融化，如此反复操作可使大部分细胞破碎。此法多用于动物性材料。

2. 超声波处理法 超声波处理法是利用一个能产生高频电流的发生器和把电磁振荡转换成机械振动的换能器所组成的超声波发生器，通过超声波在液体中传播时产生的巨大拉力使细胞破碎的过程。破碎的效果与待分离物质的浓度、使用的频率有关。如利用大肠杆菌制备各种酶时，菌体的浓度常控制在每毫升 $50\sim 100\text{mg}$ ，在 $1\text{kHz}\sim 10\text{kHz}$ 频率下处理 $10\sim 15\text{min}$ 即可。此法多用于微生物材料，处理的时间、频率、样品浓度应视具体情况而定。处理过程中应配备冷却装置，以防温度升高对所提取的活性大分子如核酸、酶等造成破坏。

3. 渗透压冲击法 将细胞在高渗溶液(如较浓蔗糖溶液)平衡一段时间后，迅速转入到水、稀盐溶液或稀缓冲液中，细胞会因渗透压的突然改变而破碎。如从大肠杆菌中制备一些亲水性酶和蛋白质时，常利用这种渗透压的冲击作用，促使细胞破碎，从而使细胞内含物释放。如果将细胞直接投入低渗溶液(如水、稀盐溶液等)，也可因溶剂分子的大量渗入细胞而引起膜的膨胀破裂。如从血红细胞中提取超氧化物歧化酶等产品时，可采用低渗溶液冲击细胞，从而使膜胀破。此法适用范围较窄，仅对细胞壁比较脆弱的样品适用。

(三) 化学及酶解法

1. 表面活性剂处理法 常用的表面活性剂有十二烷基硫酸钠、氯化十二烷基吡啶、胆酸盐等，利用这些化学物质作用于待分离的样品，均可使细胞破碎，释放出内容物。

2. 自溶法 自溶法是动物组织或微生物细胞在存放过程中，利用自身的酶系将细胞破坏，内容物释放的酶解过程。自溶时的温度对于不同的材料有所不同，动物材料一般在 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ ，微生物材料则多在室温下进行。另外考虑自溶时间一般较长，常常应加入少量防腐剂如甲苯、氯仿等。

3. 加酶促进法 此法是在细胞悬浮液中加入各种水解酶如溶菌酶、纤维素酶、脂肪酶、核酸酶、透明质酸酶等专一性地将细胞壁酶解，内容物释放。如提取与脂质结合的膜蛋白或膜酶时，常加胰脂肪酶水解甘油单酯、二酯和三酯，制备大分子核酸类药物时也常采用酶促破壁法。

破碎后的细胞其目的物常分布在不同的细胞器上，如DNA几乎全部集中在细胞核内，RNA则大部分分布于细胞质，各种酶和蛋白质在细胞内的分布也各不相同。因此，细胞破碎后，需将细胞内各组分先行分离，常用的方法之一是差速离心，即选择适当的离心介质如蔗糖、聚蔗糖等，与破碎后的细胞一起进行差速离心，利用细胞各组分质量的大小不同，沉降于离心管内不同区域，分离后即得所需要组分。此法对于制备一些难度较大要求纯度较高的生物大分子，尤其是用于分子生物学、分子遗传学等学科中的各类核酸和特异性蛋白质的制备中是相当重要的手段之一。另外也可采用两水相萃取法，选

择适当的溶剂和条件，使细胞碎片集中在下相中，而得到分离，两水相萃取法主要应用于胞内酶的提取。

三、提取

提取是指目的物由固相转入液相、由液相转入另一液相或从细胞内生理状态转入外界特定溶液环境的过程。常用的提取法有固-液萃取和液-液萃取，后者也称抽提。提取、萃取和抽提的英文均可用 extraction 表示，其含义基本相同。但习惯上，提取多指分离纯化前期，如被提取物从破碎的细胞中释放出来的过程等，而抽提则贯穿于分离纯化整个过程中。在生化制药中，提取是分离纯化的开始，将经过处理如被破碎了的细胞选择合适的溶剂，在一定的条件下，使目的物充分的释放出来。提取的效果主要取决于被提取物在溶剂中的溶解度大小，其次，选择提取的条件对被分离提取物的稳定性等也应考虑。

(一) 提取用溶剂的选择

一种物质溶解度的大小与溶质和溶剂的性质均有关，常常是溶质-溶质、溶质-溶剂、溶剂-溶剂三个相互作用力综合平衡的结果。根据生化制药的目的不同，对溶剂的选择常考虑以下两个方面，一是选择对目的物溶解度大而对杂质溶解度小的溶剂，使被提取物从混合组分中有选择地分离出来；另一是选择一种对目的物溶解度小而对杂质溶解度大的溶剂，使目的物沉淀或结晶析出。无论是使目的物有选择地溶解或有选择的沉淀均可达到与杂质分离的目的。对于一已知生物分子，其在某一溶剂中的溶解度，可查阅有关资料或手册，而对于一个未知物质，只能根据物质溶解的一般规律进行预试验，最后确定其溶解度。实际中常用的提取溶剂有水、稀盐、稀酸、稀碱或不同比例的有机溶剂，如乙醇、丙酮、氯仿、乙醚等。

一些常用溶剂的沸点、介电常数及溶解度以介电常数为序列于表 2-1 中。

表 2-1 一些常用溶剂的性质

溶剂名称	沸点(°C)	介电常数	溶解度(20~25°C)	
			溶剂在水中(%)	水在溶剂中(%)
石油醚	36~65	1.80	几乎不溶	几乎不溶
己烷	96	1.88	0.00095	0.0111
环己烷	81	2.02	0.010	0.0055
二氧六环	101	2.21	任意混溶	任意混溶
四氯化碳	77	2.24	0.077	0.01
苯	80	2.29	0.178	0.063
甲苯	110	2.37	0.1515	0.0334
间二甲苯	139	2.38	0.0196	0.0402
二硫化碳	46	2.46	0.294	<0.005
乙醚	35	4.34	6.04	1.468
醋酸戊酯	149	4.75	0.17	1.15
氯仿	61	4.80	0.815	0.072
醋酸乙酯	77	6.02	8.08	2.94
醋酸	118	6.15	任意混溶	任意混溶
苯胺	184	6.89	3.38	4.76
四氢呋喃	66	7.58	任意混溶	任意混溶

续表

溶剂名称	沸点(°C)	介电常数	溶解度(20~25°C)	
			溶剂在水中(%)	水在溶剂中(%)
苯 酚	182	9.78	8.66	28.72
吡 啶	115	12.4	任意混溶	任意混溶
叔 丁 醇	82	12.47	任意混溶	任意混溶
正 戊 醇	138	13.9	2.19	7.41
异 戊 醇	131	14.7	2.67	9.61
仲 丁 醇	100	16.56	12.5	44.1
正 丁 醇	118	17.5	7.45	20.5
异 丙 醇	82	19.92	任意混溶	任意混溶
正 丙 醇	97	20.3	任意混溶	任意混溶
醋 酐	140	20.7	微 溶	微 溶
丙 酮	56	20.7	任意混溶	任意混溶
乙 醇	78	24.6	任意混溶	任意混溶
甲 醇	65	32.7	任意混溶	任意混溶
二甲基甲酰胺	153	36.7	任意混溶	任意混溶
乙 腈	82	37.5	任意混溶	任意混溶
乙 二 醇	197	37.7	任意混溶	任意混溶
二甲亚砜	189	46.68	25.3	25.3
甲 酸	101	58.5	任意混溶	任意混溶
水	100	81		
甲 酰 胺	211	111	任意混溶	任意混溶

(二) 影响提取物溶解度的因素

1. 离子强度 离子强度是影响物质溶解度主要因素之一,有些物质在高离子强度下在水中的溶解度增加,如DNA-蛋白结合物,另一些物质在低离子强度下溶解度增加,而在高离子强度下溶解度反而减小,如RNA-蛋白结合物。大多数酶和球蛋白,在低离子强度下溶解度都较高,如蛋白质的“盐溶”就是由于在纯水中加入少量正盐后,减少了偶极溶质分子之间极性基团的静电引力,增加了溶质和溶剂相互作用力的结果。在提取蛋白质和酶类药物时,利用低离子强度溶液不仅可增加该类物质的溶解度,而且还对它们的生物活性具有一定的稳定作用。

2. pH值 对于大多数生物大分子活性物质来讲其分子中都具有可解离的酸性和碱性基团,这些基团在不同的pH下有着不同的解离状态,而在水中和有机溶剂中也有不同的溶解度,故提取时应根据被分离物质的性质,选择适当的pH范围。如蛋白质、核酸、酶等的提取,为了保证其生物活性不受破坏,一般常选择pH6~8的溶液。若从溶解度方面考虑,等电点在酸性范围的大分子,可选用偏碱性溶液提取,等电点在碱性范围时,则选用偏酸性溶液提取。

3. 温度 生物活性物质的提取一般应控制温度在0~10°C,但对一些对热耐受力较高的物质,也可适当提高提取时的温度,如胃蛋白酶等可选择37~50°C提取,使提取物的溶解度随温度的升高而增加,减小溶液的粘度,提取效果常比低温时好。选择提取时