

中药与天然活性产物 分离纯化和制备

杨义芳 主编

0629
3
中醫學院圖書館

中药与天然活性产物 分离纯化和制备

杨义芳 主编



科学出版社

北京

内 容 简 介

从天然产物中高效、快速、准确发现药物先导化合物是“重大新药创制”的关键，活性成分的快速、高通量分离、纯化和大规模化合物样品制备是目前严重制约创新药物发展的瓶颈。本书紧紧围绕这一关键技术，详尽阐述来源于中草药、动植物、微生物和海洋生物等天然产物，在活性评价导向下，快速、高效靶向分离活性产物并快速构建具有化学多样性和结构新颖性的天然产物活性化合物数据库。

全书内容包括天然活性产物分离方法，天然产物的靶向活性筛选，来源于中草药、动植物、微生物及海洋生物的活性次生代谢产物的分离纯化和制备等。每个章节后附有大量的参考文献，供读者进一步深入学习和研究。本书内容新颖，体现了多学科交叉与融合，突出特色、突出理论与实践相结合，对创新药物研发，中草药、动植物、微生物和海洋生物等天然产物的研究具有重要的参考价值。

图书在版编目(CIP)数据

中药与天然活性产物分离纯化和制备 / 杨义芳主编. —北京: 科学出版社, 2011. 9

ISBN 978-7-03-032104-6

I. 中… II. 杨… III. ①天然有机化合物-分离②天然有机化合物-提纯③天然有机化合物-制备 IV. 0629

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 172145 号

责任编辑: 李 植 / 责任校对: 钟 洋

责任印制: 刘士平 / 封面设计: 范璧合

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

双青印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2011年9月第一版 开本: 787×1092 1/16

2011年9月第一次印刷 印张: 75 1/2

印数: 1—1 500 字数: 1 812 000

定价: 248.00 元

如有印装质量问题, 我社负责调换

《中药与天然活性产物分离纯化和制备》

编委会

- 主 编** 杨义芳
- 副主编** 孔德云 萧 伟 赵文杰 郭跃伟
- 编 委** (按姓氏笔画排序)
- 王 晓 山东省分析测试中心
- 王永刚 中山大学
- 王振中 江苏康缘药业股份有限公司
- 孔德云 上海医药工业研究院
- 史作清 南开大学
- 刘海利 中国科学院上海药物研究所
- 张卫东 第二军医大学
- 李 佳 中国科学院上海生命科学研究院新药筛选中心
- 杨义芳 上海医药工业研究院
- 杨念云 南京中医药大学
- 吴晓闻 日本千叶工业大学
- 陈 刚 复旦大学
- 陈道峰 复旦大学
- 罗国安 清华大学
- 赵文杰 上海医药工业研究院
- 郭跃伟 中国科学院上海药物研究所
- 萧 伟 江苏康缘药业股份有限公司
- 魏晓东 上海医药工业研究院

序

21 世纪科学格局发生的深刻变化,将对生物医药科学的发展带来良好的机遇,中医药学学术发展方向则需要调整、变革与创新。所谓格局包括着概念更新、思维模式、理论框架与实践行动。综观系统复杂性科学过程体现科学人文的融合,将非线性不确定性的研究对象作为科学范畴,已成为科技界的共识,它推进了中医中药面向全球现代化的进程。国家“十二五”规划把中医药列为战略性新兴产业,以品种为主线、以企业为主体发展大中药产业。在新一轮经济转型背景下,适应大环境的变迁,服务大卫生的需求,东学西学兼收并蓄,中医西医融通共进,构建与整合统一的医学与药学。特别是中药创新药物的研发需要不断进步,以适应中医药协调发展的需求。从这个理念出发,本书立足于天然活性产物的分离纯化技术,为中药研发共性关键技术和多学科创新中药的发展提供了有益的尝试。

天然活性产物是在动植物、微生物、海洋生物等生物体在其生命活动过程中产生的微量的、对其他生物体具有不同的生理活性作用的代谢物质及其类似物。自然界中天然活性产物资源的多样性和代谢产物的多样性,为发现新药以及先导化合物提供了丰富的来源。结构复杂多变的天然产物是现代药物的重要组成部分和新药发现的源泉,据统计,超过 40%的现代临床药物直接或间接地来源于天然产物。有着上千年临床应用历史的中药,需要现代化与集约化提取活性成分;来源于各种微生物及海洋生物的活性产物更需要提取分离;当今药品安全性的要求越来越高,产品纯度不够和极微量的杂质都可能产生不可预计的后果,分离纯化成为天然活性产物应用的必需过程。

“重大新药创制”要解决的关键问题之一,就是要开发出从天然产物中高效、快速、准确地发现药物先导化合物的方法。然而活性成分的快速分离、纯化和化合物样品的大规模制备是制约天然药物发展的瓶颈技术。其中,活性成分的筛选、生物活性测试和药效评价显得尤为重要。本书重点对这一值得关注的內容展开讨论,阐述来源于中草药、动植物、微生物发酵物和海洋生物等天然产物中,在活性评价导向下,快速分离纯化活性产物的新技术与新方法,并构建具有化学多样性和结构新颖性的天然产物活性化合物数据库。

本书作者以中青年科技工作者为主体,他们主持并承担国家“重大新药创制”科技重大专项“十一五”计划的实施,是在各自研究领域中做出卓越成绩的专家学者。本书围绕发现天然产物先导化合物分离、纯化与制备等关键技术,参考了大量国内外文献,凸显作者在这些领域多年来的研究成果。本书理论与实践相结合,从不同角度阐述探讨分离纯化技术的研究进展及其在天然活性产物中分离纯化中的应用,反映了当前的研究现状和技术发展趋势。出书内容涉及中药化学、天然药物化学、中药学、生物学、分子生物学、微生物学、植物学、药理学及计算机和信息学等多学科,体现了多学科的交叉渗透与融合。本书论点明确,论证清楚,具有较强的参考价值和一定的理论意义。

本书的出版将为国家“重大新药创制”科技重大专项的实施提供一本极有价值的参考

书，将有力推动中药创新药物研究及产业化水平。“我辈岂是蓬蒿人”，尤其值得欣慰的是一支中青年专家学者队伍快速成长，成为中药创制关键技术的领军人物。书灏脱稿邀我写序，在此感谢编撰专家的信任与鼓励。

王永炎
辛卯仲夏

前 言

1981~2006年,美国FDA批准上市的以新分子实体(new molecular entity, NME)为活性成分的全创新药共有1184个,其中小分子药占绝大多数,有974个。这些小分子新药中,超过1/3是直接从天然物纯化而来(如紫杉醇, paclitaxel)或者是天然物的简单类似物(如多西紫杉醇, docetaxel),另有24%是从天然产物结构改良而来。即使是在占总体1/3的全合成药中,几乎所有的化合物都借助了天然物的部分活性结构,由此可见,在创制药物研究过程中天然产物快速、高通量分离、纯化和大规模化合物样品制备,活性成分的筛选与生物活性测试和评价显得尤为重要。

由于合成药的毒副作用和开发的成功率在逐年下降,人们又把创新药研究的目光集中在天然活性产物上。

中药、动植物天然产物研究提供了结构新颖、疗效高、不良反应少的活性物质,已成为制药工业中新药研究的主要源泉之一。海洋资源、微生物、少数民族地区和民间天然资源的研究与开发扩大了新药的来源,为了得到结构新颖的化合物,已有越来越多的人将注意力转向以前较少研究的领域。近年来,随着分离分析技术的进步,许多结构复杂及微量成分获得纯品并确定其化学结构,极大地丰富了天然药物的来源。在成分分离方面,各种现代新技术、新方法的应用,不仅使非极性、小分子的化合物分离速度和分离质量有了大幅度提高,而且使那些长期以来分离纯化难度较大的苷类、鞣质等多酚类及多糖等大分子的水溶性化合物也得到较好的分离。本书以21世纪的国内外大量文献资料为素材,结合我们在这些领域多年积累的研究实践和成果,根据学科发展趋势,从天然产物中高效、快速、准确发现药物先导化合物是“重大新药创制”关键,活性成分的快速、高通量分离、纯化和大规模化合物样品制备是目前严重制约创新药物发展的瓶颈,紧紧围绕这一关键技术,详细阐述来源于中草药、动植物、微生物和海洋等天然产物,在活性评价导向下,高效、快速靶向分离活性产物;并快速构建具有化学多样性和结构新颖性的天然产物活性化合物数据库。

本书共分五篇,第一篇既介绍经典方法,又以大篇幅阐述天然产物分离、纯化和制备新技术、新方法及其进展。第二篇讨论天然产物的靶向活性筛选,为第三、四、五篇天然产物高通量筛选和活性导向分离发现先导化合物提供了方法和手段。全书体现了学科交叉与融合,内容涉及中药化学、天然药物化学与分析、中药学、分子生物学、微生物学、植物学、药理学等多学科。全书突出特色、突出理论与实践相结合,对新技术、新方法的现状、进展、基本原理、技术特点、工艺流程、设备、工艺参数进行论述和评价;同时对各技术存在的问题及应用前景进行了深入的剖析,并对这些技术在中药、动植物资源、微生物资源及海洋生物资源的次生代谢的活性天然产物分离纯化和制备中的应用进行详细阐述,列举了大量的实例。每个章节后附有大量的参考文献,供读者进一步深入学习和研究。

期望本书的出版能为国家“重大新药创制”科技重大专项的实施提供极有价值的参考，并以期有助于突破制约创新药物研究开发的关键技术，加速新药创制的进程，推动创新药物研究开发及提升产业化水平。

由于本人知识水平有限，本书难免有不妥和错误之处，敬请广大读者批评指正。

杨义芳

2010年3月24日

于上海医药工业研究院

目 录

第一篇 天然活性产物分离方法

| | | | |
|---|-----|--------------------------------|-----|
| 第一章 固相析出分离法 | 3 | 技术 | 189 |
| 第一节 盐析沉淀法 | 3 | 第四节 吸附树脂在植物药成分 提取中的应用 | 196 |
| 第二节 有机溶剂沉淀法 | 5 | 第五章 分子印迹分离技术 | 246 |
| 第三节 其他沉淀方法 | 7 | 第六章 色谱分离 | 260 |
| 第四节 沉淀法应用实例 | 9 | 第一节 概述 | 260 |
| 第二章 新型萃取分离技术 | 19 | 第二节 色谱分离理论基础 | 261 |
| 第一节 双水相萃取技术 | 19 | 第三节 吸附色谱 | 263 |
| 第二节 超临界流体萃取 | 29 | 第四节 分配色谱 | 266 |
| 第三节 膜萃取技术 | 141 | 第五节 离心分配色谱 | 266 |
| 第四节 微波辅助萃取技术 | 145 | 第六节 离子交换色谱 | 270 |
| 第五节 超声辅助萃取技术 | 146 | 第七节 凝胶色谱 | 278 |
| 第六节 固相萃取技术 | 147 | 第八节 亲和色谱 | 285 |
| 第七节 快速溶剂萃取技术 | 148 | 第九节 超临界流体色谱 | 290 |
| 第八节 红外辅助萃取技术 | 149 | 第七章 制备色谱 | 307 |
| 第三章 分子蒸馏技术 | 168 | 第一节 薄层色谱 | 307 |
| 第一节 概述 | 168 | 第二节 柱色谱 | 308 |
| 第二节 原理与特点 | 168 | 第三节 压力液相色谱 | 311 |
| 第三节 分子蒸馏流程及装置 | 170 | 第四节 超临界流体制备色谱 | 328 |
| 第四节 分子蒸馏技术在天然产物 提取分离方面的应用实例 | 175 | 第五节 离子交换色谱 | 331 |
| 第五节 分子蒸馏的局限性 | 178 | 第六节 亲和色谱 | 333 |
| 第六节 展望 | 178 | 第七节 疏水作用色谱 | 335 |
| 第四章 吸附分离技术 | 180 | 第八节 共价色谱 | 338 |
| 第一节 概述 | 180 | 第九节 高速逆流色谱 | 339 |
| 第二节 吸附规律 | 185 | 第十节 模拟移动床色谱 | 400 |
| 第三节 吸附分离原理与 | | 第十一节 顶替色谱 | 401 |

| | | | |
|--------------------------------------|-----|---|-----|
| 第十三节 制备型气相色谱 | 404 | 第十一章 泡沫分离技术 | 505 |
| 第十四节 多种色谱方法的联用 | 405 | 第十二章 天然活性成分生物技术制备 方法 | 518 |
| 第八章 膜分离 | 434 | 第一节 微生物发酵 | 518 |
| 第一节 概述 | 434 | 第二节 微生物转化 | 521 |
| 第二节 膜分离技术的基本原理 | 437 | 第三节 基因工程菌表达系统 | 523 |
| 第三节 膜分离过程的操作 | 458 | 第四节 植物组织细胞培养 技术 | 525 |
| 第四节 膜分离技术在中药和天 然产物生产中的应用 | 463 | 第五节 动物细胞培养技术 | 528 |
| 第九章 电泳分离技术 | 473 | 第十三章 结晶和干燥 | 531 |
| 第一节 凝胶电泳 | 473 | 第一节 结晶的基本原理 | 531 |
| 第二节 等电聚焦电泳 | 478 | 第二节 结晶的基本方法 | 537 |
| 第三节 毛细管电泳 | 480 | 第三节 杂质对结晶的影响 | 543 |
| 第四节 制备电泳 | 488 | 第四节 干燥 | 544 |
| 第十章 亲和分离技术 | 493 | 第十四章 高效、快速分离分析及制备 研究 | 550 |
| 第一节 概述 | 493 | 第一节 集成化制备技术研究 | 550 |
| 第二节 亲和超滤 | 495 | 第二节 高速逆流色谱与质谱联用 及其在中药分析中的应用 | 598 |
| 第三节 亲和膜分离 | 498 | | |
| 第四节 亲和沉淀 | 500 | | |
| 第五节 新型亲和分离技术 | 502 | | |

第二篇 中药、动植物资源的分离纯化和制备

| | | | |
|----------------------------|-----|---------------------------|-----|
| 第十五章 醌类化合物 | 627 | 纯化 | 656 |
| 第一节 醌类化合物的结构与 分类 | 627 | 第三节 黄酮类化合物的生物 活性 | 665 |
| 第二节 醌类化合物的分离 纯化 | 630 | 第十七章 苯丙素类 | 679 |
| 第三节 蒽醌类化合物的生物 活性 | 635 | 第一节 香豆素 | 680 |
| 第十六章 黄酮类化合物 | 638 | 第二节 木脂素 | 688 |
| 第一节 黄酮类化合物的结构与 分类 | 638 | 第十八章 萜类和挥发油 | 697 |
| 第二节 黄酮类化合物的分离 纯化 | 656 | 第一节 概述 | 697 |
| | | 第二节 单萜 | 699 |
| | | 第三节 倍半萜 | 703 |
| | | 第四节 二萜类化合物 | 708 |

| | | | |
|---|-----|---------------------------------------|-----|
| 第五节 挥发油(精油) | 710 | 第二节 结构分类 | 750 |
| 第十九章 三萜及其苷类 | 720 | 第三节 生物碱的提取分离 | 776 |
| 第一节 概述 | 720 | 第四节 生物碱的生物活性 | 781 |
| 第二节 提取分离 | 731 | 第二十二章 动物药活性成分分离纯化与制备 | 790 |
| 第三节 生物活性 | 734 | 第二十三章 活性成分筛选、分离纯化与制备应用实例 | 802 |
| 第二十章 甾体及其苷类 | 738 | 第一节 中药补体抑制剂活性导向分离与表征 | 802 |
| 第一节 甾体化合物的分类及甾核的稠合方式 | 738 | 第二节 青菜花粉抗前列腺增生生活性成分筛选、分离与制备 | 823 |
| 第二节 甾体及其苷类的分离纯化 | 739 | 第三节 抗病毒活性成分筛选、分离纯化与制备 | 860 |
| 第三节 甾体及其苷类的生物活性 | 744 | 第四节 抗真菌活性成分的筛选、分离纯化与制备 | 870 |
| 第二十一章 生物碱 | 749 | 第三篇 微生物资源的分离纯化和制备 | |
| 第一节 概述 | 749 | 第五节 交沙霉素 | 910 |
| 第二十四章 概述 | | | |
| 第一节 微生物来源生理活性物质的特点 | 885 | 第二十七章 氨基糖苷类抗生素 | 913 |
| 第二节 微生物来源生理活性物质分离纯化的一般原则 | 885 | 第一节 概述 | 913 |
| 第三节 微生物资源的应用及其前景 | 886 | 第二节 链霉素 | 914 |
| 第二十五章 β-内酰胺类抗生素 | 894 | 第三节 新霉素 | 916 |
| 第一节 概述 | 894 | 第四节 西索米星 | 917 |
| 第二节 青霉素类抗生素 | 895 | 第二十八章 多肽类和糖肽类抗生素 | 921 |
| 第三节 头孢菌素类抗生素 | 898 | 第一节 概述 | 921 |
| 第四节 克拉维酸类 | 902 | 第二节 杆菌肽 | 923 |
| 第二十六章 大环内酯类抗生素 | 905 | 第三节 替考拉宁 | 925 |
| 第一节 概述 | 905 | 第四节 达托霉素 | 928 |
| 第二节 红霉素 | 906 | 第二十九章 四环素类抗生素 | 931 |
| 第三节 螺旋霉素 | 908 | 第一节 概述 | 931 |
| 第四节 麦迪霉素 | 909 | 第二节 四环素 | 932 |
| | | 第三节 土霉素 | 933 |

| | | | |
|--------------------------------|------|-----------------------------------|------|
| 第三十章 聚醚类抗生素 | 936 | 第三节 兽药 | 975 |
| 第一节 概述 | 936 | 第三十五章 极端环境微生物来源的活性成分分离纯化与制备 | 981 |
| 第二节 盐霉素 | 937 | 第一节 嗜热菌及其耐热机制 | 981 |
| 第三节 马杜霉素 | 938 | 第二节 嗜盐菌及其抗性机制 | 984 |
| 第三十一章 微生物来源的抗肿瘤和抗病毒活性物质 | 941 | 第三节 嗜酸菌及其抗性机制 | 989 |
| 第一节 概述 | 941 | 第四节 其他嗜极微生物及特点 | 992 |
| 第二节 柔红霉素 | 944 | 第五节 嗜极微生物产生的生理活性物质 | 993 |
| 第三节 丝裂霉素 C | 946 | 第六节 困难与对策 | 1001 |
| 第四节 光辉霉素 | 947 | 第三十六章 微生物来源生理活性物质的筛选模型 | 1005 |
| 第五节 抗病毒活性物质 | 949 | 第一节 抗菌活性物质的筛选模型 | 1005 |
| 第三十二章 微生物来源的免疫活性物质 | 953 | 第二节 抗肿瘤活性物质的筛选模型 | 1009 |
| 第一节 概述 | 953 | 第三节 免疫活性物质的筛选模型 | 1013 |
| 第二节 免疫抑制剂 | 953 | 第三十七章 分离纯化单元操作选用策略 | 1018 |
| 第三节 免疫增强剂 | 959 | 第一节 不同种类微生物资源的影响 | 1018 |
| 第三十三章 微生物来源的酶抑制剂 | 962 | 第二节 发酵生产方式的影响 | 1021 |
| 第一节 概述 | 962 | 第三节 产品质量标准的影响 | 1025 |
| 第二节 普伐他汀 | 963 | 第三十八章 概述 | 1037 |
| 第三节 洛伐他汀 | 965 | 第三十九章 海洋植物 | 1041 |
| 第四节 阿卡波糖 | 966 | 第一节 红树林 | 1041 |
| 第三十四章 微生物来源的兽药和农药 | 970 | 第二节 海藻 | 1050 |
| 第一节 概述 | 970 | 第四十章 海洋低等无脊椎动物 | 1074 |
| 第二节 农药 | 970 | 第一节 腔肠动物门 | 1074 |
| 第四篇 来源于海洋生物资源的活性次生代谢产物的分离纯化和制备 | | 第二节 多孔动物门 | 1086 |
| 第三十八章 概述 | 1037 | 第三节 软体动物门 | 1095 |
| 第三十九章 海洋植物 | 1041 | 第四节 棘皮动物 | 1105 |
| 第一节 红树林 | 1041 | 第五节 其他 | 1108 |
| 第二节 海藻 | 1050 | | |

| | | | | | |
|-------|---|------|-----|----------------------|------|
| 第四十一章 | 来源于海洋生物资源活性 次生代谢产物分离、纯化 和制备的方法及其应用 | 1122 | 第一节 | 分离、纯化和制备的 方法..... | 1122 |
| | | | 第二节 | 研究实例..... | 1125 |

第五篇 天然产物的靶向活性筛选

| | | | | | |
|-------|------------------------------|------|-------|-----------------------------------|------|
| 第四十二章 | 药物靶标和治疗领域选择 的多样性及针对性..... | 1145 | 第四十五章 | 天然产物的保存与 管理..... | 1176 |
| 第一节 | 定义..... | 1145 | 第一节 | 天然产物的收集和 加工..... | 1176 |
| 第二节 | 基因组学对药物发现的 影响..... | 1146 | 第二节 | 天然产物样品的保存与 管理..... | 1177 |
| 第三节 | 药物靶标的分类..... | 1147 | 第三节 | 备用化合物..... | 1179 |
| 第四十三章 | 药物靶标..... | 1151 | 第四十六章 | 中国的天然产物生物活性 筛选及创新药物研究 | 1182 |
| 第一节 | G 蛋白偶联受体..... | 1151 | 第一节 | 青蒿素：一个里程碑 ... | 1182 |
| 第二节 | 离子通道..... | 1154 | 第二节 | 抗肿瘤药物..... | 1183 |
| 第三节 | 核受体..... | 1156 | 第三节 | 神经退行性疾病药物 | 1184 |
| 第四节 | 酶..... | 1158 | 第四节 | 心血管疾病药物..... | 1185 |
| 第五节 | 核糖核酸和脱氧核糖 核酸..... | 1162 | 第五节 | 代谢性疾病药物..... | 1187 |
| 第六节 | 展望..... | 1163 | 第六节 | 抗感染药物..... | 1187 |
| 第四十四章 | 筛选模型的建立..... | 1165 | 第七节 | 展望..... | 1188 |
| 第一节 | 生化检测..... | 1165 | | | |
| 第二节 | 细胞水平检测..... | 1169 | | | |
| 第三节 | 基于小动物筛选模型 ... | 1171 | | | |

第一篇

天然活性产物分离方法



第一章 固相析出分离法

沉淀法 (precipitation) 是利用某种沉淀剂或改变条件, 使需提取的药物或杂质在溶液中的溶解度降低而形成无定形固体沉淀的过程。无论是在实验室的研究工作中还是在工业化生产中, 由于沉淀法的操作非常简单, 不需要特殊的或专用的设备, 所以其应用都极为普遍^[1~3]。虽然沉淀法具有浓缩和分离的双重作用, 但该方法对被沉淀的对象及其浓度有一些要求, 即浓度越高越好, 且不是所有的物质都适合用沉淀法, 同时该方法还存在选择性较差的缺点。沉淀法不仅适用于抗生素、有机酸等小分子物质, 在蛋白质或酶、多肽、核酸和其他细胞组分的回收或分离中应用更广泛^[4~10]。

沉淀操作常在发酵液经过滤或离心, 除去不溶性杂质及细胞碎片后进行, 得到的沉淀物可直接干燥制得成品或经进一步提纯, 如透析、超滤、层析或结晶制得高纯度微生物产品^[11]。操作方式可分为连续法和间歇法两种, 规模较小时, 常采用间歇法。不管哪一种方式操作步骤通常按三步进行: 第一步加入沉淀剂; 第二步为沉淀物的陈化, 促进粒子生长; 第三步为离心或过滤, 收集沉淀物。加沉淀剂的方式和陈化条件对产物的纯度、收率和沉淀物的形状都有很大影响。

第一节 盐析沉淀法

盐析沉淀法是在高浓度中性盐存在下, 欲分离物在中性盐水溶液中的溶解度降低而产生沉淀, 这是一种经典的分离方法, 早在 19 世纪, 盐析沉淀法就被用于从血液中分离蛋白质。目前, 盐析沉淀法仍广泛用于回收或分离蛋白质 (酶) 等生物大分子物质^[12]。

一、基本原理

蛋白质的溶解特性取决于其组成、构象、周围环境的物理化学性质以及溶剂的可利用度。这些性质就本质而言是水分子间的氢键和蛋白质表面所暴露出的 N、O 原子的相互作用, 所以易受温度、pH、介电常数和离子强度等参数的影响。蛋白质在自然环境中通常是可溶的, 其表面大部分是亲水基团, 但其内部大部分是疏水基团。无外界影响时, 呈稳定的分散状态, 其主要原因: 第一, 蛋白质为两性物质, 一定 pH 下表面显示一定的电性, 由于静电斥力作用, 使分子间相互排斥。第二, 蛋白质分子周围, 水分子呈有序排列, 在其表面上形成了水化膜, 水化膜层能保护蛋白质粒子, 避免其因碰撞而聚沉。

当向蛋白质溶液中加入中性盐时, 会产生两种现象: 低盐情况下, 随着中性盐离子强度的增高, 蛋白质溶解度增大, 称盐溶现象。但是, 在高盐浓度时, 蛋白质溶解度随之减小, 发生了盐析作用。产生盐析作用的一个原因是由于盐离子与蛋白质表面呈相反电性的离子基团结合, 形成离子对。因此盐离子部分中和了蛋白质的电性, 使蛋白质分子之间电

排斥作用减弱而能相互靠拢，聚集起来。盐析作用的另一个原因是由于中性盐的亲水性比蛋白质大，盐离子在水中发生水化而使蛋白质脱去了水化膜，暴露出疏水区域，由于疏水区域的相斥作用，使其沉淀。

蛋白质在水中的溶解度不仅与中性盐离子的浓度有关，还与离子所带电荷数有关，高价离子影响更显著，通常用离子强度来表示对盐析的影响。

二、无机盐的选择

在蛋白质盐析中，硫酸铵是最常用的一种盐析剂，主要因为它价廉，且在水中溶解度大，溶解度随温度变化小，在低温下仍具有较大的溶解度，因此常可得到较高离子强度的溶液，甚至在低温下也能盐析。硫酸铵还具有对大多数蛋白质的活性无损害的优点，但是它对金属具有腐蚀性，在贮存过程中常会变酸，在较高 pH 的溶液中容易释放氨。其他盐析剂如硫酸钠和磷酸盐，虽然盐析能力较强，但其溶解度随温度变化显著，低温下溶解度很小，常不能达到使蛋白质和酶析出的浓度。

其他盐类的沉淀效果都不如硫酸铵，一般阴离子的盐析效果比阳离子好，尤其以高价阴离子更为明显。早在 1888 年，Hofmeister 就对一系列盐沉淀蛋白质的行为进行了测定，并根据它们的盐析能力，对阳离子和阴离子进行了排序，其中阴离子对盐析效果的影响可排序为：枸橼酸根 > 酒石酸根 > F^- > IO_3^- > 盐酸盐 $H_2PO_4^-$ > SO_4^{2-} > CH_3COO^- > Cl^- > ClO_3^- > Br^- > NO_3^- > ClO_4^- > I^- > CNS^- ；阳离子排序为 Th^{4+} > Al^{3+} > H^+ > Ba^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+} > Cs^+ > Rb^+ > NH_4^+ > K^+ > Na^+ > Li^+ 。该顺序被命名为 Hofmeister 序列，又称感胶离子序。

无机盐可按两种方式加入溶液中，一种是直接加入固体硫酸铵粉末，工业生产常采用这种方式，但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或硫酸铵浓度不需要太高时，可采用这种方式，它可防止溶液局部过浓，但加量较多时，料液会被稀释。

三、影响盐析的各种因素

影响盐析作用的因素主要是无机盐的加入量、蛋白质的种类和浓度、溶液 pH、温度、操作方式及搅拌等。

(一) 无机盐加入量的影响

对于特定的蛋白质，在一定的操作条件下，产生沉淀时的无机盐浓度范围都是一定的，即具有一定的蛋白质盐析分布曲线。通常由实验可直接作出无机盐饱和度 (P) 对蛋白质溶解度 (S) 的曲线，即配制一系列具有不同 $(NH_4)_2SO_4$ 饱和度的蛋白质溶液，并离心除去蛋白质沉淀，然后分别测定上清液中蛋白质浓度，即可作 S-P 的曲线。当达到一定的盐浓度，蛋白质才开始沉淀，一旦沉淀开始，蛋白质溶解度很快下降，并大量产生沉淀。开始时蛋白质沉淀的速率十分迅速，以后逐渐变慢，因此从开始沉淀到沉淀结束，形成了具有尖峰的曲线，这就是蛋白质的盐析分布曲线。利用不同蛋白质盐析分布曲线在横