

SHENGWU

HUAXUE CHANPIN

ZHIBEI JISHU

生物化学产品

制备技术 ②

■ 陈来同 唐 运 编著

 科学技术文献出版社

生物化学产品制备技术

(2)

陈来同 唐 运 编著

科学技术文献出版社

Scientific and Technical Documents Publishing House

北 京

图书在版编目(CIP)数据

生物化学产品制备技术(2)/陈来同等编著.-北京:科学技术文献出版社,2004.1

ISBN 7-5023-4470-5

I. 生… II. 陈… III. 生物化学-化工产品-制备 IV. TQ072

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 098297 号

出 版 者 科学技术文献出版社

地 址 北京市复兴路 15 号(中央电视台西侧)/100038

图书编务部电话 (010)68514027, (010)68537104(传真)

图书发行部电话 (010)68514035(传真), (010)68514009

邮购部电话 (010)68515381, (010)58882952

网 址 <http://www.stdph.com>

E-mail: stdph@istic.ac.cn

策 划 编 辑 张金水

责 任 编 辑 张金水

责 任 校 对 赵文珍

责 任 出 版 王芳妮

发 行 者 科学技术文献出版社发行 全国各地新华书店经销

印 刷 者 北京金鼎彩色印刷有限公司

版 (印) 次 2004 年 1 月第 1 版第 1 次印刷

开 本 787×960 16 开

字 数 505 千

印 张 29

印 数 1~5000 册

定 价 45.00 元

© 版权所有 违法必究

购买本社图书,凡字迹不清、缺页、倒页、脱页者,本社发行部负责调换。

前 言

生物化学产品是以生物材料为原料,采用现代生物化学分离纯化技术制备的具有活性的“生化物质”。这类活性物质副作用少、毒性小;不仅对人体有营养价值,而且还有独特的医疗价值。因此研制生化产品,受到人们的极大重视。

随着生物技术的一些重大突破如基因工程、基因治疗及转基因动植物的成功,不仅加速了生化产品制备技术的发展进程,而且把生化技术推进到一个崭新的技术体系。我国加入 WTO 后,国内外对生化产品的种类、数量和质量提出了更高的要求,加之国外新的生化技术不断引进和新的生化产品涌进国内市场,我国生物化学产品市场面临新的机遇和挑战,故此我们必须掌握新的生化技术,以适应市场的需求。

面对生化技术在许多领域被迅速广泛应用的趋势和广大读者对新的生化制备技术的渴望,笔者结合多年从事教学、科研和生产的经验与体会,并参考了国内外大量文献资料,在《生物化学产品制备技术(1)》的基础上,又继续撰写了《生物化学产品制备技术(2)》。本书以叙述如何从生物材料中提取制备生化产品为主线,以介绍当前最新生化技术领域的新成果和新方法为重点,以阐明分离、鉴定生化产品所涉及的制备原理及操作技巧为核心,全面系统地论述了生化产品所涉及的理论和工艺,同时详细地介绍了一些生化产品的化学结构与性质、采用的原料来源、技术路线及工艺等,以满足不同读者的需求。

本书是以综合大学相关的师生及生化产品制备专业技术人员为主要对象,也可供从事生化产品生产的科技人员参考。本书共八章,包括生化产品分离纯化技术原理与方法、氨基酸类生化产品制备技术、多肽及蛋白质类生化产品制备技术、酶类生化产品制备技术、核酸类生化产品制备技术、多糖类生化产品制备技术、脂类生化产品制备技术、天然色素类生化产品的分离纯化技术等。本书力求融科学性、技术性、通俗性、先进性和实用性于一体。对所列生化产品,注重其生产的代表性和生产的可行性;对制备工艺本着科学性、准确性及产品制备的可操作性的原则,采用了土洋结合和简单易行的技术路线。

本书从构思到成型历时一年零八个月,今天能与读者见面,与科学技术文献出版社的大力支持是分不开的,在此表示衷心的感谢。在编著过程中,参阅了许多国内外最新工艺著述,但由于生物化学产品涉及面广,品种繁多,新的制备技术日新月异,加之作者学识和经验有限,疏漏之处在所难免,祈盼专家、同仁及广大读者批评指正。

陈来同

于北京大学生命科学学院

2003年8月

(京)新登字 130 号

内 容 简 介

全书共八章。第一章系统地论述了生化产品所涉及的理论、技术和工艺,分离纯化技术原理与方法;第二章至第八章详细介绍了氨基酸类、多肽及蛋白质类、酶类、核酸类、多糖类、脂类等生化产品的制备技术和天然色素类生化产品的分离纯化技术等。如缩宫素的提取、P 物质的提取、催产素的提取、表皮生长因子的提取、促皮质素的提取、人生长激素的提取、垂体后叶粉的制备、三磷酸腺苷钠的制备、香菇多糖的提取、低分子肝素的制备、海藻酸钠的提取、前列腺素的提取、胡萝卜素的提取、葡萄色素的提取、姜黄色素的提取、谷维素的制备等多种最新生化产品的化学结构和性质、采用的原料、制备工艺、技术路线及工艺讨论等。书后有附录。

这些最新生化产品都以生物材料为原料,采用土洋结合、简单易行的制备技术,可以变废为宝,提高其经济价值。

本书内容丰富,可操作性强,特别对近几年人们关注的生化产品做了论述,是一本实用的、有指导作用的工具书,可作为大专院校有关生命科学及生物技术专业的教科书,也可供生物化学产品生产企业,科研单位的技术人员及相关人员参考使用。

科学技术文献出版社是国家科学技术部系统唯一一家中央级综合性科技出版机构,我们所有的努力都是为了
使您增长知识和才干。

目 录

第一章 生化产品制备技术原理与方法	(1)
第一节 生化产品的分离纯化	(1)
第二节 层析分离技术	(5)
第三节 薄层吸附层析技术	(20)
第四节 层析聚焦技术	(35)
第五节 疏水层析技术	(44)
第六节 旋转薄层层析法	(46)
第七节 高压液相层析技术	(52)
第八节 膜分离技术	(74)
第九节 电泳分离技术	(88)
第十节 生化产品的分析与鉴定方法	(121)
第二章 氨基酸类生化产品制备技术	(140)
第一节 概述	(140)
第二节 氨基酸的分离纯化方法	(142)
第三节 氨基酸分离纯化技术	(143)
一、亮氨酸的制备	(143)
二、组氨酸的制备	(149)
第三章 多肽及蛋白质类生化产品制备技术	(152)
第一节 概述	(152)

第二节 多肽及蛋白质的分离纯化方法	(154)
第三节 多肽及蛋白质的分离纯化技术	(155)
一、胸腺肽的制备	(155)
二、胰岛素的提取	(165)
三、缩宫素的提取	(182)
四、谷胱甘肽的制备	(188)
五、P 物质的提取	(196)
六、富骨蛋白肽的制备	(199)
七、催产素的提取	(201)
八、表皮生长因子的提取	(205)
九、促皮质素的提取	(208)
十、人生长激素的提取	(212)
十一、垂体后叶粉的制备	(216)
十二、脑素原粉的制备	(218)
十三、杀菌肽的制备	(220)
十四、粉浆蛋白的提取	(222)
第四章 核酸类生化产品制备技术	(224)
第一节 概述	(224)
第二节 核酸的分离纯化方法	(225)
第三节 核酸生化产品的分离纯化技术	(227)
一、三磷酸腺苷钠的制备	(227)
二、核酸-氨基酸片的制备	(237)
第五章 酶类生化产品制备技术	(242)
第一节 概述	(242)

第二节 酶的分离纯化方法·····	(244)
第三节 酶类生化产品的分离纯化技术·····	(245)
一、胰肽酶 E 的提取 ·····	(245)
二、鲜胰浆的制备 ·····	(250)
三、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的提取 ·····	(251)
四、胃膜素的提取 ·····	(258)
五、胃蛋白酶的提取 ·····	(263)
六、胃蛋白酶和胃膜素的提取 ·····	(268)
七、溶菌酶的提取 ·····	(270)
八、木瓜蛋白酶的提取 ·····	(284)
第六章 黏多糖类生化产品制备技术·····	(290)
第一节 概述·····	(290)
第二节 黏多糖类生化产品的分离纯化方法·····	(291)
第三节 糖类生化产品的提取分离技术·····	(293)
一、香菇多糖的提取 ·····	(293)
二、肝素的提取 ·····	(299)
三、低分子肝素的制备 ·····	(318)
四、海藻酸钠的提取 ·····	(323)
第七章 脂类生化产品制备技术·····	(330)
第一节 概述·····	(330)
第二节 脂类的分离纯化方法 ·····	(331)
第三节 脂类的分离纯化技术·····	(333)
一、银杏黄酮的提取 ·····	(333)
二、葛根黄酮和葛根淀粉的提取 ·····	(336)

三、亚油酸的提取	(339)
四、花生四烯酸的提取	(343)
五、前列腺素的提取	(348)
六、谷维素的制备	(353)
七、从鸡蛋黄中提取卵磷脂	(356)
八、从鸡蛋黄中提取胆固醇	(365)
九、蛋黄油的提取	(369)
十、鹅脱氧胆酸的提取	(371)
十一、角鲨烯的制备	(375)
十二、神经节苷脂的制备	(377)
十三、辅酶 Q_{10} 的制备	(382)
十四、动物骨油的提取	(389)
十五、动物骨胶的制备	(390)
十六、禽骨粉的制备	(392)
第八章 天然色素类生化产品的制备技术	(394)
第一节 概述	(394)
第二节 天然色素分类	(395)
第三节 色素的存在形式	(396)
第四节 天然色素类生化产品的分离纯化技术	(399)
一、胡萝卜素的提取	(399)
二、葡萄色素的提取	(408)
三、姜黄色素的提取	(412)
四、辣椒红色素的提取	(414)
附录	(421)

I. 生物材料的采集与保存	(421)
II. 去离子水的制备	(427)
III. 酒精的回收及其装置	(431)
IV. 各种制备离心机的使用	(434)
V. 离心机转数与相对离心力的换算法	(439)
VI. 生化产品溶液光谱曲线的测定方法	(440)
VII. 各种透析管、透析袋和超滤膜数据表	(440)
VIII. 常用数据表	(445)
参考文献	(450)

生化产品制备技术原理与方法

通常在生化产品的制备中,都选用动物、植物、微生物及海洋生物为原料,而在这些生物材料中,除含有要制备的目的物外,还含有其他生化物质如蛋白质、酶、多糖、脂类和核酸等混杂物质。要制备某种生化产品或研究某一种生化产品的结构、理化性质及其功能,就必须进行分离纯化。在实际操作中首先要根据生化产品的分子结构和理化性质的差异,制定出可行的分离纯化方法。其次就要破碎生物材料的组织细胞,提取生化产品混合物,利用盐析法、有机溶剂沉淀及其他沉淀剂沉淀等方法对生化产品进行粗提;然后利用电泳技术、色谱技术和膜分离等技术对粗提生化产品进行进一步的分离纯化;最后可对纯化生化产品进行分析鉴定和制剂,即达到生化产品制备的目的。本章从原理上对生化产品分离纯化中常用的新技术做一概要介绍。

第一节 生化产品的分离纯化

生化产品主要包括氨基酸、多肽、蛋白质、酶、辅酶、激素、维生素、多糖、脂类、核酸及其降解产物等。以上这些生化产品具有不同的生理功能,其中有些是生物活性物质如蛋白质、酶、核酸等,它们与人们的生活密切相关。目前这些生物活性物质已成为生命科学研究的主要对象。特别是随着人类基因组序列“完成图”的完成(2003年4月15日公布),生命科学研究将进入后基因组时代(研究的焦点将从基因的序列转移到功能方面),我国在“十五”期间将人类基因组的后续研究与开发工作列为十二个国家重大科技专项之一,国家已投入6亿元,主要开展重大疾病、重要生理功能相关功能基因等多项研究。为此鉴定大量未知蛋白质(酶)的结构和功能,蛋白质研究也必将进入一个空前活跃的时期,因此分离纯化和测试分析蛋白

质技术显得十分重要。蛋白质与核酸相比,其结构更具有奇妙独特的复杂性和艺术性。它是由 20 多个不同性质(或极性)的氨基酸交互排列而成,不仅潜在的数量多达 20^{100} 种不同的蛋白质(这就是蛋白质构成如此巨大的、丰富多彩的生命世界的原因),而且相互间差异大。因此,相对而言,蛋白质的分离、纯化和鉴定有较大的难度和特殊性;而核酸的结构,虽然也有异乎寻常的多样性,但是,它是由结构相似、理化性质比较接近的 4 个碱基交互排列,且有一定规律可循。因此,核酸的分离、制备和鉴定比较容易。另外,蛋白质和核酸类物质通常是与自然界存在的诸多不同化合物结合在一起,或者是蛋白质和核酸自身相互组合在一起出现的,加之它们离体后稳定性较差(如酶)、含量偏低,这就给分离纯化带来了一定的困难;此外,生物活性物质都有复杂的空间结构,而维系这种特定的三维结构主要靠氢键、盐键、二硫键、疏水作用力和范德华引力等。这些生物活性物质对外界条件非常敏感,过酸、过碱、高温、剧烈的振荡等都可能导导致活性丧失,这是生命大分子物质不同于其他物质的一个突出特点。因此,在整个分离、纯化工工艺中,要选择十分温和的条件,尽量在低温条件下操作。同时还要防止体系中的重金属离子及细胞自身酶系的作用。为了得到高纯度的生物产品,必须认真了解生化活性物质的一些特性与特点。

一、生化活性物质的特性

通常生化活性物质以“胞内”与“胞外”两种方式存在于生物体内。“胞外”物质是由细胞产生,再释放出来的,因此两者实质上没有严格界限。但在提取时“胞内”生化活性物质必须首先将细胞破碎,使“胞内”的生化活性物质释放出来,方可进行提取分离;而“胞外”生化活性物质,不要细胞破碎,就可直接提取分离。如胰岛素是由胰腺的胰岛细胞分泌的,必须首先将胰岛细胞破碎,才能使“胞内”的胰岛素释放出来;HCG 是由胎盘滋养层合体细胞产生,然后分泌到孕妇尿液中,故可直接从孕妇尿液中提取分离。多数微生物酶,如淀粉酶、蛋白质水解酶、糖化酶,常大量存在于胞外培养液中。而合成酶类、代谢糖类、遗传物质和代谢中间产物则存在于细胞内,如 DNA 聚合酶、细胞色素 C 等。真核细胞的 DNA 大部分存在于细胞核内,只有少量存在于线粒体和微粒体中,而 RNA 主要存在于胞质中,电子传递系统物质包括黄素蛋白、细胞色素类以及糖类、脂肪酸合成、氧化和氧化磷酸化有关的酶系大部分存在于线粒体中。消化酶虽然可分泌到胞外,但难于从消化道进行收集,只能由相应的腺体提取分离,而且这些酶在细胞内刚合成时常常是以无

活性的酶原形式存在,提取时需要预先激活。细胞内的生物活性物质有些游离在胞浆中,有些结合于质膜或器膜上,或存在于细胞器内。对于胞内物质的提取要先破碎细胞,对于膜上物质则要选择适当的溶剂使其从膜上溶解下来。因此,在生化产品的制备中,我们可以根据生化活性物质的生物功能推断其存在部位,并设计提取分离方案。

生化活性物质作为一个生化大分子,如酶类药物的分子量介于 10 000~500 000 之间,抗体蛋白分子量为 50 000~950 000,多糖类药物的分子量小的上千,大的上百万。它们不仅分子大,组成、结构复杂,而且具有严格空间构象,要维持其特定的生理功能,就要稳定它的特殊三维结构,也就是靠一些非共价键如氢键、盐键、金属键、范德华引力、疏水力、碱基堆积力所维系,其键能较弱,而且键的性质差别较大,它们与生物分子的生物功能关系十分密切,因此要采取不同方法使之解离,而不损伤其分子基本结构。但须注意的是许多生物大分子的空间高级结构也是由非共价键结合的,因此分离时应十分小心,确保立体结构不受破坏。生化产品对热、酸、碱、重金属及 pH 变化和各種理化因素都较敏感,生物材料又易腐败、染菌、被微生物的活动所分解或被自身的代谢酶所破坏,甚至机械搅拌、压片机冲头的压力、金属器械、空气、日光等对生物活性都会产生影响。为此,要确保生化产品的有效药理作用,就要从原料选择、工艺过程、制剂、贮存、运输和使用各个环节严加控制。

通常分离纯化生化产品都在十分温和的条件下操作,以避免因强烈外界因子的作用而丧失其生理活性。这就是生化技术与一般有机化学制备技术的重大不同之处。

二、生物活性物质的特点

生物材料中的化学组成十分复杂。不同生物含有不同种类的活性物质。同种生物,在细胞与细胞之间、组织与组织之间,由于细胞的类型、年龄、分化程度的不同,都会改变活性物质的组成。尤其是色素类物质和某些生理活性成分的种类与组成,在不同生物间的差别更大。如植物含叶绿素,胡萝卜素,花色素类;动物与微生物含细胞色素、原卟啉;藻类含藻胆色素;脊椎动物含脊椎动物激素:ACTH、MSH、GH、后叶激素、胰岛素、肾上腺素、甲状腺素、甾体激素;无脊椎动物含蜕皮激素(变态激素)和促幼激素及外激素(信息素)——蚕的性外激素与蚂蚁的报警激素;植物含吲哚乙酸,脱落酸,玉米素,乙烯,赤霉素等植物激素。

生化产品的有效成分在生物材料中浓度都很低,杂质的含量相对较高,而且生理活性愈高的成分,含量往往愈低。如胰腺中,脱氧核糖核酸酶的含量为0.004%,胰岛素含量为0.002%;胆红素在胆汁中的含量为0.05%~0.08%,由几吨竹笋方可得到几毫克竹笋素,所以直接从生物材料生产含量极低的生理活性物质没有太大的工业价值,这正是现代生物技术的重点开发领域。

生物材料中的生化组成数量大,种类多。目的物与杂质的理化性质如溶解度、分子量、等电点等都十分接近,所以分离、纯化比较困难。尤其是纯化过程中生物材料中有效成分的生理活性处于不断变化中,它们可能被材料中自身的代谢酶所破坏,或为微生物活动所分解,还可能在制备过程中受到酸、碱、盐、重金属离子,机械搅拌、温度,甚至空气和光线的作用而改变其生理活性。因此,在整个制造过程中都要把防止目的物的失活作用放在首位。

三、生化产品的分离纯化方法

生化产品的分离纯化就是把生物体内的生化基本物质,既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,较高纯度地分离出来。它是一项严格、细致、复杂的工艺过程,涉及到物理、化学、生物学等方面的知识和操作技术。

要分离纯化得到纯的或比较纯的生化产品,就必须熟悉并掌握生化产品特有的理化性质,确定合适的分离制备方案。这包括生物材料的选择和处理,目的生化产品的提取、分离、纯化和鉴定。生化产品分离纯化的基本目标是得到足够量的具有天然生物学活性的生化物质,为此,在整个分离纯化过程中必须避免生化物质的变性和降解。提取生化产品的第一步是将组织粉碎、破坏细胞,一般用低浓度缓冲溶液提取。具体的溶剂系统与提取条件的选择因不同组织而异。在提取过程中一般需注意低温操作,避免强烈搅拌,防止产生大量泡沫,避免与强酸、强碱及重金属离子作用,并添加相应的蛋白酶抑制剂。常用于生化产品的分离纯化的方法包括盐析、有机溶剂沉淀、透析、选择性沉淀法以及各种层析方法等。

笔者已经在《生物化学产品制备技术(1)》中分别介绍了生物组织与细胞的破碎以及生化产品的提取方法。同时还介绍了一些分离纯化技巧,以下重点叙述一些在《生物化学产品制备技术(1)》中未介绍到的新分离纯化技术。

第二节 层析分离技术

物质的分离和提纯是生化产品研究及制备的重要任务。随着生产技术的发展,对物质纯度的要求也愈来愈高,经典的分离方法,如多级蒸馏、多级萃取、结晶等很难满足需要。层析法(或称色谱法)是在近 40 多年来迅速发展起来的一种新技术,它的优点是分离效率高、设备简单、操作方便,且不包含强烈的操作条件(如加热等),因而不易使物质变性,特别适用于不稳定的大分子有机化合物。操作方法和条件的多样性使它能适应多种物质的分离。层析分离法的缺点是处理量小,操作周期长,不能连续操作,因此以往主要用于实验室中,但随着技术的进步,层析分离法已在生化产品制备上广泛应用。

层析技术(chromatography)又称色谱法,俄国植物学家 Michael Tswett 于 1906 年首先创建,当时他用装填有白色粒子吸附剂的柱子来分离植物叶子色素,各种色素以不同的速率通过柱子时彼此分开,形成易于区分的色素带,由此得名。后来不仅用于分离有色物质,而且在多数情况下用来分离无色物质。色谱法由于分离效率高,操作简单等优点而被广泛应用。1941 年 Martin 和 Synge 发现了液-液(分配)色谱[liquid-liquid(partition)chromatography, LLC]。该法用覆盖于吸附剂表面的并与流动相不混淆的固定液来代替以前仅有的固体吸附剂,使组分按照其溶解度在两相之间分配。在使用柱色谱的早期年代,可靠地鉴定小量的被分离物质是困难的,所以研究发展了纸色谱法(paper chromatography, PC)。在这种“平面”的技术中,分离主要是通过滤纸上的分配来实现的。然后由于充分考虑了平面色谱法的优点而发展了薄层色谱法(thin-layer chromatography, TLC),在这种方法中,分离系在涂布于玻璃板或某些坚硬材料上的薄层吸附剂上进行。气相色谱法是 Martin 和 James 于 1952 年首先描述的,它特别适用于气体混合物或挥发性液体和固体,其特点是分辨率高,分析迅速和检测灵敏等。近年来,因为新型液相色谱仪和新型柱填料的发展以及对色谱理论的更深入了解,又重新引起对密闭柱液相色谱法的兴趣。高效液相色谱(high-performance liquid chromatography, HPLC)迅速成为与气相色谱一样被广泛使用的方法,对于迅速分离非挥发性的或热不稳定的试样来说,高效液相色谱常常是更可取的。

一、层析技术分类

(一)按两相所处的状态分类

用液体作为流动相(mobile phase),称为“液相色谱”(liquid chromatography);用气体作为流动相,称为“气相色谱”(gas chromatography)。固定相(stationary phase)也有两种状态,以固体吸附剂作为固定相和以附载在固体上的液体作为固定相,所以层析法按两相所处的状态可分为:液-固色谱(liquid-solid chromatography)、液-液色谱(liquid-liquid chromatography)、气-固色谱(gas-solid chromatography)、气-液色谱(gas-liquid chromatography)。

(二)按层析过程的机理分类

吸附层析(adsorption chromatography)是利用吸附剂表面对不同组分吸附性能的差异,达到分离鉴定的目的。分配层析(partition chromatography)是利用不同组分在流动相和固定相之间的分配系数(或溶解度)不同,而使之分离的方法。离子交换层析(ion-exchange chromatography)是利用不同组分对离子交换剂亲和力的不同,而进行分离的方法。凝胶层析(gel chromatography)是利用某些凝胶对于不同组分因分子大小不同而阻滞作用不同的差异,进行分离的技术。

(三)按操作形式不同分类

柱层析(column chromatography)是将固定相装于柱内,使样品沿一个方向移动而达到分离目的的方法。纸层析(paper chromatography)是用滤纸作液体的载体(担体 support),点样后,用流动相展开,以达到分离鉴定的目的。薄层层析(thin layer chromatography)是将适当粒度的吸附剂铺成薄层,以与纸层析类似的方法进行物质的分离和鉴定。

(四)根据分离机理色谱法的分类

1. 吸附色谱法——靠吸附力不同而分离。
2. 分配色谱法——靠物质在两液相间的分配系数不同而分离。
3. 离子交换色谱法——靠各物质对离子交换树脂的化学亲和力不同而分离。
4. 凝胶色谱法——靠各物质的分子大小或形状不同而分离。