

99.6.4
普通高等教育药学类规划教材

分离纯化工艺原理

(供微生物制药专业用)

顾觉奋 主编

中国医药科技出版社

普通高等教育药学类规划教材

分离纯化工工艺原理

(供微生物制药专业用)

主编 顾觉奋(中国药科大学)

主审 邬行彦(华东化工学院)

编者 顾觉奋

李丽燕(沈阳药学院)

刘叶青(华东化工学院)

中国医药科技出版社

登记证号：(京) 075 号

内 容 提 要

本书系高等学校药学类微生物制药专业的专业教材。全书分总论和各论两部分，总论部分着重于理论上的阐述，重点介绍了现代分离方法和技术在微生物药品生产中应用的基本原理、理论基础、技能和方法，包括溶媒萃取法、离子交换法、吸附法、沉淀法、结晶和中间盐转移法、双水相萃取法、膜过滤法、旋转薄层层析法、高压液相色谱法及免疫亲和色谱法、憎水色谱法等，各论部分主要讨论了各类微生物药物的分离与纯化。

图书在版编目(CIP)数据

分离纯化工艺原理/顾觉奋主编. -北京:中国医药科技出版社,1994.8(1996重印)
普通高等教育药学类规划教材

ISBN 7-5067-0854-X

I. 分… II. 顾… III. ①分离提纯-工艺-高等学校-教材②药物:微生物-提纯,分离-生产工艺-高等学校-教材 IV. TQ464

中国版本图书馆 CIP 数据核字(96)第 05787 号

中国医药科技出版社 出版
(北京西直门外北礼士路甲 38 号)
(邮政编码 100810)

河北省昌黎县印刷厂 印刷
全国各地新华书店 经销

*

开本 787×1092mm¹/₁₆ 印张 22¹/₂

字数 518 千字 印数 1501—4500

1994 年 8 月第 1 版 1996 年 6 月第 2 次印刷

定价:18.00 元

前 言

《分离纯化工艺原理》系根据国家教委“八五”期间高等学校教材建设纲要的精神,在国家医药局科教司直接领导和普通高等学校制药类专业教材评审委员会主持下,由中国药科大学主编,沈阳药学院和华东化工学院等单位参编,经全体编委共同努力编写而成。本书可作为高等医药院校微生物制药专业的主要必修课教材和其它有关专业的教学参考书,也可供抗生素工厂、微生物药品检验部门或其它微生物发酵工厂的科技人员参考。

全书分总论和各论两大篇。总论部分着重于理论上的阐述,重点介绍了现代分离方法和技术在微生物药品生产中应用的基本原理、理论基础、技能和方法,主要有溶媒萃取法,离子交换法,吸附法,沉淀法,结晶和中间盐转移法,双水相萃取法,膜过滤法,旋转薄层层析法,高压液相色谱法以及蛋白质常用的免疫亲和色谱法、憎水色谱法等。尤其对分离纯化的近代定性概念叙述得比较详细,结合有关生产实例阐述使之理论联系实际。

各论部分 12 章讨论对象主要是各类微生物药物,包括抗生素、氨基酸、维生素、核酸、蛋白质和激素。其中抗生素部分又以常用抗生素为主,分为 β -内酰胺类、氨基糖苷类、四环类、大环内酯类、多肽类、多烯类、林可霉素类等 7 大类,详细地阐述了它们的结构特点和理化性质;对各类微生物药物都以一种主要的药物为代表,详细讨论其与生产直接有关的理化性质,并对其分离工艺原理从理论上作了解释。在介绍中注意恰当地处理与《发酵工艺原理》等相关、相邻课程之间的交叉和衔接。

本书编写过程中,华东化工学院邬行彦教授于百忙中承担了全稿审阅,中国医药科技出版社在出版过程中给予技术指导,并得到了华北制药厂、苏州第二制药厂、上海第三制药厂的鼎力相助,中国药科大学领导及药学院的关心支持,在此一并谨致谢意。

本书第一章,第四章第七节,第六章第四、十、十一节,第十章,第十一章第五节,第十六章,附录由顾觉奋教授编写;第四、七、十一、十五、十七、十九、二十、二十三章由李丽燕副教授编写;第二、三、八、十八、二十一、二十二章由刘叶青副教授编写;第六、十三章由陈曙曦高工编写;第五、九章由周长林老师编写;第十二章第一、二、三节由宗秀华高工编写;第四、五、六节由吕伟青高工编写;第十四章由王毓芬高工编写。

为了使本书适应我国药学科技和医药工业发展的需要,我们参考了大量国内外有关书籍和文献,并结合自己的教学经验进行编撰工作,但限于水平和时间仓促,难免会有错误和不足之处,祈盼专家、同仁及广大读者批评指正。

顾觉奋 谨识

1992 年 12 月于南京中国药科大学

目 录

第一篇 总论

第一章 分离与纯化概论.....	1
第一节 分离纯化技术在微生物制药中的地位.....	1
第二节 传统微生物药物的分离方法.....	2
第三节 分离纯化方法的选择依据.....	4
第四节 基因工程药物和动物细胞培养药物的分离与纯化方法.....	6
第五节 分离纯化技术的发展趋向.....	8
第二章 发酵液的预处理和液固分离	10
第一节 发酵液的预处理	10
第二节 发酵液的液-固分离	15
第三章 微生物细胞的破碎	22
第一节 微生物的细胞壁	22
第二节 微生物细胞的破碎技术	24
第四章 溶剂萃取法分离原理	32
第一节 分配定律	32
第二节 萃取方法和理论收率计算	35
第三节 化学萃取	39
第四节 乳化和破乳	42
第五节 影响溶剂萃取的主要因素	48
第六节 溶剂回收	49
第七节 萃取设备	51
第五章 双水相萃取	59
第一节 双水相萃取法概述	59
第二节 双水相萃取理论	64
第三节 影响双水相萃取的因素	67
第四节 双水相萃取的应用	71
第六章 离子交换分离原理	75
第一节 离子交换树脂的基本概念	76
第二节 离子交换树脂的分类及理化性质	76
第三节 离子交换树脂的合成	87
第四节 离子交换过程的理论基础	91
第五节 离子交换过程的选择性	98
第六节 偶极离子吸附.....	102
第七节 大网格离子交换树脂.....	103
第八节 离子交换树脂和操作条件的选择及应用实例.....	105

第九节	软水和无盐水制备	107
第十节	离子交换法分离蛋白质	110
第十一节	离子交换膜和电渗析	113
第七章	吸附法分离原理	115
第一节	吸附法的基本概念	115
第二节	吸附类型	116
第三节	吸附等温线	117
第四节	几种常用的吸附剂	118
第五节	影响吸附过程的因素	120
第六节	大孔网状聚合物吸附剂及其应用	121
第八章	沉淀法分离原理	127
第一节	盐析沉淀法	127
第二节	有机溶剂沉淀法	135
第三节	其它沉淀方法	137
第九章	膜过滤	139
第一节	分类和定义	140
第二节	膜的制备	140
第三节	表征膜性能的参数	143
第四节	分离机理	145
第五节	膜两侧溶液间的传递方程式——浓差极化——凝胶层模型	147
第六节	膜过滤技术的应用	149
第十章	色层分离法	159
第一节	色层法的分类	159
第二节	色层法的基本概念	160
第三节	吸附色层法	164
第四节	分配色层法	172
第五节	离子交换色层法	174
第六节	凝胶色层法	176
第七节	亲和色层法	180
第八节	逆流分配法	186
第九节	纸色层法	194
第十节	柱色层法	197
第十一节	薄层(板)色层法	199
第十二节	旋转薄层色层法	206
第十三节	高压液相色谱法	210
第十四节	蛋白质分离常用的色谱法	215
第十一章	结晶	221
第一节	结晶过程的实质	221
第二节	过饱和溶液的形成	222

第三节	晶核的形成和晶体的生长·····	224
第四节	提高晶体质量的途径·····	229
第五节	共沸蒸馏结晶·····	232
第六节	工业生产实例·····	234
 第二篇 各论		
第十二章	β -内酰胺类抗生素·····	237
第一节	β -内酰胺类抗生素·····	237
第二节	青霉素的理化性质·····	241
第三节	青霉素的分离纯化工艺·····	250
第四节	头孢菌素 C 的理化性质·····	256
第五节	头孢菌素 C 的分离纯化工艺·····	258
第六节	棒酸的分离纯化·····	261
第十三章	氨基糖苷类抗生素·····	263
第一节	概述·····	263
第二节	链霉素的理化性质·····	265
第三节	链霉素的分离纯化工艺·····	270
第四节	影响工艺的因素·····	272
第十四章	四环素类抗生素·····	275
第一节	四环素类抗生素理化性质·····	275
第二节	四环素类抗生素主要化学反应·····	278
第三节	四环素类抗生素分离纯化工艺·····	281
第四节	提取工艺影响因素·····	282
第十五章	大环内酯类抗生素·····	284
第一节	大环内酯类抗生素理化性质·····	284
第二节	大环内酯类抗生素主要化学反应·····	285
第三节	几种主要的大环内酯类抗生素的结构和性质·····	287
第四节	大环内酯类抗生素分离纯化工艺·····	292
第五节	影响分离纯化过程的因素·····	294
第十六章	多肽类抗生素·····	296
第一节	概述·····	296
第二节	多粘菌素的理化性质·····	297
第三节	多粘菌素的分离纯化·····	299
第十七章	多烯类抗生素·····	301
第一节	多烯类抗生素理化性质·····	301
第二节	多烯类抗生素分离纯化工艺·····	303
第十八章	林可霉素类抗生素·····	307
第一节	林可霉素类的结构和理化性质·····	307
第二节	林可霉素类抗生素分离纯化工艺·····	309

第十九章	氨基酸的分离纯化	313
第二十章	维生素的分离纯化	317
第二十一章	核酸的分离纯化	322
第一节	概述	322
第二节	腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)的提取工艺	324
第三节	辅酶 A 的提取工艺	325
第二十二章	蛋白质的分离纯化	328
第一节	重组白细胞介素-2 的提纯	328
第二节	干扰素的提纯	329
第三节	L-天门冬酰胺酶的提纯	331
第二十三章	激素	333
附录:		
附录一	弱酸和弱碱的离解常数	337
附录二	难溶化合物的溶度积常数(18℃)	338
附录三	常用的缓冲溶液	339
附录四	国产离子交换树脂的性能	340
附录五	国内外离子交换树脂相应牌号对照表	342
附录六	国内外大孔离子交换树脂相应牌号对照表	343
附录七	离子交换膜的性能	344
附录八	国产葡聚糖凝胶的规格和性能	344
附录九	适用于结晶的互溶溶媒对	345
附录十	有关溶剂的常数	346
附录十一	有关共沸混合物的数据	348

第一篇 总 论

第一章 分离与纯化概论

第一节 分离纯化技术在微生物制药中的地位

微生物代谢物的分离纯化目的在于从发酵液中分离并纯化成高纯度的、符合药典规定的各种微生物药物,又称为发酵液的后处理或下游加工过程(downstream processing)。药品生产,质量第一。药品质量的优劣直接关系到人民的身体健康和生命安全,同时也是衡量微生物药物工业生产水平的重要标志之一。建国以来,我国生产的药品质量有很大的提高,国家颁布的新版药典,对质量提出了更高的要求。微生物药物由于没有适当的提取方法或因提取收率太低,成本过高而不能投产的例子是屡见不鲜的。微生物生物合成的发酵液是复杂的多相系统,含有微生物细胞、代谢产物、未耗用的培养基等。其中生物活性物质的浓度通常很低(例如抗生素含量为 $10\sim 30\text{kg}/\text{m}^3$,酶为 $2\sim 5\text{kg}/\text{m}^3$,维生素 B_{12} 为 $0.02\text{kg}/\text{m}^3$),而杂质含量却很高,并且某些杂质又具有非常相似的化学结构和理化性质,加上生物活性物质通常很不稳定,遇热或某些化学试剂会引起失活或分解(特别是蛋白质的生物活性与其二级、三级和四级结构有关),某些产品还要求无菌操作,因此从发酵液中制取生物活性物质不是一件容易的工作。

据各种资料统计,后处理的费用要占产品总成本的很大比例,按产品不同,在 $40\%\sim 70\%$ 之间。对抗生素生产而言,其提炼部分的投资费用约为发酵部分的4倍;对有机酸或氨基酸生产而言,则为1.5倍;对基因工程药物,分离纯化技术的要求更高,可占整个生产费用的 $80\%\sim 90\%$ 。因此研究后处理技术,降低其成本,对微生物药物实现商品化生产,非常重要。

发酵液后处理由一些化学工程的单元操作组成,但其中某些单元操作在一般化学工业中应用较少。胞内产物需经细胞破碎,细胞碎片分离等步骤,提取较复杂。胞外产物则将细胞去除后,对余下的液体即可进行初步纯化。在初步纯化及其以前的各步操作,处理的体积较大,着重于浓缩,或称为提取(或称分离);以后各步为精细的分离操作,着重于纯化,或称为精制(或称纯化)。一般工艺流程如图1-1所示。

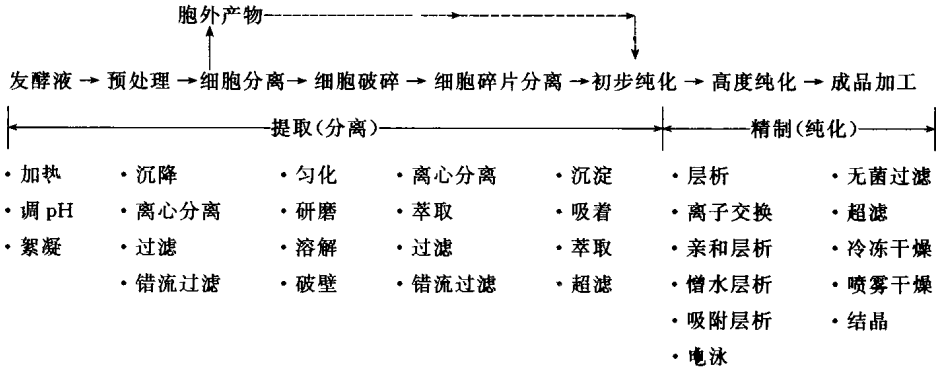


图 1-1 发酵液后处理的工艺流程和各阶段的单元操作

第二节 传统微生物药物的分离纯化方法

各种分离方法

以抗生素为例来说明。多数抗生素都存在于液体中,故应从发酵液中分离,分离方法一般有四种。

(1)吸附法:系利用吸附剂与抗生素分子之间的分子引力而将抗生素吸附在吸附剂上,然后再选用洗脱剂将其洗下来。

(2)溶剂萃取法:如果抗生素在某一种有机溶剂中(这种有机溶剂必须不溶于水)溶解度较大或分配系数较大,则当有机溶剂和发酵液相接触,抗生素就从水相转移到有机溶剂相。再适当改变 pH,使抗生素自有机溶剂相再转入水相,这样反复萃取,可以达到浓缩和提纯的目的。

(3)离子交换法:利用离子交换树脂与抗生素之间的化学亲和力,有选择地将抗生素吸着上去,然后改变条件以较少量的溶液将其洗脱下来,达到浓缩和提纯的目的。

(4)沉淀法:采用各种方法,降低抗生素的溶解度或形成难溶解的复合物而自发酵液中沉淀出来。

上面四种方法都系指抗生素分泌在液体中,如抗生素处在菌丝内部,一般的提取方法,是用溶剂从菌丝体浸取出来。如多烯类抗生素的制霉菌素、曲古霉素等,就是以乙醇进行浸取。

发酵液的第一步分离操作主要起浓缩作用,也部分地有纯化作用,但纯度离产品要求还很远,尚需进一步纯化。

各种纯化方法

抗生素的纯化或精制方法和普通有机化合物的精制方法没有什么不同,但多数抗生素往往稳定性较差,因而精制方法也受到一些限制。例如蒸馏、升华等加热方法很少应用,而上述的吸附、离子交换、萃取等方法,当然还能用于精制,但技术上有所发展。如在精制时采用的不仅是一次萃取或一次吸附,而是多次萃取或多次吸附,即色层分离的方法。

(1)色层分离法:它的机理是多种多样的,但不管怎样,必须有两相,一相是固定的,另

一相是移动的,由于物质在两相间的分配情况不同,经过多次差别分配而达到分离;或者说,当在柱中运动时,易分配于固定相中的物质走得慢,易分配于流动相中的物质走得快,因而逐渐分离。此法常被应用于实验室中新抗生素的精制,纯化。

(2)中间盐转移法:利用抗生素能形成某些盐类,而自溶液中沉淀析出,然而再将沉淀转化为所需要的盐的形式。经过这样一次转换后,抗生素的纯度就大大提高。例如在链霉素水溶液中,加入甲醇-氯化钙溶液,则形成链霉素的氯化钙复盐沉淀,将沉淀溶于水中,加入硫酸三乙胺,则有链霉素硫酸盐沉淀出来。又如红霉素与草酸可结合成红霉素草酸盐而从醋酸丁酯萃取液中沉淀出来,而后再将草酸盐溶于水,加 NaOH 即得红霉素碱结晶。土霉素盐酸盐可转移成土霉素碱而得到精制,先将土霉素盐酸盐在 pH2 下溶于水中,然后加碳酸钠调 pH 到 5,成土霉素碱析出,再将土霉素碱溶于甲醇-氯化钙溶液中,加浓盐酸,就有土霉素盐酸盐沉淀析出。

(3)结晶和重结晶法:结晶的方法很多。可以加入无机或有机溶剂使抗生素沉淀析出。例如链霉素可形成苦味酸盐、甲基橙盐等自水溶液中分出。也可以利用盐类不溶于有机溶剂,而游离酸或游离碱不溶于水的特性而析出。例如,在青霉素的二级丁酯萃取液中,加入醋酸钾,就可得青霉素钾盐结晶析出。在红霉素的缓冲液萃取液中,加入 20%NaOH 碱化至 pH9.8~10.2,并加热至 45~50℃(注意,红霉素游离碱在高温时溶解度反而小),保温 10~15 分钟,即有红霉素游离碱沉淀析出。

(4)活性炭脱色法和超滤法:活性炭处理在抗生素纯化中占很重要的地位,可以将各种色素和热原质除去。也可以用 DEAE 葡聚糖凝胶除去热原。但去热原最好的方法为超滤法。应用截断分子量为 10000 或 20000 的超滤膜,能截除热原质,而抗生素等小分子能自由通过。

(5)加抗氧化剂或通惰性气体:抗生素在温度较高时易氧化,使成品颜色变深,为此,可加入还原剂,如 Na_2SO_3 、 NaHSO_3 ,或通入惰性气体(CO_2 、 N_2)而使其和空气隔绝。

(6)加脱水剂:要除去有机溶剂浓缩液中的微量水分,常常可加入些脱水剂,如无水 Na_2SO_4 等,除去水分,以利于下一步的精制。例如红霉素的氯仿提取液,以粉末状无水 Na_2SO_4 脱水后,蒸去氯仿,即可得红霉素碱。

(7)透析:在实验室中,利用透析法可以将无机离子和大部分微生物代谢物分开。这是利用抗生素和无机物分子量相差较大,经过半透膜的速度不同而分离的原理。此法缺点是所需时间较长,分离也不完全。

(8)电透析法:系利用离子交换膜对离子的选择透过作用。在电场下阳离子交换膜能透过阳离子,阴离子交换膜能透过阴离子,而不带电的抗生素分子则不能透过,借此将抗生素溶液脱盐。

(9)浓缩:为使浓度增高,常常利用真空浓缩或薄膜蒸发的方法。浓缩条件(如温度、pH)和浓缩倍数等应控制适当。浓缩后常常会使抗生素的颜色加深,需再经活性炭脱色。一般,薄膜蒸发的速度快,对抗生素破坏少。新近发展的离心薄膜蒸发器,则在离心力场下,使溶液以薄膜状快速流过加热片表面,蒸发速度很快,受热时间很短,因而特别适用于抗生素等热敏物质的浓缩。

第三节 分离纯化方法的选择依据

分离方法的选择需根据具体条件,通过小试验而决定。选择时应考虑两个因素。

(1) 抗生素的理化性质: 先要了解该抗生素是极性还是非极性化合物,如是极性化合物,进一步确定是酸性、碱性或两性;如酸性,还应决定它是强酸还是弱酸;如为碱性,则应决定其为强碱还是弱碱,当然最好能知道它的 pK 值和化学结构。此外还应知道抗生素在各种溶剂中的溶解度,以及 pH , 温度,其它盐类对其溶解度的影响,它和哪些物质能形成不溶性的盐类等。

(2) 抗生素的稳定性: 要了解它在什么样的 pH 和温度范围易受破坏,酸性和碱性下的降解产物,最好能知道其分解速度。必须记住,在整个提炼过程中,要尽量使抗生素保持稳定。

有了这些数据后,就可大体决定采用何种方法。例如对于极性较强的抗生素可考虑用离子交换法;能形成沉淀的可考虑用沉淀法。以上方法都不适用,或进行小规模新抗生素提炼试验时,也可以用吸附法。究竟应选用何种方法,应通过小规模预试验,将各种方法比较,并不断改进。现有各种抗生素的分离方法,就是这样逐步决定的。例如青霉素和链霉素的分离方法,开始时都用吸附法,后来逐渐分别改用溶剂萃取法和离子交换法。

对于新抗生素常常在未确定其结构前,就需进行提炼。根据上述,应首先了解其极性和溶解度,这通常利用纸上层析和纸上电泳的方法。

1. 纸上层析法

以滤纸作为载体,以滤纸上吸附的水分作为固定相,以另一溶剂作为移动相,使抗生素在固定相和移动相间不断进行分配(图 1-2)。由于抗生素的分配系数或在溶剂中的溶解度不同,它在滤纸上的移动距离也不一样,因而其比移值 R_f (抗生素所走的距离与溶剂所走的距离之比)也不一样。抗生素在某一种溶剂中 R_f 值大,这表明它在该种溶剂中溶解度大;相反,如 R_f 值小,则溶解度小;如 $R_f = 0$,即不移动,则说明不能溶解。如抗生素在极性强的溶剂中有较大的 R_f 值,则表明该抗生素是极性化合物,因为极性物质易溶于极性溶剂中;而非极性抗生素在非极性溶剂中 R_f 值较大,在极性溶剂中 R_f 值较小。例如由链霉素硫酸盐的纸上层析谱(图 1-3)可见它的极性很强,易溶于水,不溶于丁醇、丙酮、丁酯中。又如新抗生素 2809 在氯仿等有机溶剂中溶解度大,也即非极性的溶剂中 R_f 值较大,因而系非极性抗生素,从而可以决定萃取时的最适 pH 值。

通常利用 8 种溶剂系统的纸层析数据决定抗生素的极性和溶解度。这 8 种溶剂系统配方如下:

- (1) 用水饱和的正丁醇;
- (2) 用水饱和的正丁醇,内含 2% 的对甲基苯磺酸;
- (3) 正丁醇 : 醋酸 : 水 = 2 : 1 : 1;
- (4) 用水饱和的正丁醇,内含 2% 的六氢吡啶;
- (5) 0.5mol/L $pH7.0$ 的磷酸缓冲液,用正丁醇饱和;
- (6) 用正丁醇饱和的水,内含 2% 的对甲基苯磺酸;
- (7) 苯 : 甲醇 = 4 : 1,滤纸用 0.5mol/L $pH7.0$ 的磷酸缓冲液处理;

(8)75%甲醇,25%水(内含 NaCl 13%),滤纸用 5%硫酸钠处理。

层析结果与已知抗生素在该 8 种溶剂系统的结果相比较,可以判断属于何种抗生素。

pH-层析法是纸层析法的一种,可用来研究某些酸性、碱性或两性抗生素的离解性能,其方法如下:用 9 条层析纸分别用 pH2,3,4,5,6,7,8,9,10 的各种缓冲液处理,点上样品后,选用适当的水饱和的有机溶剂展开,层析完毕后用生物显影,即得到 pH-层析谱。几种抗生素的 pH-层析图谱如图 1-4 所示。

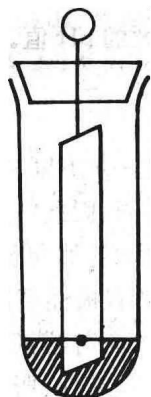


图 1-2 纸上层析

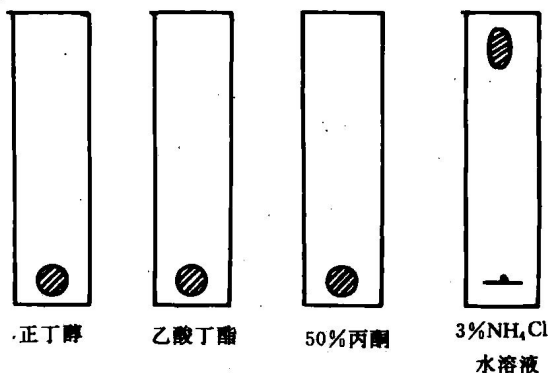


图 1-3 链霉素硫酸盐的纸上层析谱

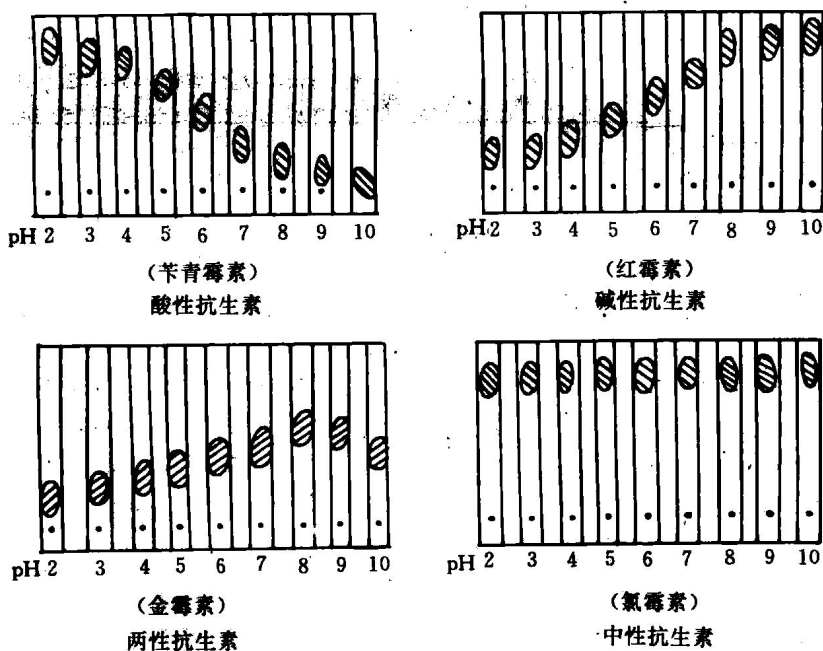


图 1-4 抗生素的 pH-层析图谱

从图 1-4 可以看出:

(1)酸性抗生素:在 pH-层析图谱中, R_f 值呈 S 形曲线,其最大值在酸性区域,随 pH 值增加其 R_f 值降低。

(2)碱性抗生素:在 pH-层析图谱中 R_f 值也呈 S 形曲线,曲线的最大值在碱性区域,而其最小值在酸性区域。

(3)两性抗生素:在 pH-层析图谱中 R_f 值在某一 pH 值有极大值,向酸性侧或碱性侧移动时, R_f 值减小。

(4)中性抗生素:在 pH-层析图谱中,在整个 pH 值范围内, R_f 值接近相同,呈一水平直线型。

从 pH-层析谱中可决定用有机溶剂从液相中抽提抗生素以及反抽提到液相中的最适 pH 值。用溶剂抽提时的最适 pH 值,即为 pH-层析谱中 R_f 值最大的 pH 值。相反,在层析谱中 R_f 值最小的 pH 值,即为重新溶于水的最佳 pH 值。

2. 纸电泳法

经过系统纸层析法判断为水溶性的抗生素,可用纸电泳法进一步判断其电离性质。其原理是不同的抗生素由于带电性质、电荷数量以及分子量大小不同,因此一定时间内在电场作用下,移动的方向和距离是不同的。带有正电荷的抗生素电泳时移向负极,为碱性抗生素;带有负电荷的抗生素电泳时移向正极,为酸性抗生素;不具有极性基团的抗生素电泳时不移动,为中性抗生素;两性抗生素在电场作用下移动的方向与溶液的 pH 密切相关。由此,可利用纸电泳法来判断抗生素为强酸性,或为弱酸性、强碱性、弱碱性、两性、中性抗生素,以及确定有可能采用何种离子交换树脂来提取。试样在电压、电流时间相同的情况下,分别用酸性(pH4)和碱性(pH8)缓冲液进行电泳,两次电泳结果及判断归纳如表 1-1。

表 1-1 电泳结果与样品性质的判断

判断	缓冲液 pH	电泳结果		讨论
		正 极	负 极	
中性化合物	pH4 pH8	—●—	—●—	可以用活性炭,大孔吸附剂(如 XAD-2)或有机溶剂提取
中性化合物	pH4 pH8	—●—	—x—	因滤纸带有羧基,由于发生电渗作用,使化合物偏向负极,提取方法同上
弱碱性化合物	pH4 pH8	—x—	—●—	可用 732 等强酸性离子交换剂提取
强碱性化合物	pH4 pH8	—x—	—x—	可用 732,101 等强酸或弱酸性树脂提取
弱酸性化合物	pH4 pH8	—●—	—x—	可用 717 等强碱性树脂提取
强酸性化合物	pH4 pH8	—x—	—x—	可用 717 或 330 等强碱或弱碱性树脂吸附
两性化合物	pH4 pH8	—x—	—●—	可任意选用酸性或碱性或大孔吸附剂、活性炭或有机溶剂提取

第四节 基因工程药物和动物细胞培养药物的分离与纯化方法

基因重组和单克隆抗体技术是现代生物工程的两大成就,依赖它们,已获得一些用传

统方法不能获得的、性能优良的诊断和治疗药物,如胰岛素、生长激素、干扰素、疫苗、尿激酶、组织血纤维蛋白、溶酶原激活剂(TPA)等。基因工程药物系通过重组微生物(多数为 *E. coli*)发酵得到;而大规模制备单克隆抗体系采用悬浮培养杂交瘤细胞得到。后者就是动物细胞培养的一个例子,当然动物细胞培养获得的产物并不限于单克隆抗体,一些疫苗、免疫调节剂、酶、激素都可用动物细胞培养方法获得。

从重组微生物或动物细胞培养液中提取药物要比传统产品困难得多。首先在培养液中有效成分的含量很低,如动物细胞的培养液中,产物的含量在 $5\sim 50\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间(在杂交瘤细胞培养液中,单克隆抗体含量可达 $500\mu\text{g}/\text{ml}$),但杂质含量却很高。如基因工程产品(*E. coli* 为宿主)多为胞内产物,细胞破碎后,大量杂蛋白、核酸等也进入培养液中;动物细胞培养时,常需加成分比较复杂的胎牛血清,可带入病毒、支原体、细菌和酵母于培养液中。血清即使经过灭菌,也仍有可能带有内毒素,在以后纯化中,内毒素很难除去。其次对产品的纯度要求很高,需满足药品的规范。如对蛋白质类药物,一般认为杂蛋白含量不应超过 100ppm ;某些核酸是致癌的,一次剂量中核酸含量不应超过 10pg 。

从重组微生物或动物细胞培养液中制取药物的步骤,一般不应超过 $4\sim 5$ 步,它们又可分为分离(提取)和纯化(精制)两类。

1. 分离方法

在 *E. coli* 中表达的基因工程产品多为胞内产物,则需经细胞收集、破碎和细胞碎片分离等步骤。细胞破碎后,常有大量核酸释出,去核酸的标准方法系用聚乙烯亚胺(polyethylenimine)沉淀。当胞内蛋白质表达量增加时,常会形成不溶解的包含体(inclusion body),处理包含体应先将蛋白质变性,然后再“折迭”成天然形式。

动物细胞培养产物通常分泌在培养液中,因而可省却细胞破碎等步骤。

通常培养液浓度很稀,需先经浓缩。浓缩可以采用膜过滤的方法。如果培养液粘度较大,膜过滤速度下降到不可接受的程度时,而浓度仍不够高(通常供纯化处理的蛋白质浓度应高于 $60\text{g}/\text{l}$),则可用硫酸铵沉淀法浓缩。

2. 纯化方法

纯化主要依赖色层分离的方法。层析的机理是多种多样的,其中分辨能力最强的为亲和层析和离子交换层析。人们自然期望经过一步纯化操作,如亲和层析,使纯度就能达到要求。实际上这是不可能的,因为此时杂质含量还相当高,会污染亲和层析柱而使其寿命降低,因此还需经过一次预处理操作,如双水相萃取、憎水层析或盐析。

经过预处理操作后,就可采用高分辨能力的层析操作,通常包含 1 步或 2 步离子交换层析或亲和层析,纯度可提高到 99% (一般为 $95\sim 98\%$)。

最后还需经过成品加工操作,以保证得到高纯度产品。这是由于产品蛋白质在分离和纯化过程中会聚合成二聚体(dimer)或分子量更高的化合物,或含有降解产物(由于有蛋白酶存在),或脱落的亲和层析配基等。最通常的成品加工操作是基于分子量差别的凝胶层析法,也可用高效液相色谱法,但费用较高。

3. 选择分离、纯化方法的依据

选择分离和纯化方法应根据目标蛋白质和杂蛋白质在物理、化学和生物化学方面性质的差异,例如,表面电荷(滴定曲线)对一些配基的生物特异性、表面憎水性、分子量、 pI 值和稳定性等。当几种方法连用时,最好以不同的分离机理为基础,且前一种方法处理过

的液体应能适于作后一种方法的料液。如经盐析后得到的液体含大量盐分，不适宜于离子交换层析，需先经透析或膜过滤脱盐；但可直接应用于憎水层析。

离子交换层析系根据蛋白质表面所带电荷不同而分离。假如 A、B、C 三种蛋白质的电荷与 pH 的关系如图 1-5 所示。分离时应选择在电荷相差最大的 pH 下进行。图 1-5 中蛋白质 A 和 B 有相同的等电点，但 pH 向两侧改变时，其电荷数相差增大。在本例中，可选择 pH3~4，使 B 从 A 和 C 中分出，然后选择 pH>8，将 A 和 C 分开。

亲和层析对某一种或一小组蛋白质有很高的选择性，但有时选择性太高，洗脱就很困难，需兼顾两者，选择一最佳的方法。层析介质很贵，但可反复利用。有时为防止

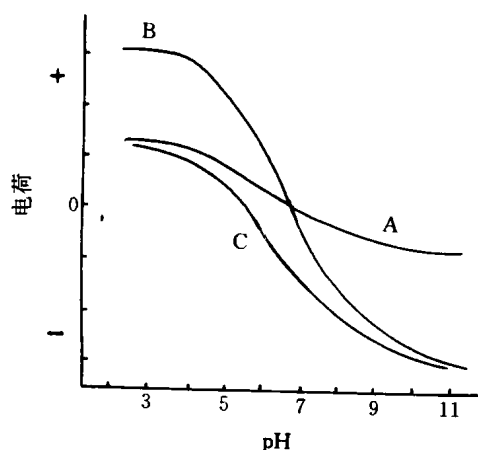


图 1-5 A、B、C 三种蛋白质的滴定曲线

层析中毒，在其前面加一保护柱(guard column)，通常为不带配基的介质。

4. 目标蛋白质的表征方法

蛋白质在分离、纯化过程中易发生变化，因此得到的产品应用已知标准品对照，证明为同一物质并检查其纯度。为达此目的，仅用一种方法是不够的，常需用几种方法，例如，①HPLC；选用基于不同原理的两种层析系统(如反相层析和离子交换层析)，如只得到单个对称峰，则表明纯度较高；②SDS-PAGE 和等电聚焦；③顺序分析：N-端和 C-端顺序分析可用来表征蛋白质。④其他方法：如氨基酸分析、肽图、免疫化学分析等可进一步提供产品纯度达到均质(homogeneity)和与标准品一致的证明。

第五节 分离和纯化技术的发展趋向

(1)膜技术的推广使用 随着膜本身质量的改进和膜装置性能的改善，在下游加工过程的各个阶段，将会越来越多地使用膜技术。例如 Millipore 公司进行研究的提取头孢菌素 C 的过程，利用微滤进行发酵液的过滤，利用超滤去除一些蛋白质杂质和色素，利用反渗透进行浓缩，最后结合 HPLC 进行精制，就可得成品，其纯度达到 93%。

(2)亲和技术的推广使用 利用生物亲和力可使分离的选择性大大提高，在下游加工过程的各个阶段，都正在使用或有可能使用亲和技术，除已知的亲和层析外，还有亲和分配、亲和沉淀、利用亲和膜过滤等。利用单克隆抗体的免疫吸附层析，选择性是最理想的，但介质的价格太高，急需研究改进。

(3)优质层析介质的研究 色层分离中主要困难之一是层析介质的机械强度差，对天然糖类为骨架的介质目前已研究出高交联度的产品如 Monobeads(pharmacia)和与无机介质(如硅藻土)相结合的产品。

(4)上游技术对下游过程的影响 过去上游技术的发展常不考虑下游方面的困难，致使发酵液浓度提高了，却得不到产品。还强调下游方面要服从上游方面的需要，比较被动。

现在发展的要求是,生物工程作为一个整体,上、中、下游要互相配合。上游方面已开始注意为下游提取方便创造条件,例如将原来是胞内产物的变为胞外产物或处于围膜间隙(periplasmic space);在细胞中高水平的表达形成细胞质内的包含体,在细胞破碎后,在低离心力下即能沉降,故容易分离;利用基因工程方法,使尿抑胃素(urogastrone)上接上几个精氨酸残基,使其碱性增强,而易为阳离子交换剂所吸附。

(5)发酵与提取相结合 在发酵过程中,把产物除去,以避免反馈抑制作用,其方法很多,如利用半透膜的发酵罐,在发酵罐中加入吸附树脂等。

(顾觉奋)