

生化药物的一般制备方法（6 课时）

[学习目的]

1. 学会氨基酸、蛋白质、核酸、酶类、多糖、脂类药物的一般制备方法。
2. 会比较各种制备方法的优缺点
3. 能举出不同的案例制备

[工作项目]

项目一 氨基酸类药物的一般制备方法

氨基酸类药物是指用于治疗因蛋白质代谢紊乱或缺乏所引起的一系列代谢性疾病的药物，同时也是具有高度营养价值的蛋白质营养补剂。

制备氨基酸粗品的常用方法有水解提取法、化学合成法、微生物发酵法、酶合成法等。

1. 水解提取法：最早使用的方法。

优点是原料来源丰富，投产比较容易。缺点是产量低，成本比较高。

（1）酸水解法：蛋白质水解常用的方法。在原料中加入 4 倍量的 6mol/L 的盐酸或 8mol/L 的硫酸。优点：水解完全，不引起氨基酸的消旋作用，得到的都是 L-型氨基酸。缺点：色氨酸全被破坏，含羟基的丝氨酸和酪氨酸部分被破坏。

（2）碱水解法：在蛋白质原料中加入 6mol/L 的氢氧化钠或 4mol/L 的氢氧化钡。优点：水解时间短，色氨酸不被破坏，水解液清亮。缺点：含羟基和巯基的氨基酸大部分被破坏，引起氨基酸的消旋作用。产物有 D-型氨基酸和 L-型氨基酸。

（3）酶水解法：通常利用胰酶、微生物蛋白酶等在常温下进水解。优点：反应条件温和，氨基酸不被破坏且不引起消旋作用，所需设备简单，无环境污染。缺点：蛋白质水解不彻底，中间产物较多，水解时间长。主要用于水解蛋白和蛋白胨。

2. 微生物发酵法：是指以糖为碳源，以氨或尿素为氮源，通过微生物的发酵繁殖，直接生产氨基酸；或是利用菌体的酶系，加入前体物质合成特定氨基酸的方法。基本过程有菌种培养、接种发酵、产品提取和分离纯化等。所需菌种为细菌、酵母菌，早期多为野生型菌株。优点：直接生产 L-型氨基酸，原料丰富，成本低。缺点：产物浓度低，生产周期长，设备投资大，有副反应，单晶体的氨基酸分离较复杂。

3. 化学合成法：制备氨基酸的重要途径之一。优点：可以采用多种原料和多条工艺路线，适合工业化生产，产品易分离纯化；缺点：生产工艺复杂，生产出的氨基酸需拆分才能得到 L-型氨基酸。

4. 酶合成法：是指在特定酶的作用下使某些化合物转变为相应氨基酸的技术。优点：产物浓度高，副产物少，成本低，周期短，收率高，固定化酶或细胞可连续反复使用，节省能源。

案例

胱氨酸的制备：酸水解，取之于毛发，用于毛发的生长；

蛋氨酸的制备：化学合成，用甘油和其它化学试剂合成；

项目二 多肽类和蛋白质类药物制备的一般方法

1. 材料的选择：先考虑来源丰富、目的物含量高、成本低的材料；还应考虑生物的种类、发育阶段、生物状态、解剖部位等。

案例

猪垂体的生长素对人体无效，不能用于人体；
饱食后动物的胰腺分泌胰岛素增加，有利于胰岛素的提取分离；
杀菌肽提取前必需用大肠杆菌免疫过蚕蛹；
胸腺素提取必需是小牛或胎牛的胸腺。

2. 提取前的处理：机械法、物理因素法、化学法和酶解法。

3. 提取：（1）水溶液提取：水溶液是蛋白质提取常用的溶液。

影响因素：A、盐浓度：一般用等渗盐浓度，如 0.02~0.05mol/L 的磷酸盐缓冲溶液或 0.15mol/L 的氯化钠溶液；

B、PH 值：选择偏离 PI 点附近的两侧，一般含碱性氨基酸残基较多的蛋白质选偏酸的 PH 值，含酸性氨基酸残基较多的蛋白质选择偏碱的 PH 值。

C、温度：为防止蛋白质的变性和降解失活，一般在低温（5℃以下）下操作。

（2）有机溶剂提取：常用不同比例的有机溶剂提取。如正丁醇（亲水性兼具亲脂性）。

4. 纯化：包括两方面的内容。一是将蛋白质与非蛋白质分离，二是将不同的蛋白质分开。常用的方法有：利用溶解度不同进行的纯化；利用分子形状和大小不同进行的纯化；利用电离性质不同进行的纯化；利用生物功能专一性不同进行的纯化。

5. 含量测定：方法有凯氏定氮法、紫外分光光度法、福林-酚试剂法等

6. 纯度鉴定：方法有电泳法、高速离心法、可结晶性、恒定的氨基酸比等。

项目三 核酸及其衍生物类药物的制备

核酸类药物是一切可以用于药用的核酸、核苷酸、碱基及其类似物。

（一）RNA 的制备

1. 材料的选择和预处理

RNA 的材料大多选取动物的肝、肾、脾等含核酸量丰富的组织。

在工业生产上，主要采用啤酒酵母、面包酵母、酒精酵母、白地霉、青霉等真菌的菌体为原料，因为它们的 RNA 含量丰富，易提取，DNA 的含量很少。

动物组织的预处理过程是：先把组织捣碎，制成组织匀浆，然后用 0.14mol/L 的 NaCl 溶液溶解 RNA，将组织中的 RNA 核蛋白提取出，调节 PH 值为 4.5 时，RNA 在溶液中而核蛋白则成为沉淀。

真菌菌体的预处理采用的是先将 RNA 从细胞中释放出来，然后进行提取、纯化的方法。

如可用 1%的 NaOH 在 25℃左右处理酵母的菌体，使细胞壁变性，释放 RNA，然后用 6mol/L 的 HCl 中和，PH 为 7 时加热至 90~100℃处理 3~4 小时，破坏使核酸分解的酶。接着快速冷却至 10℃以下，这时 RNA 溶解在清液中而蛋白质和菌体残渣沉淀出去。

2. 提取与纯化：

(1) 提取：方法如 (a) 乙醇沉淀法；(b) 去污剂处理法；(c) 酚法：能得到未被降解的 RNA。

(2) 纯化：方法如：(a) 密度梯度离心法；(b) 柱层析法；(c) 凝胶电泳法。

3. 含量测定

方法：(1) 定磷法：必须将 RNA 中的磷水解成无机磷。常用浓硫酸或过氯酸将 RNA 消化，使其中的磷变为正磷酸。正磷酸在酸性条件下与钼酸作用变为磷钼酸，在还原剂的作用下成为钼蓝。钼蓝在 660nm 处有最大吸收峰，通过测定样品吸收度，可作标准曲线算出样品含磷量。

(2) 定糖法：先用 HCl 水解 RNA，使核糖游离出来，并进一步变成糠醛，然后再与地衣酚（苔黑酚）反应。产物呈鲜绿色，在 670nm 处有最大吸收度，光吸收度与 RNA 含量成正比，可测出 RNA 的含量。

案例

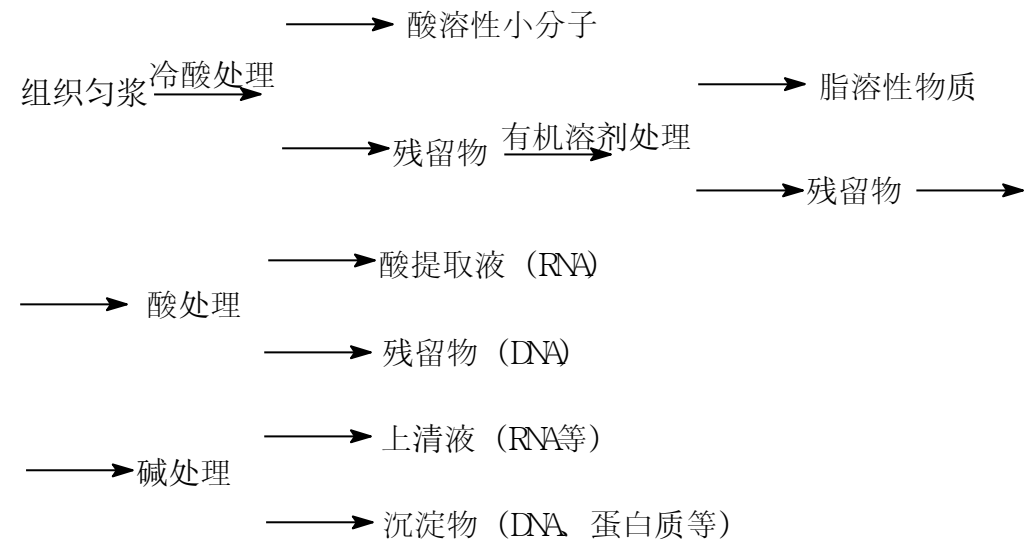
实验室 RNA 提取：用酵母做原料

(二) DNA 的制备

1. 原料的选择和预处理

制备 DNA 的材料一般用小牛胸腺或鱼精，这类组织细胞小，DNA 含量高。预处理与 RNA 相似。

2. 提取与纯化：可采用与 RNA 相似的方法。



3. 含量测定

方法：(1) 定磷法：与 RNA 相同，DNA 含磷 9.9%。

(2) 定糖法（二苯胺法）：在酸性溶液中，将 DNA 与二苯胺共热，生成蓝色化合物，在 595nm 处有最大吸收度。光吸收度与 DNA 浓度成正比，可测出 DNA 的含量。

案例

实验室 DNA 提取：用动物肝脏做原料

(三) 核苷酸、核苷、碱基等的制备

1. 直接提取法：如 ATP 可以从兔子的肌肉中直接提取；
2. 水解法：酸水解、碱水解、酶水解
3. 微生物发酵法
4. 化学合成法
5. 酶合成法

项目四 酶类药物

1. 概述

酶（enzyme）是具有催化功能的蛋白质（protein）。存在于细胞内的酶称为胞内酶，在细胞外的酶称为胞外酶。药用酶最早是从动物脏器中提取的，后来发展从微生物发酵液中提取。

酶类药物是直接利用酶的各种剂型以改变体内酶的活力，或改变体内某些生理活性物质和代谢产物的数量等，从而达到治疗某些疾病的目的。

随着酶类药物在治疗上的应用，对其品种和剂型以及纯度都提出了新的要求，如以下几点：

- (1) 在生理 PH（中性环境）下具有最高活力和稳定性。
- (2) 对其作用的底物具有较高的亲和力。
- (3) 在血清中半衰期较长。即要求药用酶从血清中的清除率较慢，以利于酶充分发挥治疗作用。
- (4) 要求纯度高，特别是对注射用的酶类药物纯度要求更高。
- (5) 由于酶的化学本质是蛋白质，酶类药物都不同程度的存在免疫原性的问题。因此，应寻求制备免疫原性较低或无免疫原性的酶。为了克服酶被体内蛋白酶水解和产生抗原抗体反应，将酶包埋在半透性的胶囊中，利用膜的性质只让酶与底物反应后的产物通过，而不让酶通过。

案例

酶类药物延长血清中半衰期的方法：制剂时添加右旋糖苷、肝素等

2. 酶类药物的一般制备方法

酶的制备一般包括四个步骤：酶的原材料的选择和预处理、酶的提取、酶的纯化、酶活力的测定和纯度检测。

（1）酶的原材料的选择和预处理：

原材料的选择依据制备的酶而异。一般选择酶来源丰富、取材容易、材料价廉为原则。如：用男性尿提取尿激酶，从血清中提取溶菌酶等。

利用细胞培养技术可以在体外大规模培养动植物细胞，可获得大量原来极为珍贵的酶的原料。利用基因工程重组 DNA 技术，能使某些含量极微的酶的纯化成为可能。

原材料的预处理方法有：机械法、冻融法、超声波处理法、酶解法、丙酮粉法等。

（2）酶的提取

A 水溶液法：一般胞外酶和细胞内游离的酶可用此法提取。常用等渗或低浓度的盐溶液或缓冲溶液提取，如用 0.02~0.05mol/L 磷酸盐缓冲溶液或 0.15mol/L 氯化钠溶液等。提取溶剂的 PH 值的一般规律是酸性蛋白酶用碱性溶液提取，碱性蛋白酶用酸性溶液提取。

B 有机溶剂法：对某些与微粒体膜和线粒体膜结合的结合酶，由于和脂质结合牢固，必须用有机溶剂除去结合的脂质，且不能使酶变性。最常用的有机溶剂是正丁醇。正丁醇亲脂性强且兼有亲水性。

C 表面活性剂法：表面活性剂有亲水性和疏水性的功能基团，分为阴离子型、阳离子型和非离子型。非离子型表面活性型比离子型较温和，不易引起酶失活，所以常使用。

3. 酶的纯化

（1）杂质的去除：主要方法有

PH 或加热沉淀法：利用蛋白质对酸、碱和热变性方面的差异，可以通过调 PH 和等电点、加热使杂蛋白变性加以除去。如：胰蛋白酶、溶菌酶等在酸性条件下可加热到 90℃ 不被破坏，而除去大量杂蛋白。

蛋白质表面变性法：利用蛋白质不同的表面变性的性质，也可去除杂蛋白。

选择性变性法：利用不同的蛋白质对变性剂的稳定性差异，可以选择某种变性剂。

加保护剂的热变性法：利用酶和底物、辅酶、竞争性抑制剂结合可增大酶和杂蛋白之间的耐热性差别，所以常用其作为保护剂，再用加热的手段破坏杂蛋白。

核酸沉淀剂法：用微生物等为原料的抽提液中常含有大量核酸，可加硫酸链霉素、鱼精蛋白和二氧化锰等使之沉淀去除。

（2）脱盐和浓缩

脱盐：粗酶常需要脱盐。常用的方法有透析和凝胶过滤。

浓缩：提取液或发酵液中的酶浓度一般都很低，所以要加以浓缩。常用的浓缩方法有：蒸发、超滤法、凝胶吸水法、冷冻干燥法。

（3）酶的结晶

通常当酶的浓度达到 50% 以上就可以结晶。结晶既是一种酶是否纯化的标志，也是一种酶和杂蛋白分离纯化的手段。

一般酶的结晶需要几种方法：盐析法、有机溶剂法、透析平衡法、等电点法。

案例

溶菌酶提取：取鸡蛋清，用食盐、乙酸等进行提取，的黄绿色液体，结晶需加晶体。

4. 酶的活力测定和纯度检测

(1) 活力测定：各种测定酶活力的方法都必须符合以下条件：

酶催化作用的反应时间应选择在初速度范围内；

测定用的酶量必须和测得的活力呈线性关系。

(2) 纯度检测：在酶的分离提纯中，总活力用于计算某一抽提或纯化步骤后酶的回收率（Y），而比活力则用来计算某一纯化步骤的效果，即纯度的提高（E），其计算如下：

$Y = \text{某步骤后的总活力} / \text{某步骤前的总活力}$

$E = \text{某步骤后的比活力} / \text{某步骤前的比活力}$

酶的回收率和纯度的检测能帮助选择纯化方法和条件。

由于酶分子较复杂，由某种方法测定为均一的酶制剂，用另一种方法检测结果可能不一致。因此，须注明酶的纯度达到哪种纯度，如电泳纯、层析纯、免疫效价等。

项目五 糖类药物

糖类药物主要是多糖类物质，如微生物中提取到的香菇多糖、灵芝多糖、猴头菌多糖、银耳多糖等；植物中的黄芩多糖、人参多糖、海藻多糖；动物中提取到的肝素、硫酸软骨素、玻璃酸等。

糖类药物的功能：抗凝、抗血栓、调血脂、调节免疫功能、抗肿瘤和抗辐射能力都有显著的药理作用和疗效。

多糖类药物的一般分离、纯化方法

1. 提取原理：在组织中与蛋白质相连接，三种方式：（1）在木糖与丝氨酸羟基之间的一个 O-糖苷键；（2）在 N-乙酰半乳糖与丝氨酸或苏氨酸羟基之间的一个 O-糖苷键；（3）在 N-乙酰基葡萄糖与天冬酰胺的酰胺基之间的一个 N-氨基糖残基的键。

2. 粘多糖的提取：

（1）非降解法：是指用水或盐溶液从动物组织中提取粘多糖的方法。适合于与其它组织结构连接不牢固的粘多糖或其蛋白复合物的提取，如从玻璃体、脐带、关节滑液中提取玻璃酸。缺点：提取的粘多糖结合有蛋白质，需要用酶解法去除。

（2）降解法：

A 碱处理法：优点：可以较完全的提取；

缺点：粘多糖分子有从裂解的一端被碱进一步降解的可能，应尽可能避免高温。

B 酶处理法：用蛋白酶消化，常选专一性低的酶。如胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、链霉蛋白酶、糜蛋白酶等。

3. 粘多糖的纯化

(1)去掉残蛋白的方法：等电点沉淀法、加热变性法、蛋白质沉淀剂法等

(2)去掉小分子物质常用的方法：透析和超滤

(3)有色物质：氧化法（常用的氧化剂为高锰酸钾和过氧化氢），但可使粘多糖末端的醛基氧化成羧基，应慎用。

4.粘多糖的分级分离

(1)乙醇沉淀：从溶液中定量回收粘多糖的简单方法。

影响因素：粘多糖的浓度：1%~2%，过高则沉淀趋向于糖浆状难以分离，过低则需要乙醇量增大

盐浓度：5%即可，常用氯化钠和醋酸盐，醋酸盐优点：在乙醇中溶解度高，在使用过量乙醇溶液时，不至于沉淀

乙醇浓度：在足够盐存在的条件下，一般用4~5倍量的乙醇即可。

(2)季铵化合物沉淀：粘多糖的聚阴离子与某些表面活性物质，如十六烷基三甲基溴化氢（CTAB）能形成季铵盐络合物，这些络合物在低离子强度的水溶液中不溶解。在离子强度大时可解离并溶解。不同的粘多糖带的聚阴离子电荷不同，可用不同浓度的盐溶液进行分级分离。

(3)离子交换层析：粘多糖由于具有酸性基团如糖醛酸羧基和各种硫酸基，在溶液中以聚阴离子的形式存在，可以用阴离子树脂进行交换吸附层析。

(4)凝胶过滤分离：根据粘多糖分子量大小不同，可选用合适的分子筛，如葡聚糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶、琼脂糖凝胶等进行分离。

(5)超滤分离：选择合适的分子量截留膜，优点：可用于大规模的生产。

案例

香菇多糖、灵芝多糖的提取：从干香菇或鲜香菇中提取香菇多糖，从灵芝提取灵芝多糖，具有提高免疫力，抗肿瘤，防癌的功效。

项目六 脂类药物

脂类药物的分类有：胆酸类，如胆酸钠、鹅去氧胆酸、去氢胆酸等；不饱和脂肪酸类，如亚油酸、亚麻酸、花生四烯酸；磷脂类，如卵磷脂、脑磷脂；固醇类，如胆固醇；色素类，如胆色素、胆绿素、血红素；其他，如鲨烯。

脂类药物的药理作用和临床应用都不太相同，如胆酸钠具有乳化脂肪、促进脂肪吸收等作用，临床上用于治疗胆囊炎或消化不良等疾病；鱼油多不饱和脂肪酸具有调血脂作用临床上用于预防动脉粥样硬化，防治高血脂症等；胆红素为抗氧化剂，有清除自由基作用，可用于消炎。

1.脂类药物的制备方法：

直接提取法：胆酸和胆红素可以从胆汁中提取；

化学合成法：去氢胆酸可用半合成制备；

微生物发酵法：辅酶Q10可用烟草细胞培养生产；

酶转化法：前列腺素 E2

2.纯化方法：

丙酮沉淀法：利用不同脂质在丙酮中的溶解度不同进行分离，如大部分磷脂不溶于冷丙酮，而中性脂质溶于冷丙酮。

吸附层析：硅胶、氧化铝、硅酸镁等。

离子交换层析：常用的纯化方法。

案例

胆红素和胆色素的提取：从胆汁中提取，具有消炎的功效。

[综合实训]

结合理论知识，自己按照应用实例设计一种生化药物的制备，要求有工艺路线和具体操作。