



## 第三章 沉淀分离技术

沉淀技术是药物分离纯化过程中最常用和最简单的分离方法之一，它是利用加入试剂或改变条件使物质从溶液中析出，生成不溶性颗粒而沉降。当沉淀的是杂质时，则可以去除杂质；当沉淀的是目标物质时，则可收集目标物质。因此，沉淀可以用来去除杂质或是收集目标产物。

沉淀可分为晶形沉淀和非晶形沉淀。当析出物为晶体时，称之为晶形沉淀。析出物为无定形固体时称为非晶形沉淀。前者是条件变化缓慢时，溶质分子具有足够时间进行排列，有利于晶体形成，通常需要放置一段时间进行陈化。只有同类分子或离子才能排列成规则的结构，故结晶法具有高度的选择性，析出的晶体纯度比较高，这在后续的成品化阶段中介绍。相反，当条件变化剧烈时，强迫快速析出，溶质分子来不及排列就析出，结果形成无定形沉淀，通常不一定需要陈化阶段。

在这一章中重点介绍的是非晶形沉淀，沉淀具有分离与浓缩的双重效果。虽然，沉淀分离需经过过滤、洗涤等程序，操作较繁琐费时，某些组分的沉淀分离选择性较差，所得的沉淀物可能聚集有多种物质，或含有大量的盐类，或包裹着溶剂，分离不完全，但由于应用范围广、不需特殊设备，仍然是一种较常用的分离方法。常用的沉淀法主要有等电点沉淀法、盐析法、有机溶剂沉淀法等。



### 基础知识

沉淀分离技术，也称作沉淀分离法，是利用沉淀反应把待测组分与干扰组分分离的方法。即在样品溶液中加入适当沉淀剂，控制一定条件使某一组分以一定组成的固相形式析出（如图 3-1），经过滤、离心等方法将固液两相分开，从而达到分离的目的。

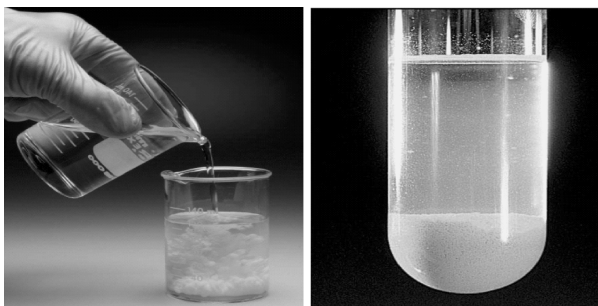


图 3-1 沉淀

## 一、物理沉淀法和化学沉淀法

### 1. 物理沉淀法

利用固体颗粒和悬浮物的物理性质将其从溶液中分离去除的方法称为物理沉淀法。物理沉淀法的主要处理对象是溶液中的漂浮物、悬浮物以及颗粒物质。物理沉淀法的最大优点是简单易行，效果良好，费用较低。

### 2. 化学沉淀法

化学沉淀法是向溶液中投加某种化学物质，使它与溶液中的溶解物质发生化学反应，生成难溶于水的沉淀物，以降低溶液中溶解物质的方法。一般用于金属离子的去除或者是沉淀分析。

## 二、蛋白质的理化性质

### 1. 两性解离和等电点

(1) 两性解离 蛋白质可以在酸性环境中与酸中和成盐而游离成正离子，即蛋白质分子带正电，在电场中向阴极移动；在碱性环境中与碱中和成盐而游离成负离子，即蛋白质分子带负电，在电场中向阳极移动。以“P”代表蛋白质分子，以 $\text{—NH}_2$ 和 $\text{—COOH}$ 分别代表其碱性和酸性解离基团，随 pH 变化，蛋白质的解离反应可简示如图 3-2。

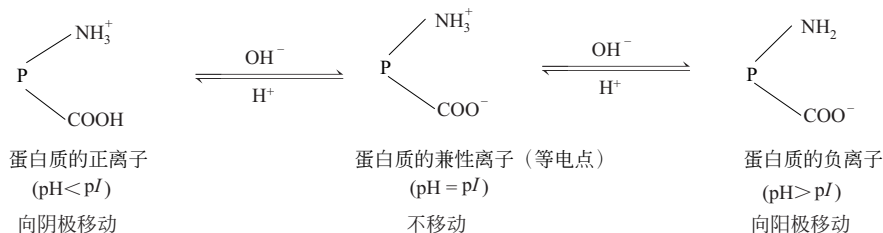


图 3-2 蛋白质的解离反应

一般来说，含有酸碱性基团的具有两性解离的物质，均具有等电点，例如核酸、DNA 和 RNA。

(2) 等电点性质 当溶液在某一特定的 pH 条件下，蛋白质分子所带的正电荷数与负电荷数相等，即净电荷数为零，此时蛋白质分子在电场中不移动。这时溶液的 pH 称为该蛋白质的等电点，用  $\text{pI}$  表示。此时蛋白质的溶解度最小。

### 2. 胶体性质

蛋白质的分子量很大，球状蛋白质的表面多亲水基团，具有强烈吸引水分子作用，使蛋白质分子表面常为多层水分子所包围。实验证明，每 1g 蛋白质可以结合约 0.3~0.5g 的水，使蛋白质分子表面形成一层水化层，称水化层（如图 3-3）。

蛋白质分子表面具有许多可解离的基团，因此在一定的 pH 条件下，能与其周围电性相反的离子形成所谓双电层（如图 3-4）。

水化层和双电层这两种稳定的因素，使蛋白质溶液成为亲水的胶体溶液。同时由于水化层和双电层的存在，蛋白质颗粒彼此不能接近，因而增加了蛋白质溶液的稳定性，阻碍蛋白质胶粒从溶液中沉淀出来。故它在水中能够形成胶体溶液。

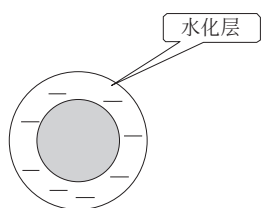


图 3-3 带负电荷蛋白质的水化层

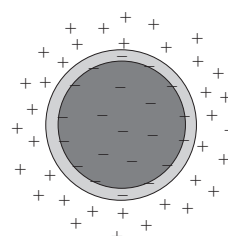


图 3-4 带负电荷蛋白质的双电层

蛋白质溶液具有胶体溶液的典型性质，如丁达尔现象、布朗运动、凝聚作用等。胶体中胶粒在适当的条件下相互结合成直径大于 100nm 的颗粒而沉淀或沉积下来，如在胶体中加入适当的物质（电解质），胶体中胶粒相互聚集成沉淀。

### 3. 沉淀作用

蛋白质胶体溶液的稳定性决定于其颗粒表面的水化层和电荷。当这两个因素遭到破坏后，蛋白质溶液就失去稳定性，并发生凝聚作用，沉淀析出，这种作用称为蛋白质的沉淀作用（如图 3-5）。

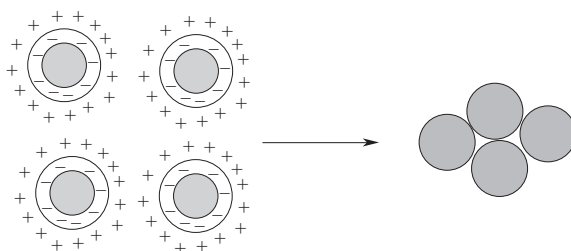


图 3-5 蛋白质的沉淀作用

蛋白质的沉淀作用主要有两种：第一制备有活性的天然蛋白质制品；第二，从样品中除去杂蛋白，或者制备失去活性的蛋白质制品（一些变性的蛋白质更有利于人体消化）。根据蛋白质的结构是否破坏，将沉淀分为以下两种。

**(1) 可逆沉淀** 可逆沉淀的蛋白质结构和性质都没有发生变化，在适当的条件下，可以重新溶解形成溶液，所以这种沉淀又称为非变性沉淀。一般是在温和条件下，改变溶液的 pH 或电荷状况，使蛋白质从胶体溶液中沉淀分离。可逆沉淀是分离和纯化蛋白质的基本方法，如等电点沉淀法、盐析法和有机溶剂沉淀法等。

**(2) 不可逆沉淀** 在蛋白质的沉淀过程中，产生的蛋白质沉淀不可能再溶解于水中。在强烈沉淀条件下，不仅破坏了蛋白质胶体溶液的稳定性，而且也破坏了蛋白质的结构和性质。由于沉淀过程蛋白质的结构和性质发生了变化，所以又称为变性沉淀，因此该方法主要用于去除杂蛋白。

### 4. 蛋白质变性

蛋白质的性质与它们的结构密切相关。某些物理或化学因素，能够破坏蛋白质的结构状态，引起蛋白质理化性质改变并导致其生理活性丧失。这种现象称为蛋白质的变性。

变性蛋白质通常都是固体状态物质，不溶于水和其他溶剂，也不可能恢复原有蛋白质所具有的性质。所以，蛋白质的变性通常都伴随着不可逆沉淀。引起变性的主要因素是热、紫外线、剧烈的搅拌以及强酸和强碱等。

### 三、溶液的离子强度

离子强度是溶液中离子浓度的量度，是溶液中所有离子浓度的函数。离子化合物溶于水时，会解离成离子。水溶液中电解质的浓度会影响到其他盐类的溶解度。尤其是当易溶的盐类溶于水中时，会大幅降低难溶盐类的溶解度，这种影响的强弱程度就称为离子强度。

## 第一节 等电点沉淀法

### 一、等电点沉淀法的基本原理和特点

#### 1. 原理

两性生物物质在溶液 pH 处于等电点时，分子表面电荷为零，导致赖以稳定的双电层及水化层削弱或破坏，分子间静电排斥作用减弱，因此吸引力增大，能相互聚集起来，发生沉淀（如图 3-6）。

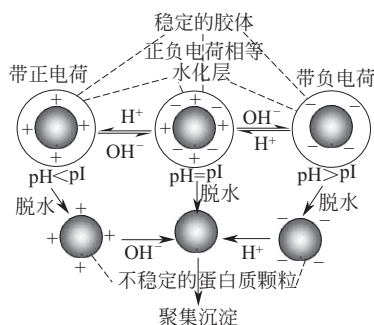


图 3-6 等电点沉淀原理

#### 2. 特点

等电点沉淀法操作简单，试剂消耗少，给体系引入的外来物也少，是一种有效的初级分离方法。一般强酸强碱易使蛋白质变性、酶失活，所以宜采用弱酸、弱碱。

由于一般蛋白质的等电点多在偏酸性范围内，故在等电点操作中，多通过加无机酸（如盐酸、磷酸和硫酸等）调节 pH 值，而无机酸的成本比较低。这种方法适用于疏水性强的蛋白质，例如酪蛋白、大豆蛋白，在等电点  $pI = 4.5 \sim 5$  时溶解度较小（如图 3-7），能形成凝聚物，固相析出。

需要指出的是单独利用等电点分离效果并不理想，对一些亲水性强的蛋白质。如明胶、乳清蛋白，调 pH 在等电点时，溶解度仍然很好，并不产生沉淀，因此常需要等电点沉淀法与盐析法和有机溶剂沉淀法并用。

但要注意当向溶液中加入中性盐时，会使有的蛋白质溶液等电点发生偏移，影响沉淀分离效果，因此一般先加盐，再调溶液 pH 值到其等电点。

### 二、等电点沉淀法的影响因素

#### 1. 杂质种类

由于酸碱氨基酸比例相近的蛋白质其等电点大多为中性偏酸（pH 约为 5.0），所以混合液中可能存在许多等电点相近的两性电解质，如乳清蛋白、大豆蛋白、酪蛋白等，其等电点非常接近，不利于等电点沉淀分离。

发酵液中含有不利于等电点提取的物质较多时，单独使用此法效果差。例如在谷氨酸的

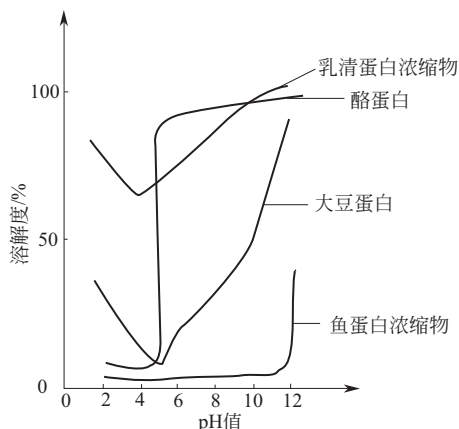


图 3-7 不同蛋白质在等电点时的溶解度

发酵生产过程中，从发酵液提取粗制的谷氨酸常用的方法是低温等电点工艺。等电点法提取谷氨酸，谷氨酸发酵液不经过除菌或不经过浓缩处理，其收率的高低，直接取决于发酵液的优劣。但是在实际工业生产中由于菌种、原料、设备或者操作的原因，发酵液含有不利于等电点提取的有害物质较多，出现如生物蛋白（包括植物性和动物性）以及胶体物质含量较高、黏性增强、泡沫大、酮酸高等异常情况，严重的尚有絮状不溶性悬浮物存在，致使不容易用等电点法沉淀发酵液。

## 2. 离子强度

蛋白质有盐溶和盐析两面性，等电点的数值随着溶液中中性盐离子的种类和浓度变化而变化。不同 pH 值条件下，大豆蛋白质的离子强度与其溶解度变化曲线是不同的（如图 3-8），致使等电点发生改变，可见离子强度对等电点的沉淀作用影响较大。

## 三、等电点沉淀法的操作

### 1. 操作方式

等电点沉淀法是利用蛋白质在等电点时溶解度最低而各种蛋白质又具有不同等电点的特点进行分离的方法。

等电点沉淀操作需要在低离子浓度下调整溶液的 pH 至等电点，或在等电点的 pH 下利用透析等方法降低离子强度，使蛋白质沉淀。

大豆蛋白溶液的  $pI$  为 4~5 时，在该 pH 值下溶解度最低，因此大豆蛋白的提取工艺中（见图 3-9），步骤③酸沉，用盐酸调 pH 到 4.5 左右后，静置，离心取沉淀。

不同蛋白质氨基酸组成不同，等电点不同。调节蛋白质混合溶液的 pH 值，可使它们分次沉淀析出。根据这一特性，用依次改变溶液 pH 的办法，可将不同的蛋白质分别沉淀析出，从而达到分离纯化的目的。例如，在碱性磷酸酯酶的等电点沉淀提取工艺中，发酵液 pH 值先调至 14.0 后出现含碱性磷酸酯酶的沉淀物，离心收集沉淀物。然后用 pH9.0 的 0.1mol/L Tris-HCl 缓冲溶液重新溶解，加入 20%~40% 饱和度的硫酸铵分级，离心收集的沉淀用 Tris-HCl 缓冲液再次沉淀，即得较纯的碱性磷酸酯酶。

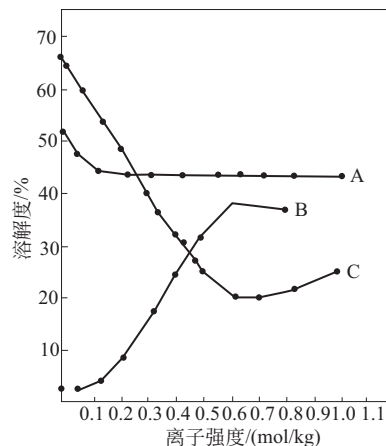


图 3-8 大豆蛋白质的离子强度与溶解度关系图

A—pH6.8；B—pH4.7；C—pH2.0

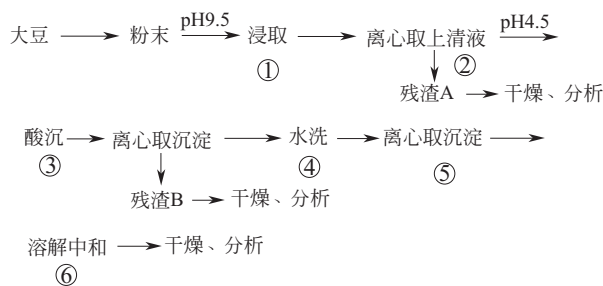


图 3-9 大豆蛋白的碱提酸沉工艺

表 3-1 不同蛋白质等电点

蛋白质名称	来源	等电点	蛋白质名称	来源	等电点
白明胶	动物皮	4.0~4.1	胰蛋白酶	胰液	5.0
乳清蛋白	牛乳	5.12	胃蛋白酶	猪胃	2.75
酪蛋白	牛乳	4.6	鱼精蛋白	蛙鱼精	12.0~12.4
卵清蛋白	鸡蛋	4.5	丝蛋白	蚕丝	2.0~2.4
卵球蛋白	鸡蛋	5.5~5.8	胶原蛋白	动物皮	4.8~5.2
血清清蛋白	马血	4.88	麦胶蛋白	小麦	6.5
血清球蛋白	马血	5.4~5.5	乳球蛋白	牛乳	4.5~5.5
肌球蛋白	肌肉	5.2~5.5	麻仁蛋白	麻仁	5.5~6.0
胰岛素	猪胰脏	5.35~5.45	大豆蛋白	大豆	4.5

2. 注意事项

① 不同的蛋白质，具有不同的等电点（如表 3-1）。在药物纯化过程中应根据分离要求，除去目的产物之外的杂蛋白；若目标产物也是蛋白质，可先除去高于等电点的杂蛋白，再去除低于等电点的杂蛋白。因此等电点沉淀法可用于两性生物物质的收集，也可用于除去杂蛋白及其他杂质，在实际工作中普遍用等电点沉淀法作为除杂手段。

例如，胰岛素的等电点为 5.35~5.45，在工业上生产胰岛素时，可以先将粗提取液调 pH 至 8.0 去除碱性蛋白质杂质，再调 pH 为 3.6 去除酸性蛋白质杂质（如图 3-10）。

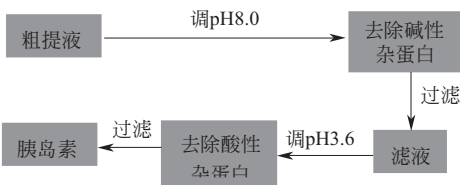


图 3-10 工业生产中胰岛素除杂

② 同一种蛋白质在不同条件下，等电点不同。在盐溶液中，蛋白质若结合较多的阳离子，则等电点值升高。因为结合阳离子后，正电荷相对增多，只有 pH 值升高才能达到等电点状态。如胰岛素在水溶液中的等电点为 5.3，在含一定浓度锌盐的水-丙酮溶液中的等电点为 6。如果改变锌盐的浓度，等电点也会改变。因此加入金属离子后选择等电点沉淀蛋白质时，必须注意调整 pH。蛋白质若结合较多的阴离子（如  $\text{PO}_4^{3-}$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$  等），则等电点移向较低的 pH 值，因为负电荷相对增多，只有降低 pH 值才能达到等电点状态。

③ 目的活性成分对 pH 值的要求。生产中应避免直接用强酸或强碱调节 pH 值，以免局部过酸或过碱，而引起目的活性成分蛋白质或酶变性。另外，调节 pH 值所用的酸或碱应与





原溶液中的盐或即将加入的盐相适应。

例如溶液中含硫酸铵时，可用硫酸或氨水调 pH 值；如原溶液中含有氯化钠时，可用盐酸或氢氧化钠调 pH 值，应以不增加新物质为原则。

④ 等电点沉淀法只适用于水化程度不大，在等电点时溶解度很低的两性生物物质，如酪蛋白。对于亲水性很强的两性生物物质，在等电点及等电点附近仍有相当的溶解度（有时甚至比较大），用等电点沉淀法往往沉淀不完全，加上许多生物分子的等电点比较接近，故很少单独使用等电点沉淀法，往往与盐析法、有机溶剂沉淀法等多种沉淀方法结合来实现沉淀分离。例如，在工业上生产胰岛素时，除去杂质时，均加入一定量有机溶剂以提高沉淀效果。

总之，在考虑生物蛋白质对提取的影响时，一定要注意，不同种类的蛋白质，具有不同的等电点，在中和过程中时刻要关注蛋白质絮状物的变化，而且其 pH 值一定要控制在一定范围内，否则，会使其他一些物质遭到破坏造成严重的经济损失。同时这也提醒我们在工业生产中要注意发酵液的变化和酸的加入要注意均匀，不可使局部 pH 过低，这可能会引起其他物质变性。

## 第二节 盐析法

### 一、盐析法的基本原理和特点

#### 1. 原理

在高浓度中性盐存在的情况下，蛋白质（或酶）等生物大分子在水溶液中的溶解度降低并沉淀析出的现象称为盐析。

盐析原理主要有两点：①高浓度的中性盐溶液中存在大量的带电荷的盐离子，它们能中和蛋白质分子的表面电荷，使蛋白质分子间的静电排斥作用减弱甚至消失而能相互靠拢，聚集起来；②中性盐的亲水性比蛋白质大，它会抢夺本来与蛋白质结合的自由水，使蛋白质表面的水化层被破坏，导致蛋白质分子之间的相互作用增大而发生凝聚，从而沉淀析出。如图 3-11 所示。

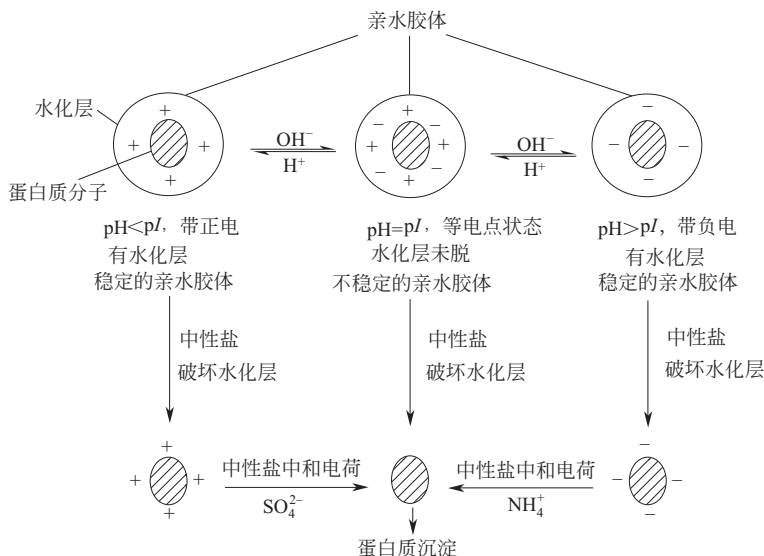


图 3-11 盐析原理

## 2. 特点

不同的蛋白质盐析时所需的盐的浓度不同,因此调节盐的浓度,可以使混合蛋白质溶液中的蛋白质分段析出,达到分离纯化的目的。不仅蛋白质,许多生化物质都可以用盐析法进行沉淀分离,如多肽、多糖、核酸、酶等。例如 20%~40% 饱和度的硫酸铵可以使许多病毒沉淀;使用 43% 饱和度的硫酸铵也可以使 DNA 和 rRNA 沉淀,而 tRNA 保留在上清液中。但盐析法应用最广的还是在蛋白质领域内。盐析法具有许多突出的优点:经济、安全、操作简便,不需特殊设备,应用范围广泛,不容易引起蛋白质变性。但盐析法由于共沉作用,不是一个高分辨的方法,需和其他方法交替使用,一般用于生物分离的粗提纯阶段。

**【难点解答】**盐析过程中,中性盐加入时蛋白质的溶解度先增加,后减小,其原因何在?

在蛋白质水溶液中,加入少量的中性盐,如硫酸钠、氯化钠等,会增加蛋白质分子表面的电荷,增强蛋白质分子与水分子的作用,从而使蛋白质在水溶液中的溶解度增大。这种现象称为盐溶。

而加入高浓度的中性盐,盐离子夺取蛋白质表面水分子,破坏了蛋白质分子表面的水膜,大量中和蛋白质颗粒上的电荷,使蛋白质在水溶液中的溶解度减小,从而使水中蛋白质颗粒积聚而沉淀析出。这种现象称为盐析。

## 二、盐析的影响因素

### 1. 盐的离子强度

在盐析时,蛋白质的溶解度与溶液中离子强度关系如图 3-12 所示,可用下式(Cohn 经验方程)表示:

$$\lg S = \lg S_0 - K_S \times I$$

$$\lg S_0 = \beta$$

式中, $S_0$ 是蛋白质在纯水(离子强度  $I=0$ )中的溶解度; $S$ 为蛋白质在离子强度为  $I$  的溶液中的溶解度, $K_S$ 为盐析常数,图中表示为方程斜率,与温度和 pH 无关,与盐和蛋白质的种类有关。不同的蛋白质在同一种盐溶液中的  $K_S$  值不同, $K_S$  值愈大,盐析效果愈好。 $\beta$  为方程截距  $\lg S_0$ ,与盐的种类无关,与温度、pH 和蛋白质种类有关。当温度和 pH 一定时, $S_0$  仅取决于蛋白质的性质。因此对于同一蛋白质,在一定温度和 pH 时, $\beta$  是常数。

从上述公式可知在温度和 pH 一定的同一种盐溶液中,不同蛋白质有各自一定的  $\beta$  和  $K_S$  值。可以通过改变盐的离子强度来分离不同的蛋白质。这种方法称  $K_S$  分段(分级)盐析法。对于同一种盐溶液,如果保持离子强度不变,通过改变温度和 pH 来改变  $\beta$  值,也可达到盐析分离的目的。这种方法称为  $\beta$  分段(分级)盐析法。

盐的离子强度是影响蛋白质盐析的重要因素。由于不同的蛋白质,其结构和性质不同,盐析时所需盐的离子强度也就不同。几种蛋白质在不同离子强度下的盐析效应如图 3-13 所示,由此可见,在盐析区,离子强度越大,蛋白质的溶解度越低。在进行分离的时候,通常从低离子强度到高离子强度顺次进行。

由于盐的离子强度与其浓度密切相关,在实际操作中,加入盐的浓度一般以饱和度(饱和溶液的饱和度定为 100%)表示,常以调整盐的饱和度来控制分级盐析的效果。每一组分被盐析出来后,经过过滤或冷冻离心收集,再在溶液中逐渐提高中性盐的饱和度,使另一种蛋白质组分盐析出来。例如用硫酸铵盐析分离血浆中的蛋白质,饱和度达 20% 时,纤维蛋白原首先





析出；饱和度增至 28%~33% 时，血红蛋白析出；饱和度再增至 33%~50% 时，假球蛋白析出；饱和度大于 50% 以上时，清蛋白析出；最后饱和度达到 80% 时，肌红蛋白析出。

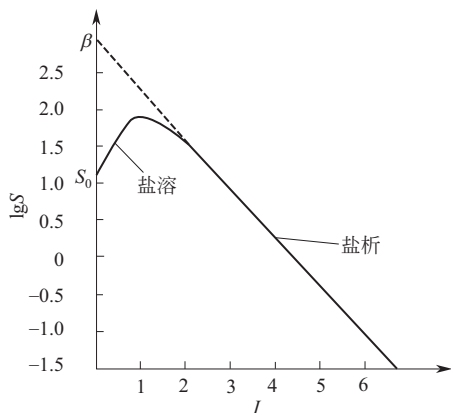


图 3-12 碳氧血红蛋白的溶解度  $S$  与  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  离子强度  $I$  的关系

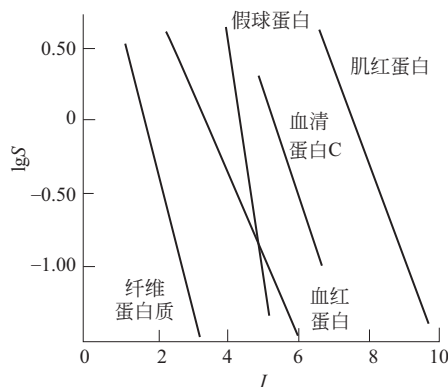


图 3-13 不同蛋白质溶解度  $S$  与离子强度  $I$  的关系

一般来说，组成相近的蛋白质，分子量越大，沉淀所需盐的量越少；蛋白质分子不对称性越大，也越易沉淀。

## 2. pH 值

蛋白质在 pI 时的溶解度最小，最容易从溶液中析出（如图 3-14）。因此，在进行盐析时的 pH，要选择在被盐析的蛋白质的 pI 附近。这样，产生沉淀时所消耗的中性盐较少，蛋白质的收率也高，同时也可以减少共沉作用。

## 3. 温度

一般来说，在低盐浓度下蛋白质等生物大分子的溶解度与其他无机物、有机物相似，即温度升高，溶解度升高。但对多数蛋白质而言，在高盐浓度下，它们的溶解度随温度的升高反而降低（如图 3-15）。另外，高温还容易导致蛋白质变性。因此，蛋白质的盐析一般在室温下进行，某些温度敏感型的蛋白质盐析最好在低温下进行，常在 0~4℃ 范围内迅速操作。

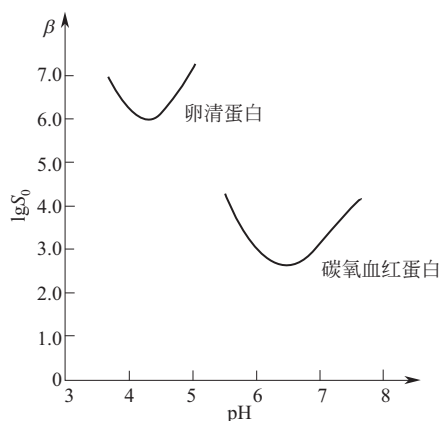


图 3-14 pH 值对卵清蛋白与碳氧血红蛋白盐析曲线的影响

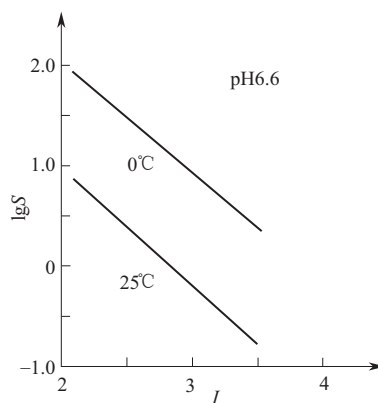


图 3-15 温度对碳氧血红蛋白的磷酸盐盐析曲线的影响

#### 4. 蛋白质浓度

在相同的盐析条件下，蛋白质浓度越大，越容易沉淀，中性盐的极限沉淀浓度也越低（如图 3-16）。

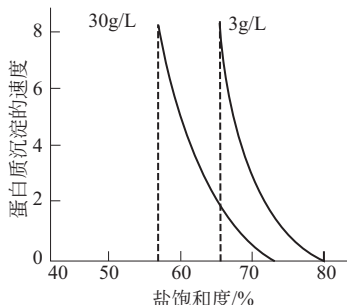


图 3-16 不同浓度碳氧肌红蛋白的盐析分布曲线

例如：起始浓度 30g/L 的碳氧肌红蛋白（COMb），大部分蛋白质在 58%~65% 饱和度沉淀；稀释 10 倍的碳氧肌红蛋白溶液，饱和度达到 66% 才开始沉淀，而相应的沉淀范围为 66%~73% 饱和度。

但蛋白质的浓度越高，其他蛋白质的共沉作用也越强，从而使分辨率降低，这在一般情况下是不希望的。相反，蛋白质浓度小时，中性盐的极限沉淀浓度增大、共沉作用小、分辨率较高，但用盐量大，蛋白质的回收率低。

所以在盐析时，首先要根据实际条件选择适当的蛋白质浓度，一般常将蛋白质浓度控制在 2%~3% 为宜。

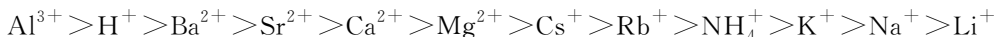
### 三、盐析用盐的选择

选用盐析用盐主要考虑以下几个问题：

① 盐析作用要强。一般来说多价阴离子的盐析作用强。常见阴离子的盐析作用顺序：



常见阳离子对盐析效果的影响：



② 盐析用盐必须要有足够大的溶解度，且溶解度受温度影响应尽可能小。这样便于获得高浓度盐溶液，有利于操作，尤其是在较低温度下操作，不致造成盐结晶析出，影响盐析结果。

③ 盐析用盐在生物学上是惰性的，不致影响蛋白质等生物大分子的活性。最好不引入给分离或测定带来麻烦的杂质。

④ 来源丰富、经济。常用的盐析用盐主要有硫酸铵、硫酸钠、硫酸镁、氯化钠、磷酸钠、磷酸钾等。

硫酸铵具有盐析作用强、溶解度大且受温度影响小，一般不会使蛋白质变性，价廉易得，分段分离效果较好等优点。所以无论在实验室中，还是生产上，除少数有特殊要求的盐析以外，大多数情况下都采用硫酸铵进行盐析。

但硫酸铵具腐蚀性且缓冲能力差，饱和溶液的 pH 在 4.4~5.5 之间，使用时多用浓氨水调整 pH 到 7 左右。硫酸钠虽无腐蚀性，但低于 40℃ 就不容易溶解，因此只适用于热稳定性较好的蛋白质的沉淀过程，应用远不如硫酸铵广泛。

磷酸盐也常用于盐析，具有缓冲能力强的优点，但它们的价格较昂贵，溶解度较低，还



容易与某些金属离子生成沉淀，所以应用不如硫酸铵广泛。

#### 四、盐析操作

用盐析法沉淀蛋白质时主要有两种操作方法：

① 在一定的 pH 和温度下，改变盐浓度（即离子强度）达到沉淀的目的，即  $K_s$  分段盐析法；

② 在一定的盐浓度（离子强度）下，改变溶液的 pH 及温度，达到沉淀的目的，即  $\beta$  分段盐析法。

在多数情况下，尤其是生产中，常用第①种方法，使目的物或杂蛋白析出。这样做使得被盐析物质的溶解度剧烈下降，容易产生共沉现象，故分辨率不高，所以第①种方法多用于蛋白质的粗提阶段。在分离的后期阶段（即蛋白质的进一步分离纯化时）常用第②种方法，因为第②种方法被盐析物质的溶解度变化缓慢且变化幅度小，分辨率较好。

下面以硫酸铵盐析法为例介绍第一种盐析操作方法。

##### 1. 操作方式

盐析时，硫酸铵的加入主要有三种方式。

**(1) 加入饱和溶液法** 在实验室和小规模生产中溶液体积不大时，或硫酸铵浓度不需太高时，可采用这种方式。它可防止溶液局部过浓，但加量过多时，料液会被稀释，不利于下一步的分离纯化。为达到一定的饱和度，所需加入的饱和硫酸铵溶液的体积可由下式求得：

$$V = V_0(S_2 - S_1) / (1 - S_2)$$

式中， $V$  为加入的饱和硫酸铵溶液的体积，L； $V_0$  为溶液的原始体积，L； $S_1$  和  $S_2$  分别为初始和最终溶液的饱和度，%。

饱和硫酸铵溶液配制应达到真正饱和，配制时加入过量的硫酸铵，加热至  $50 \sim 60^\circ\text{C}$ ，保温数分钟，趁热滤去不溶物，在  $0 \sim 25^\circ\text{C}$  下平衡  $1 \sim 2$  天，有固体析出，即达到 100% 饱和度。

**(2) 透析盐析法（透析平衡法）** 先将盐析的样品装于透析袋中，然后浸入饱和硫酸铵中进行透析，透析袋内硫酸铵饱和度逐渐提高，达到设定浓度后，目的蛋白质析出，停止透析。该法优点在于硫酸铵浓度变化有连续性，盐析效果好，但操作繁琐。

**(3) 加入固体盐法** 在工业生产溶液体积较大时，或硫酸铵浓度需要达到较高饱和度时，可采用这种方式。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，注意防止局部浓度过高。

为达到所需的饱和度，加入固体硫酸铵的量，可用计算法或查表法得到。

##### ① 计算法

由下式计算而得

$$X = G(S_2 - S_1) / (1 - AS_2)$$

式中， $S_1$  和  $S_2$  分别为初始和最终溶液的饱和度，%； $X$  为 1L 溶液所需加入的固体硫酸铵的质量，g； $G$  为经验常数， $0^\circ\text{C}$  时为 515， $20^\circ\text{C}$  为 536， $25^\circ\text{C}$  为 541； $A$  为常数， $0^\circ\text{C}$  时为 0.27， $20^\circ\text{C}$  为 0.29， $25^\circ\text{C}$  为 0.30。

##### ② 查表法

由附录 1 或附录 2 中查表所得。

**例 1:** 室温下有 50mL 的料液, 要采用直接加固体硫酸铵进行盐析, 其硫酸铵饱和度为 10%, 需要达到的硫酸铵饱和度为 50%, 需加入多少固体硫酸铵?

**解:** 查附录表 2 可知

硫酸铵饱和度由 10% 达到 50%, 每 1000mL 溶液加入固体硫酸铵 251g。

$$m = 251 \times (50/1000) = 12.55\text{g}$$

即 50mL 的料液需加入 12.55g 固体硫酸铵。

## 2. 操作注意事项

① 加固体硫酸铵时, 必须看清楚表上所规定的温度, 一般有室温 (25℃) 和 0℃ 两种, 在附录表 1 与附录表 2 中已考虑加入固体盐后体积的变化。

② 分段盐析时, 要考虑到每次分段后蛋白质浓度的变化。蛋白质浓度不同, 要盐析的饱和度也不同。

③ 为了获得实验的重复性, 盐析的条件如 pH、温度和硫酸铵的纯度都必须严加控制。

④ 盐析后一般需放置 0.5~1h, 待沉淀完全后才过滤离心, 过早的分离将影响收率。低浓度的硫酸铵溶液盐析后固液分离采用离心方法, 高浓度硫酸铵溶液则常用过滤方法。因高浓度硫酸铵的密度太大, 蛋白质要在悬浮液中沉降出来, 需要较高离心速度和长时间的离心操作, 故采取过滤法较合适。

⑤ 盐析过程中, 搅拌必须是有规则的和温和的。搅拌太快将引起蛋白质变性, 其变性特征是起泡。

⑥ 为了平衡硫酸铵溶解时产生的轻微酸化作用, 沉淀反应至少在 50mmol/L 缓冲溶液中进行或者加完后微调 pH 值。

## 第三节 有机溶剂沉淀法

### 一、有机溶剂沉淀法的基本原理和特点

#### 1. 原理

向蛋白质等生物大分子的水溶液中加入一定量亲水性的有机溶剂, 能显著降低蛋白质等生物大分子的溶解度, 使其沉淀析出。

不同的蛋白质沉淀时所需的有机溶剂的浓度不同, 因此调节有机溶剂的浓度, 可以使混合蛋白质溶液中的蛋白质分段析出, 达到分离纯化的目的。有机溶剂沉淀法不仅适用于蛋白质的分离纯化, 还常用于酶、核酸、多糖等物质的分离纯化。

有机溶剂沉淀的机理主要有两点: ①加入有机溶剂后, 会使水溶液的介电常数降低, 而使溶质分子 (如蛋白质分子) 之间的静电引力增加, 从而促使它们互相聚集, 并沉淀出来; ②水溶性有机溶剂的亲水性强, 它会抢夺本来与亲水溶质结合的自由水, 使其表面的水化层被破坏, 导致溶质分子之间的相互作用增大而发生凝聚, 从而沉淀析出。



#### 知识拓展

##### 介电常数 $\epsilon$

介电常数  $\epsilon$  是物质相对于真空来说增加电容器电容能力的度量。介电常数随分子偶



极矩和可极化性的增大而增大。在化学中，介电常数是溶剂的一个重要性质，它表征溶剂对溶质分子溶剂化以及隔开离子的能力。介电常数大的溶剂，有较大隔开离子的能力，同时也具有较强的溶剂化能力。

以真空的介电常数为 1，在温度 25℃，频率 1kHz 条件下，水的相对介电常数比较大，为 81.5，而有机溶剂的相对介电常数比较小，例如乙醇为 25.7，丙酮为 20.7。因此，在蛋白质和酶等极性物质的水溶液中加入乙醇、丙酮等与水相溶的有机溶剂可降低溶液的介电常数，使离子聚合能力增强，降低了蛋白质和酶的溶解度而使之沉淀。

## 2. 特点

与盐析法相比，有机溶剂沉淀法的优点是分辨率高于盐析。乙醇、丙酮等有机溶剂沸点低，容易挥发除去，不会残留于成品中，产品更纯净；沉淀物与母液间的密度差较大，分离容易。有机溶剂沉淀法的缺点是容易使蛋白质等生物大分子变性，沉淀操作需在低温下进行，需要耗用大量有机溶剂，成本较高，为节省用量，常将蛋白质溶液适当浓缩，并要采取溶剂回收措施。有机溶剂一般易燃易爆，所以储存比较困难或麻烦。

## 二、有机溶剂的选择和体积的计算

### 1. 有机溶剂的选择

沉淀用有机溶剂的选择主要考虑以下几个方面的因素：①介电常数小，沉淀作用强；②对生物分子的变性作用小；③毒性小，挥发性适中，沸点过低虽有利于溶剂的除去和回收，但挥发损失较大，且给生态环境及安全生产带来麻烦；④沉淀用溶剂一般需能与水无限混溶。

常用于生物大分子沉淀的有机溶剂有乙醇、丙酮和甲醇等。其中乙醇是最常用的沉淀剂，因为它具有沉淀作用强、沸点适中、无毒等优点，广泛用于沉淀蛋白质、核酸、多糖等生物高分子及核苷酸、氨基酸等。丙酮的介电常数小于乙醇，故沉淀的能力较强，用丙酮代替乙醇作沉淀剂一般可减少用量 1/4~1/3，但其具有沸点较低、挥发损失大、对肝脏有一定毒性、着火点低等缺点，使得它的应用不及乙醇广泛。甲醇的沉淀作用与乙醇相当，对蛋白质的变性作用比乙醇、丙酮都小，但甲醇口服有剧毒，所以应用也不及乙醇广泛。

### 2. 体积计算

进行有机溶剂沉淀时，欲使原溶液达到一定的溶剂浓度，需加入有机溶剂的量，可用计算法或查表法得到。

#### ① 计算法

由下式计算而得

$$V = \frac{V_0(S_2 - S_1)}{100\% - S_2}$$

式中，V 为需加入的有机溶剂的体积； $V_0$  为原溶液体积； $S_1$  为原溶液中有机溶剂的质量分数； $S_2$  为需达到的有机溶剂的质量分数；100%是指加入的有机溶剂浓度为 100%，若所加入有机溶剂浓度为 95%，则公式中的分母也应改为  $(95\% - S_2)$ ，其他溶剂浓度以此类推。

**例 2:** 某一 30mL 料液中乙醇浓度为 35%，要将乙醇浓度调整到 55%，需要往料液中加入多少无水乙醇？

解：

由公式  $V = \frac{V_0 (S_2 - S_1)}{100\% - S_2}$  可得

$$V = V_0 (S_2 - S_1) / (100\% - S_2) = 30(55\% - 35\%) / (100\% - 55\%) \approx 13.33\text{mL}$$

即 30mL 的料液需加入 13.33mL 无水乙醇。

上式与盐析公式一样未考虑混合后体积的变化，实际上等体积的乙醇和水相混合后体积会缩小 5%。如此的体积变化对大多数工作影响不大，在有精确要求的场合可按物质的量比计算，这样可将体积变化因素抵消。实际工作中，有时查表比计算更方便。

## ② 查表法

查表法考虑了乙醇与水混合后体积的变化量，有时会比计算法更方便准确，因此实际工作中配制乙醇溶液常用此法。

查表法一般用于高浓度乙醇溶液制备低浓度乙醇溶液，由附录 3 查表可得。

**例 3:** 20℃ 时，制备 1L 浓度为 35% 乙醇溶液，需要加入无水乙醇和水各多少？如使用 75% 的乙醇，所需 75% 的乙醇和水各多少？

解：由附录 3 表可得：

用无水乙醇制备 1L 浓度为 35% 乙醇溶液，需要无水乙醇 350mL，水 681mL；

用 75% 的乙醇制备 1L 浓度为 35% 乙醇溶液，需要 75% 的乙醇 467mL，水 550mL。

## 三、有机溶剂沉淀法的影响因素

### 1. 温度

有机溶剂与水混合时，会放出大量的热量，使溶液的温度显著升高，从而增加有机溶剂对蛋白质的变性作用。另外温度还会影响有机溶剂对蛋白质的沉淀能力，一般温度越低，沉淀越安全，如图 3-17 所示，适宜的温度为 10~20℃。

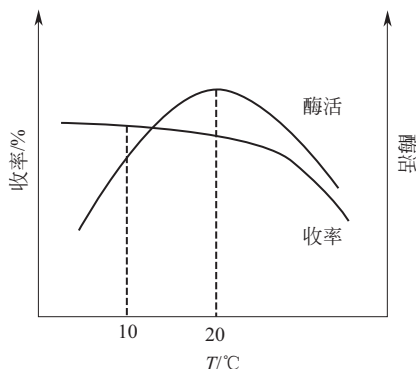


图 3-17 有机溶剂沉淀法的温度影响示意图

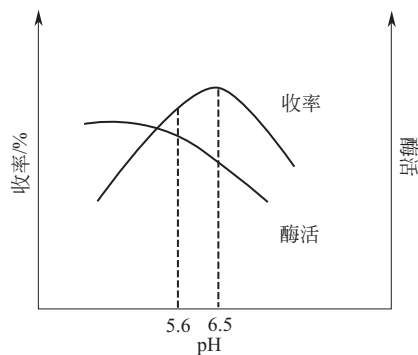


图 3-18 有机溶剂沉淀法的 pH 影响示意图

因此，在使用有机溶剂沉淀生物高分子时，整个操作过程应在低温下进行，而且最好在单一温度，防止已沉淀的物质溶解或另一物质的沉淀。





具体操作时，常将待分离的溶液和有机溶剂分别进行预冷，后者最好预冷至 $-20\sim-10^{\circ}\text{C}$ 。为避免温度骤然升高损失蛋白质活力，操作时还应不断搅拌，少量多次加入。

为了减少有机溶剂对蛋白质的变性作用，通常使沉淀在低温下短时间（0.5~2h）处理后即进行过滤或离心分离，接着真空抽去剩余溶剂或将沉淀溶入大量缓冲溶液中以稀释有机溶剂，旨在减少有机溶剂与目的物的接触。

## 2. pH 值

许多蛋白质在等电点附近有较好的沉淀效果，所以 pH 多控制在待沉淀蛋白质的等电点附近（图 3-18）。但要注意的是少数蛋白质在等电点附近不太稳定。另外，在控制溶液 pH 时务必使溶液中大多数蛋白质分子带有相同电荷，而不要让目的物与主要杂质分子带相反电荷，以免出现严重的共沉作用。

## 3. 样品浓度

与盐析相似，样品较稀时，将增加有机溶剂投入量和损耗，降低溶质收率，但稀的样品共沉作用小，分离效果较好；反之，浓的样品会增加共沉作用，降低分辨率，然而减少了溶剂用量，提高了回收率。

一般认为蛋白质的初始质量分数以 0.5%~2% 为好，糖胺聚糖则以 1%~2% 较合适。

## 4. 盐浓度

较低浓度的中性盐存在有利于沉淀作用，减少蛋白质变性。

一般在有机溶剂沉淀时，中性盐浓度以 0.01~0.05mol/L 为好，常用的中性盐为乙酸钠、乙酸铵、氯化钠等。但在中性盐浓度较高时（0.2mol/L 以上），往往需增加有机溶剂的用量才能使沉淀析出。所以若要对盐析后的上清液或沉淀物进行有机溶剂沉淀，则必须事先除盐。

## 5. 某些金属离子

有些金属离子如  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  等可与某些阴离子状态的蛋白质形成复合物，这种复合物溶解度大大降低而不影响生物活性，有利于沉淀形成，并降低溶剂用量。使用时要避免有与这些金属离子形成难溶盐的阴离子存在（如磷酸根离子）。

实际操作时往往先加有机溶剂，沉淀除去杂蛋白，再加  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  沉淀目的物，见图 3-19 胰岛素精制工艺。

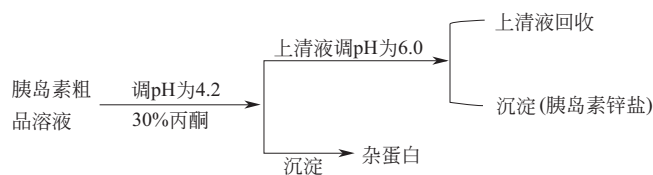


图 3-19 胰岛素精制工艺

# 第四节 其他沉淀法

## 一、聚合物沉淀法

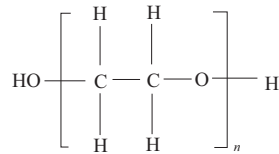
### 1. 离子型聚合物沉淀法

离子型聚合物是一类温和的沉淀剂，能与目标蛋白质形成复合盐沉淀。例如鱼精蛋白在

溶液中形成多聚阳离子，用于酸性蛋白的沉淀；核酸含有多聚阴离子基团，用于碱性蛋白的沉淀。在操作时要调整溶液 pH 值，使蛋白质带有与离子型聚合物不同的电荷。

## 2. 非离子型聚合物沉淀法

水溶性非离子型聚合物是 20 世纪 60 年代发展起来的一类重要沉淀剂，最早应用于提纯免疫球蛋白 (IgG) 和沉淀一些细菌与病毒，近年来逐渐广泛应用于核酸和酶的分离纯化。这类非离子型聚合物包括各种不同分子量的聚乙二醇 (PEG)、壬基酚聚氧乙烯醚 (NPEO)、葡聚糖、右旋糖酐硫酸酯等。其中应用最多的是聚乙二醇，其结构式如下：



聚乙二醇亲水性强，分子量范围广，在生化制备中用得较多的是 PEG2000~6000。分子量超过 20000 以上的聚乙二醇则具有很高的黏性，操作十分不便，平时很少使用。聚乙二醇及其他非离子型聚合物应用于生物大分子、病毒和细菌等微粒的沉淀时，其效果与 PEG 分子量与蛋白质分子量有关。在一定范围内，高分子量的 PEG 沉淀性好。随着蛋白质分子量的提高，沉淀所需加入的 PEG 用量减少。一般来说，PEG 浓度通常为 20%，浓度过高会使溶液黏度增大，加大沉淀物分离的困难。此外，沉淀效果除与沉淀剂本身浓度有关外，还受到离子强度、pH 和温度等因素的影响。例如，用 PEG 沉淀蛋白质，使用 PEG 的浓度与溶液中盐的浓度常呈反比关系，在固定 pH 值下，盐浓度越高，所需的 PEG 浓度越低。溶液 pH 值越接近蛋白质的等电点，沉淀蛋白质所需的 PEG 浓度越低。

非离子型聚合物分离生物大分子和微粒的方法一般有两种情况。一是选用一种水溶性非离子型聚合物，使生物大分子和微粒在同一液相中，由于被排斥相互凝集而沉淀析出。操作时先将料液离心除去粗大悬浮颗粒，调整溶液 pH 和温度至适度，然后加入中性盐和聚合物至一定浓度，冷却静置一段时间，即形成沉淀。所得到的沉淀中含有大量聚合物，除去的方法可采用吸附法、乙醇沉淀法及盐析法等。这种沉淀技术具有操作条件温和（通常室温）、生物大分子不易变性、沉淀的颗粒较大、产物易收集等优点。二是选用两种水溶性非离子型聚合物组成液-液两相系统，使生物大分子在两相中分配，并外加离子强度、pH 和温度等因素，增强分离的效果，这就是前面章节介绍的双水相萃取。

## 二、表面活性剂沉淀法

表面活性沉淀剂有很多，如聚丙烯酰胺 (PAM)、十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB)、十六烷基氯化吡啶 (CPC) 和十二烷基硫酸钠 (SDS) 等。聚丙烯酰胺表面活性剂从分子结构上看也属于聚合物，其作用原理在发酵液预处理章节中已介绍过，主要是架桥作用形成沉淀。十六烷基三甲基溴化铵和十六烷基氯化吡啶与多糖上的阴离子形成季铵盐络合物，降低离子强度，生成络合物沉淀析出，是分离酸性糖胺聚糖的有效沉淀剂。十二烷基硫酸钠能使膜蛋白和核蛋白变性沉淀，核酸则存在于水溶液中，从而将核酸和蛋白质分离。

## 三、成盐沉淀法

某些生化物质（如核酸、蛋白质、多肽、氨基酸、抗生素等）能和重金属、某些有机酸与无机酸形成难溶性的盐类复合物而沉淀，该法根据所用的沉淀剂的不同可分为金属离子沉淀法、有机酸沉淀法和无机酸沉淀法。值得注意的是成盐沉淀法所形成的复合盐沉淀，常使



蛋白质发生不可逆的沉淀，应用时必须谨慎。

### 1. 金属离子沉淀法

许多有机物包括蛋白质在内，在碱性溶液中带负电荷，都能与金属离子形成金属复合盐沉淀。所用的金属离子，根据它们与有机物作用的机制可分为三大类：第一类包括  $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  等，它们主要作用于羧酸、胺及杂环等含氮化合物；第二类包括  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$  等，这些金属离子也能和羧酸起作用，但不能与含氮化合物结合；第三类包括  $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Ag}^{+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$  等，这类金属离子对含巯基的化合物有特殊的结合力。

蛋白质和酶分子中含有羧基、氨基、咪唑基和巯基等，均可以和上述金属离子作用形成盐复合物。调整水溶液的介电常数（如加入有机溶剂），用  $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$  等金属离子可以把许多蛋白质沉淀下来，所用金属离子浓度约为  $0.02\text{mol/L}$ 。金属离子沉淀法也适用于核酸或其他小分子（氨基酸、多肽及有机酸等）。

用金属离子沉淀法分离出沉淀物后，可以通  $\text{H}_2\text{S}$  使金属变成硫化物而除去，也可采用离子交换法或金属螯合剂 EDTA 等将金属离子除去。

金属离子沉淀法已有广泛的应用，除提取生化物质外，还能用于沉淀除去杂质。例如，锌盐用于沉淀制备胰岛素；锰盐选择性地沉淀除去发酵液中的核酸，降低发酵液黏度，以利后续纯化操作；锌盐除去红霉素发酵液中的杂蛋白以提高过滤速度。

### 2. 有机酸沉淀法

某些有机酸如苦味酸、鞣酸能与蛋白质分子中的含氮碱性基团形成复合物而沉淀析出。但这些有机酸与蛋白质形成盐复合物沉淀时，常常发生不可逆的沉淀反应。所以，应用此法制备生化物质特别是蛋白质和酶时，需采用较温和的条件，有时还加入一定的稳定剂，以防蛋白质变性。常用的有鞣酸、三氯乙酸、雷（利）凡诺等试剂。

**(1) 鞣酸** 鞣酸又称单宁，广泛存在于植物界中，为多元酚类化合物，分子上有羧基和多个羟基。由于蛋白质分子中有许多氨基、亚氨基和羧基等，所以可与单宁分子形成众多的氢键而结合在一起，从而生成巨大的复合颗粒而沉淀下来。

单宁沉淀蛋白质的能力与蛋白质种类、环境 pH 及单宁本身的来源（种类）和浓度有关。由于单宁与蛋白质的结合相对比较牢固，用一般方法不容易将它们分开，故多采用竞争结合法，即选用比蛋白质更强的结合剂与单宁结合，使蛋白质游离释放出来。这类竞争性结合剂有聚乙烯吡咯烷酮（PVP），它与单宁形成氢键的能力很强。此外，聚乙二醇、聚氧化乙烯及山梨糖醇甘油酸酯也可用来从单宁复合物中分离蛋白质。

**(2) 三氯乙酸** 三氯乙酸（TCA）沉淀蛋白质迅速而完全，一般会引起变性。但在低温下短时间作用可使有些较稳定的蛋白质或酶保持原有的活力，如用 2.5% 的 TCA 处理细胞色素 c 提取液，可以除去大量杂蛋白而对酶活性没有影响。此法多用于目的物比较稳定且分离杂蛋白相对困难的场合。

**(3) 雷（利）凡诺** 雷（利）凡诺是一种吡啶乳酸盐染料，虽然其沉淀机理比一般有机酸盐复杂，但其与蛋白质作用也主要是通过形成盐的复合物而沉淀的。此种染料提纯血浆中  $\gamma$ -球蛋白有较好效果。实际应用时以 0.4% 的雷（利）凡诺溶液加到血浆中，调 pH 7.6~7.8，除  $\gamma$ -球蛋白外，可将血浆中其他蛋白质沉淀下来。然后以 5% 浓度的 NaCl 将雷（利）凡诺沉淀。溶液中的  $\gamma$ -球蛋白可用 25% 乙醇或加等体积饱和硫酸铵沉淀回收。使用雷（利）凡诺沉淀蛋白质，不影响蛋白质活性，并可通过调整 pH，分段沉淀一系列蛋白质组分。但

蛋白质的等电点在  $\text{pH}3.5$  以下或  $\text{pH}9.0$  以上, 不被雷(利)凡诺沉淀。而核酸大分子却可在较低  $\text{pH}$  时 ( $\text{pH}$  为  $2.4$  左右), 被雷(利)凡诺沉淀。

### 3. 无机酸沉淀法

某些无机酸如磷钨酸、磷钼酸等能与阳离子形式的蛋白质形成溶解度极低的复合盐, 从而使蛋白质沉淀析出。用此法得到沉淀物后, 可在沉淀物中加入无机酸并用乙醚萃取, 把磷钨酸、磷钼酸等移入乙醚中除去, 或用离子交换法除去。

## 四、选择性变性沉淀法

这一特殊方法主要是破坏杂质, 保存目的物。其原理是利用蛋白质、酶和核酸等生物大分子对某些物理或化学因素敏感性不同, 而有选择地使之变性沉淀, 达到分离提纯的目的。

### 1. 选择性试剂变性

加入表面活性剂或有机溶剂引起变性。例如, 制备核酸时, 加入含苯酚、氯仿、十二烷基硫酸钠等有选择地使蛋白质变性沉淀, 从而与核酸分离。

### 2. 选择性热变性

利用对热的稳定性不同, 加热破坏某些组分, 而保留另一些组分。例如, 脱氧核糖核酸酶的热稳定性比核糖核酸酶差, 加热处理可使混杂在核糖核酸酶中的脱氧核糖核酸酶变性沉淀; 又如由黑曲霉发酵制备脂肪酶时, 常混杂有大量淀粉酶, 当把混合粗酶液在  $40^{\circ}\text{C}$  水溶液中保温  $150\text{min}$  ( $\text{pH}$  为  $3.4$ ),  $90\%$  以上的淀粉酶将受热变性而除去。

热变性方法简单可行, 在制备一些对热稳定的小分子物质过程中, 对除去一些大分子蛋白质和核酸特别有效。

### 3. 选择性酸碱变性

利用酸碱变性有选择地除去杂蛋白在生物分离中的例子很多, 如用  $2.5\%$  浓度的三氯乙酸处理胰蛋白酶、抑肽酶或细胞色素  $c$  粗提取液, 均可除去大量杂蛋白, 而对所提取的酶活性没有影响。有时还把酸碱变性与热变性结合起来使用, 效果更为显著。但应用前必须对目的物的热稳定性及酸碱稳定性有足够的了解, 切勿盲目使用。

例如, 胰蛋白酶在  $\text{pH}$  为  $2.0$  的酸性溶液中可耐极高的温度, 而且热变性后所产生的沉淀是可逆的。冷却后沉淀溶解即可恢复活性。还有些酶与底物或竞争性抑制剂结合后, 对  $\text{pH}$  或热的稳定性显著增加, 则可以采用较为强烈的酸碱变性和热变性除去杂蛋白。



## 案例分析

### 一、沉淀法在人血白蛋白生产中的应用

1940 年, 哈佛大学教授科恩等人用乙醇来完成蛋白质沉淀经典实验。他们应用低温乙醇分级沉淀人血浆的方法制备了白蛋白溶液, 并通过冷冻干燥将乙醇从成品中去除, 得到白蛋白产品成功地救治了 1941 年珍珠港空袭后的幸存者。除此以外, 免疫球蛋白、血纤维蛋白原等其他许多蛋白质都是利用上述方法进行沉淀分离。

目前, 国内用于生产人血白蛋白和免疫球蛋白类制品的生产方法基本都是低温乙醇法。从血浆中通过六步沉淀可生产得到纯度为  $99\%$  的免疫球蛋白和  $96\% \sim 99\%$  的白蛋白。

影响这种沉淀过程的主要有五大参数: 溶液的蛋白质浓度、 $\text{pH}$  值、离子强度、溶液的



温度和乙醇的浓度。在前四个参数都一致的情况下，乙醇的沉淀作用取决于蛋白质分子的大小。在逐渐提高乙醇浓度时，蛋白质将按分子大小顺序先后沉淀。

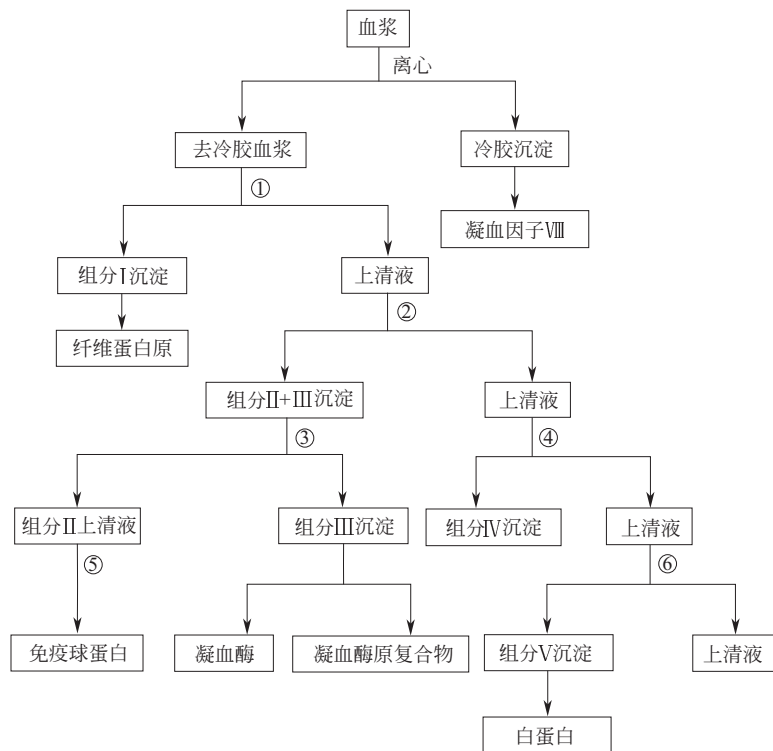


图 3-20 低温乙醇沉淀法分离白蛋白与免疫球蛋白的工艺流程

- ①乙醇，8%；pH，7.2；3℃；蛋白质浓度，5.0%      ②乙醇，20%；pH，5.8；-5℃；蛋白质浓度，4.5%  
 ③乙醇，20%；pH，5.5；-5~-5.5℃      ④乙醇，40%；pH，5.8；-7℃；蛋白质浓度，2.5%  
 ⑤乙醇，25%；pH，7.0；-6.5~-7.5℃      ⑥乙醇，40%；pH，4.8；-8℃；蛋白质浓度，2.0%

人血白蛋白制备工艺流程如图 3-20 所示。对血浆进行常见的 5 种病毒检测是国家的强制标准，而且必须是检测合格后方可投入生产。对原料血浆进行一次离心，可以分离得到冷沉淀，这也是制造凝血因子Ⅷ的原料。离心去除冷胶沉淀之后的血浆可以用于人凝血酶原复合物（凝血因子Ⅱ、Ⅶ、Ⅸ、Ⅹ的混合物）的生产。接下来进行 8%乙醇沉淀步骤（若不生产凝血因子Ⅷ和人凝血酶原复合物，也可以直接对原料血浆进行 8%乙醇沉淀操作）。

步骤①：8%乙醇沉淀，产生组分Ⅰ沉淀，主要成分为纤维蛋白原。组分Ⅰ沉淀可以用于人纤维蛋白黏合剂的生产。由于工业化生产中投入的血浆数量巨大（一般一次为 5000kg 血浆左右），沉淀罐的容积也是很大的，向沉淀罐中加入缓冲溶液或乙醇的时候一定要控制好速度，加得太快会使局部 pH 值或乙醇浓度超出限度而导致不良后果，加得太慢则会延长生产周期。沉淀完成以后，需要静置数小时，以利于沉淀的积累。然后离心（也有的工艺采用板框压滤，加入硅藻土作为助滤剂），收集沉淀，同时将上清液转移入另外的沉淀罐以备进行下一步的沉淀。

步骤②：20%乙醇沉淀，分离出组分Ⅱ+Ⅲ沉淀，其主要成分为各种类型的球蛋白和凝血因子Ⅱ、Ⅶ、Ⅸ、Ⅹ。组分Ⅱ+Ⅲ沉淀可以用于免疫球蛋白类制品和人凝血酶原复合物的生产。上清液继续进入下一步的沉淀。

步骤③：组分Ⅱ+Ⅲ沉淀溶解并稀释，加入乙醇至 20%，分离出组分Ⅳ沉淀，用于人



凝血酶原复合物的生产。上清液继续进入下一步的沉淀。

步骤④：40%乙醇沉淀，分离出组分Ⅳ沉淀，主要成分为 $\alpha_2$ 巨球蛋白、铜蓝蛋白和一些补体蛋白，同时还含有少量的白蛋白。组分Ⅳ沉淀也可以用于回收分离白蛋白。上清液继续进入下一步的沉淀。

步骤⑤：25%乙醇沉淀，分离出免疫球蛋白。

步骤⑥：40%乙醇沉淀，分离出组分Ⅴ沉淀，也就是清蛋白，一般5000kg的血浆能得到600kg左右（具体的量和沉淀的干湿程度等都有关系）的组分Ⅴ沉淀，其蛋白质含量约为25%~28%。上清液中仅含少量的蛋白质，直接弃去。此步骤分离出的清蛋白还不是很纯，需要再进行一次纯化反应。之后还有白蛋白纯化，超滤脱醇及配制、灭活，分装、检测等，待结果合格后才能投入销售。

一批次的人血白蛋白从开始投料到可以销售，大概需要一个半月到两个月多的时间。低温乙醇法生产人血白蛋白已经是一个比较成熟的方法，现今的主要问题就是如何进一步提高人血白蛋白的得率，这主要涉及各步骤的一些细微操作注意点，也是生产企业一直在追求的目标。

## 二、沉淀法在中草药提取中的应用

沉淀法是在中草药提取液中加入某些试剂使其析出某种成分或者析出杂质，以获得收集有效成分或除去杂质的方法。

### 1. 水提醇沉法（水醇法）

水醇法是指在中药材水提浓缩液中，加入乙醇使其达到要求含醇量，某些药物成分在醇溶液中溶解度降低而析出沉淀，固液分离后使水提液得以精制的方法，见图3-21。除去糖类、蛋白质等水溶性杂质，保留水不溶性成分，一般用于提取极性较小的化合物。

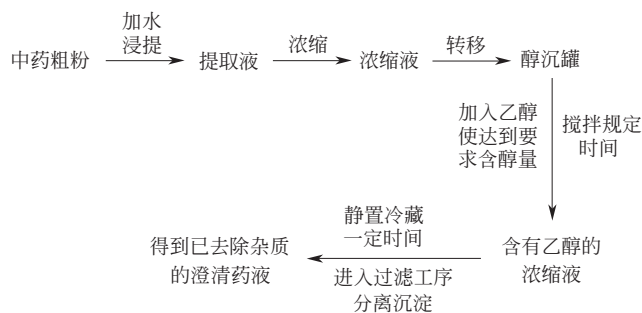


图 3-21 中药材水醇法工艺流程

### 2. 醇提水沉法（醇水法）

醇水法是先以适宜浓度的乙醇提取药材成分，将提取液回收乙醇后，加适量水搅匀，静置冷藏一定时间，沉淀完全后滤除的方法。药材用乙醇为溶剂提取，可避免淀粉、蛋白质、黏液质等成分的浸出，加水处理后可除去醇提液中树脂、脂溶性色素等杂质，保留水溶性成分，一般用于提取极性较大的化合物。应用此方法要慎重，避免醇溶性有效成分因水溶性差而被一起沉淀除去。

### 3. 盐析法

盐析法是在中药材的水提液中加入无机盐使之达到一定的浓度后，可使提取液中的某些





成分在水中的溶解度降低而沉淀析出，从而达到与水溶性大的杂质分开的一种分离方法。一般的生物碱、皂苷、挥发油等都可用盐析从水溶液中分离出来。

例如，在黄连粗粉中提取小檗碱，根据小檗碱的盐酸盐在水中溶解度小，而小檗碱的硫酸盐水中溶解度较大。因此，从植物原料中提取小檗碱时常用稀硫酸水溶液浸泡或渗漉，然后向提取液中加入 10% 的食盐，在盐析的同时提供氯离子，使其硫酸盐转变为氯化小檗碱（即盐酸小檗碱）而析出。图 3-22 为黄连中提取小檗碱工艺流程。

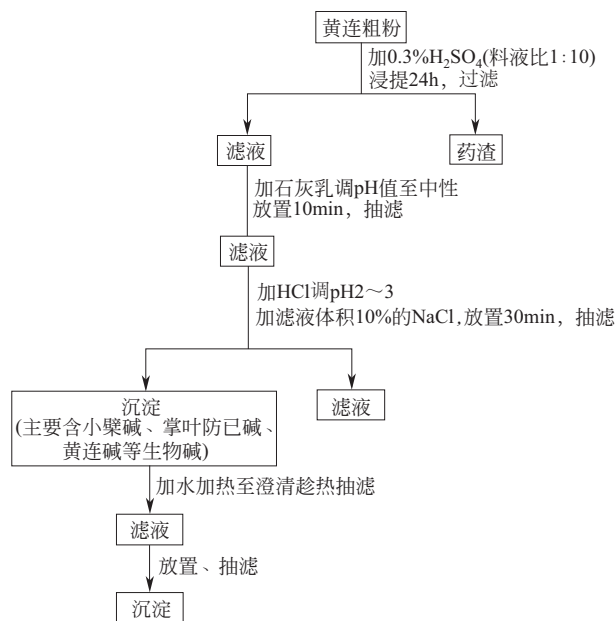


图 3-22 黄连小檗碱工艺流程

① 浸提。将黄连粉碎成粗粉，用硫酸水溶液浸提，一般为 0.2%~0.3% 为宜。若硫酸水溶液浓度过高，小檗碱可成为重硫酸小檗碱，其溶解度（1:150，即溶质与溶剂的溶解比例）明显较硫酸小檗碱（1:30）小，从而影响提取效果。硫酸水溶液浸出效果与浸渍时间有关。浸渍 12h 约可浸出小檗碱 80%，浸渍 24h，可浸出 92%。常规提取应浸渍多次，使小檗碱提取完全。

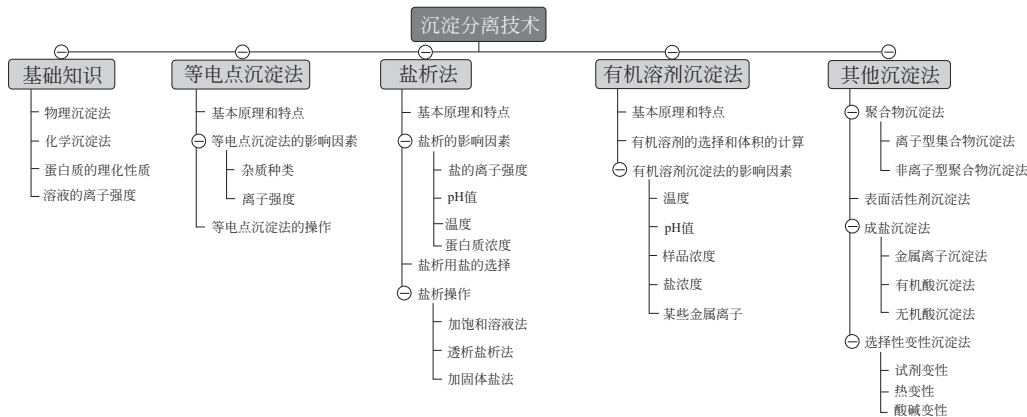
② 中和。浸提液过滤后，滤液加石灰乳调 pH 值至中性，静置后，抽滤。生物碱一般是有机碱，酸性条件会被中和，所以要把溶液调成中性或碱性，加石灰乳，其中钙离子与硫酸根沉淀，这种沉淀又会吸附药材中的其他杂质，大大减少了以后浓缩除杂质的难度。如果用氢氧化钠（钾），形成可溶性盐类，不但这种盐很难除去（会粘在小檗碱上），药材中其他杂质也会粘在小檗碱上，对小檗碱纯度影响很大。

③ 盐析。加盐酸调 pH 值 2~3，加滤液体积 10% 的 NaCl，放置 30min，抽滤。进行盐析时，加入氯化钠的量，以提取液量的 10%（100mL 提取液中加入 10g 氯化钠）计算，即可达到析出盐酸小檗碱的目的。氯化钠的用量不可过多，否则溶液的相对密度增大，造成析出的盐酸小檗碱结晶呈悬浮状态难以下沉。

④ 精制。盐析后所得沉淀，加水加热溶解，趁热抽滤后，静置，结晶，抽滤后得到盐酸小檗碱晶体。在精制盐酸小檗碱过程中，因盐酸小檗碱放冷极易析出结晶，所以加热煮沸后，应迅速抽滤或保温过滤，防止溶液在过滤过程中冷却，析出盐酸小檗碱结晶阻塞滤孔，造成过滤困难，降低提取率。

## 总结归纳

### 本章知识点思维导图



## 拓展阅读

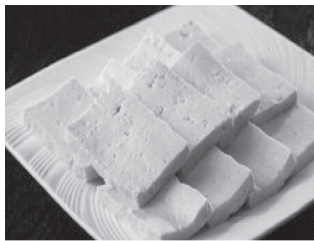
### 豆腐小百科

豆腐存在的历史悠久，相传是在公元前 164 年，由汉高祖刘邦之孙——淮南王刘安所发明。豆腐生产的原理就是蛋白质变性沉淀。豆腐因凝固剂的不同主要分为三类：

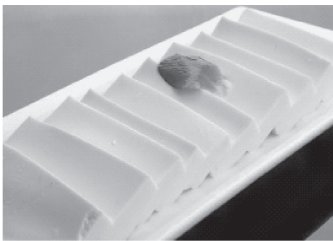
一是以盐卤为凝固剂制得的，多见于北方地区，称为北方豆腐，如图 3-23(a)，含水量少，含水量在 85%~88%，较硬；

二是以石膏粉为凝固剂，多见于南方，称为南方豆腐，如图 3-23(b)，含水量较北方豆腐多，可达 90%左右，松软；

三是以葡萄糖酸- $\delta$ -内酯为凝固剂，称为内酯豆腐，如图 3-23(c)。葡萄糖酸- $\delta$ -内酯是一种新型的凝固剂，较传统制备方法提高了出品率和产品质量，减少了环境污染。



(a) 盐卤豆腐(北方豆腐)



(b) 石膏豆腐(南方豆腐)



(c) 内酯豆腐

图 3-23 豆腐的种类

目前市场上出现有不用大豆制作的“豆腐”，这是利用蛋白质胶体溶液可以在凝固剂的作用下凝集成型的原理。例如牛奶是均匀的乳白色液体，用发酵的方法制成的酸奶就像“豆腐脑”，挤出水分可以制成“奶豆腐”。还有用鸡蛋制成胶体溶液后加入凝固剂制成的“鸡蛋豆腐”（市场上的“日本豆腐”大多就是鸡蛋豆腐）。

来源：龙武生. 几种营养豆腐的制作 [N]. 湖南科技报, 2015-07-05 (005).



## 复习与练习题

### 一、选择题

1. 盐析法沉淀蛋白质的原理是 ( )。  
A. 降低蛋白质溶液的介电常数      B. 中和电荷, 破坏水化层  
C. 与蛋白质结合成不溶性蛋白      D. 调节蛋白质溶液 pH 到等电点
2. 将四环素粗品溶于 pH 2 的水中, 用氨水调 pH4.5~4.6, 28~30℃ 保温, 即有四环素沉淀析出。此沉淀方法称为 ( )。  
A. 等电点沉淀法      B. 盐析沉淀法      C. 成盐沉淀法      D. 有机溶剂沉淀法
3. 使蛋白质盐析可加入试剂 ( )。  
A. 氯化钠      B. 硫酸      C. 硝酸汞      D. 硫酸铵
4. 盐析操作中, 硫酸铵在 ( ) 情况下不能使用。  
A. 酸性条件      B. 中性条件      C. 碱性条件      D. 和溶液酸碱度无关
5. 从四环素发酵液中去除铁离子, 可用 ( )。  
A. 草酸酸化      B. 加黄血盐      C. 加硫酸锌      D. 氨水碱化
6. 有机溶剂沉淀法中可使用的有机溶剂为 ( )。  
A. 乙酸乙酯      B. 正丁醇      C. 苯      D. 丙酮
7. 有机溶剂能够沉淀蛋白质的原因是 ( )。  
A. 介电常数大      B. 介电常数小      C. 中和电荷      D. 与蛋白质相互反应
8. 若两性物质结合了较多阴离子, 则等电点 pH 会 ( )。  
A. 升高      B. 降低      C. 不变      D. 以上均有可能
9. 单宁沉淀法制备菠萝蛋白酶实验中, 加入 1% 的单宁于鲜菠萝汁中产生沉淀, 属于 ( ) 沉淀原理。  
A. 盐析      B. 有机溶剂沉淀      C. 等电点沉淀      D. 有机酸沉淀
10. 当向蛋白质纯溶液中加入中性盐时, 蛋白质溶解度 ( )。  
A. 增大      B. 减小      C. 先增大, 后减小      D. 先减小, 后增大
11. 蛋白质溶液进行有机溶剂沉淀, 蛋白质的浓度在 ( ) 范围内适合。  
A. 0.5%~2%      B. 1%~3%      C. 2%~4%      D. 3%~5%
12. 若两性物质结合了较多阳离子, 则等电点 pH 会 ( )。  
A. 升高      B. 降低      C. 不变      D. 以上均有可能

### 二、简答题

1. 何谓等电点沉淀法?
2. 等电点沉淀的影响因素是什么?
3. 简述盐析的原理及产生的现象。
4. 何谓有机溶剂沉淀法? 简述有机溶剂沉淀的原理。
5. 影响有机溶剂沉淀的因素是什么?



## 第四章 固液分离技术

药物分离前阶段的步骤往往是把不溶性的固体从药液中除去，即固液分离。固液分离是指将药液中的悬浮固体，如细胞、菌体、细胞碎片以及蛋白质等的沉淀物或它们的絮凝体分离除去。固液分离常用的方法为沉降、过滤和离心分离。通过这几个过程均可得到清液和固态浓缩物两部分。在进行分离时，有些反应体系可以采用沉降或过滤的方式加以分离，有些则需要经过加热、凝聚、絮凝及添加助滤剂等辅助操作才能进行过滤。但对于那些固体颗粒小、溶液黏度大的发酵液和细胞培养液或生物材料的大分子抽提液及其过滤难实现的固-液分离，必须采用离心技术才能达到分离的目的。

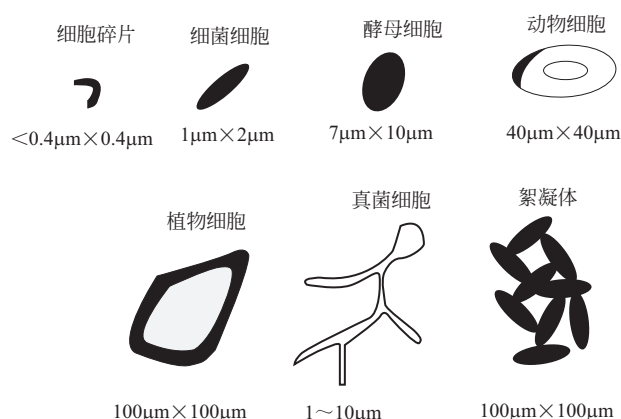


图 4-1 生物产品悬浮液中粒子的形状和大小

当静置悬浮液时，密度较大的固体颗粒在重力作用下逐渐下沉，这一过程称为沉降。当颗粒较细、溶液黏度较大时，沉降速度缓慢。若采用离心技术则可加速颗粒沉降过程，缩短沉降时间，因此离心分离是生物物质固-液分离的重要手段之一。离心分离是基于固体颗粒和周围液体密度存在差异，在离心力场中使不同密度的固体颗粒（见图 4-1）加速沉降的分离过程。通过离心产生的固体浓缩物和过滤产生的固体浓缩物不相同，通常情况下离心只能得到一种较为浓缩的悬浮液或浆体，而过滤可获得水分含量较低的滤饼。与过滤设备相比，离心设备的价格昂贵，但当固体颗粒细小、溶液黏度大而难以过滤时，离心操作往往十分有效。



### 基础知识

#### 一、实验室常用的过滤方法

实验室常用的过滤方法有常压过滤、减压过滤和热过滤。



(1) **常压过滤** 常压过滤是最为简便和常用的过滤方法，适用于胶体和细小晶体的过滤。其缺点是过滤速度较慢。一般是使用玻璃漏斗和滤纸进行过滤（如图 4-2）。

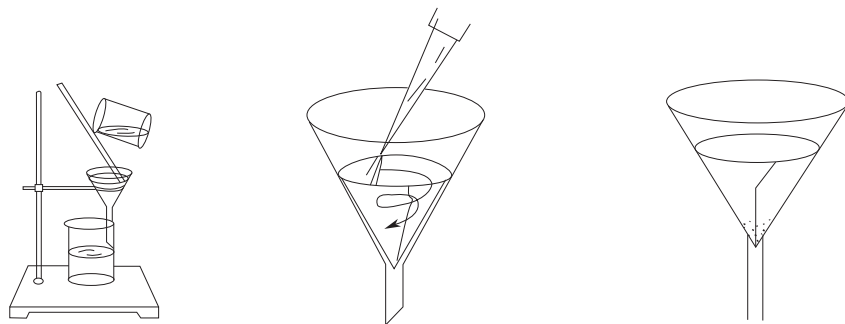


图 4-2 常压过滤

(2) **减压过滤** 减压过滤也称吸滤或抽滤（如图 4-3）。此方法过滤速度快，沉淀抽得较干，适合大量溶液与沉淀的分离，但不宜过滤颗粒太小的沉淀和胶体沉淀。因颗粒太小的沉淀易堵滤纸或滤板口，而胶体沉淀易透滤。

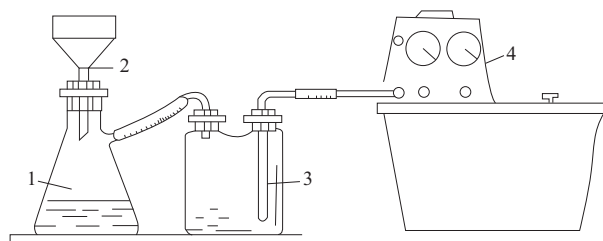


图 4-3 减压过滤装置

1—吸滤瓶；2—过滤器（布氏漏斗）；3—安全瓶；4—减压系统（真空泵）

(3) **热过滤** 热过滤是将欲过滤的溶液加热后趁热用预热的漏斗或热水漏斗进行的过滤（如图 4-4）。常用于重结晶操作中。

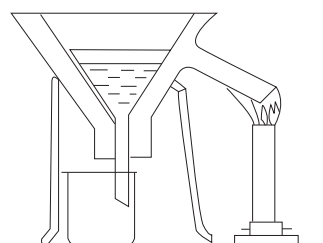


图 4-4 热水漏斗过滤装置

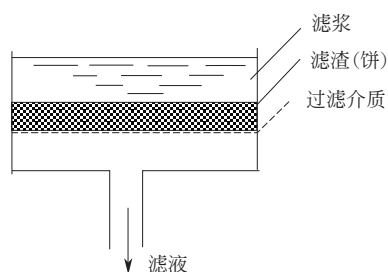


图 4-5 过滤过程示意图

此外，也可将布氏漏斗预热后进行减压热过滤。缺点是由于较细的沉淀，容易透滤。

## 二、过滤基本术语

过滤过程示意图 4-5。

滤浆指的是过滤操作中所处理的悬浮液。

滤液指的是通过过滤介质的液体。

滤渣（滤饼）指的是被截留住的固体物质。

收集滤液还是滤饼取决于目标产物的分布。

### 三、过滤类型

#### 1. 按照过滤的原理不同分类

按照过滤的原理不同可以将过滤分为表面过滤和深层过滤。

(1) **表面过滤** 表面过滤是利用过滤介质表面或过滤过程中固体堆积在滤材上并架桥所生成的滤饼表面，来拦截固体颗粒，使固体与液体分离，所以也称为滤饼过滤或饼层过滤，如图 4-6 所示。

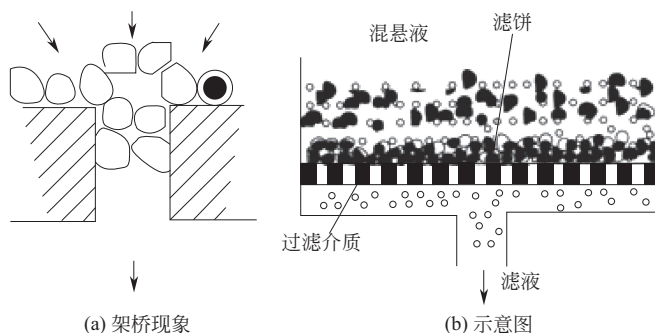


图 4-6 表面过滤（滤饼过滤）示意图

表面过滤主要依靠直接拦截捕获颗粒，过滤的推动力是压力差，过滤的阻力主要来自滤饼层。

(2) **深层过滤** 颗粒沉积在床层内部的孔道壁上但并不形成滤饼，这种过滤方式叫深层过滤，如图 4-7 所示。在生物制药生产中有许多工序是深层过滤操作。

深层过滤的过滤介质是表面型过滤介质的多层串联集合，其滤孔遍布整个介质厚度，形成“弯曲通道”，颗粒捕获于介质内部结构的一种过滤介质，对于颗粒物的去除起到了辅助作用。

深层过滤会使过滤介质内部的孔道逐渐缩小，所以过滤介质必须定期更换或再生。用砂滤法过滤饮用水是深层过滤作用的实例。

#### 2. 按照过滤的方向不同分类

按照过滤的方向不同可以将过滤分为常规过滤和错流过滤。

传统的常规过滤也叫垂直过滤或液体死端过滤，是大部分液体过滤所采用的过滤形式。其液体的流动方向与过滤方向一致，随着过滤的进行，过滤介质表面形成的滤饼层或凝胶层厚度逐渐增大，流速逐渐降低（如图 4-8）。

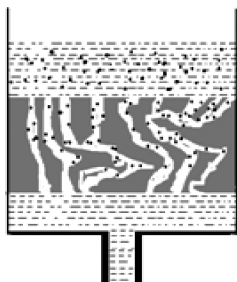


图 4-7 深层过滤示意图

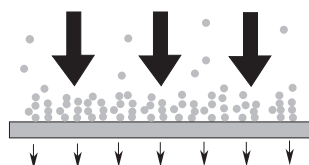


图 4-8 常规过滤（死端过滤）

随着过滤应用领域的扩大，对于像极小粒子、金属氢氧化物、蛋白质以及多糖等难过滤





的物质，采用传统的过滤模式已无法满足需要，为了提高物质的分离速率，新的过滤方法应运而生。

错流过滤又称切向流过滤，是指液体流动方向与过滤方向呈垂直的过滤形式（如图 4-9）。

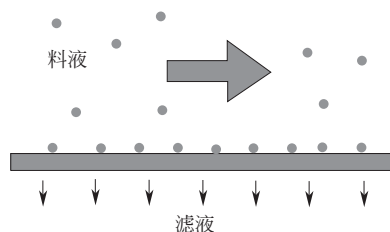


图 4-9 错流过滤（切向流过滤）

膜过滤大多采用动态错流过滤，大分子溶质被过滤介质阻隔，随浓缩液流出组件，过滤介质不易被堵塞，可连续长期使用。过滤过程可在常温、低压下运行，无相态变化，高效节能。

### 3. 按照过滤推动力不同分类

按照过滤推动力不同可将过滤分为压力过滤和离心过滤，其中按照压力推动力的产生条件不同，可将过滤分为常压过滤、加压过滤和减压过滤三种。

#### (1) 压力过滤

##### ① 常压过滤（重力过滤）

常压过滤是以液位差为推动力的过滤方法。实验室常用的滤纸过滤以及生产中使用的吊篮（图 4-10）或吊袋过滤（4-11）都属于常压过滤。



图 4-10 吊篮过滤



图 4-11 吊袋过滤

##### ② 加压过滤

加压过滤是以压力泵或压缩空气产生的压力为推动力的过滤方法（如图 4-12）。

##### ③ 减压过滤

减压过滤又称为真空过滤或抽滤，是通过在过滤介质的下方抽真空，以增加过滤介质上下方之间的压力差，推动液体通过过滤介质，而把大颗粒截留的过滤方法（如图 4-13）。实验室常用的抽滤瓶和生产中使用的各种真空抽滤机均属于此类。

减压过滤需要配备有抽真空系统。由于压力差最高不超过 0.1 MPa，多用于黏性不大的物料的过滤。

**(2) 离心过滤** 以离心力作为推动力实现的过滤，它将离心与过滤两种方法相结合实现固液分离。

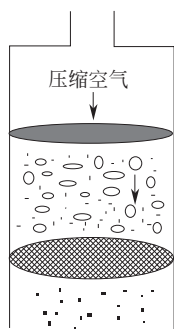


图 4-12 加压过滤



图 4-13 减压过滤（抽滤）

#### 4. 按照操作方式分类

按照操作方式分类可分为间歇式过滤和连续式过滤。间歇式过滤操作简单，占地面积小且过滤面积大，但操作压强高，效率较低，劳动强度大，滤布损耗快；连续式过滤能连续自动操作，节省人力，生产能力大，过滤的适应性好（能适合多种料液的过滤），但它的设备复杂，成本高，过滤面积不大。

#### 四、相对离心力

离心力是一种虚拟力，是一种惯性力，它使旋转的物体远离它的旋转中心（如图 4-14）。

物体（生物大分子或细胞器）围绕中心轴高速旋转时会受到离心力作用（如图 4-15），此离心力  $F$  由下式定义，即： $F = ma = m\omega^2 r$ 。



图 4-14 离心力的产生示意图

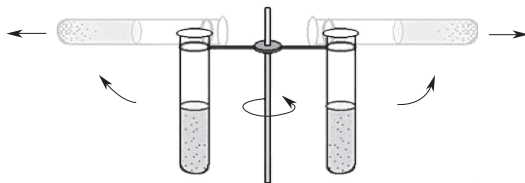


图 4-15 粒子高速旋转产生的离心力示意图

式中， $a$  为沉降粒子旋转的加速度， $\text{m/s}^2$ ； $m$  为沉降粒子的有效质量， $\text{kg}$ ； $\omega$  为沉降粒子旋转的角速度， $\text{rad/s}$ ； $r$  为沉降粒子的旋转半径， $\text{m}$ 。

通常离心力常用重力的倍数来表示，因而称为相对离心力（RCF）。或者用数字乘  $g$  来表示，例如  $25000 \times g$ ，则表示相对离心力为 25000。

相对离心力是指在离心场中，作用于颗粒的离心力相当于重力的倍数，单位是重力加速度  $g$  ( $980\text{cm/s}^2$ )，此时 RCF 可用下式计算：

$$\text{RCF} = 1.119 \times 10^{-5} \times n^2 \times r$$

式中， $n$  为转速， $\text{r/min}$ ； $r$  为旋转半径。

由上式可见，只要给出旋转半径  $r$ （如图 4-16），则 RCF 和  $n$  之间可以相互换算。但是由于转头的形状及结构的差异，每台离心机的离心管，从管口至管底的各点与旋转轴之间的距离是不一样的，所以在计算时规定旋转半径均用平均半径  $r_{\text{av}}$  代替： $r_{\text{av}} = (r_{\text{min}} + r_{\text{max}}) / 2$

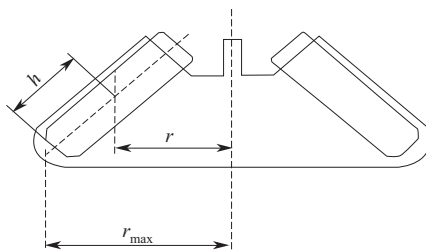


图 4-16 旋转半径

一般情况下，低速离心时常以转速  $n$  来表示，高速离心时则以  $g$  表示。

计算颗粒的相对离心力时，应注意离心管与旋转轴中心的距离  $r$  不同，即沉降颗粒在离心管中所处位置不同，则所受离心力也不同。因此在表示超离心条件时，通常总是用重力的倍数“ $\times g$ ”代替转速，因为它可以真实地反映颗粒在离心管内不同位置的离心力及其动态变化。科技文献中离心力的数据通常是指其平均值 ( $RCF_{av}$ )，即离心管中点的离心力。

为便于进行转速和相对离心力之间的换算，Dole 和 Cotzias 利用 RCF 的计算公式，制作了转速  $n$ 、相对离心力 RCF 和旋转半径  $r$  三者关系的列线图，图式法比公式计算法方便。换算时，先在  $r$  标尺上取已知的半径和在转速标尺上取已知的离心机转速，然后将这两点间划一条直线，与图中 RCF 标尺上的交叉点即为相应的相对离心力数值（如图 4-17）。

注意，若已知的转速值处于转速标尺的右边，则应读取 RCF 标尺右边的数值，转速值处于转速标尺左边，则应读取 RCF 标尺左边的数值。

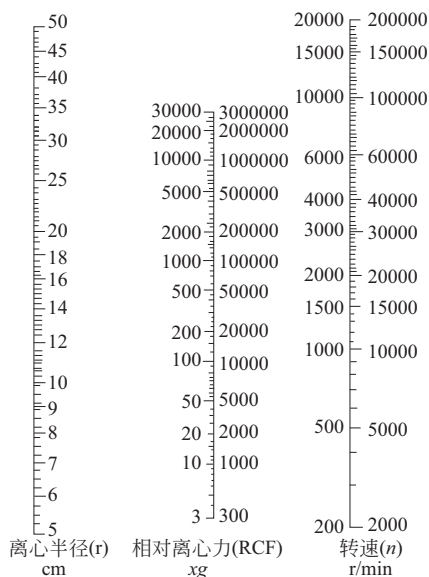


图 4-17 转速、相对离心力和旋转半径三者关系的列线图

## 五、(离心) 沉降系数

在分子生物学中，衡量大分子沉降速度时用沉降系数来表示，指的是单位离心力作用下粒子的沉降速度。沉降系数是以时间表示的，蛋白质、核酸等生物大分子的沉降系数实际上时间在  $10^{-13}$  s 左右，故把沉降系数  $10^{-13}$  s 称为一个 Svedberg 单位，简写 S，单位为 s。如核糖体 RNA 有 30S 亚基和 50S 亚基，这里的 S 指的是沉降系数。

沉降系数  $S$  可以通过分析超离心机测定，它与分子量呈正关系，沉降系数越大，其分子量也越大。

## 六、离心机结构组成与转子

普通离心机的基本结构包括机盖、离心室、转子、离心套管、电机主轴、电动机、底座（图 4-18）。其中转子又称为转盘或转头，转子可分为水平式转子、角式转子、垂直转子（图 4-19）。一套完整的水平转子包括水平转子体、挂架、适配器（图 4-20）。

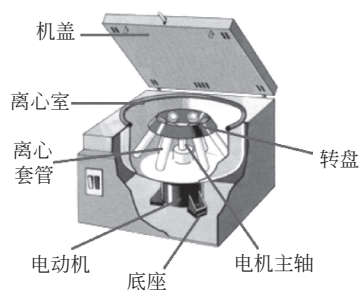


图 4-18 普通离心机的结构

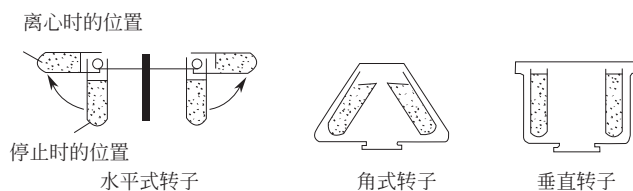


图 4-19 转子的类型

## 七、转子配平

离心机在运转过程中，如果没有配平，转轴受到的力矩不同，转子对转轴会产生较大磨损。长时间的磨损会减少离心机使用寿命。配平除了对称放置的离心管（含离心液体）质量需要天平平衡之外，其摆放位置也是非常重要的。

### 1. 水平转子配平

水平转子配平时既要考虑单个吊篮内的样品是否对称，又要考虑对向吊篮内的样品是否平衡，一般遵循以下两个原则与要求（图 4-21）。



图 4-20 水平转子的组成

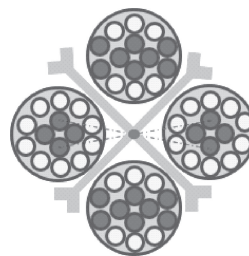


图 4-21 水平转子的配平

- ① 单个吊篮内的样品放置，应保证吊篮的重心在吊篮的中心点。
- ② 对向吊篮内的样品放置，应以一个吊篮的样品放置为基准，严格按照转子中心点对称原则。

### 2. 固定角式转子配平

对于固定角式转子的配平，只需要做好“中心对称”即可。以 12 孔固定角式转子为例，见图 4-22 所示，图中给出 2~12 根离心管的摆放位置。

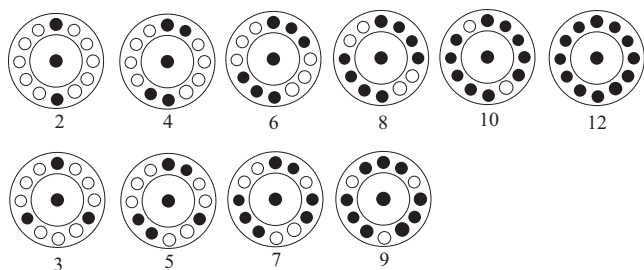


图 4-22 角式转子的配平

## 第一节 沉降

沉降是指悬浮液中密度较大的固体颗粒在力的作用下逐渐下沉的过程，可分为重力沉降和离心沉降。重力沉降是常用的气-固、液-固和液-液分离手段，在生物分离过程中有一定程度的应用。菌体和动植物细胞的重力沉降虽然简便易行，但菌体细胞体积很小，沉降速度很慢。因此，实际应用时需使菌体细胞聚合成较大凝聚体颗粒后进行沉降操作，提高沉降速度。在中性盐的作用下，可使菌体表面双电层排斥电位降低，有利于菌体之间产生凝聚。另外，向含菌体的料液中加入聚丙烯酰胺或聚乙烯亚胺等高分子絮凝剂，可使菌体之间产生架桥作用而形成较大的凝聚颗粒。凝聚或絮凝不仅有利于重力沉降，而且还可以在后续过滤分离中大大提高过滤速度。

### 一、悬浮液重力沉降过程

悬浮液颗粒在重力作用下发生的颗粒沉降过程见图 4-23 所示。悬浮液重力沉降过程中出现清液区、等浓度区、变浓度区和沉聚区四个分区。随着沉降过程的进行，A、D 两区逐渐扩大，B 区这时逐渐缩小至消失。等浓度 B 区消失后，A、C 界面以逐渐变小的速度下降，直至 C 区消失，此时在清液区与沉聚区之间形成一层清晰的界面。此后便属于沉聚区的压紧过程。D 区又称为压紧区，压紧过程往往占沉降过程的绝大部分时间。

### 二、重力沉降及设备

颗粒受到重力加速度的影响而沉降的过程叫重力沉降。

#### 1. 颗粒沉降过程

如果颗粒在重力沉降过程中不受周围颗粒和器壁的影响，称为自由沉降。而固体颗粒因相互之间影响而使颗粒不能正常沉降的过程称为干扰沉降。

固体颗粒在静止流体中，受到的作用力有重力、浮力和阻力（见图 4-24）。如果合力不为零，则颗粒将做加速运动，表现为固体颗粒开始沉降。当颗粒加速沉降时，所受到的摩擦力和其他流体阻力的作用越来越大，当作用在颗粒上的合力渐趋为零，即浮力、摩擦阻力和重力达到平衡，此时固体颗粒匀速沉降。所以颗粒的沉降过程分为加速沉降阶段和匀速沉降阶段。其中加速沉降阶段时间很短，颗粒在短时间内即达到最大速度。随着合力减小为零，颗粒进入匀速沉降阶段，保持匀速运动直至下沉到容器底部。因此颗粒在匀速沉降阶段的速度就近似地看作整个沉降过程的速度。其表达式为：

$$u_t = \sqrt{\frac{4gd(\rho_s - \rho)}{3\zeta\rho}}$$

式中,  $u_t$  为沉降速度,  $\text{m/s}$ ;  $\rho_s$  为固体颗粒密度,  $\text{kg/m}^3$ ;  $d$  为固体颗粒直径,  $\text{m}$ ;  $\rho$  为流体的密度,  $\text{kg/m}^3$ ;  $g$  为重力加速度,  $\text{m/s}^2$ ;  $\zeta$  为沉降系数。

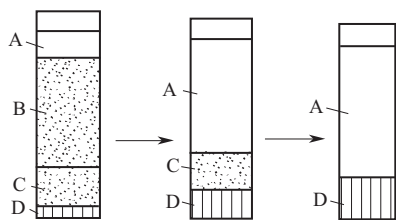


图 4-23 悬浮液重力沉降过程

A—清液区; B—等浓度区; C—变浓度区; D—沉聚区

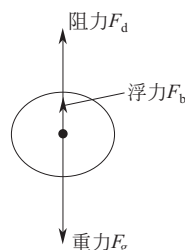


图 4-24 颗粒受力分析

影响颗粒沉降速度的因素是多种多样的。流体的密度越大, 沉降速度越小; 颗粒的密度越大, 沉降速度越大。颗粒形状也是影响沉降的一个重要的因素。对于同一性质的固体颗粒, 非球形颗粒的沉降阻力比球形颗粒大得多, 因此其沉降速度较球形颗粒的要小一些。

重力沉降的效果有限, 通常以颗粒为  $10\mu\text{m}$  为衡量标准, 一般重力沉降能分离的颗粒直径大于  $10\mu\text{m}$  (大于  $75\mu\text{m}$  效果较好)。对小于  $10\mu\text{m}$  颗粒的分离, 重力沉降无法实现, 则改用离心沉降。

## 2. 重力沉降设备

工业上进行重力沉降的设备主要有沉降室(降尘室)和沉降槽。沉降室一般指气固沉降, 沉降槽一般指液固沉降。

(1) 降尘室 如图 4-25 所示为工业用沉降气体悬浮颗粒的设备, 其结构非常简单。含尘气体以一定流速进入沉降室后, 因气流通道横截面积扩大而流速减小, 气体中的悬浮颗粒受重力作用而沉降下来, 达到与气体分离的目的。降尘室的长度  $L$  与高度  $H$  的比例要恰当, 要保证气体在沉降室流动的时间内, 颗粒能够沉降到降尘室的底部。

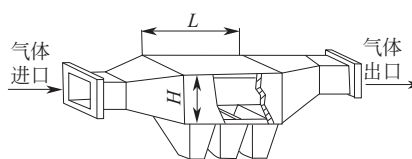


图 4-25 降尘室

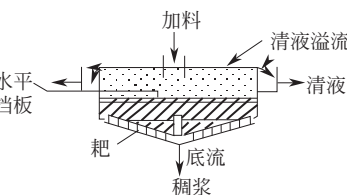


图 4-26 单层连续沉降槽

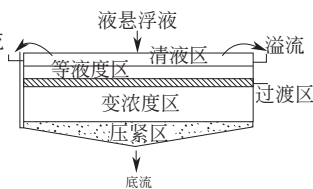


图 4-27 连续沉降槽的沉降区

大型降尘室常用来进行废气处理。为了提高降尘室生产能力, 可在降尘室内安装多层搁盘, 使颗粒沉降在搁盘上。这样有效地利用了空间, 提高了沉降生产力。

(2) 沉降槽 沉降槽也称增稠器或澄清器, 是重力沉降设备, 用来提高悬浮液浓度, 同时得到澄清液。当沉降分离的目的主要是为了得到澄清液时, 所用设备称为澄清器; 若分离目的是得到含固体粒子的沉淀物时, 所用设备为增稠器。由于从沉降槽得到的沉渣中还含有约 50% 的液体, 悬浮液的增稠常作为下一步分离的预处理, 以减小后续工序分离设备的负荷。

生产中普遍应用是单层连续沉降槽(如图 4-26), 是一个底部稍带锥形的大直径圆筒形





槽。料浆经中央下料筒送至液面以下 0.3~1m 处，即要插到悬浮液区。清液由槽壁顶端周围圈上的溢流堰连续流出，称为溢流。颗粒下沉，沉渣由缓慢转动的耙集中到底部中央的卸渣口排出，称为底流。在连续沉降槽中，上部的悬浮液很稀，颗粒的沉降速度快，而底部的密度和浓度都很高（如图 4-27），虽然每一个颗粒的沉降终速很小，但单位时间单位面积上固体颗粒通过的总量要比槽的中部的多。

## 第二节 过滤

过滤是固液分离常用的操作方法。在生物反应领域，发酵液中存在细胞、培养基颗粒、代谢产物中的不溶性物质以及预处理过程中产生的细胞碎片、杂质沉淀等悬浮固体，往往都需要进行过滤分离操作。另外，生物药品中的血液制剂、免疫血清、细胞营养液以及基因工程纯化产品等不耐高温的液体只有通过过滤（膜过滤）才能达到除菌的目的。

### 一、过滤原理与过滤介质

利用薄片形多孔性介质截留固-液悬浮液中的固体粒子，进行固-液分离的方法称为过滤。根据过滤方式可分为表面过滤和深层过滤（图 4-28）。这种能使溶剂通过又将其固体颗粒截留以达到分离或净化目的的多孔材料称为过滤介质（图 4-29）。由此可见，过滤介质起着使滤液通过，截留固体颗粒并支撑滤饼的作用。

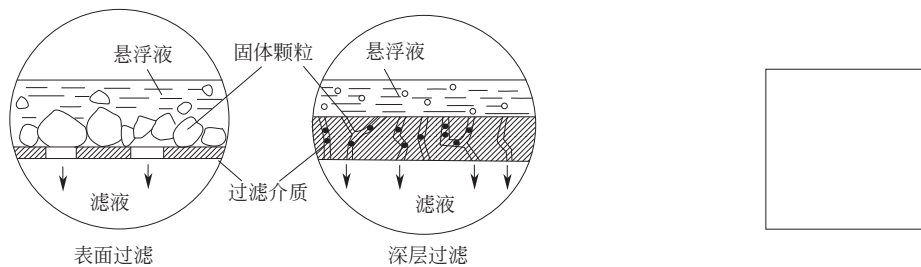


图 4-28 过滤与过滤介质

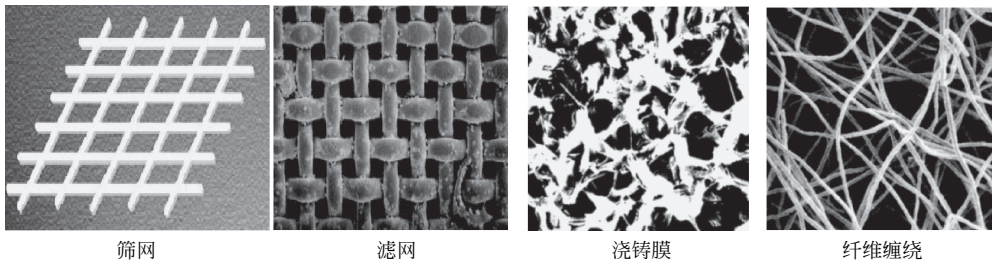


图 4-29 过滤介质

过滤介质具有下列特点：

- ① 多孔性，孔道适当，对流体的阻力小，又能截住要分离的颗粒。
- ② 物理化学性质稳定，耐热，耐化学腐蚀。
- ③ 足够的机械强度，使用寿命长。
- ④ 制造方便，价格便宜。

过滤介质根据材料的不同，可分为织物介质、多孔性固体介质、堆积介质和多孔膜介

质。织物介质如金属丝网、滤布等；多孔性固体介质如陶瓷滤材；堆积介质如硅藻土、膨润土、活性炭等；各种性能的膜包括微孔膜、超滤膜、半透膜等。

## 二、影响过滤速率的因素

单位时间通过单位过滤面积的滤液体积称为过滤速度，是滤液通过过滤介质的平均速度，表明了过滤设备的生产强度，即设备性能的优劣。过滤速率（瞬间速率）用公式表示为：

$$u = \frac{dV}{A d\tau} = \frac{dQ}{d\tau} = \frac{A \cdot \Delta P}{\mu (R_m + R_c)} = \frac{\Delta P}{\frac{\mu (R_m + R_c)}{A}} = \frac{\text{推动力}}{\text{阻力}}$$

式中， $u$  为过滤速率， $\text{m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  即  $\text{m/s}$ ； $V$  为滤液体积， $\text{m}^3$ ； $A$  为过滤面积， $\text{m}^2$ ； $\tau$  为过滤时间， $\text{s}$ ； $Q$  为单位过滤面积所得滤液量， $\text{m}^3/\text{m}^2$ ； $\Delta P$  为压强差， $\text{Pa}$ ； $\mu$  为悬浮液中液相的黏度， $\text{pa} \cdot \text{s}$ ； $R_m$ ， $R_c$  分别为介质阻力，滤饼阻力。

过滤速率与过滤推动力成正比，与过滤阻力成反比。在压力过滤中，推动力就是压差，过滤阻力则与过滤介质结构、滤饼的结构与厚度、料液的黏度等诸多因素有关。

## 三、助滤剂

### 1. 助滤剂基本概念

为了减小可压缩性滤饼的过滤阻力，可采用助滤剂改变滤饼结构，提高滤饼的刚性和颗粒之间的空隙率。助滤剂是一种颗粒均匀、质地坚硬、不可压缩的粒状物质。其化学性质稳定，不与混合体系发生任何化学反应，不溶解于溶液相中，在过滤操作的压力范围内是不可压缩的。常用的助滤剂有硅藻土、活性炭、滑石粉、纤维粉、珍珠岩粉、石棉等。

硅藻土系由硅藻化石加工制成的一种形状不规则的多孔颗粒，主要成分为  $\text{SiO}_2$ ，有较高的惰性和不溶性，能形成坚硬的不可压缩的滤饼，是最常用的助滤剂。

活性炭常用于注射剂的过滤，具有很强的吸附性，能吸附热原、微生物并具有脱色作用，但它也能吸附药物，特别是生物碱类，应用时要注意用量。

滑石粉吸附性小对胶质分散作用好，能吸附水溶液中过量挥发油和一些色素，适用于含黏液、树胶较多的滤浆过滤。另外，用挥发油制备芳香水剂时，常用滑石粉作助滤剂。需要注意的是，滑石粉很细，不易滤清。

纸浆有助滤和脱水作用，在中药注射剂生产中使用较广，特别适用于处理某些难以滤清的药液。



### 知识拓展

#### 滑石粉的用途以及与镁粉的区别

滑石粉的主要成分是硅酸镁，具有润滑性、抗黏、助流、光泽好、吸附力强等优点。通常将化妆品级滑石粉用于各种润肤粉、美容粉、爽身粉等化妆品中。片剂中的滑石粉是经过纯化的医药食品级含水硅酸镁，主要起到助流作用，片剂中常常还有一种起润滑作用的白色粉成分为硬脂酸镁。而镁粉的主要成分是碳酸镁，起到吸汗防滑的作用，这正与滑石粉的作用相反。体操、举重运动员赛前在手上涂的粉以及 NBA 成员赛前在手上抹的粉一般是镁粉，起到防滑的作用。

### 2. 助滤剂的使用

(1) 预涂法 预涂是将助滤剂用适量的滤浆制成糊状物，加至过滤介质上，在过滤介



质表面形成助滤剂预涂层，抽滤成 1~5mm 厚的助滤剂沉积层，然后过滤滤浆。这种过滤方法可防止过滤介质孔道被细颗粒或黏着物堵塞，过滤初期就可得到澄清溶液。具体用量需根据过滤设备的类型和过滤条件来确定。

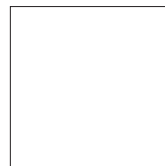
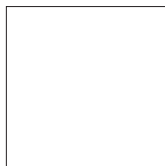
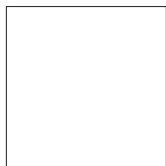
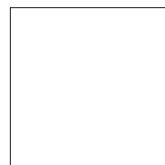
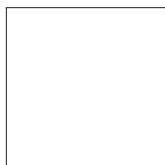
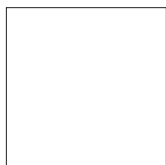
**(2) 掺滤法** 掺滤法是把助滤剂按一定比例直接分散在待过滤的悬浮液中，一起过滤，其加入量约为浆液质量的 0.1%~0.5%。在过滤介质上形成多孔、疏松的滤饼，反复过滤得到澄清溶液。这种方法适合滤浆中固体含量少，特别是含有黏性或胶凝性物质，可有效提高过滤量与澄清度，延长过滤介质使用寿命。

当然也可将①、②两种方法联用。由于助滤剂在滤饼中不易分离，所以当滤饼是目标物质时一般不使用助滤剂，当以获得澄清滤液为目的时，采用助滤剂才是合适的。

## 四、过滤设备

制药工业常用的过滤设备有板框压滤机、带式压滤机、加压叶滤机、转鼓（筒）真空过滤机、机械过滤器、砂滤缸、离心过滤机等。其中板框压滤机、带式压滤机、加压叶滤机、机械过滤器、砂滤缸、转鼓（筒）真空过滤机是以压力差为推动力的过滤设备，而离心过滤机是以离心力为推动力的过滤设备。

对于以压力为推动力的工业过滤设备来说，一般经历以下四个阶段：①过滤阶段，初期采用恒速过滤，压力升至某值后，转而采用恒压过滤，悬浮液在推力作用下，克服过滤介质阻力进行固液分离，固体颗粒被过滤介质截留逐渐形成滤饼；②滤饼阶段，滤饼毛细孔中含有许多滤液须用清水或其他液体洗涤，以得到较为纯净固体产品或尽量多的滤液；③滤饼干燥，用压缩空气吹或者真空吸，将存留的洗涤液排走，得到含水量较低的滤饼；④卸料，把滤饼从过滤介质上卸出，并将过滤介质洗净，最大限度回收滤饼。



## 第三节 离心分离技术

离心分离是指借助于离心力，使密度不同的物质进行分离的方法。

离心分离对那些固体颗粒很小或液体黏度很大、过滤速度很慢甚至难以过滤的悬浮液十分有效，对那些忌用助滤剂或助滤剂使用无效的悬浮液的分离，也能得到满意的结果。离心分离不但可用于悬浮液中液体或固体的直接回收，而且可用于两种不相溶液体的分离（如液-液萃取）和不同密度固体或乳浊液的分离（如制备超离心技术）。离心分离可分为离心沉降、离心过滤和超离心三种形式。

## 一、离心沉降

离心沉降是在离心力作用下使分散在悬浮液中的固相粒子或乳浊液中的液相粒子沉降的过程。它利用固液或液液两相的相对密度差，在离心机无孔转鼓或离心管中进行悬浮液或乳浊液的分离操作。

离心沉降是实验研究与生产实践中广泛使用的非均相分离手段，用来分离固相含量较少，颗粒较细的悬浮液。例如，用于菌体和细胞的回收或除去，还用于红细胞、病毒以及蛋白质的分离，也还应用于液液两相分离。

### 1. 离心沉降速度

当颗粒处于离心场时，将受到四个力的作用，即重力  $F_g$ 、惯性离心力  $F_c$ 、向心力  $F_f$  和阻力  $F_d$ ，如图 4-30 所示。

与其他三种力相比，微小颗粒所受的重力太小，可不予考虑。根据牛顿运动定律，当颗粒所受的惯性离心力、向心力和阻力平衡时，颗粒在径向上将保持匀速运动而沉降到器壁。在匀速沉降阶段的径向速度就是颗粒在此位置上的离心沉降速度  $u_r$ 。其计算式为：

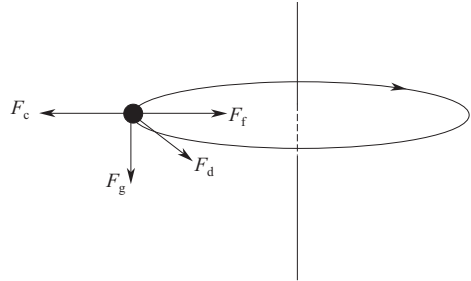


图 4-30 颗粒在离心场中的受力分析

$$u_r = \sqrt{\frac{4d(\rho_s - \rho)u_T^2}{3\zeta\rho R}}$$

式中， $u_r$  为离心沉降速度，m/s； $u_T$  为离心切向速度，m/s； $\rho_s$  为固体颗粒密度，kg/m<sup>3</sup>； $\rho$  为流体的密度，kgm/m<sup>3</sup>； $d$  为固体颗粒直径，m； $\zeta$  为沉降系数。

其中  $\frac{u_T^2}{R}$  是离心场的离心加速度。由上式可看到离心沉降速度随旋转半径  $R$  的变化而变化，半径增大则沉降速度减小。

### 2. 离心分离因数

离心加速度与重力加速度之比叫离心分离因数，用  $K_c$  表示。它是离心分离设备的重要性能指标。其定义式为

$$K_c = \frac{mu_T^2}{Rmg} = \frac{u_T^2}{Rg}$$

式中， $K_c$  为离心分离因数； $m$  为颗粒质量，g； $u_1$  为颗粒的切线速度，m/s； $R$  为离心半径，m； $g$  为重力加速度，m/s<sup>2</sup>。

$K_c$  值愈高，离心沉降效果愈好。常用离心机的  $K_c$  值在几十至几千之间，高速管式离心机的  $K_c$  可达到数万至数十万，分离能力强。 $K_c$  值大说明了离心机的分离能力要比重力沉降设备的分离能力强。

用于离心沉降分离的设备可分为瓶（管）式离心机、无孔转鼓离心机和旋流分离器三种类型。其中瓶（管）式离心机根据离心转子的角度分为斜角式离心机和平抛式离心机。无孔转鼓离心机可分为三足式沉降离心机、高速管式离心机、碟片式离心机和高速冷冻离心机等。旋流分离器可分为旋风分离器和旋液分离器，旋风分离器主要用于气体中颗粒的分离，而旋液分离器主要用于液体中颗粒的分离。



## 二、离心过滤

所谓离心过滤，就是以离心力代替压力差作为过滤推动力的分离方法，是将料液送入有孔的转鼓并利用离心力场进行过滤的过程。以离心力为推动力完成过滤操作，兼有离心和过滤的双重作用（如图 4-31）。离心过滤适合于含固体量大、粒径大的悬浮液。

离心过滤设备的转鼓为一多孔圆筒，圆筒转鼓内表面铺有滤布。操作时，被处理的料液由圆筒口连续进入筒内，在离心力的作用下，清液透过滤布及鼓壁小孔被收集排出，固体微粒则被截留于滤布表面形成滤饼。常用离心过滤的设备主要有三足式过滤离心机、卧式刮刀卸料过滤离心机和活塞推料离心机三种。

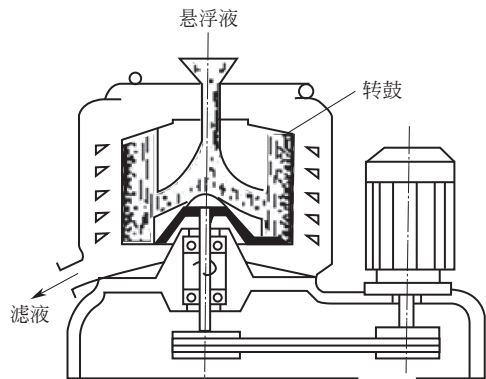


图 4-31 离心过滤分离原理

## 三、离心设备

离心设备根据作用目的不同可分为离心沉降设备和离心过滤设备。根据结构不同可分为三足式离心机、平板式离心机、卧螺式离心机、管式离心机、碟式离心机等类型，这些结构类型的离心机根据转鼓有无孔和作用目的不同，相对应的有沉降离心机和过滤离心机。

### 1. 三足式离心机

三足式离心机结构如图 4-32 所示。整机由外壳、转鼓、传动主轴、底盘等部件组成，机体悬挂在机座的三根支杆上。由于有弹簧装置起减震作用，在运行时非常平稳。三足式离心机的转鼓由传动轴驱动作一定速度的旋转，混悬液进入转鼓后也随之旋转，从而产生了强大的离心力。在离心力的作用下，重液部分被甩向转鼓壁，残留在转鼓壁上或者沉积于转鼓底部的集液槽里。当集液槽里积累了一定量的重液后，需要停机卸料。卸料方式目前有人工卸料、手动刮刀卸料和自动刮刀卸料三种。人工卸料从上部卸料的称为人工上部卸料三足式离心机，从下部卸料的称为人工下部卸料三足离心机。

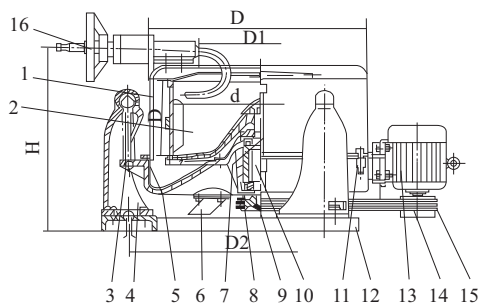
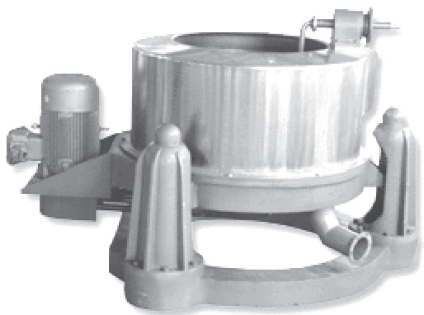


图 4-32 三足式离心机

1—机壳；2—转鼓部件；3—吊杆；4—柱脚；5—中心盘；6—出水弯头；7—刹车部件；8—轴承座；9—衬套；10—主轴；11—钩头螺栓；12—三角底盘；13—电机；14—离合器；15—三角皮带；16—吸液装置



三足式离心机对物料适应性强，操作方便，结构简单，价格低，是目前工业上广泛采用的离心分离设备。其缺点是需间歇或周期性循环操作，卸料阶段需减速或停机，不能连续生产。又因转鼓体积大、分离因数小、对微细颗粒分离不完全，需要与高分离因数的离心机配合使用才能达到分离目的。

2. 平板式离心机

平板式离心机是指离心机的支撑形式为平板式的，即整机是由一块平板支撑，平板下面再安放减震垫支撑（图 4-33），而三足式离心机则是由三个柱脚支撑机体。平板式离心机是从三足式离心机、卧式刮刀离心机基础上发展起来，采用一体化结构，清洁方便，工作环境卫生，自动化程度高，工作强度少，满足现代制药企业生产使用的要求。

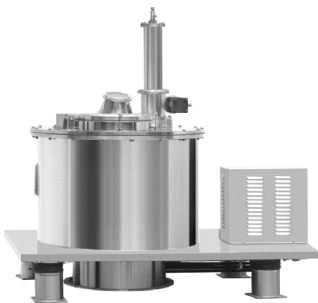


图 4-33 平板式离心机

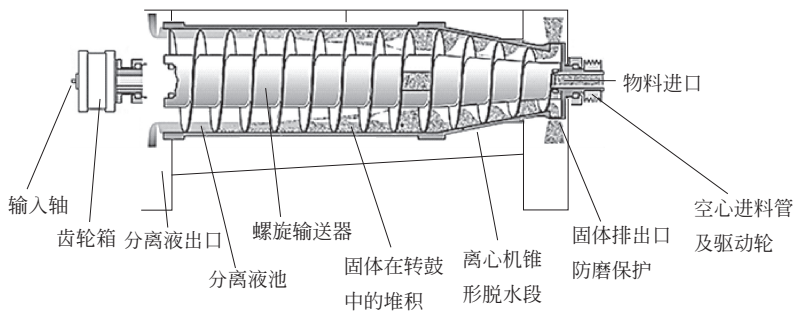


图 4-34 卧螺式离心机结构示意图

3. 卧螺式离心机

卧螺式离心机是将混合液体中密度大于液相的固体物从液相中分离出来（图 4-34）。当混合液体由进料口进入高速旋转的转鼓体内腔后，混合液体中密度较大的固体物，在离心力的作用下，迅速沉降到转鼓内壁，被螺旋推料器从固相出口排出转鼓体外；同时密度较小的液相则在离心力的作用下形成内层液环，通过液相溢流口排出转鼓体外。转鼓与螺旋推料器同时高速运转，两者之间存在一定的转速差，使得沉降在转鼓壁上固体物不间断地被螺旋推料器推送至出口排出，整个分离过程连续进行。

卧螺式离心机是一种卧式螺旋卸料、连续操作的高效离心分离设备，具有自动化程度高、工作环境好等优点，但价格昂贵。适合分离含固相物粒度大于 0.005~10mm 的悬浮液，可应用于中药等植物提取分离、植物及动物蛋白分离等领域。

4. 管式离心机

管式离心机原理是通过离心力的作用，利用离心机产生的离心力将不同密度的物料进行有效分离。依据不同的分离原理，管式离心机可分为澄清型（GQ）和分离型（GF）两种（图 4-35）。澄清型管式离心机的主要功能是处理液体和固体的两相分离；分离型管式离心机的主要功能是处理液体与液体或者是液体、液体和固相两相及三相分离。管式离心机由机身、传动装置、转鼓、集汇盘、进液轴承座组成，转鼓上部是挠性主轴，下部是阻尼轴承。电机通过传动，





从而使转鼓自身轴线高速旋转，在转鼓内部形成强大的离心力场，物料由底部进液口射入，转鼓离心力促使料液沿转鼓内壁向上流动，使料液按不同组分的密度差分层，从液盘出口流出。

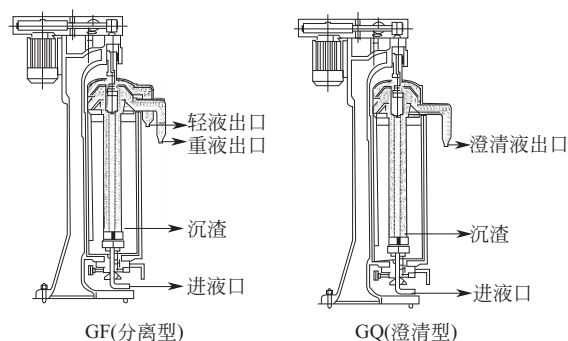


图 4-35 管式离心机结构示意图

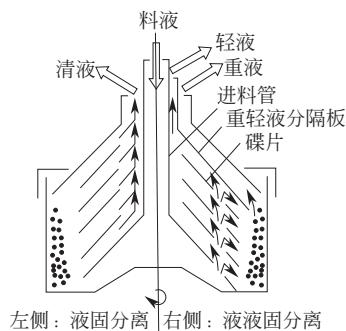


图 4-36 碟式离心机结构示意图

## 5. 碟式离心机

电机驱动转鼓绕主轴线做高速回转，料液由上部中心进料管流至转鼓底部，经碟片下座面的分流孔趋向转鼓壁。在离心力场作用下，比液体密度大的固相物沉向转鼓内壁形成沉渣，经轻液向心泵，由轻液出口排出。重液沿碟片内锥面趋向鼓壁，然后向上流经重液向心泵，由重液出口排出，从而完成重液与轻液分离（图 4-36）。

转鼓内腔呈双锥形，可对沉渣起压缩作用，提高沉渣浓度。转鼓周缘有喷出浆状沉渣的喷嘴。喷嘴的数目和孔径根据悬浮液性质、浓缩程度和处理量确定。为提高排渣浓度，这种分离机还有将排出的沉渣部分送回转鼓内再循环的结构。沉渣的固相浓度可比进料的固相浓度提高 5~20 倍。这种分离机的处理量最大达 30t/h，适用于处理固相颗粒直径为 0.1~100 $\mu$ m、固相浓度通常小于 10%（最大可至 25%）的悬浮液。一般常用于分离两种密度不同的液体所形成的乳浊液或含有极微量固体颗粒的悬乳液。

## 四、超离心法

根据物质的沉降系数、质量和形状不同，应用强大的离心力将混合物中各组分分离、浓缩、提纯的方法称为超离心法。超速离心机的离心速度为 6000r/min 及以上，离心力约为重力加速度的 50 万倍。它在生物化学、分子生物学以及细胞生物学的发展中起着非常重要的作用。应用超离心技术中的差速离心、等密度梯度离心等方法，已经成功地分离制取各种亚细胞物质，如线粒体、微粒体、溶酶体、肿瘤病毒等。用  $5 \times 10^5 g$  以上的强大离心力，长时间的离心（如 17h 以上），可获得具有生物活性的脱氧核糖核酸（DNA）、各种与蛋白质合成有关的酶系、各种信使核糖核酸（mRNA）和转移核糖核酸（tRNA）等，这为遗传工程、酶工程的发展提供了基础。超离心法是现代生物技术领域研究中不可缺少的实验室分析和制备手段。

### 1. 超离心技术的原理

超离心技术中，由于使用的离心机类型是无孔转鼓，所以也属于离心沉降。一个球形颗粒的沉降速度不但取决于所提供的离心力，也取决于粒子的密度和直径以及介质的密度。当粒子直径和密度不同时，移动同样距离所需的时间不同，在同样的沉降时间，其沉降的位置也不同。

## 2. 超离心技术的分类

超离心技术按处理要求和规模分为制备超离心和分析超离心两类。

(1) 制备超离心 制备超离心的主要目的是最大限度地从样品中分离高纯度目标组分, 进行深入的生物化学研究。制备超离心分离和纯化生物样品一般有差速离心法和区带离心法。

① 差速离心法。差速离心法是采用逐渐增加离心速度或交替使用低速和高速进行离心, 用不同强度的离心力使具有不同质量的物质分级分离的方法。此法适用于混合样品中各沉降系数差别较大组分的分离。

它利用不同的粒子在离心力场中沉降的差别, 在同一离心条件下, 沉降速度不同, 通过不断增加相对离心力, 使一个非均匀混合液内的大小、形状不同的粒子分步沉淀。

操作过程中一般是在离心后用倾倒的办法把上清液与沉淀分开, 然后将上清液加高转速离心, 分离出第二部分沉淀, 如此往复加高转速, 逐级分离出所需要的物质。

差速离心的分辨率不高, 沉降系数在同一个数量级内的各种粒子不容易分开, 常用于其他分离手段之前的粗制品提取。例如用差速离心法分离细胞匀浆中的细胞器(图 4-37)。

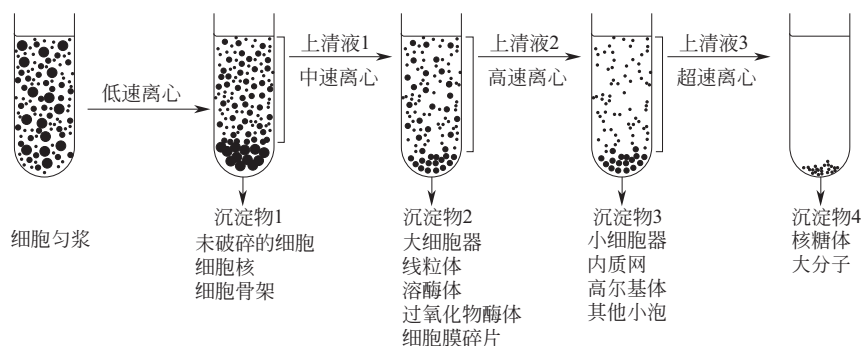


图 4-37 差速离心颗粒分级沉降

② 区带离心法。区带离心法(密度梯度离心法)是指用一定的介质在离心管内形成一连续或不连续的密度梯度, 将生物物料液置于介质的顶部或与密度梯度介质混合, 在离心力场的作用下, 这些微粒最终稳定在梯度中某些特定位置上, 使生物物料液中的组分得到分离, 形成不同区带的分离方法。区带离心法又称为密度梯度离心法, 可分为速率区带离心法和等密度(梯度)离心法。

梯度介质要有足够大的溶解度, 不与分离组分反应, 也不会引起分离组分的凝集、变性或失活。常用介质有蔗糖、甘油、CsCl、CsBr、Cs<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>等。样品铺在密度梯度溶液表面或与密度梯度液混合, 离心后形成若干条界面清楚的不连续区带。

### a. 速率区带离心法

速率区带离心是在离心管中装入密度梯度溶液, 溶液的密度从离心管顶部至底部逐渐增加。将所需分离的样品小心地加入到密度梯度溶液的顶部。由于不同大小的粒子在离心力作用下, 在梯度中移动的速度不同, 所以经过离心后会形成几条分开的样品区带, 所以称之为速率区带离心法。利用生物组分在尺寸上的差异形成沉降速率的不同, 选择某一特定时刻, 当它们中的各个纯样品区带之间的距离彼此分开时, 停止离心即可达到分离目的, 见图 4-38。

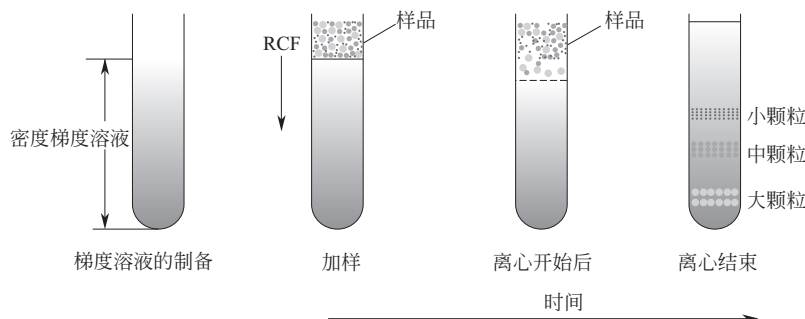


图 4-38 速率区带离心分离示意图

此法仅用于分离有一定沉降系数差别的颗粒，与颗粒的密度无关，因此沉降系数相同、密度不同的颗粒（如线粒体、溶酶体等）不能用此法分离。一般应用于物质的沉降系数相异，而密度相同的情况。密度梯度中的介质最大密度要小于待分离的目标产物的密度，常用蔗糖、甘油等做介质，来分离提取核酸，富含 A、T 和富含 G、C 的 DNA，亚细胞器和质粒等，可以用高速冷冻离心机进行速率区带离心。

#### b. 等密度（梯度）离心法

等密度（梯度）离心是指在离心过程中，粒子会移动到与它本身密度相同的地方形成区带（图 4-39）。等密度（梯度）离心法在离心前预先配制介质的密度梯度，待分离的样品铺在梯度溶液顶上或和梯度液先混合，离心开始后，当梯度溶液由于离心力的作用逐渐形成管底浓而管顶稀的密度梯度，与此同时原来分布均匀的粒子也发生重新分布。

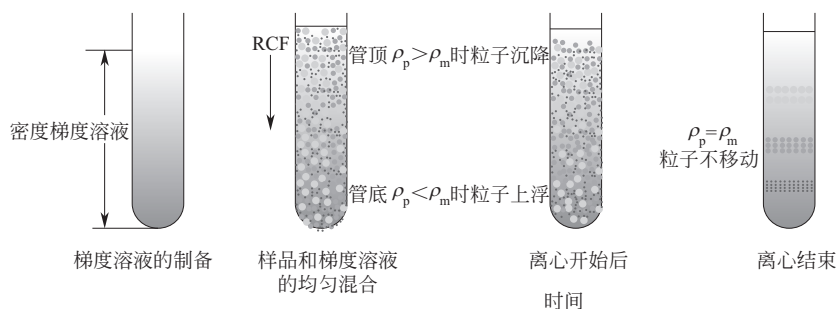


图 4-39 等密度（梯度）离心分离示意图

$\rho_p$ —颗粒密度； $\rho_m$ —介质密度

此法一般应用于物质的沉降系数相近，而密度差异较大时。等密度梯度溶液包含了被分离样品中所有粒子的密度，常用的梯度溶液是 CsCl 和 CsBr。

**(2) 分析超离心** 分析超离心主要是为了研究生物大分子的沉降特性和结构，而不是专门收集某一特定组分。因此它使用了特殊的转子和检测手段，以便连续监视物质在一个离心场中的沉降过程。

分析超离心机主要由一个椭圆形的转子、一套真空系统和一套光学系统所组成。离心机中装有的光学系统可保证在整个离心期间都能观察小室中正在沉降的物质，可以通过对紫外线的吸收（如对蛋白质和 DNA）或折射率的不同对沉降物进行监视。图 4-40

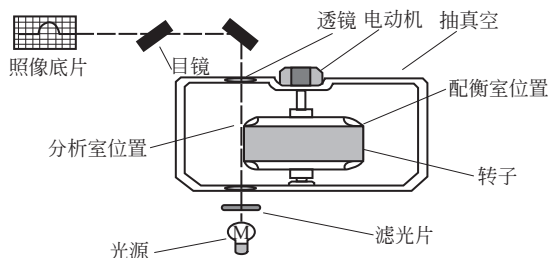


图 4-40 分析超离心系统示意图

为分析超离心系统的示意图，主要用于测定生物大分子的分子量、测定生物大分子的纯度、分析生物大分子中的构象变化等。

## 案例分析

### 一、固液分离技术在生活中的应用

洗衣机脱水是固液分离技术在生活中的典型应用例子，全自动洗衣机工作流程如图 4-41 所示。

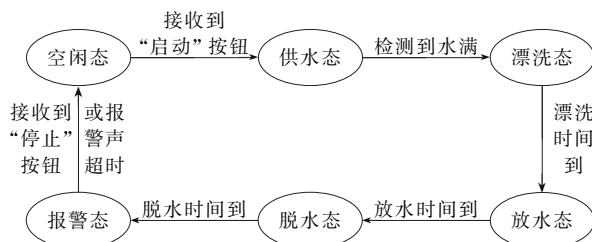


图 4-41 全自动洗衣机工作流程

洗衣机的洗涤原理是由模拟人工搓揉衣物的原理而发展起来的。它以电动机为动力，通过对衣物和水的摩擦、翻滚、冲刷等机械作用和洗涤液的表面活化作用，将附着在衣物上的污垢去掉，达到洗净衣物的目的。洗涤衣物的过程，在于破坏污垢在衣物纤维上的附着力，并脱离衣物。

洗衣机的脱水多数采用离心式脱水方式，波轮洗衣机是垂直离心脱水式。离心式脱水转速一般为  $500 \sim 1500 \text{ r/min}$ ，依靠离心力的作用能够将衣物内的水甩掉。离心式脱水与人工手拧（如图 4-42）相比，具有含水率低、不损伤布料、脱水均匀、无皱折等特点。

不同类型洗衣机脱水转速不同，小功率全自动洗衣机（额定容量在  $2.8 \text{ kg}$  以下）脱水采用轻柔脱水，转速一般为  $500 \text{ r/min}$ ；波轮全自动洗衣机脱水转速一般约为  $700 \sim 800 \text{ r/min}$ ；波轮双桶洗衣机脱水转速一般约为  $800 \sim 1500 \text{ r/min}$ 。



图 4-42 洗衣机脱水滤筒和人工拧干

一般情况，转速越高，脱水效果越好，但超过  $800 \text{ r/min}$  以上，脱水效果差距并不很明显，而转速太高所产生的离心力，也会对衣物造成损伤。

### 二、固液分离技术在制药生产中的应用

在生物反应领域，几乎所有的发酵液均存在或多或少的悬浮固体，如生物细胞、固态培养基或代谢产物中的不溶性物质。不少目的产物存在于细胞内，如胞内酶、微生物多糖等，有时产物就是菌体本身，如酵母、单细胞蛋白等，往往都需要进行固液分离操作。

#### 1. 固液分离技术在链霉素发酵液预处理中的应用

链霉素发酵液的预处理工艺过程如图 4-43 所示。

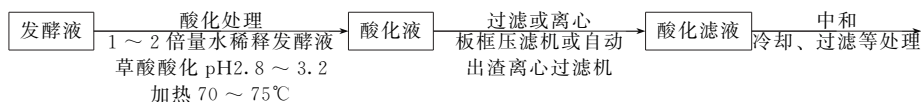


图 4-43 链霉素发酵液的预处理及固液分离工艺图



链霉素在发酵终了时,部分链霉素留在菌丝内部,为了使其释放至液体中,对发酵液加水稀释,加水稀释的目的为降低发酵液黏度,增加过滤速度,一般可用回流水或三次水来稀释,通常稀释到 6000U/mL 左右。若采用反吸附,则不需过滤,可将发酵液直接用水稀释到 3000U/mL 左右。

然后将发酵液酸化至 pH3 左右,大多数蛋白质在酸性条件下会沉淀,因此草酸酸化的目的在于使发酵液中的大多数蛋白质沉淀以及沉淀除去钙镁离子。同时酸化还会释放菌丝体内含有的链霉素单位,以提高链霉素的收率。若酸化 pH 偏高,上述作用将减弱、同时使过滤速度减慢。若酸化 pH 偏低,过滤速度增加,但链霉素在 pH 偏低情况下分解速度加快,使原液中降解产物增加,影响质量和过滤收率。

将处理好的酸化液直接蒸汽加热 70~75℃,可使蛋白质充分凝固,在这个温度下短时间加热,链霉素破坏较少,又可提高过滤速度。如加热温度小于 70℃,由于蛋白质凝固不充分,发酵液黏稠,过滤速度慢。反之加热到 75℃ 以上时,因为链霉素属于热敏性抗生素,温度提高,引起分子降解,降低原液质量和过滤收率。

链霉素发酵液的过滤设备可选择板框压滤机和自动排渣离心机两种。经板框压滤机过滤的滤液澄清,设备简单,价格便宜,但工人劳动强度大。遇到不易过滤的染菌或氨氮回升发酵液时,滤速骤降,影响生产进度。经自动排渣离心机过滤尽管澄清度较差,设备复杂,价格高,但自动化程度高,劳动强度小,基本能适应各种情况的链霉素发酵液的过滤,不会影响生产进度。同时排渣瞬间带走的抗生素浓度基本等于此时滤液的浓度,降低过滤收率。因此必须将滤渣收集后作二次稀释分离,回收链霉素单位,以减少损失。

经过酸化、加热、固液分离、冷却、中和等处理,能将发酵液中的大量菌丝体、蛋白质和碱土金属等杂质去除,可保证下一步过程的顺利进行。

## 2. 固液分离技术在改善中药口服液澄清度中的应用

中药口服液为单剂量包装的合剂,是在汤剂、注射剂基础上发展起来的新剂型。近几年,作为新剂型的中药口服液,由于服用剂量小、吸收较快、质量稳定、携带和服用方便、易保存等优点,得到了迅速的发展,在整个制剂中占有比例逐年上升。

口服液传统生产工艺流程为:酏剂→半成品配制(5℃以下静置 15 天)→过滤→成品配制(5℃以下静置 15 天)→过滤→复滤→罐封。

口服液的品质与澄清度项目检查密切相关。而口服液中含有的有效成分如皂苷、生物碱、黄酮,还有其他成分如多糖、黏液质等均会影响其澄清度,因此如何最大限度地保留有效成分,同时改善中药口服液的澄清度成为制备口服液的一大难点。

目前,离心法用于口服液的生产能有效解决这一难题。其工艺流程为:提取液→过滤→药液配制→离心→过滤→灌封。

离心法制备的清热解毒口服液与醇水法、水醇法相比,具有工艺流程短、成本低、有效成分损失少的优点,成品色泽深且澄清,活性成分含量显著高于醇水法和水醇法。低温离心法制备清热解毒口服液的工艺条件为转速 3000r/min,离心时间 40min,药液温度 5℃。

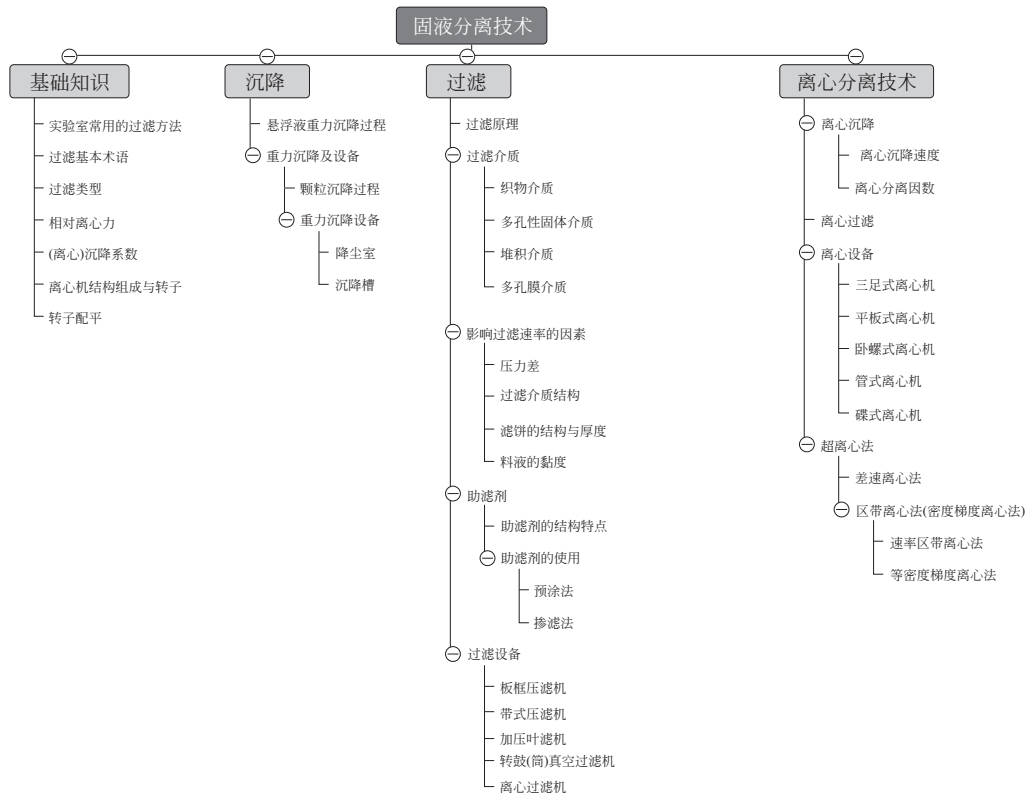
提取液成分复杂,多糖、黏液质等成分不好去除,因此在口服液纯化过程中单纯使用离心法来除杂的较少,常常将离心法与水沉、醇沉、澄清剂纯化等工艺相结合使用。





## 总结归纳

### 本章知识点思维导图



## 拓展阅读

### 单采血与血细胞分离机的发展

很多人应该都见过，有人在献血屋里或者献血车上献血，甚至很多人也都献过血。坐在采血椅上，殷红的血液徐徐流入血袋中，短短几分钟，200~400mL 血液就采集完成了，这是我们最熟悉也是最常见的一种献血方式，即献全血。平时所说的献血，基本上都是指献“全血”，即血液的全部成分。

然而全血献血，献出的全血需要再到实验室中分离，其中涉及人工操作和费时的二次处理，且实验室分离后不需要的那些血液成分也无法回输给献血者。

同时，人体血液每一种成分都有其特殊的功能。临床输血病人，由于疾病种类不同，输血目的也不完全相同，据统计，80%以上的病人只需输注一种或两种血液成分。输全血，病人得不到所需要的血液成分，其他成分发挥不了作用，还导致心脏负担。

成分输血始于1959年，20世纪80年代初在发达国家普及，是输血史上的一场革命。

20世纪50年代初，Dr. Cohn研究出了第一台封闭式血液分离机，又称为Cohn（血液）离心机。脱钙的血液由下向上流经离心机进入转速2000r/min离心分离室。该室首先充满血液，然后，开始离心分离过程，不同的血液成分经过不同的管道收集到不同的





收集袋。这种离心机属于不连续分离方式，即抽取-分离-返还的循环操作过程。

其后，IBM 的高级工程师 Mr. G. Judson 与美国国家癌症研究所（NCI）的 Dr. Emil Freireich 合作研究一种新型的血液成分分离方法，并于 1962 年 6 月开发出了第一台连续式血细胞分离机。值得一提的是，Mr. G. Judson 对于血液成分分离技术的浓厚兴趣源于他家庭的不幸，因为他的儿子患慢性粒细胞白血病。怀揣着治好儿子疾病的梦想，这位父亲孜孜不倦地工作，取得了重要成就。

在 20 世纪 80 年代初，由于血液成分分离仪器的改进，血液成分分离技术达到了一个新水平，血液成分单采技术在发达国家兴起。如今，世界范围的血液中心已经使用血细胞分离机（如图 4-44）采血系统超过了 30 年。



图 4-44 血细胞分离机

单采成分血是安全、科学、高效的血液采集技术，目前有采血浆和血小板等成分。血液经过血细胞分离机离心分离，采集人体血液中的血浆部分，而将红细胞、白细胞、血小板等回输给献血浆本人；采集人体血液中的血小板部分，是将部分血浆、红细胞、白细胞等回输给献血浆本人，使其能很快恢复。

来源：张田勘．打消献血顾虑从科学认知血液开始 [N]．中国青年报，2019-06-13（002）．



## 复习与练习题

### 一、选择题

- 不能用于固液分离的手段为（ ）。
  - 离心
  - 过滤
  - 超滤
  - 沉降
- 以下（ ）不是在重力场中，颗粒在静止的流体中降落时受到的力。
  - 重力
  - 压力
  - 浮力
  - 阻力
- 颗粒与流体的密度差越小，颗粒的沉降速度（ ）。
  - 越小
  - 越大
  - 不变
  - 无法确定
- 工业上常用的过滤介质不包括（ ）。
  - 织物介质
  - 堆积介质
  - 多孔固体介质
  - 真空介质
- 降尘室没有的优点是（ ）。
  - 分离效率高
  - 阻力小
  - 结构简单
  - 易于操作

6. 过滤推动力一般是指 ( )。
- A. 过滤介质两边的压差                      B. 过滤介质与滤饼构成的过滤层两边的压差
- C. 滤饼两面的压差                          D. 液体进出过滤机的压差
7. 为加快过滤效果通常使用 ( )。
- A. 电解质                      B. 聚合物                      C. 惰性助滤剂                      D. 活性助滤剂
8. 助滤剂应具有以下 ( ) 性质。
- A. 颗粒均匀、柔软、可压缩                      B. 颗粒均匀、可压缩、易变形
- C. 粒度分布广、坚硬、不可压缩                      D. 颗粒均匀、坚硬、不可压缩

## 二、简答题

1. 什么是过滤？过滤推动力有哪些？
2. 常用的过滤方法分几类？
3. 什么是离心分离？离心分离主要用于哪些方面？
4. 什么是助滤剂？助滤剂的作用是什么？常用的助滤剂有哪些？
5. 工业过滤设备一般经历哪几个阶段？
6. 过滤式离心机与沉降式离心机有什么区别？
7. 什么是超离心？有哪些离心方法？
8. 什么是速率区带离心法和等密度（梯度）离心法？它们有什么区别？