

高等职业教育生物技术系列创新教材



国家职业教育生物技术及应用专业
教学资源库配套教材

生物药物分离技术

主 编 牛红军
副主编 吴贵海 刘 恒
苑 鹏 黄艳玲
主 审 王青松

SHENGWU YAOWU
FENLI JISHU



上海交通大学出版社
SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY PRESS

内容提要

本书共有四个项目,项目一是生物药物分离技术导论,项目二是细胞色素 C 的生产,项目三是人干扰素 $\alpha 2b$ 的生产,项目四是抗 HER2 单克隆抗体的生产。其中,项目二至项目四以真实生物药物生产项目为主要载体,按照生产流程的顺序,将分离与纯化单元操作技术融入典型工作任务,形成 318 个教学任务,用于培养岗位所需的典型工作技能。

本书可作为药品生产技术、药品生物技术、生物制药技术和制药工程技术等生物医药生产相关专业教材,也可作为生物制药企业一线技术人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

生物药物分离技术 / 牛红军主编. —上海: 上海交通大学出版社, 2023. 4

ISBN 978-7-313-28282-8

I. ①生… II. ①牛… III. ①生物制品—分离法
IV. ①TQ464

中国国家版本馆 CIP 数据核字(2023)第 063897 号

生物药物分离技术

SHENGWU YAOWU FENLI JISHU

主 编: 牛红军

出版发行: 上海交通大学出版社

邮政编码: 200030

印 制: 三河市骏杰印刷有限公司

开 本: 787 mm×1 092 mm 1/16

字 数: 367 千字

版 次: 2023 年 4 月第 1 版

书 号: 978-7-313-28282-8

定 价: 59.00 元

地 址: 上海市番禺路 951 号

电 话: 021-64071208

经 销: 全国新华书店

印 张: 17.5

印 次: 2023 年 4 月第 1 次印刷

版权所有 侵权必究

告读者: 如您发现本书有印装质量问题请与印刷厂质量科联系

联系电话: 0316-3662258

编 审 委 员 会

主 编：牛红军

副主编：吴贵海 刘 恒

苑 鹏 黄艳玲

编 者：(以姓氏笔画为序)

王青松(北京大学)

牛红军(天津现代职业技术学院)

师 亮(山西医科大学)

吕春晖(天津现代职业技术学院)

刘 恒(黑龙江农业工程职业学院)

刘雅莉(河北工业大学)

刘鑫龙(天津现代职业技术学院)

吴贵海(哈药集团三精制药有限公司)

张 舟[丹娜(天津)生物科技股份有限公司]

苑 鹏(天津现代职业技术学院)

高芦宝(天津现代职业技术学院)

黄艳玲(天津现代职业技术学院)

主 审：王青松

生物药物分离技术课程是高职药品生产技术、药品生物技术、生物制药技术和制药工程技术等生物医药生产相关专业的必修主干课程。生物药物分离技术由一系列能把生物原料中的生物活性物质制成原料药的原理多样的分离与纯化单元操作技术组成。生物药物分离技术决定了药品质量和生产成本,是影响生物药物实现产业化生产的关键技术,对生物医药战略新兴产业的发展有着举足轻重的作用。

本书凸显职业教育类型特色,囊括生物药物生产中典型的生物药物分离技术。教材遵循职业教育教学规律和人才成长规律,在深入行业 and 高职院校调研的基础上立足于工作能力的培养,打破传统学科教学模式,以真实生物药物生产项目为主要载体,按照生产流程的顺序,将分离与纯化单元操作技术融入典型工作任务,形成十八个教学任务,培养岗位所需的典型工作技能。教学任务后设置有“拓展任务”栏目,提升了教材的适用性和实践的可及性。本书依据专业教学标准和课程标准,参考相关职业技能竞赛标准、职业技能等级证书标准和岗位技能要求,将新技术、新工艺、新规范纳入教材内容,反映典型岗位(群)职业能力要求,是“岗课赛证”融通教材。本书循序渐进地安排生物药物生产中必备的生物药物分离基础技术、预处理技术、提取技术、分离与纯化技术和浓缩与干燥技术等内容,适用于学生学习从业所需的岗位操作技能,培养职业素养,实现毕业即胜任生物药物、生化物质和功能食品生产加工与研发等岗位。

本书为活页式、工作手册式、融媒体新形态教材,适应职业教育专业建设、课程建设、教学模式与方法改革创新的需要,能有效提升课程的育人效果。教材落实“立德树人”根本任务,坚持为党育人、为国育才。本书发掘生物医药产业的思想元素,融入劳模精神、专业精神、职业精神和工匠精神等,适用于同步开展思想教育、知识学习与技能训练,能够帮助学生树立正确的世界观、人生观和价值观,做社会主义核心价值观的坚定信仰者、积极传播者和模范践行者,成为有职业道德、遵守规范和实践能力强的高素质生物医药应用型技术技能人才。

本书由两个国家级职业教育教师教学创新团队立项建设单位(药品生产技术专业和生物制药技术专业)联合本科院校骨干教师和企业专家编写完成,体现了生物产业发展的新技术、新工艺、新规范、新标准,具有适用性、科学性、先进性。具体编写分工如下:牛红军任主编,编写项目一和项目三,修改全书并统稿。苑鹏编写项目二任务一、任务三,并修改部分项目二书稿;高芦宝编写项目二任务二、任务五;吕春晖编写项目二任务四、任务六、任务七;刘鑫龙编写项目二任务八、任务九;黄艳玲参与编写项目三;刘恒编写项目四。哈药集团三精制药有限公司吴贵海高级工程师作为第一副主编指导和参与本书编写工作,河北工业大学刘雅莉副教授和丹娜(天津)生物科技股份有限公司张舟高级工程师参与编写工作,有效地提升了教材的实践性和科学性。全书由北京大学王青松副教授主审。全球生命科学技术服务提供商 Cytiva 思拓凡为本书提供了部分视

频和动画等资源,有助于教材紧密对接产业发展需要和符合技术革新趋势,在此表示感谢!为尊重原创和避免引起版权纠纷,请勿转载资源用于本教材以外的其他用途!

本书开发有大量配套信息化资源,获取方式如下:

(1)微课、动画和虚拟仿真等资源,以二维码的形式内置于教材,学习者可扫码学习。

(2)配套建设有 MOOC,学习方式:国家职业教育智慧教育平台(<https://vocational.smart-edu.cn/>),搜索“生物药物分离技术”,点击《生物药物分离技术》MOOC(课程负责人:牛红军),即可登录后免费学习;高等教育出版社“智慧职教”网站(<https://www.icve.com.cn/>),点击“MOOC 学院”,搜索“生物药物分离技术”,点击《生物药物分离技术》MOOC(课程负责人:牛红军),即可登录后免费学习。

由于生物医药产业在持续、飞速发展,新的药物分离技术不断出现,书中不足之处在所难免,敬请广大读者批评指正。

牛红军
2022 年 9 月



视频:生物药物
分离技术简介

目 录

项目一 生物药物分离技术

项目一 生物药物分离技术 导论 1

- 一、认识生物医药产业 1
- 二、认识生物药物分离技术 4
- 三、认识生物药物分离基础技术 6
- 四、生物药物分离技术导学 11

项目二 细胞色素 C 的生产 14

任务一 认识细胞色素 C 15

- 一、任务描述 15
- 二、任务目标 16
- 三、任务支撑 16
- 四、任务实施 19
- 考核与评价 22
- 拓展任务 23

任务二 细胞色素 C 原材料的预处理 24

- 一、任务描述 24
- 二、任务目标 24
- 三、任务支撑 24
- 四、任务实施 28
- 操作记录 29
- 考核与评价 30
- 拓展任务 31

任务三 细胞色素 C 的提取 33

- 一、任务描述 33
- 二、任务目标 33
- 三、任务支撑 33

- 四、任务实施 42
- 操作记录 43
- 考核与评价 45
- 拓展任务 46

任务四 细胞色素 C 提取液的中和 47

- 一、任务描述 47
- 二、任务目标 47
- 三、任务支撑 47
- 四、任务实施 56
- 操作记录 57
- 考核与评价 58
- 拓展任务 59

任务五 人造沸石吸附细胞色素 C 61

- 一、任务描述 61
- 二、任务目标 61
- 三、任务支撑 61
- 四、任务实施 65
- 操作记录 67
- 考核与评价 70
- 拓展任务 71

任务六 细胞色素 C 洗脱液的盐析 73

- 一、任务描述 73
- 二、任务目标 73
- 三、任务支撑 73
- 四、任务实施 77
- 操作记录 79
- 考核与评价 80
- 拓展任务 81

任务七 细胞色素 C 的三氯乙酸	
沉淀	83
一、任务描述	83
二、任务目标	83
三、任务支撑	83
四、任务实施	91
操作记录	92
考核与评价	94
拓展任务	95
任务八 细胞色素 C 的凝胶层析	97
一、任务描述	97
二、任务目标	97
三、任务支撑	97
四、任务实施	104
操作记录	105
考核与评价	107
拓展任务	108
任务九 电泳法检定细胞色素 C	109
一、任务描述	109
二、任务目标	109
三、任务支撑	110
四、任务实施	124
操作记录	127
考核与评价	130
拓展任务	131
项目三 人干扰素 $\alpha 2b$ 的生产	134
任务一 人干扰素 $\alpha 2b$ 发酵液的生产	135
一、任务描述	135
二、任务目标	136
三、任务支撑	136
四、任务实施	139
操作记录	145
考核与评价	148
拓展任务	149
任务二 人干扰素 $\alpha 2b$ 发酵液的处理	150
一、任务描述	150
二、任务目标	150
三、任务支撑	150
四、任务实施	155
操作记录	157
考核与评价	158
拓展任务	159
任务三 人干扰素 $\alpha 2b$ 包涵体的处理	161
一、任务描述	161
二、任务目标	161
三、任务支撑	162
四、任务实施	172
操作记录	174
考核与评价	176
拓展任务	177
任务四 人干扰素 $\alpha 2b$ 的离子交换层析	179
一、任务描述	179
二、任务目标	179
三、任务支撑	179
四、任务实施	195
操作记录	197
考核与评价	199
拓展任务	200
任务五 人干扰素 $\alpha 2b$ 的疏水层析	202
一、任务描述	202
二、任务目标	202
三、任务支撑	202
四、任务实施	208
操作记录	210
考核与评价	211
拓展任务	212
任务六 人干扰素 $\alpha 2b$ 的凝胶层析	214
一、任务描述	214
二、任务目标	214
三、任务支撑	214
四、任务实施	217
操作记录	219
考核与评价	220

拓展任务·····	221	三、任务支撑·····	242
项目四 抗 HER2 单克隆抗体的生产····· 223		四、任务实施·····	248
任务一 抗 HER2 单克隆抗体丰收液生产····· 224		操作记录·····	251
一、任务描述·····	224	考核与评价·····	255
二、任务目标·····	225	拓展任务·····	256
三、任务支撑·····	225	任务三 抗 HER2 单克隆抗体冻干····· 257	
四、任务实施·····	229	一、任务描述·····	257
操作记录·····	235	二、任务目标·····	257
考核与评价·····	239	三、任务支撑·····	257
拓展任务·····	240	四、任务实施·····	262
任务二 抗 HER2 单克隆抗体纯化····· 242		操作记录·····	264
一、任务描述·····	242	考核与评价·····	267
二、任务目标·····	242	拓展任务·····	268
		参考文献····· 269	

生物药物分离技术导论

项目导读

生物药物分离技术由一系列能把生物原料中的生物活性物质制成原料药的原理多样的分离与纯化单元操作技术组成。生物药物生产中“没有一成不变的工艺”，在生产同种生物药物时，不同企业往往会组合运用不同的生物药物分离技术，从业人员需掌握这些技术，以便于胜任需要采用不同工艺的工作岗位。生物药物分离技术决定了药品质量和生产成本，是影响生物药物实现产业化生产的关键技术，对生物医药战略性新兴产业的发展有着举足轻重的作用。本项目介绍生物医药产业发展状况。通过学习本项目，应对生物药物生产技术有系统的理解；掌握学习生物分离纯化所需的基础知识和技能，为学习本课程夯实基础；知道使用本教材的方法，明确本课程所要达成的学习目标。



图文：生物药物分离技术思维导图

项目学习目标

认识生物医药产业和生物药物分离技术。掌握生物药物分离基础技术，为系统学习生物药物分离技术提供支撑。掌握依托本教材学习课程的方法，明确学习目标，树立做德才兼备的生物医药高素质技术技能人才的理想和信念。

一、认识生物医药产业

生物药物、化学药物和中药是我国的三大药源。其中，生物药物是维系人类健康和对抗疾病的重要“武器”，在疾病的预防、诊断和治疗环节发挥着至关重要的作用。

（一）全球生物医药产业发展现状

数千年来，古人在日常生活实践中积累了大量使用生物体防病、治病的经验。近年来，伴随着基因工程技术、细胞培养技术和单克隆抗体技术等高新技术的出现，生物制药领域取得了迅猛发展。2020年，全球生物药市场规模已超3 000亿美元。2021年，全球销售额Top 10的药物中有7种为生物药物。

全球生物医药产业区域聚集特征明显，主要以欧美、中国、日本、新加坡等国家和地区为主。中国已成为新兴的产业聚集区。

(二)中国生物医药产业发展现状

1. 中国生物医药产业规模

中国医药工业起步较晚,但发展较快。生物医药产业是国家战略性新兴产业。近年来,我国生物药研制与生产能力迅速提高,创新活力和增长潜力大,在医药工业中占比逐年增加。2021年,我国医药工业实现营业收入33707.5亿元,累计同比增长18.7%,增速创近5年来新高。医药工业各子行业增长不均衡,生物药品制造子行业是增长的主要拉动力。2021年,生物药品制造、基因工程药物和疫苗制造等子行业实现营业收入5918亿元,同比增长113.8%;实现利润在医药工业利润总额中的比重达41.7%,有力地推动了医药工业的整体发展。

2. 中国生物医药企业规模

根据国家统计局数据,截至2021年年底,我国有医药制造业企业单位8337家。受我国医药工业起步晚、起点低等客观因素的影响,我国存在生产同一类产品的企业数量众多、企业间竞争激烈、市场化程度高等问题;从企业规模看,行业内大、中、小型企业呈金字塔形分布,小型企业居多。

值得肯定的是,在政策和市场驱动下,我国生物医药产业市场集中度持续增高,百强制药企业的贡献度不断增加,在全球制药行业中的影响力趋强。美国《制药经理人》杂志公布的2022年全球制药企业TOP50榜单上,有4家中国药企上榜:江苏恒瑞医药、中国生物制药、上海医药和石药集团分别位居第32名、第40名、第41名和第43名。

3. 中国创新药发展情况

创新驱动和结构调整将是未来一段时期医药工业发展的主旋律。我国制药企业对创新药研发投入和产出显著增多,创新药数量增长显著,生物医药产业发展后劲足。2021年,国家药品监督管理局审批中心受理创新药注册申请1886件(998个品种),同比增长76.10%。其中创新中药54件(51个品种),同比增长134.78%;创新化学药1166件(508个品种),同比增长55.05%;创新生物制品666件(439个品种),同比增长125.00%。创新生物制品的品种数较多,增长率较高。同年,国家药品监督管理局审评通过了47个(69件)创新药,再创历史新高,包括创新中药11件、创新化学药35件、创新生物制品23件。截至2022年年初,中国药品研发数量占全球的20.8%,在全球中仅次于美国。

创新成果转化助推创新药形成一定的市场规模。2021年,国产1类创新药销售TOP20合计销售规模超过400亿元,其中8个为治疗类生物制品,有19个销售额达10亿元及以上(4款突破30亿元)(表1-1)。未来几年,我国有望出现国产“重磅炸弹”药物。以往“专利悬崖”更多是针对跨国药企,而今面临“专利悬崖”的中国原创新药将越来越多。

表 1-1 2021 年国产 1 类创新药销售 TOP 20(节选)^①

药品名称	企业名称	药品类型	2021 年国内 销售额/亿元	最早获批年份
盐酸安罗替尼胶囊	正大天晴	化学药	40+	2018
注射用卡瑞丽珠单抗	恒瑞医药	治疗用生物制品	40+	2019
重组人血小板生成素注射液	三生生物	治疗用生物制品	30+	2005
信迪利单抗注射液	信达生物	治疗用生物制品	30+	2018
PEG 化重组人粒细胞集落刺激因子注射液	格兰百克生物	治疗用生物制品	20+	2011

^① 超 400 亿! 国产 1 类新药销售 TOP 20 曝光, 4 款超 30 亿, 正大天晴、豪森……上市即爆发[EB/OL]. [2022-05-18]. http://www.phirda.com/artilce_27689.html.

4. 中国生物医药产业发展的政策环境

(1) 中国生物医药产业得到党和政府的高度重视,受到国家产业政策的重点支持。习近平总书记在党的十九大报告明确提出实施健康中国战略,在党的二十大报告中指出要推进健康中国建设,把保障人民健康放在优先发展的战略位置。在推动健康中国建设背景下,在一系列法律法规和政策保障下,我国开启了生物医药产业高速发展的新时代。

(2) 政府重视生物医药产业发展。例如,2021年12月,国务院九部门联合印发的《“十四五”医药工业发展规划》提出,到2035年,医药工业实力将实现整体跃升;创新驱动发展格局全面形成,原创新药和“领跑”产品增多,成为世界医药创新重要源头;产业竞争优势突出,产业结构升级,在全球医药产业链中占据重要地位。2022年5月,国家发展改革委印发的《“十四五”生物经济发展规划》提出“生物医药战略性新兴产业在经济社会发展中的战略地位显著提升”的发展目标,“拟在京津冀、长三角、粤港澳大湾区、成渝双城经济圈等区域,以城市为载体布局建设生物经济先导区,围绕生物医药、生物农业、生物能源、生物环保等领域开展科技创新和改革试点,引领我国生物经济发展壮大”。

(3) 药品监督管理相关部门保驾护航。例如,2022年2月,国家药品监督管理局药审中心组织制定的《生物类似药临床药理学研究技术指导原则》为规范生物类似药的研发和评价提供了依据。于2021年6月1日起施行的《中华人民共和国专利法》第四十二条规定:“为补偿新药上市审评审批占用的时间,对在中国获得上市许可的新药相关发明专利,国务院专利行政部门应专利权人的请求给予专利权期限补偿。补偿期限不超过五年,新药批准上市后总有效专利权期限不超过十四年。”这进一步提升了医药企业研发创新药的积极性。

(三) 生物药物生产常识

1. 《中华人民共和国药典》

药品应当符合国家药品标准和经国家药品监督管理局核准的药品质量标准。国家药品标准是国家为保证药品质量,对药品的质量指标、检验方法等做出的强制性规定,是药品生产、流通、使用和监管所必须遵循的法定技术要求。国务院药品监督管理部门颁布的《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)和药品标准为国家药品标准。《中国药典》是国家药品标准的组成部分,是国家药品标准体系的核心,是保证药品安全有效的“基准线”。国家药品标准是药品质量安全的底线。经国家药品监督管理局核准的药品质量标准,为药品注册标准。药品注册标准应当符合《中国药典》有关通用技术要求,不得低于国家药品标准。

2. 《药品生产质量管理规范》

企业应当建立药品质量管理体系。该体系应当涵盖影响药品质量的所有因素,包括确保药品质量符合预定用途的有组织、有计划的全部活动。《药品生产质量管理规范》(Good Manufacturing Practice, GMP)作为质量管理体系的一部分,是药品生产管理和质量控制的基本要求,旨在最大限度地降低药品生产过程中可能出现的污染、交叉污染以及混淆、差错等风险,确保持续稳定地生产出符合预定用途和注册要求的药品。企业应当严格执行本规范,坚持诚实守信,禁止任何虚假、欺骗行为。

3. 标准操作规程

GMP明确指出,配备标准操作规程(又称操作规程,简称SOP)是药品生产质量管理的基本要求之一。SOP是指经批准用来指导设备操作、维护与清洁、验证、环境控制、取样和检验等药品生产活动的通用性文件。企业需制定SOP,操作人员需经过培训,能够按照SOP正确操作。

4. 药品注册申请

药品注册是指药品注册申请人(以下简称申请人)依照法定程序和相关要求提出药物临床试验、药品上市许可、再注册等申请以及补充申请,药品监督管理部门基于法律法规和现有科学认知进行安全性、有效性和质量可控性等审查,决定是否同意其申请的活动。

注册申请类别有:新药临床试验申请(简称 IND),新药上市许可申请(简称 NDA),同名同方药、仿制药、生物类似药上市许可申请(简称 ANDA),仿制药质量和疗效一致性评价注册申请,补充申请,境外生产药品再注册申请,直接审批的注册申请和复审注册申请等。药品注册按照中药、化学药和生物制品等进行分类注册管理。生物制品注册按照生物制品创新药、生物制品改良型新药、已上市生物制品(含生物类似药)等进行分类。

5. 生物类似药

生物类似药是指在质量、安全性和有效性方面与已获准注册的参照药(已获批准注册的,在生物类似药研发过程中与之进行比对试验研究用的产品)具有相似性的治疗用生物制品。生物类似药不可能完全与原研药相同,只能达到与原研药“相似”。生物类似药并非简单的仿制药,因此,并不将其称为生物仿制药。

二、认识生物药物分离技术

(一)生物药物分离技术与生物药品制造业

目标活性物质存在于由众多各类物质组成的生物体原料或运用生物技术制成的原料中,只有将它与其他杂质分开,达到国家药品标准,才能制成生物药品供患者使用。生物药物分离技术就是以植物、动物、动物细胞和微生物及其代谢产物等为原材料,将目标活性物质与其他杂质分开的技术的总称。

生物制药过程主要涉及菌株/细胞株构建、微生物发酵和细胞大规模培养,以及将大规模培养生成的目标活性物质分离、纯化、精制等操作过程。其中,分离、纯化、精制目标活性物质,制得生物原料药的生产技术即生物药物分离技术。

生物药物分离技术与生物制药工艺技术、药物制剂技术等配合,共同完成生物药品生产。生物药物分离技术决定了生物药品的质量和生产成本(往往占总成本的70%以上),是影响生物药物能否实现产业化生产的关键技术,对生物药品制造业的发展具有举足轻重的影响。

(二)生物药物分离技术的基本原理

生物药物的生产原材料为混合物组成的固态、液态或固-液混合体系,分离将使混合体系中的物质被分开,得到两个或多个组分或相(图 1-1)。合理地组合运用分离操作可实现将生物活性物质纯化的目的。分离剂是分离过程的辅助物质或推动力,它可以是某种形式的能量或某种

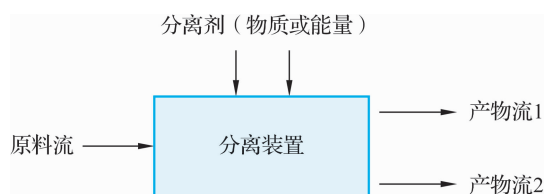


图 1-1 生物药物分离纯化示意图

物质,如风力分选(简称风选)中的空气、离子交换层析中的离子交换剂等都是分离剂。分离装置主要提供分离场所或分离介质。

处理不同原材料时所采用的分离技术差异很大,应用的分离剂和分离装置也会有很大的差异,分离原理也各异。生物药物分离技术的基本原理主要有两大类:机械分离和传质分离。

1. 机械分离

机械分离过程是利用机械力,针对非均相混合物,在分离装置中简单地将两相混合物相互分离的过程,相间无物质传递。例如,离心、过滤、沉降、原材料的风选等。

2. 传质分离

传质分离针对均相体系或非均相体系,多数情况为均相体系,第二相是因加入分离剂(能量或物质)而产生的。传质分离过程中相间有物质传递发生。传质分离可分为以下两类:

(1)平衡分离。某些传质分离过程以混合物中各组分在处于相平衡的两相中不等的分配能力为依据,利用溶质在两相中的浓度与达到相平衡时的浓度之差为推动力进行分离,如蒸馏、萃取、结晶等分离过程。

(2)速率控制分离。某些传质分离过程是在某种推动力(浓度差、压力差、温度差、电位差等)的作用下,有时在选择性透过膜的配合下,利用各组分移动速率的差异实现组分的分离。这类过程所处理的原料和产品通常属于同一相态,仅存在组成上的差别。例如,场分离,包括电泳、热扩散、超速离心分离等。

(三)生物药物分离技术的依据及类型

分离混合物的本质是有效识别混合物中不同组分间物理性质、化学性质和生物学性质的差异,利用能够识别或扩大这些差异的分离介质和分离装置,依据机械分离或传质分离的原理,分离组分或纯化生物活性物质。通常,分离纯化过程中需要依次使用两种或多种利用不同性质将物质分开的分离技术才能从原材料中制得符合质量标准的生物活性物质。

1. 物理性质

(1)依据分子大小和形状。利用物质间密度、几何尺寸和形状等差异分离物质的技术,如微滤、透析、离心、超滤和凝胶过滤层析等。

(2)依据溶解性和挥发性。依据物质间溶解性和挥发性差异分离物质的技术,如萃取、蒸馏、盐析、结晶、等电点沉淀、有机溶剂沉淀等。

(3)依据分子极性 & 电荷性质。依据物质间等电点、电荷特性、电荷分布等差异分离物质的技术,如电泳、电渗析、离子交换层析、等电点沉淀等。

2. 化学性质

(1)依据分子间的相互作用。如吸附层析技术,利用分子间的氢键、范德瓦耳斯力,离子间的静电引力及疏水作用大小等物理性质和化学性质差异分离物质的技术。

(2)依据特有的化学反应。利用生物活性物质能与其他试剂发生某种或某类特定化学反应的特性,使生物活性物质的理化性质、生物学性质发生改变而易于通过采用其他方法从混合物中分离纯化出来的技术。例如,金属盐类沉淀分离法,利用金属离子与酸根在形成盐类后溶解度降低而沉淀分离的原理分离金属离子;钙盐法,在柠檬酸发酵液中加入碳酸钙,形成柠檬酸钙沉淀,与发酵液中的其他杂质分离,并经过多道工序,提纯柠檬酸的技术。

3. 生物学性质

应用生物学性质分离纯化生物活性物质是生物药物所特有的,它通过生物活性物质与生物大分子之间的分子识别和特异性结合达到纯化目的。例如,亲和层析技术,酶与其辅酶是成对互配的,可把辅酶作为固定相使样品中的酶得到纯化;反之,可把酶作为固定相,使样品中的辅酶得到纯化。

三、认识生物药物分离基础技术

在生物药物的生产中,称量和溶液配制等为必备的基础技术,相应会用到电子天平和酸度计,以及吸量管和容量瓶等器具。

(一)电子天平操作技术

电子天平一般有自动校准、自动显示、去皮重、自动数据输出、自动故障寻迹、超载保护等功能,与机械天平相比具有操作简便、称量准确可靠、显示快速清晰等优势,应用较广。

1. 电子天平的使用

步骤一 调水平

当水平泡不在圆环中央时[图 1-2(a)],调整地脚螺栓高度,直至天平的水平泡位于中央[图 1-2(b)]。

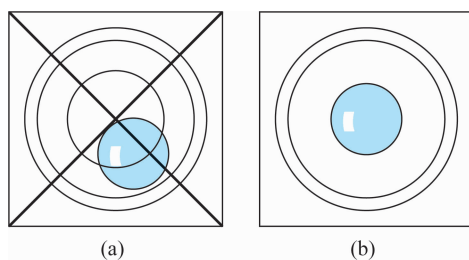


图 1-2 天平水平泡示意图

步骤二 开机

接通电源,按开关键 ON/OFF,直至全屏自检。

步骤三 预热

天平在初次接通电源或长时间断电之后,至少需要预热 30 min(天平日常应保持在待机状态)。

步骤四 校正

首次使用天平必须进行校正,按校正键 CAL,天平将显示所需校正砝码质量,放上砝码直至出现“g”,校正结束(日常使用中无须频繁校正)。

步骤五 称量

使用去皮键 TARE,去皮清零。放置样品,以增量法或减量法等方法进行称量。

步骤六 关机

天平应 24 h 一直保持通电状态,不使用时将开关调至待机状态,以延长天平的使用寿命,并使测定更准确。长期不用时,可关机、断电。再次开机后,需预热,必要时重新进行校正。

注意事项:

- (1)天平应静置于固定的称量台上,避免受到气流、振动和阳光照射的影响。
- (2)选择适宜量程的天平,勿超载称量。
- (3)变换使用工作场所时,需重新调平和校正。

2. 电子天平的称量方法

(1)直接测量法。直接测量法常用于称量洁净干燥的器皿、块状金属、不易潮解或升华的固体试样及不易吸湿、在空气中性质稳定的粉末状物质。

准备一个洁净干燥的器皿(或称量纸),先用电子天平称量器皿的质量,然后按去皮键,去皮清零,取下器皿,加入已用普通天平粗称的试样后,放在秤盘上,显示屏的读数即试样的质量。

(2)减量测量法。减量测量法常用于称量易吸湿、易与空气反应(氧化或与 CO_2 反应)的物质。用此法称量的试样应盛放在称量瓶内。称量瓶是具有磨口玻璃塞的容器,使用前必须洗净并烘干,在干燥器内冷却至室温。称量瓶不能放在不干净的地方,以免被沾污。

首先将适量试样装入称量瓶内,盖上瓶盖。用手套或干净的纸折成纸条套住称量瓶,将称量瓶放在秤盘上,称出称量瓶加试样的准确质量,按去皮键,去皮清零。仍用纸条套住称量瓶,



视频:电子天平的使用



图文:电子分析天平操作规程与操作记录

将其从称盘上取下。右手戴手套或用一洁净小纸片包住瓶盖柄,在接收容器(如锥形瓶、烧杯)上方打开瓶盖,慢慢倾斜称量瓶身。用瓶盖轻轻敲瓶口部,使试样缓缓落入容器中。直到倒出的试样量接近所需要的试样量时,边敲边慢慢竖起称量瓶,使黏附在瓶口的试样落入容器中或落回称量瓶中,盖好瓶盖。

将称量瓶放回称盘上,显示屏读数为倾倒入试样的负值,记下第一份试样质量读数,再除皮清零,重复上述操作,称得第二份的质量。这样可连续称取多份试样。

(二)酸度计操作技术

1. pH 标准缓冲溶液的配制

通常购买 pH 缓冲剂粉剂,定量加入蒸馏水配制成 pH 标准缓冲溶液。

步骤一 溶解

将 pH 缓冲剂粉剂(pH 4.00)、pH 缓冲剂粉剂(pH 6.86)、pH 缓冲剂粉剂(pH 9.18)各分别倒入一个烧杯中。分别加入适量蒸馏水,并用蒸馏水将缓冲剂袋冲洗两次,补加至烧杯中。用玻璃棒缓慢搅拌至试剂充分溶解。

步骤二 定容

利用玻璃棒引流,将烧杯中的缓冲溶液倒入容量瓶中,规范地完成容量瓶定容操作(参照 pH 缓冲剂说明书选择容量瓶规格)。

步骤三 备用

pH 标准缓冲溶液配制完成,转移至试剂瓶中,备用。

2. 酸度计的标定(以 EL20K 型酸度计为例)

步骤一 开机

短按“电源”键开机。

步骤二 设置温度补偿

屏幕显示 ATC(自动温度补偿功能)或 MTC(手动温度补偿功能)。如为 MTC,则需手动设置温度进行补偿。

步骤三 设置标准缓冲溶液组

根据标定用 pH 标准缓冲溶液的 pH,设置标准缓冲溶液组。我国常用的缓冲溶液组为 pH 4.00、pH 6.86 和 pH 9.18 缓冲溶液。

步骤四 标定

可采用一点标定法、二点标定法和三点标定法标定,一般采用二点标定法或三点标定法,即采用两种或三种 pH 标准缓冲溶液标定酸度计电极。以下为二点标定法:

用蒸馏水冲洗电极,然后用滤纸吸干后,放入第一种 pH 标准缓冲溶液,示数稳定后,自动读数或手动按“读数”键,完成第一点标定。

用蒸馏水冲洗电极,然后用滤纸吸干后,放入第二种 pH 标准缓冲溶液,示数稳定后,自动读数或手动按“读数”键,完成标定。屏幕显示零点和斜率,然后自动退回到测量界面,即可用于测量 pH。

3. 未知溶液 pH 的测定

步骤一 测定

用蒸馏水冲洗电极,用滤纸条吸干残留水分后,将电极浸入未知溶液,测定 pH,反复测定三次,记录结果。



视频:pH 标准缓冲溶液的配制



视频:酸度计的标定



视频:未知溶液 pH 的测定

步骤二 保存酸度计

关机,将电极保存于装有 3 mol/L 氯化钾溶液的电极套后,将酸度计放置于适宜环境中保存、备用。

注意事项:

(1)未使用的 pH 标准缓冲溶液可置于 4 °C 冰箱中保存 2~3 个月,取出升温至室温后即可使用。

(2)pH 标准缓冲溶液出现浑浊、发霉或沉淀等现象时,不能继续使用。

(三)常用容器具的处理

1. 容器具的清洗

(1)玻璃容器具的清洗。

步骤一 清洗

用纯化水洗净玻璃容器具内的残留物,加入适量洗涤剂,用毛刷仔细刷洗干净(吸量管用超声处理 1 h);新器材用 2% 盐酸浸泡过夜。用纯化水反复冲洗至少 3 次(每次冲洗 30 s 以上)。

步骤二 泡酸

将体积小的玻璃容器具放入重铬酸钾洗液中浸泡过夜。在体积大的玻璃容器具内倒入重铬酸钾洗液,浸泡过夜。

步骤三 冲洗与干燥

用自来水冲洗 10 次,将玻璃容器具壁上的重铬酸钾洗液冲净,用纯化水反复冲洗 5 次(每次冲洗 30 s 以上),用注射用水反复冲洗 5 次(每次冲洗 30 s 以上),室温下倒置自然晾干水分或 50 °C 烘干。

(2)不锈钢容器具、塑料容器具、胶管、洗瓶等的清洗。

步骤一 清洗

用纯化水洗净容器具内外的残留物,加入适量洗涤剂,用试管刷仔细刷洗干净,用纯化水反复冲洗至少 5 次(每次冲洗 30 s 以上)。用 0.3 mol/L NaOH 溶液浸泡 8 h 以上(不锈钢容器具除外)。

步骤二 冲洗与干燥

用注射用水反复冲洗至少 5 次(每次冲洗 30 s 以上),37 °C 烘干或倒置晾干。

(3)正压除菌过滤器的清洗。

步骤一 清洗

不锈钢外套用纯化水洗净容器具内外的残留物,加入适量洗涤剂,用试管刷仔细刷洗干净,用注射用水反复冲洗至少 10 次(每次冲洗 30 s 以上)。

步骤二 安装与灭菌

将滤芯与外套安装,用铝箔纸或硫酸纸包好进出口和压力表接口。湿热灭菌。

注意事项:

器具清洗后保存不得超过 72 h,否则必须重新清洗。

2. 容器具湿热灭菌

步骤一 包扎

将需要湿热灭菌的容器具等物品包好。



图文:常用容器具处理操作记录

步骤二 灭菌

121 °C、0.11 MPa 湿热灭菌 30 min。

步骤三 保存

灭菌结束,待湿热灭菌器冷却压力下降后,打开后门取出已灭菌物品,放于储存室内保存,并挂上已灭菌标志。

3. 容器具干热灭菌

玻璃容器具、不锈钢容器具、金属器械等常用干热灭菌。

步骤一 包装

用铝箔纸或硫酸纸将玻璃容器具口包扎严密,移液管、滴管尾部用脱脂棉塞紧后放入不锈钢消毒筒。其他待灭菌的物品经严密包扎后,放入干热灭菌柜。

步骤二 灭菌

高温干热灭菌,条件为 250 °C、45 min。

步骤三 保存

灭菌结束,待干热灭菌柜冷却后,打开后门取出已灭菌物品,放于储存室内保存,并挂上已灭菌标志。

注意事项:

容器具必须在灭菌后使用,灭菌有效期为 72 h,如超出则应在使用前重新灭菌。

(四)吸量管操作技术

1. 移液管的使用

移液管即单标线吸量管,管颈上部刻有单一的标线,用来准确移取单一体积的溶液,为量出式玻璃量器。中间有一膨大部分的移液管称为大肚移液管。移液管的常用规格有 5 mL、10 mL、20 mL、25 mL 和 50 mL 等。

步骤一 洗涤

用前以铬酸洗液洗涤,再用自来水洗净,用蒸馏水润洗 3 次,用吸水纸将洗干净后的管尖内外的水除去后,用待移取的溶液润洗 3 次。

步骤二 移取溶液

移取溶液时,一般用右手拇指和中指拿住管颈的上方,把管下部的尖嘴插入待吸取的溶液中,不宜插入太少,以免吸空;也不宜插入太深,避免管外壁带出的溶液过多;一般控制管尖在液面下 2~3 cm 处。

左手拿吸耳球,先把球内的空气压出,然后把球的尖嘴紧按在移液管口上,慢慢松开左手手指,使溶液被吸入移液管中。

当液面升高到标线以上时,迅速移去吸耳球,立即用右手食指按住管口,使移液管离开液面,然后将容器倾斜成 30°,管垂直于水平面,管尖紧靠在容器的内壁上。略微放松右手食指,使溶液缓慢平稳下降,直到溶液的弯月面下缘与标线相切,立即用食指压紧管口,取出移液管。

左手改拿接收溶液的容器,并将容器倾斜成 30°左右。将移液管插入容器中,使移液管的尖嘴紧靠在容器的内壁上,移液管垂直于水平面。松开食指,让管内溶液自然沿器壁流下,待液面下降至管尖后,等待 15 s,即可将移液管拿出。

2. 吸量管的使用

具有分刻度的玻璃管称为分度吸量管(简称吸量管)或刻度吸管。吸量管的常用规格有 0.5 mL、1 mL、2 mL、5 mL、10 mL 和 15 mL 等。



视频:移液管和吸量管的使用

吸量管的种类较多,包括不完全流出式分度吸量管、完全流出式分度吸量管、等待时间分度吸量管和吹出式分度吸量管等,其操作方法有所差异。管上分度数值由上到下或由下到上递增。吸量管的操作方法与移液管相似,转移溶液的体积为溶液流出吸量管前、后分度数值的差值,具体标准详见《实验室玻璃仪器 分度吸量管》(GB/T 12807—2021)。

吸量管在使用时,应先洗涤,再用于移取溶液,操作与移液管相似。常用吸量管的分度数值由下到上,操作中先将溶液吸取定容于最大刻度,然后定量流出溶液至接收溶液用容器。例如,采用 10 mL 吸量管移取 6 mL 液体时,先准确吸取溶液至 0 mL 刻度,再流出溶液至 4 mL(管上分度数值由上到下递增),即移取得 6 mL 溶液。

注意事项:

- (1)必要时,采用衡量法校准吸量管,符合吸量管的容量允差方可使用。
- (2)在具体操作上,不同种类的吸量管会稍有差异,使用时需注意。

(五)容量瓶操作技术

容量瓶主要用于准确配制一定摩尔浓度的溶液。它是一种颈细长、瓶身呈梨形的平底玻璃瓶,配有磨口塞。其瓶颈上刻有标线,当瓶内液体在所指定温度下达到标线处时,其体积即瓶上所注明的容积数。一种规格的容量瓶只能量取一个量。常用的容量瓶有 100 mL、250 mL、500 mL、1 000 mL 等多种规格。

步骤一 检漏

取洁净的容量瓶,在其内加水到标线附近,塞紧瓶塞,用右手食指顶住瓶塞,另一只手五指托住容量瓶底部,将其瓶口朝下倒立 2 min,用干滤纸片沿瓶口缝处检查,看有无水渗出。若不漏水,将瓶正立且将瓶塞旋转 180°后,再次倒立,检查是否漏水。两次检查都不漏水的容量瓶才能使用。

步骤二 洗涤

容量瓶在使用前都要洗涤,直至内壁不挂水珠为洗涤干净。对污染严重的容量瓶,可用铬酸洗液洗涤:先用铬酸洗液浸泡内壁,再用自来水冲洗,最后用蒸馏水洗涤干净。

步骤三 加入试剂

- (1)如为液体试剂。以移液管或吸量管准确移取一定体积的溶液至容量瓶中。
- (2)如为固体试剂。

①溶解与转移。把称量好的固体试剂置于烧杯中,用少量溶剂充分溶解并搅拌混匀后,用玻璃棒引流,转移至容量瓶中。

②洗涤。用溶剂少量多次洗涤烧杯,并把洗涤液全部转移至容量瓶中,转移时要用玻璃棒引流(溶液总量不得超过容量瓶容积的 3/4)。

步骤四 定容

向容量瓶补加溶剂至 2/3~3/4 后,水平摇动容量瓶数次,混匀溶液。继续补加入溶剂至液面,至液体的弯月面与标线正好相切(若加水超过刻度线,则必须重新配制)。

步骤五 摇匀

盖紧瓶塞,用倒转和摇动的方法使瓶内的液体混合均匀,反复操作 15~20 次。静置后如果未发生漏液,而液面低于刻度线,则是由容量瓶内极少量溶液附着在刻度线上部的瓶颈处导致的,不会影响所配制溶液的浓度,不需要再向容量瓶内加溶剂。

注意事项:

- (1)容量瓶只用于配制溶液,不得用于储存溶液。
- (2)容量瓶用后需及时洗涤干净,待干燥后塞上瓶塞,并在塞子与瓶口之间



视频:容量瓶的使用



图文:配制溶液的操作要点

夹一张纸条,避免瓶塞与瓶口粘连。

四、生物药物分离技术导学

(一)教材的特色与用法

本教材为活页式、工作手册式新形态教材和配套有丰富信息化资源的融媒体教材,适用于开展理论学习和实践相统一,强调实践性,兼顾思想教育的生物药物分离技术教学活动。

1. 工作手册式教材

本教材以细胞色素 C(Cytochrome C,Cyt C)生产、人干扰素 $\alpha 2b$ 生产和抗 HER2 单克隆抗体生产等三个企业生产项目为主要载体,根据最新版《中国药典》和 GMP 要求,结合技术技能人才成长规律和学生认知特点,组织形成三个教学项目,以教学项目为主体设计形成工作手册式教材。

三个教学项目均按照生产工艺流程顺序提炼岗位 SOP 和生产操作记录等生产文件中内容,设计教学任务。在教学中,依次实施教学任务即可完成细胞色素 C 生产、人干扰素 $\alpha 2b$ 生产和抗 HER2 单克隆抗体生产,制备得到这三种典型的生物药物。教学任务后设置有“拓展任务”栏目,该栏目为易于实施,与教学任务主题一致的实训任务,提升了教材的适用性和实践的可及性。三个教学项目囊括生物药物生产中常用的分离技术,适用于全面开展生物药物分离技术知识学习、技能训练和药德培养。

2. 活页式教材

教学任务包括“任务描述”“任务目标”“任务支撑”“任务实施”“操作记录”“考核与评价”和“拓展任务”栏目。

“任务实施”和“操作记录”改编自生物制药企业岗位 SOP 和生产操作记录,教学中依次完成各教学任务的“任务实施”,填写“操作记录”,即可生产制得生物原料药,贯通了学习场域与工作场域。

围绕“任务实施”中涉及的生物药物分离技术,设置其他栏目:“任务描述”和“任务目标”使师生知道要做什么及做到什么程度,“任务支撑”为“任务实施”所必备的知识与技能,“拓展任务”为“任务实施”中技术相关的实训任务,对于不能执行“任务实施”而无法完成教学项目的院校,通过完成各个“拓展任务”亦可锻炼相应的生物药物分离技术技能,并且在“任务分析与总结”部分完成对技术的总结与强化。“考核与评价”用于督促、评价学习效果和反馈提升教学效果。综合完成各个栏目的学习,即可掌握生物药物分离技术。

教材为活页式装订,可重新编排、汇总内容。汇总各任务中“任务实施”和“操作记录”即形成“工作手册”,汇总各任务中“任务支撑”即形成“知识与技能手册”,汇总各任务中“拓展任务”即为“实训手册”,汇总各任务中“考核与评价”即为该生的“学习评价手册”。

3. 融媒体教材

教材适当应用信息技术,配套建有大量动画、视频和仿真等信息化教学资源,为编排方式科学、资源丰富、呈现形式灵活的融媒体教材。

(二)课程的教学实施

一体化地设计由新形态教材、在线课程、公众号平台组成的课程教学体系,可供高水平专兼职教师在线或线上线下混合式开展生物药物分离技术教学活动。

信息化教学资源以二维码形式内置于教材,并有更多信息化资源整合上传于教学平台,建成《生物药物分离技术》MOOC,供教材配套使用。

学习《生物药物分离技术》MOOC 的方式如下:

(1)国家职业教育智慧教育平台(<https://vocational.smartedu.cn/>),搜索“生物药物分离技术”,点击《生物药物分离技术》MOOC(课程负责人:牛红军),即可登录后免费学习。

(2)高等教育出版社,“智慧职教”网站(<https://www.icve.com.cn/>),点击“MOOC 学院”,搜索“生物药物分离技术”,点击《生物药物分离技术》MOOC(课程负责人:牛红军),即可登录后免费学习。

(三)课程教学目标

培养致力于为人类提供合格药品,服务于群众健康,能够担当中华民族复兴大任的高水平生物医药技术技能型专业人才。

1. 知识目标与能力目标

(1)使学生能够解读生产工艺流程及岗位 SOP,按照 GMP 要求完成生产岗位的产前检查、生产和生产记录填写、洁净区的清洁与消毒等工作。

(2)掌握从事生物药物分离工作所需的知识和操作技能,胜任生物药物生产、功能食品加工和生化物质生产等企业的相关生产岗位,并具备在科研、原辅料采购和检测等岗位从业的能力。

(3)能够在教学和生产实践中发现问题、分析问题、解决问题,胜任生物药物生产管理工作,为安全、有序地生产生物药物提供保障。

2. 素质目标

依托由新形态教材、在线课程、公众号平台组成的《生物药物分离技术》课程教学体系,与其他课程同向同行,发挥协同效应,共同潜移默化、系统地达成素质目标,育德技并修的技能型医药人才。

(1)思想道德素质方面。

①政治立场坚定,拥护中国共产党的领导,认同中国特色社会主义,坚定“四个自信”,自觉践行社会主义核心价值观,具有正确的世界观、人生观、价值观,树立正确的国家观、民族观、历史观、文化观。

②法治意识强,道德水平高。遵守国家法律、校规校纪和厂纪厂规,节约资源,爱护环境,讲究卫生,文明礼貌,做文明有礼的中国人。

③树立劳动光荣信念,弘扬专业精神、职业精神、劳动精神、工匠精神和劳模精神,吃苦耐劳,爱岗敬业,恪尽职守,精益求精,致力于创造美好世界与和谐社会。

④正视我国医药发展成就与不足,以成就激发自信心和自豪感,将破解“卡脖子”难题转化为学习的推动力。

(2)科学文化素质方面。

①有科学的认知理念与认知方法,实事求是、勇于实践的工作作风。

②自强、自立、自爱,有正确的审美观,言谈举止及衣着修饰等符合自己的职业和身份,有较高的文化修养。

③敢为人先、善于钻研、勇于突破,培养创新意识,形成创新精神,以创新推动国家强盛和民族进步。

(3)身体与心理素质方面。

①有切合实际的生活目标和个人发展目标,提高抗压能力。

②培养学生刻苦、勤奋、创新的学习态度,提高学习能力。

③能正常处理人际关系,有集体主义和团结协作精神,提高沟通能力。

(4)职业道德与职业素质方面。

①领会医药行业对保障人类健康的重要意义,坚定为人民群众健康事业努力奋斗的决心。

②严格执行标准操作规程和质量标准等文件与要求,遵守工作纪律,培养规范意识和质量意识。

③规范地使用危险化学品、处置危险废弃物、防范生物危害、操作和维护设备,培养安全意识。

④强化无菌意识、环保意识、成本意识、责任意识和服务意识,牢记使命,做合格的制药工作者。

拓展阅读

立志做德才兼备的生物医药高素质技术技能人才

药品为维持人体健康和维系生命提供基本保障,是特殊的商品。药品如存在质量问题,将危及患者的健康,甚至生命。人员是 GMP 实施过程中的一个重要方面。企业应当配备足够数量并具有相应资质(含学历、培训和实践经验等)的管理和操作人员。与药品生产、质量有关的所有人员都应当经过培训,培训的内容应当与岗位的要求相适应。

同学们将在高等职业教育阶段学习和培养生物医药产业从业所需的职业道德、科学文化与专业知识、技术技能等职业综合素质及行动能力。扎实的科学文化与专业知识及娴熟的专业技能是从事药品生产工作的前提,良好的职业道德素养为从业人员凭借专业本领生产出合格药品提供保障。

药品生产安全事故和药品质量安全事故的发生往往与从业人员对自身行为的约束不足有关,其根源通常在于职业道德水平不高和价值观缺失。一个人如果没有坚定的理想信念和正确的价值观,就可能会在日复一日的工作中慢慢放松对自己的约束,因麻痹大意而造成事故,对自己和他人造成伤害。作为制药人,我们不仅要学习专业知识与提升自身技能水平,还要提升自我职业素质,养成遵章守纪的习惯,致力于研发和生产人民需要的合格药品,把人民群众的生命安全和身体健康放在首位,以安全地生产合格药品为己任,成为能够担当中华民族伟大复兴大任,德才兼备的高素质生物医药技术技能人才,在为人民谋幸福、为民族谋复兴的伟大征程上书写无愧于时代的业绩。