

照一定的时序和逻辑动作,以实现连续自动监测及自动记录和报警。

四、结 束 语

大面积符合式流气计数管经现场试用,表明能满足弱放射性 β 污水监测的需要,但性能指标及制作工艺方面都还可以进一步改进和提高。至于这种计数管除用于环境监测外,

改进后还可能扩大其使用范围,如用于体内放射性的测量^[3]等,这些问题有待于大家共同探讨。

参 考 文 献

- [1] Lippert, J.: *Risø Report*, 44, 1963.
- [2] Quirk, E. J. M.: *Health Physics*, 12, 1333, 1966.
- [3] Tomitant, T. & Tanaka, E.: *Health Physics*, 18, 195, 1970.

水 解 蛋 白 针 剂 的 制 备

北京市生物化学制药厂
中国科学院生物物理研究所
中国医学科学院血液学研究所

序 言

水解蛋白针剂是一种营养型的代血浆,它是酸法、碱法或酶法水解蛋白质后的产物,制剂中含有各种氨基酸或氨基酸及小肽。它适用于大面积烧伤病人、胃切除病人、胃肠道肿瘤病人及外科手术病人等等。早在本世纪四十年代国外已开始应用。由于内科、外科病人常产生低蛋白血症,注射水解蛋白后,可补充身体内缺少的必须氨基酸,以合成体内蛋白质,其疗效显著,价格低廉,因此较一般代血浆为佳。我国在1960年开始生产应用,但原料及制备工艺系采用酸水解酪蛋白,水解产物中缺少人体所必需的色氨酸,因此必须添加色氨酸,以保证其营养价值。近年来由于酶制剂在食品、医药、纺织、化工、采矿、造纸等方面得到广泛的应用,对于革新工艺,提高产品质量起了积极作用,因此我们采用了国产栖土曲霉菌产生的蛋白酶(代号:3.942酶),用猪血纤维为原料制备水解蛋白。栖土曲霉产生的蛋白酶应用广泛,它可用于皮革脱毛、柔化,胶卷回收银,丝绸脱胶,水解蛋白等等。我们用栖土曲霉蛋白水解酶水解猪血纤维的优点为:①水解产物为氨基酸和小肽,易

被人体吸收利用;②血纤维含有极丰富的维持人体氮平衡需要的八种必须氨基酸,尤其是色氨酸,这种水解工艺国内外均未见正式报导。

1970年5月,北京市生物化学制药厂、中国科学院生物物理所、中国医学科学院血液学研究所三个单位共同协作,组成了以工人为主体的三结合小组,在工人阶级的领导下,以毛泽东思想为指导,运用毛主席的光辉哲学思想解决了研究试制过程中一系列问题(如热原、抗原、组胺、澄明度等),确定了比较合理的生产工艺,拟定了酶法水解猪血纤维生产水解蛋白大输液的流程,经鉴定成品符合要求。经初步试用,并与进口的水解蛋白(Baxter)进行了对比,反映很好。

本文系用酶法水解猪血纤维蛋白制备水解蛋白针剂的实验结果。

一、实 验 部 分

(一) 原料的选择

本实验用原料,分为刀口接血(手搅)、血槽取血(机搅)血纤维两种。二者相比,刀口接血得到的纤维比较干净,易于洗涤,对消除热原有

利。但用此法取血存在费工、产量低等缺点,不适用大量生产。机搅血纤维,即从血槽取血,用机器打碎血块,将血纤维捞出洗净。此法存在原料易腐臭,不易洗涤等缺点,但由于这种方法产量高、节约人力、有利于水解等优点,适用于大型生产。操作时只要注意洗涤干净血纤维,并不影响产品质量。现在北京生化制药厂采取机搅血纤维进行生产。

(二) 水解条件的选择

酶法制备水解蛋白的水解条件,直接影响产品的产量和质量。为了寻找最适水解条件,我们对酶浓度、底物浓度、水解温度及水解时间进行了条件试验。

1. 酶浓度 用 500 毫升反应瓶,按固定反应条件加入五个不同浓度的 3.942 酶,即: 32,000 单位/100 毫升、48,000 单位/100 毫升、64,000 单位/100 毫升、80,000 单位/100 毫升、96,000 单位/100 毫升。反应条件为:底物浓度 8% (即每 100 毫升中含干血纤维的克数)、甲苯 0.5%、反应液 pH6.8—7.0、反应温度 45℃、反应时间 24 小时、反应液总体积 300 毫升。反应中不时加以振荡。24 小时后煮沸 5 分钟以中止反应,测定总氮和氨基氮。实验表明,酶浓度大于 64,000 单位/100 毫升,氨基氮与总氮之比大于 50%。随酶浓度的增加,氨基氮与总氮之比增大趋势减小,故从实际出发,采用 64,000 单位/100 毫升酶浓度即可。

2. 底物浓度 在上述试验条件下,固定酶浓度为 64,000 单位/100 毫升,分别对 6%、7%、8%、9%、10% 五个不同浓度的底物进行水解,24 小时后中止反应,测定氨基氮与总氮之比。结果表明,底物浓度在 6—9% 时,氨基氮与总氮之比在 50% 以上,超过这个浓度则低于 50%,并且,底物浓度在 7% 时,含氨基氮比例最高。

3. 水解温度 温州发酵厂生产的 3.942 酶适宜温度范围为:短时间作用以 45—50℃ 为宜,长时间作用以 40—45℃ 较适宜。对反应温度 40℃、46℃、56℃ 进行比较试验,结果表明,反应温度在 40—46℃ 时,氨基氮不断增加,反

应温度在 56℃ 时则氨基氮显著下降。

4. 反应时间 在固定酶浓度为 85,000 单位/100 毫升,底物浓度为 8.5%,甲苯 0.2%,水解温度为 45℃,pH6.8—7.0,分别在 2、4、6、8、12、16、20、24、34 小时中止反应,取样测定氨基氮与总氮之比。结果表明,水解时间增加,氨基氮含量增加,20 小时以后,氨基氮的增加幅度变小。为保证充分水解,采用 24 小时即可。

5. pH 温州发酵厂生产的 3.942 酶的最适 pH 为 5—9,实验中选用了 pH6.8—7.0,没有再进行不同 pH 条件的比较试验。

(三) 热原的控制

为了消除水解蛋白制剂产生的热原,一般采取积极预防与污染后及时去除两种方法。预防办法即水解原料力求新鲜,使用器具洗涤干净,配制针剂使用的蒸馏水应保证新鲜,无热原(4 小时内使用)。水解过程采用无菌或半无菌环境等。水解物如被污染,即采用不同吸附剂,如活性炭、离子交换树脂等消除热原。我们在制备水解蛋白的过程中,在不同阶段采用了不同的方法来控制热原的产生。

在原料制备过程中,不用过夜腐臭的原料,根据热原的水溶性特点,增加血纤维的洗涤次数。实验证明,对原料采用三次高压,每次气压 1.2 公斤,1 小时,基本上能消除原料中的热原。

在针粉制备过程中,为不使细菌感染,除增加高压次数外,主要是选用不同种类的活性炭,并改善活性炭的吸附条件。经过多次试验,最后确定使用针用炭(粉状),高压 1.2 公斤 20 分钟后,常温搅拌吸附 1 小时。2 次吸附,每次加炭量 0.5%,完全可以控制热原。

在针剂制备过程中,消除热原是个关键环节。由于操作不严,可能带入热原质。而采用 G₄ 玻璃砂滤棒加 0.2% 的活性炭反复抽滤,在多次封灌中未发现热原反应,从而保证了制品的质量。

针剂被热原污染后,可采用 0.2—0.5% 针用活性炭处理来消除热原,效果良好。动物实

验结果见下表:

两次加炭处理被污染水解蛋白情况

针剂编号	污染情况 (三只家兔体温)	处理后情况 (三只家兔体温)
1	平均升 0.8℃	平均升 0.25℃
2	平均升 0.6℃	平均升 0.31℃

两次加炭处理,针剂颜色会加深,添加少量稳定剂,可防止此现象发生。

(四) 抗原与组胺的控制

蛋白质产生抗原的特性表明:①产生抗原的蛋白质必须保持其一定的分子量及其胶体性质;②必须有完整的分子结构,且表面存在一定数量的极性基团。依据这些特性,进行了以下消除抗原的条件实验。

1. 水解时增加 3.942 酶的用量及添加酶的次数,以提高蛋白质的水解程度。实验中,我们曾把酶的浓度从 64,000 单位/100 毫升增加到 96,000 单位/100 毫升,从一次加酶改为两次加酶。结果表明,水解程度有所提高,氨基氮与总氮之比可达 60—70%,但抗原物质仍不能消除。

2. 加碱,改变水解液中残存蛋白质的结构。据报导,蛋白质经碱处理后,蛋白质的烯酮基转变为烯醇基,丧失了蛋白质的旋光性,同时丧失抗原特性。具体做法可在水解 24 小时后,用氢氧化铵碱化水解液至 pH10 左右,即对消除抗原有明显效果。但水解液中的氨基酸也有被消除的可能性,营养价值将降低。

3. 用盐酸调节水解液的 pH 至血纤维蛋白的等电点,即分别于 pH 5.7 和 pH 4.2 时加入 3% 和 4% 药用活性白土,搅拌吸附 1 小时,经多次实验证明消除了抗原。

关于引起血压下降的组胺问题。用 3% 白土吸附,组胺含量已符合卫生局暂定标准,即在 0.075 微克/毫升以下。实验中,为充分消除抗原使用 7% 白土吸附,则组胺含量完全符合标准要求。

实验证明,不同型号的活性白土,去抗原能

力有很大不同。试产中,采用药用白陶土,去抗原效果很好,但在组胺含量上过不了关。经过多次试验,发现青岛产的活性白土吸附组胺的效果明显。因此,在灌针时,调针液至 pH4.6 左右,再加入 4% 青岛活性白土,以去除组胺。目前,抗原与组胺的稳定度达 90% 以上。

(五) 色泽及澄明度

水解蛋白针剂色泽及澄明度的好坏直接影响着成品的质量及贮存期限,为此需要添加稳定剂。对亚硫酸钠、亚硫酸氢钠、半胱氨酸、抗坏血酸等进行比较试验,表明亚硫酸钠效果很好。当亚硫酸钠为 0.04 % 时,成品呈浅黄色,无明显颗粒,说明无葡萄糖氧化及其他反应发生。

实验中还发现稳定剂对保证色泽和澄明度有不良影响。各种稳定剂在高压后均曾出现混浊、颗粒及油状物。其中油状物主要是橡皮塞、涤纶薄膜处理不净及打盖不紧所致。消除方法是,针粉先配成 30 % 浓度,冰水冷却,滤去不溶物再稀释,最后用 0.2 % 活性炭通过 G₆ 玻璃砂滤棒反复抽滤,针剂成品的色泽和透明度均可得到保证。

水解蛋白针剂中色氨酸含量是决定制剂营养价值高低的一个重要因素。色氨酸在水解蛋白针剂中的最低含量不得少于 20—30 毫克/100 毫升。实验证明,用 1.5 % 活性炭吸附时,色氨酸含量一般在 8—18 毫克/100 毫升左右,而用 1 % 活性炭吸附可保证色氨酸含量在 30 毫克/100 毫升以上,所以针剂制备过程中活性炭的用量不能超过 1 %。

二、讨 论

(一) 关于水解蛋白的抗原问题

为了保证水解蛋白针剂的质量,制备过程中消除抗原和控制热原是两个关键问题。

水解蛋白针剂中若含有抗原物质,就会使动物或人体产生过敏反应。用酸法制备水解蛋

白,由于蛋白质水解较为彻底,故一般无抗原物质存在。用酶法水解蛋白质,由于水解的不彻底性,水解液中往往残存少量具有抗原特性的蛋白质大分子,从而使动物或人产生过敏反应,轻者抓鼻、咳嗽,重者痉挛、瘫痪,甚至死亡。

酶法制备水解蛋白产生抗原问题,国外报导不多,一般认为蛋白质经蛋白水解酶分解,氨基酸达到总氮的 50% 以上时,即可消除抗原引起的过敏反应。我们在实验中,为了提高水解程度,使用了过量的蛋白水解酶和充分的水解反应时间,使氨基酸达到总氮的 60—70% 时,仍不能消除抗原,其原因有待进一步探讨。制备过程中,采用在血纤维蛋白等电点加 7% 活性白土吸附的办法来消除抗原,收到了较理想的效果。

(二) 消除水解蛋白的热原与保证色氨酸含量的问题

热原是细菌的一种分泌物,它是一种高分子量的粘多糖体,易溶于水。有人曾用提纯的热原做实验,发现以 0.001 微克/公斤用量注入人体即可使人发烧。水解蛋白本身营养丰富,特别在酶水解过程中,极易受细菌污染产生热原。含有热原的水解蛋白注入人体后,15 分钟至 8 小时内发生冷感、寒战、发热、有时恶心、呕吐、重者甚至昏迷。

热原还可高度提纯,经冷冻干燥长期保存,其颗粒大小约为 0.05—1.0 微米之间,一般细菌滤器不能滤除。甚至塞氏滤器也不易除去。它有较强的耐热性,115℃ 消毒 15 分钟对消除热原无作用,但 250℃ 消毒 30—40 分钟或 200℃ 消毒 2 小时以上,可以彻底消灭热原。热原能被过氧化氢或高锰酸钾等破坏,故可应用此类药物消毒制备水解蛋白的器具。

制备中多次使用活性炭吸附的办法来消除热原,而实验证明活性炭对色氨酸的选择吸附也很强,即制备过程中活性炭用量越多,色氨酸含量越低,特别在配制针剂时使用活性炭吸附,色氨酸损失最大,因此,必须严格控制活性炭用量。

(三) 水解蛋白的产率问题

酶法水解蛋白质的平均产率,一般认为可达 50% 左右,而在我们多次中型实验中,平均产率仅为 34%,产量偏低。其原因可能是在步骤较多的工艺过程中逐步损失的。特别在酪氨酸沉淀一步,损失最多,另外就是活性炭和活性白土的吸附造成的损失。产率的大小与色氨酸的含量是密切相关的。

(四) 水解蛋白针剂的贮存期限问题

对水解蛋白针剂放置多长时间仍能保证不变质的问题,没有做过系统研究,目前北京市生物化学制药厂生产的水解蛋白针剂有效期定为一年。

三、工 艺 规 程

(一) 生产流程图



(二) 制备工艺

1. 猪血纤维的制备 刀口接血,用棒搅出血纤维,自来水漂洗至白色,以细孔绞肉机绞碎,再用自来水漂洗,挤压数次至完全无血色。用 2 倍新鲜无热原水淘洗,挤压三次。加入 2 倍无热原水,高压 1.2 公斤 1.5 小时。压去水分,再加 2 倍无热原水,高压 1.2 公斤 1 小时。压去水分,再续加 2 倍无热原水,高压 1.2 公斤 1.5 小时。压去水分,搓碎备用。

2. 针粉的制备

水解 取一定重量处理好的血纤维于反应罐中。加无热原水至血纤维浓度为 7%,甲

苯 0.5%, 3.942 酶浓度为 56,000 单位/100 毫升(即每克干血纤维重量加入 8,000 单位), 反应温度为 45℃, 密封搅拌, 水解 24 小时后高压 1.2 公斤 30 分钟(或煮沸)中止反应, 趁热用布氏漏斗过滤。

精制 滤液用 10% 盐酸调至 pH 5.7, 高压消毒 1.2 公斤 3 小时。按滤液原体积加入 0.5% 活性炭, 高压 1.2 公斤 20 分钟。常温搅拌吸附 1 小时, 再按滤液原体积加入 3% 药用活性白土, 搅拌吸附 1 小时。布氏漏斗抽滤, 滤液减压浓缩至原体积 30% 左右, 有大量酪氨酸析出, 冰水冷却, 放置 4 小时沉淀酪氨酸。然后过滤, 用少量无热原水洗涤沉淀数次。稀释滤液, 使体积为原体积的 1/2。用 10% 盐酸调至 pH 4.4, 高压 1.2 公斤 1 小时。再按原体积加入 0.5% 活性炭, 高压 1.2 公斤 20 分钟。常温搅

拌吸附 1 小时。再按原体积加入 4% 药用活性白土, 继续搅拌吸附 1 小时。用布氏漏斗抽滤。滤液加入 701 阴离子交换树脂搅拌脱酸至 pH 5.5—6.0。迅速过滤。滤液减压浓缩成糊状, 倾入搪瓷盘中真空干燥, 80℃, 4—6 小时, 即成针粉。干燥保存。

3. 针剂的制备 称取一定重量的针粉, 用冰冷的无热原水溶解成 30% 浓度, 将不溶物滤除, 再将滤液稀释 5 倍, 使针粉约含 6%。高压 1 公斤 1 小时。加入 0.06% 亚硫酸钠, 充分溶解。加入 5% 葡萄糖, 待全部溶解后, 加入 1% 活性炭, 常温搅拌吸附 1 小时, 放冷过滤。滤液再加入 0.2% 活性炭, 用 G₆ 玻璃砂滤棒反复抽滤至澄明度合格。灌针时, 调到 pH 4.6 左右, 再加入 4% 青岛活性白土, 吸附处理后, 密封, 高压消毒 0.5 公斤 40 分钟。

蝾 牛 酶

中国科学院生物物理所三室

蜗牛酶是蜗牛消化液中一类混合酶, 其中包括纤维素酶、蛋白水解酶、果胶酶等, 有三、四十种之多。它能溶解酵母和植物的细胞壁, 因此近年来日益广泛地应用于细胞生物学的研究。例如: 用蜗牛酶溶解酵母细胞壁, 从中提取线粒体; 或用它去除植物细胞壁, 使细胞互相融合, 从而培育新的杂交植株。

过去, 蜗牛酶依赖进口。最近, 由于工作需要, 我们从我国南方的一种体形较大而分布普遍的褐云玛瑙螺 (*Achatina fulica* Férussac) 和环口螺 (*Cyclophorus pyrostoma* Moellendorff) 的消化液中制备了蜗牛酶, 并对该酶溶解酵母细胞壁的作用条件进行了初步实验。

蜗牛酶的制备过程基本按 Fogel 等方法。蜗牛饥饿两天后, 用水冲洗干净, 轻轻敲碎外壳, 小心剥去。然后, 顺消化道剪开体壁, 剥离出消化道, 从嗦囊和胃里抽出红棕色的消化液。

每只褐云玛瑙螺平均可抽得 1.0—1.5 毫升。消化液在 0—5℃ 下离心 (10,000 转/分) 十分钟。上清液经细菌漏斗过滤, 滤液预冷到 -20℃ 后进行真空干燥。然后分装于瓶中, 抽气密封, 在低温下保存。第一批制备的酶迄今已保存一年多, 活力未见显著变化。

一毫升褐云玛瑙螺消化液中平均可得 100—130 毫克干重蜗牛酶。100 毫克干重蜗牛酶平均含蛋白质 80—90 毫克。

在蜗牛酶作用酵母细胞之前先用巯基化合物 (2-巯基乙醇或巯基乙酸钠、巯基乙醇等) 进行预处理, 以提高作用效果。蜗牛酶作用的最适 pH 为 5.8—8.0, 最适温度为 30—37℃。每克湿酵母所需酶量随菌株而异, 一般为 20—40 毫克。在合适的条件下, 可使 80—90% 酵母细胞细胞壁溶去而形成球形体。