

· 药剂学进展 ·

利凡诺——硫酸铵法生产人血丙种球蛋白工艺条件的探讨

江苏省无锡中心血站(无锡 214021) 邱霞琴

本文着重总结了人血丙种球蛋白生产过程中几个重要环节的工艺条件变化对产品质量与量的影响,从而选择最佳条件,组合最佳工艺,提高生产率,使达 72g/万ml(丙种白蛋白/血浆),现分别介绍如下:

制备方法

取沉淀白蛋白后上清液加入 2% Na_2CO_3 溶液(每万ml加125ml),以 0.25M NaOH 调 pH 9.9 ± 0.1 静止 2 h 以上,取沉淀物,以 3/40 原血浆量的介离液(内含 NaCl,甘氨酸各为 2.6%) 解离,调 pH 6.5 ± 0.1 (将 0.5M HCl 适量预先加入解离液中),解离过夜,抽滤,滤渣以原血浆量的 1/20 的生理盐水洗涤与原液合并,另则以适量蒸馏水溶解 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 将后液在搅拌下缓缓加入前液(以每万毫升血浆投料量合并二液的体积为 3000ml,总重量为 3.38 kg,硫酸铵最后浓度为 22% 的标准)。硫酸铵盐析时调 pH $6.3 \sim 7.0$ (可先在硫酸铵溶液中加入适量氨水),静止过夜,抽滤,沉淀物(盐析物)包透析袋于水中透析,水温不超过 22 $^\circ\text{C}$,透析至硫酸铵合格(通常需 15~20h),取透析液加 NaCl 使成 0.9%,加甘氨酸使成 2%,加适量活性炭,半小时后澄清过滤,中间体含量测定,稀释成 10.6%,调 pH 6.9 ± 0.1 随后除菌分装。

原料与检测方法

健康者血浆(酶联免疫吸附法测 HBsAg 为阴性者)NaCl(药用)、 Na_2CO_3 、NaOH、HCl $\text{CH}_2\text{NH}_2\text{COOH}$ (甘氨酸)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 均为分析纯。

中间体蛋白测定为双缩脲法;成品蛋白

测定为凯氏定氮法;中间体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 残留量测定为奈氏比色法;成品 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 残留量测定凯氏定氮法。

粗得率计算(不考虑纯度)

$$= \frac{\text{蛋白浓度}(\%) \times \text{蛋白溶液总体积}(\text{ml})}{\text{总投料量}(\text{万ml})}$$

$$= \text{g/万ml 血浆}$$

结果

(一)利凡诺与丙球的因素及其对成品色泽、得率的影响(络合简称沉淀)

表 1 中的条件同其他工艺条件基本一致。

表1 不同沉淀条件对丙球色泽与得率的影响

批号	沉淀 pH	沉淀 温度 ($^\circ\text{C}$)	沉淀 时间 (h)	成品 色泽(g/万ml血浆)	得率
910514	10.00	14	2	微红	75.90
910521	9.90	15	2	淡黄	70.03
911015	10.00	25	2	微红	78.16
911022	9.90	16	2	清白	70.71
920107	10.08	5	4	较红	68.78
920114	10.21	7	4	较红	67.28

实验表明:

(1) 沉淀 pH 高成品色泽深得率高,沉淀 pH 低成品色泽好,但得率偏低。

(2) pH 不超过 10 为好,过硷会使蛋白变性,反而影响得率。

(3) 反应体系温度高,可适当缩短沉淀时间,冬天反应体系温度低,反应速度减慢,应适当延长沉淀时间。

(二)利凡诺-丙球络合物解离 pH 对该步功效及其对色泽得率的影响

表(2)条件:介离物体积,NaCl,甘氨酸浓度相同,其他工艺条件基本一致。

表2 不同抽滤条件对丙球得率的影响

批号	介离pH	最大抽滤负压kg/cm ²	原液抽滤时间	残渣量	残渣性状	色泽	得率g/万ml血浆
911119	6.6	1	2	多	疏松有些粘	较红	80.08
910514	6.6	1	1.5	多	疏松有些粘	较红	75.90
911203	6.47	0.6	1	很少	一薄层不粘	淡黄	62.51
920121	6.24	0.4	40'	很少	一薄层不粘	淡黄	59.87

实验表明:

1. 解离pH工艺上规定为 6.5 ± 0.1 。生产实践得出 pH 高解离不完全,造成抽滤困难,抽滤时所需负压高,抽滤时间长,并易穿孔,成品色泽较红。

2. pH低至6.3~6.4解离较为安全,原液抽滤十分顺利,抽滤时只需较低负压,抽滤时间短,成品色泽好,但得率较低。

3. 偶而在生产中解离pH6.0~5.8,再往回调,特别是酸硷来回调,易使丙球变性,得率更为下降。

(三)硫酸铵盐析对成品色泽得率的影响

表(3)硫酸铵浓度不变,蛋白浓度不变,其他工艺条件基本一致(投料量为9万ml血浆)

表3 盐析条件对丙球色泽与得率的影响

批号	盐析 pH	盐析物重 (g)	总蛋白量 (g)	得率 g/万 ml血浆	成品 色泽
910507	7.0	2780	690.30	76.70	微红
911009	7.0	2775	701.35	77.50	微红
910521	6.6	2350	630.20	70.03	淡黄
911022	6.7	2650	634.40	70.71	清白

实验表明:在介离 pH 基本一致条件下,盐析时 pH 对成品色泽得率影响是 pH 高色泽深得率高,pH 低色泽好得率低。

注:盐析物重量仅作参考,因抽干程度不会绝对一样

(四)透析时水温对透析效果的影响

1. 盐析物在水中透析去 $[(NH_4)_2SO_4]$ 透析温度不宜太高,一般不超过 $22^\circ C$,透析长时间温度过高会促使丙球变性,因而产生乳光。夏季采用致冷水透析或在透析中途加入适量 NaCl 和甘氨酸。

2. 透析水温低需透析时间长,透析温度高透析时间可明显缩短。

3. 冬季透析可先用 $22-24^\circ C$ 水静止透析5-6小时,然后小水流动透析,效果较好,明显缩短透析时间,也无孔光产生,透析原液仍然易于澄清,并透明度很好。

(五)如何调半成品丙球的 pH

两种球蛋白半成品在除菌分装前调正 pH 6.9 ± 0.1 (丙球成品要求的 pH 是 $6.4 \sim 7.4$)通常总需加入少量碱,但发现在加碱后色泽明显加深,现改进加碱方法如下:

1. 取透析液加 NaCl 使成0.9%,加甘氨酸使成2%,加适量活性炭搅匀。

2. 若透析原液较大,可先加入部分洗液(洗透析玻璃纸的溶液内含0.9% NaCl,2%甘氨酸)。

3. 将0.25M NaOH 稀释2-3倍,缓慢滴入原液适量,随加随搅,测 pH。

4. 存放半小时以上,即可进入下步澄清。

(六)澄清方法对澄清速度,效果的影响 (9万ml血浆投料量)

表4 为不同澄清方法的澄清效果

表4 不同澄清方法的澄清效果

澄清方法	澄清材料及顺序	滤器直径 12.5cm	澄清原液 时间(h)	滤材更换次数	澄清效果	损 失
滤纸法	①二层滤纸 ②澄清滤板	2	1—1.5	通常各换一次	带少量炭 澄明度差	少量
薄膜法	①二层滤纸 ②0.45 μ m薄膜	4	2—3	每500~600m换 薄膜一次每批换 7—8次	不带炭 澄明度好	多
滤纸浆法	滤纸浆+滤纸+澄 清滤板	2	30'—1	不换	清彻透明	几无
炭床法	活性炭层+二层 滤纸+澄清板	2	30'—1	不换	清彻透明	几无

实验表明

1. 滤纸法澄清效果不太理想,常带炭,给除菌带来麻烦。
2. 薄膜法虽澄清效果较好,但很难过滤,必须常换薄膜,薄膜上带有原液,故造成浪费很多,并操作繁琐,无实用价值。
3. 滤纸浆法是炭离心后澄清,效果很好,但带炭澄清尚未实践。
4. 目前常用炭床法,与以上三法比较,它的优点是操作方便,效果理想,损失最少。

讨论

1. 沉淀白蛋白的 pH (即内含丙球上清液的 pH), 对丙球得率也有影响, 前段生产中, 发现 pH8.4 时, 丙球得率几乎是 75g/万 ml 血浆左右, pH8.8 时得率降至 68g/万 ml 血浆, 但目前尚未进一步验证。

2. 在利凡诺——丙球络合过程中, pH 高得率高 pH 低者反之, 最好不超过 10.00, 过高会使丙球变性, 反使得率下降。

3. 决定丙球色泽的最主要的环节为解离 pH, pH6.3~6.4, 丙球色泽好, pH 过低者, 低于 6.0, 得率下降较多, 并酸加入过多, 特别是酸硷来回多次调 pH, 会使丙球变性而产生乳光。

4. 要是介离 pH 稳定在 6.6~6.7, 则硫酸铵沉淀 pH 直接影响成品色泽, 工艺上规定盐析 pH 6.3~7.0 低者色好产量低, 高者色差产量高。

5. 澄清过滤采用活性类加滤纸加澄清滤板, 效果较好, 目前尚未更好方法替代。

成品色泽、纯度、得率是生产工艺优与劣的充分体现。目前我们兼顾产品的质与量, 掌握生产环节中的重要条件, 基本能生产色泽较好年终平均得率达 76 g/万 ml 血浆的丙种球蛋白, 目前尚未清楚利凡诺与白蛋白络合的最佳条件, 使得它既能保证白蛋白的得率, 又不影响丙球的得率, 需进一步在生产实践中总结。本文叙述的结果, 望同行在生产实践中进一步验证, 不足之处, 多多指教。

参 考 文 献

- [1] 周明忠等. 输血与血液学, 1979, 1: 33
- [2] 王清和. 中华血液学杂志, 1983, 4(4): 249
- [3] 马仁和俞仁妙. 药学通报, 1985, 12: 743
- [4] 樊绍文、陈爱民. 中国输血杂志, 1988, 1(2): 76
- [5] 邱霞琴. 现代应用药学, 1988, 5(5): 25
- [6] 邱霞琴. 药学情报通讯, 1989, 7(3): 80
- [3] 邱霞琴. 中国药学杂志, 1990, 1: 24