

醇溶液低溫血漿提煉法在純製 抗毒素上之應用

劉 雋 湘

(中央生物製品研究所, 北京)

在普通溫度下, 蛋白質在相當濃度的醇溶液中會變性 (Denaturation) 破壞, 但在低溫 (0—10°C) 則只沉澱而不變性。Cohn 氏^[1] 等即根據這一事實並充分利用下列幾個因素的配合, 造成不同的條件, 使各種物理性質不同的血漿蛋白成份互相分開: (1) 醇濃度; (2) 氫游子濃度 (pH); (3) 電解質濃度 (或離子強度, Ionic Strength, $I/2$ ^[1]); (4) 蛋白濃度; (5) 溫度。

用這種方法提煉人血漿已得到十餘種製品, 適於各種預防及醫療的用途^[2,3,4]。這種方法近年來不斷的發展, 除提煉人血漿外還被用於提煉純的毒素、類毒素及激素等^[5,6] 都很成功。

Smith 及 Gerlough 氏^[7] 用 Cohn 氏法提煉破傷風抗毒素馬血漿, 發現抗毒素存在於三種不同的蛋白成份中: “T”、乙種及丙種球蛋白。經過透析又從乙種球蛋白中分出富於類脂體但幾乎不含抗體的優性球蛋白。他們研究的結果與 V. d. Scheer 及 Wyckoff^[9,10], Kekwick 及 Record^[11] 等氏的抗毒素馬血漿電泳分析完全符合。Smith 及 Gerlough 之研究同時也證明了用醇溶液低溫法提煉抗毒素馬血漿是可能的。實際上, 遠在 1908 年 Mellauby^[12] 即曾報告在 28% 乙醇溶液中, 在 -2°C, 大部分白喉抗毒素沉澱但不破壞; 1910 年 Hardy, Gardiner^[13] 及 1925 年 Hartley^[14] 也曾先後報告用乙醇、丙酮或乙醇乙醚混合液在低溫可使抗毒素沉澱。可惜這些報告在當時未引起廣泛的注意。

作者曾在這方面進行了一些研究, 茲報告其結果。

1) $I/2 = \frac{1}{2} \sum c_i z_i^2$, c_i 為每一分子量中之離子數, Z_i 為離子的價。

材 料

(一) 抗毒素血漿：低效價白喉抗毒素馬血漿，效價 500—700 單位/毫升，加有枸橼酸鈉為防凝劑及 0.5% 酚為防腐劑。

(二) 主要試劑：

1. 乙醇：95% 乙醇，化學純，貯於 -10°C 不銹鋼罐中，量取之前熱至室溫，用前再冷卻至 -5°C 以下。

2. 無熱原質蒸餾水：雙蒸餾水在密閉系統中經過石棉濾過貯於玻璃鑲裏 (Glass Lined) 之罐中，溫度保持 70°C ，用前冷卻至接近冰點。一切試劑均用此水配製，一切與血漿接觸之器皿均用此水沖洗。

3. 乙酸·乙酸钠緩衝液：依照 Boyd 氏處方^[15]配製，pH 4.0，先配成濃溶液貯存待用，用前稀釋至所需之 $1/2$ ，用氫游子濃度計測定，如不準確則矯正之。

4. 炭酸鈉：化學純，用前配製所需濃度。

5. NaCl, NaOH, HCl 溶液：用化學純品配製。

6. 標準白喉抗毒素：同一材料用 50% 甘油溶液稀釋為二種濃度：6 單位/毫升者作為家兔皮內法的常備標準，50 單位/毫升者作為絮狀反應標準，均每 3 個月根據國際標準檢定一次。本標準動物體內測定與試管內測定之比例 *in vivo/in vitro* 為 0.94。

7. 標準白喉毒素：每毫升含 $1/12 \text{ L}_4$ 量，以甲苯防腐，保存於 $2-4^{\circ}\text{C}$ 冰箱內，每三個月根據國際標準檢定一次，作為家兔皮內測定之常備標準毒素。

8. 標準白喉類毒素：每毫升 25 L_7 ，以 0.5% 酚防腐，保存於 $2-4^{\circ}\text{C}$ 冰箱中，每三個月根據國際標準絮狀反應用抗毒素檢定一次，作為常備標準類毒素，與國際標準抗毒素作用時 K_7 為 18 分鐘。

分析及測定方法

(一) 蛋白氮測定：待檢品用 10% 三氯醋酸在沸水浴中加熱 10 分鐘，離心除去上清液，沉澱洗滌 3 次用 Pregl 法測定氮量。

(二) pH 測定：用 Beckman G 型玻璃電極氫游子濃度計，待檢品先用 0.5% NaCl 溶液稀釋使蛋白濃度不超過 2%。

(三) 電泳分析：用 Longsworth 式 Tiselius 電泳器^[16]，依照 Armstrong 等氏^[17] 推薦之方法用 pH 8.6, $r/2$ 0.1 之 Sodium diethylbarbiturate 緩衝液，在 1°C 下進行，只取下移側 (descending) 計算分析，上移側 (ascending) 僅供參考。

(四) 抗毒素單位測定：

1. 家兔皮內法：將待檢品用生理鹽水稀釋為各種稀釋度，各取 1 毫升分別與 1 毫升標準毒素 (每毫升 壹 L+) 混合，在室溫放置 1 小時，各取 0.1 毫升注射於事先脫毛的家兔皮內。同時用標準抗毒素稀釋為 1 : 30 (=0.2 單位/毫升) 同樣與標準毒素混合，同樣注射 0.1 毫升於家兔皮內作為對照。注射後 60—72 小時觀察反應。與標準對照反應強度相同之待檢品稀釋液即與標準對照所含之抗毒素單位相等。依下式計算：

待檢品稀釋度：0.1 : : 1 : X

2. Ramon 氏絮狀反應測定：每管加標準類毒素 (25 L/) 1 毫升與不同量的待檢品混合，放置於 45°C 水箱中不斷觀察。最先出現絮狀反應之管表示其中抗毒素含量為 25 單位，以該管待檢品含量除 25 即為待檢品每毫升所含抗毒素單位數。例如含 0.05 毫升待檢品之管最先出現絮狀沉澱則：

$$\frac{25}{0.05} = 500 \text{ 單位/毫升}$$

(五) 熱原質試驗：取事先經過選擇已知體溫穩定，體重 1500—2000 克之白色家兔，先量取體溫然後每公斤體重注射待檢品 3 毫升於耳靜脈中，每個樣品注射家兔 3 隻。注射後每隔 1 小時量取體溫 1 次，共取 3 次。注射後所取之 3 次體溫中不得有任何一次超過注射前體溫 1.1°C，否則該待檢品即被認為不合格^[18]。

(六) 過敏性反應試驗：依照 Glaubiger 氏^[19] 之方法，取健康家兔，用明礬沉澱馬血清注射腹腔，每次 5 毫升，每週 1 次連注 5 週。試驗證明 0.02 毫升馬血漿蛋白注射於過敏家兔之皮內即可引起明顯之過敏性皮膚反應。試驗待檢品時須先將其用生理鹽水稀釋 5 倍，然後注射 0.1 毫升於皮內，24 小時、45 及 72 小時各觀察反應一次。

提煉設備與操作方法

視每批所擬處理之血漿多少而採用不同的設備與操作方法：小量試驗在普通試驗室中使用裝有冷卻裝置之角型離心器或浸在低溫酒精槽中的玻璃砂濾漏斗

(Sintered Glass Filter); 大量試驗則在恆溫冷室中使用裝有冷卻裝置之大型“Sharple’s”離心器。分述如下:

(一) 角型離心器操作法: 由於提煉要在相當穩定的低溫下進行故必須有自動調節的冷卻裝置。試驗中所用之角型離心器係萬國儀器公司 (International Equipment Co.) 出品, 用 Freon-12 冷凍機冷卻電阻式溫度調節自動裝置, 使溫度變化不超過 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。離心速度每分鐘最高 5000 轉。

提煉試驗即在沉澱管中進行。先將所需之血漿倒入沉澱管內, 將管浸沒於低溫酒精槽內 (酒精用冷卻管冷卻, 自動調節器控制溫度, 保持於所需之低溫), 然後用滴管或吸管加入所需之醇溶液、緩衝液等。加入時不停攪拌或搖盪使混合均勻, 加入濃的醇溶液時尤須注意醇被稀釋時所發生之熱, 故加入時必須緩慢並將醇溶液於用前冷卻至 -10°C , 其他試劑加入前亦應冷卻至接近冰點。在混合過程中不斷檢視溫度以保持恆溫。混合均勻後放置半小時使溫度穩定後即可開始離心沉澱。一般情況下以每分鐘 3500—4000 轉的速度沉澱半小時即可。離心後立刻將上清液倒入另一容器即可繼續進行下一步的處理。如不再繼續處理, 則上清液於適當的稀釋後, 沉澱於溶解後即可用冷凍真空乾燥法 (Lyophile) 將其乾燥保存或供作試驗及檢定。

(二) 玻璃砂濾漏斗操作法: 漏斗係採用“Pyrex F”容量 50—250 毫升, 用橡皮管及塞或玻璃磨口緊緊裝於瓶上, 浸沒於低溫酒精槽內, 如圖示 (圖 1):

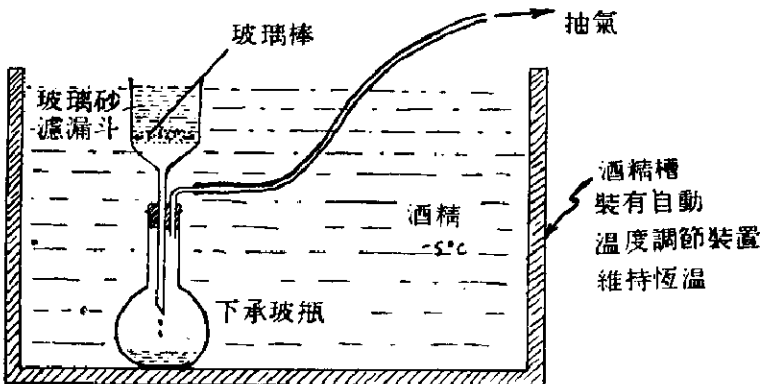


圖 1 玻璃砂濾漏斗 (Sintered Glass Filter) 之裝置圖解

將血漿加於漏斗上再徐徐加入醇溶液等，不停攪拌並檢視溫度。加完及混合均勻後放置 $1/2$ 至 1 小時使溫度穩定，同時漏斗上之清液即逐漸滲過玻璃砂漏斗開始徐徐滴入下承的瓶內。如滴入瓶內之濾液已經澄清即可開動抽氣機增加濾過速度。濾完後漏斗上之沉澱（必要時須經洗滌）及瓶內之清液即可繼續作下一步的處理。

上述二法均可通用於處理每份 5—50 毫升之血漿，適於小量試驗，但據作者經驗，離心法優于過濾法。用過濾法時常有不規律之情況發生，這可能是由於過濾法操作時間較長，血漿醇混合物與空氣之接觸較多，過濾時用真空抽氣引起醇及某些物質的揮發，每次操作不易使條件完全相同，因而結果不易規律。但過濾法所需的設備較為簡單，對於條件不太好不能裝備自動調節冷卻離心器的試驗室仍是一個值得介紹的操作方法。

（三）大量試驗操作法：大量試驗每次可處理血漿 5—20 公升。全部操作除冷凍乾燥外均在 $-5 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 恆溫冷室中進行。將血漿倒於玻璃鑲裏之罐內稀釋至所需濃度，將應加入之醇溶液、緩衝液及其他試劑先行混合並冷卻至接近冰點，然後緩緩加入於血漿中，加時用電動攪拌器不停攪拌並將冷卻用盤旋管（Cooling Coil）放在罐中以保持所需之溫度。混合完畢在冷室中放置 4—18 小時使溫度穩定後用 #6 “Sharple’s” 離心器沉澱。離心器排出之清澈液體用容器收集，離心器中聚集之沉澱取出再分別進行下一步的處理。提煉出之蛋白成份於溶解後加入防腐劑經 Seitz 過濾除菌後即為成品，可作試驗檢定之用，如須長期保存則將其冷凍乾燥。

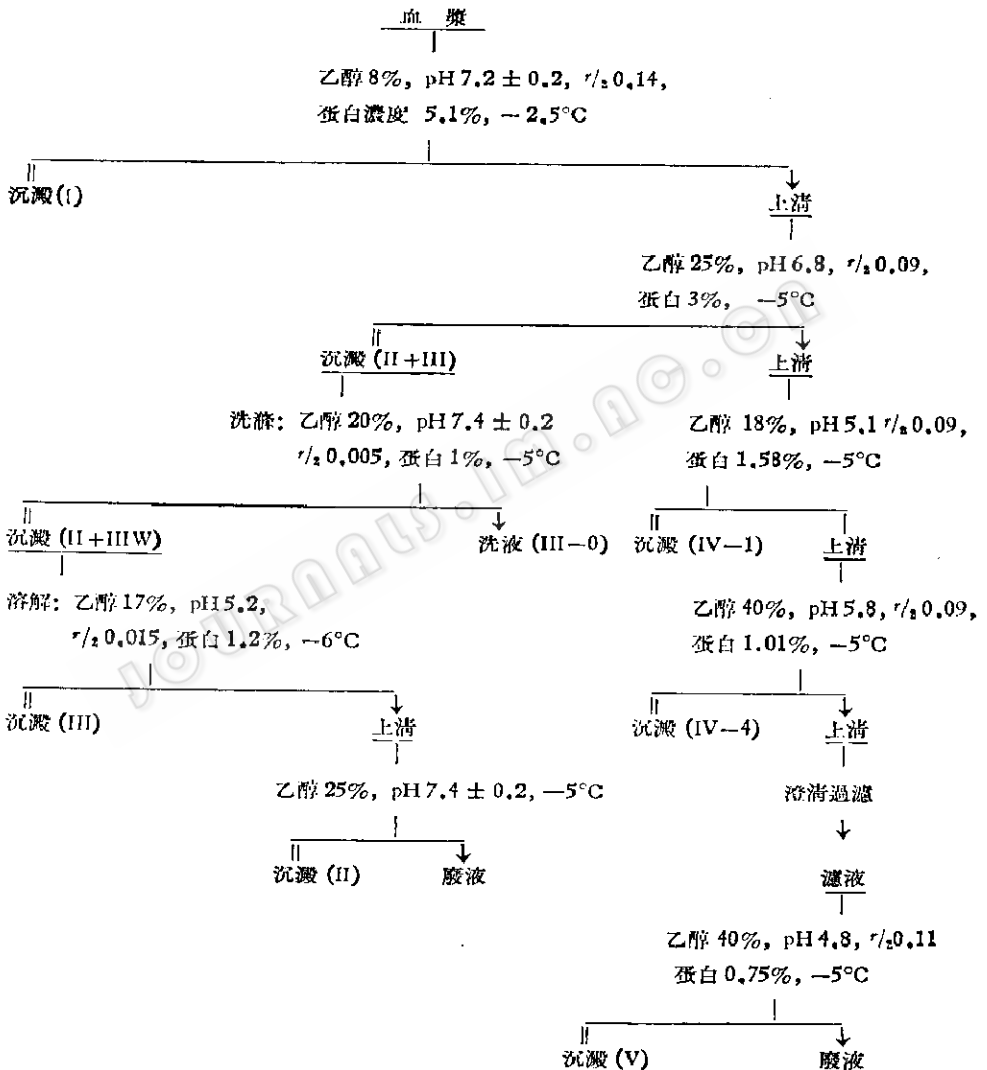
試 驗

試驗採取如下的步驟：先用 Cohn 氏提煉人血漿的方法^[1,20]作試探性的初步試驗，由這些試驗可以得到抗毒素分佈在各個蛋白成份中的大體情況及各個成份之溶解性上的特點；根據初步試驗結果擬出提煉方法逐一加以試驗以選擇適當的提煉條件；用小量試驗所選擇的提煉條件與步驟大量試驗純製抗毒素數批；經過分析檢定比較其結果。

（一）Cohn 氏提煉法為了提煉不同的蛋白成份並達到較高的純度，除了一般的方法外還有許多特別適用於提煉某一個別成份的補充方法，而且所有這些方法都在不斷的改進與發展中，不斷的有新方法來代替舊的。本試驗所採取的是截至

1948 年以前爲止各血漿提煉試驗室所廣泛採用的重要方法^[1,20,21]，提煉程序略如圖解：(圖 2)

圖 2 Cohn 氏提煉法程序圖解



用這個方法提煉白喉抗毒素馬血漿，將提出之各“份”(Fraction)用電泳分析，與提煉人血漿的結果相比較，如表 1 及表 2:

表 1 人血漿各“份”(Fraction)蛋白成份之電泳分析⁽²²⁾

份 別	蛋 白 成 份 (克/公 升 血 漿)					
	A	α	β	ϕ	γ	總 蛋 白
血 漿	33.2	8.4	7.8	4.3	6.6	60.3
I	0.2	0.2	0.8	2.6	0.5	4.3
II+III	0.7	1.8	6.2	1.6	6.0	16.3
IV	1.0	5.4	3.1	...	0.2	9.7
V	29.0	0.6	29.6

A 白蛋白, α 甲種球蛋白, β 乙種球蛋白, ϕ 纖維元, γ 丙種球蛋白, (以下各表均用此符號)

表 2 白喉抗毒素馬血漿各“份”(Fraction)之電泳分析及抗毒素效價

份 別	蛋 白 成 份 (克/公 升 血 漿)							每克含單位數
	A	α	β	ϕ	“T”	γ	總蛋白	
血漿1092	12.1	18.9	19.2	9.3	23.5	19.9	108	7,200
I	0.2	0.4	0.5	6.7	+	—	7.8	—
II	—	—	—	—	0.9	15.0	15.9	17,300
III	—	1.0	3.9	1.7	23.6	3.5	33.7	5,800
IV-1	—	11.8	3.9	—	0.2	—	15.9	2,700
IV-4	—	5.4	11.8	—	3.2	1.0	20.4	11,800
V	10.3	0.2	—	—	—	—	10.5	—
血漿1105	14.8	17.4	14.8	8.2	27.8	15.0	98	4,300
I	0.1	0.2	0.2	7.3	—	—	7.8	—
II	—	—	—	—	1.3	11.6	12.9	12,200
III	—	0.2	2.7	1.6	22.0	2.4	29.1	5,900
IV-1	+	5.6	3.7	—	—	0.1	9.4	1,650
IV-4	0.1	4.6	8.5	—	1.9	—	15.1	8,900
血漿1144	12.6	18.4	19.6	7.9	25.4	17.1	101	5,800
I	0.1	0.3	0.3	5.7	+	+	6.4	未測定
II	—	—	—	—	0.9	13.4	14.3	12,900
III	—	0.5	4.0	2.7	28.1	3.6	38.9	5,400
IV-1	—	7.7	3.9	—	0.4	+	12.0	未測定
IV-4	1.1	3.6	5.1	—	1.8	0.2	11.9	10,900
V	12.6	0.5	+	—	—	—	13.1	未測定

“T” 馬血漿內因免疫而出現之蛋白, + 微量

由試驗結果可以看出：

1. 在人血漿中抗毒素僅存在於丙種球蛋白中^[9]，用 Cohn 氏法提煉，僅第 II+III 份 (Fraction II+III) 含抗毒素；在馬血漿中則抗毒素不僅存在於丙種球蛋白中而且也存在於乙種及因免疫而產生的“T”球蛋白中^[9,10,11]，用 Cohn 氏法提煉，不但第 II+III 份中含抗毒素，第 III, IV-1 及 IV-4 份中也含抗毒素。抗毒素效價以第 II 及 IV-4 份較高，第 III-1 份次之，第 IV-1 份最低。第 II 份之主要成份為丙種球蛋白，III-1 主要為“T”球蛋白，IV-4 主要為乙種球蛋白，IV-1 則除乙種球蛋白外還含有大量的不含抗毒素之甲種球蛋白。

2. 抗毒素馬血漿中有抗體作用之三種球蛋白 (γ , β , “T”) 在每批血漿中之相對濃度不是固定的。表 2 所列之血漿 # 1092, # 1105 及 # 1144 係由同一匹馬在不同的時候採出的。由這三批血漿提出之第 III, IV-1 及 IV-4 份所含成份也較複雜且不穩定，只有第 II 份成份比較單純固定 (90-95% 丙種，餘為“T”球蛋白)。

由此可見用提煉人血漿的程序 (圖 2) 提煉馬血漿雖也可以把蛋白成份分離成與人血漿中類似的“份” (Fraction)，但這個程序不適用於純製抗毒素，其主要缺點是：

1. 第一次沉澱 (I) 主要目的是除去纖維元及一部分不穩定的蛋白成份，但從試驗結果可以看出尚有約三分之一的纖維元遺留於 II+III 中；

2. 將第 IV 份分離為第 IV-1 及 IV-4 份並未能把抗毒素與非抗毒素蛋白分離開來，特別是第 IV-1 份還含有大量的非抗毒素蛋白；

3. 第 III 份仍含有不穩定之蛋白成份 (纖維元及類脂體蛋白)，使血清於放置後發生混濁。

(二) 根據上述試驗結果擬定以下試驗條件：如圖解 (見圖 3)

1. 第一次沉澱 (I) 試行增加乙醇濃度及氫游子濃度及減低 $r/2$ ，以除去更多的纖維元；

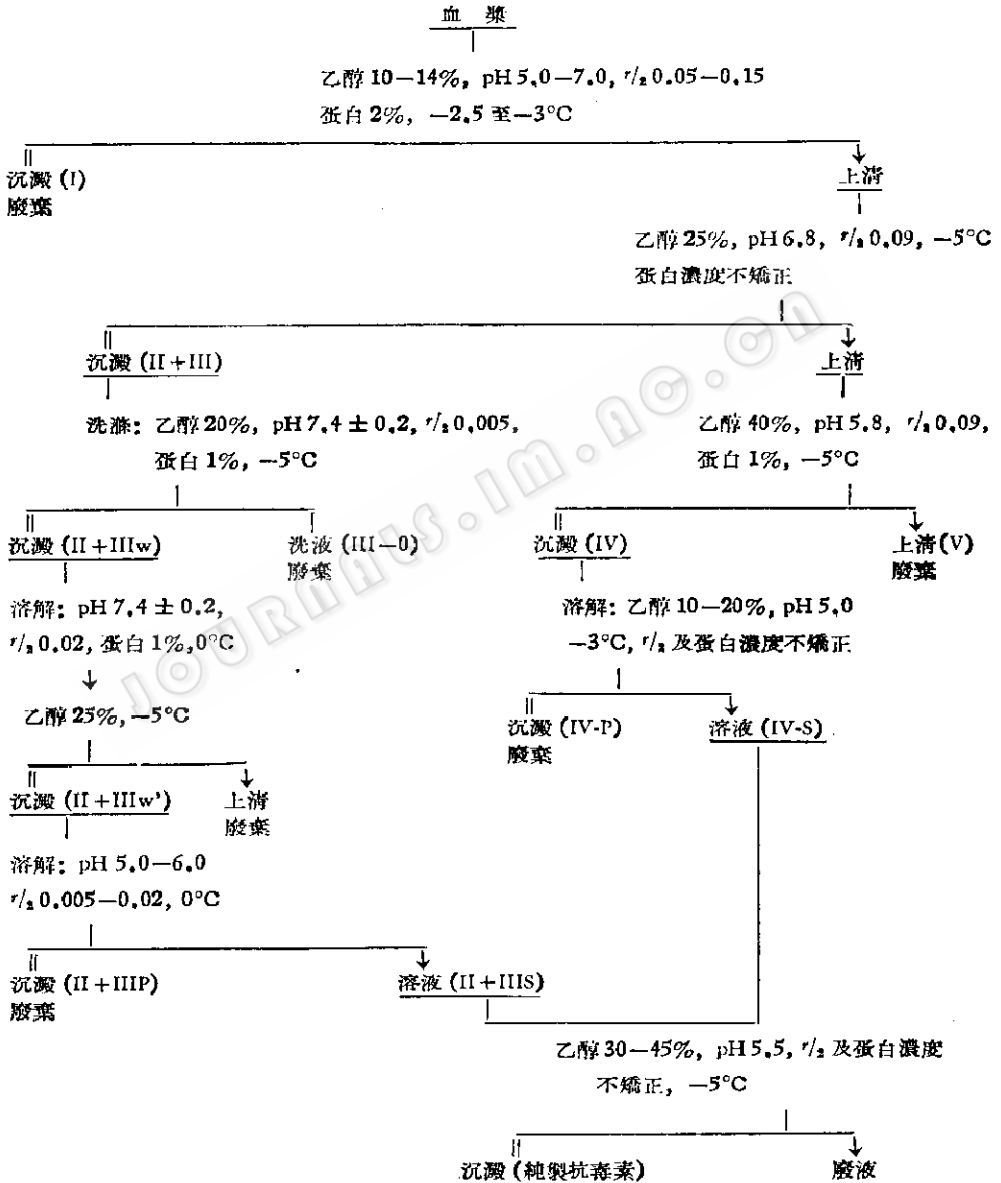
2. 除去 III-0 後將 II+IIIw 直接用沉澱丙種球蛋白的條件 (乙醇 25%，pH 7.4 ± 0.2 , $r/2$ 0.02, 蛋白 1%， -5°C) 盡量使全部球蛋白沉澱，再用 pH 及 $r/2$ 不同之溶液溶解沉澱，使丙種及“T”球蛋白溶於上清液 (II+III-S) 而溶解度較低之甲種及乙種球蛋白仍留於沉澱 (II+III-P) 中；

3. 自 II+III 之上清液中直接用乙醇 40% 沉澱出全部甲種及乙種球蛋白 (IV) 而使白蛋白留在清液中 (V)。再用不同乙醇濃度及 $r/2$ 之溶液溶解乙種球蛋白

(IV-S)，而使甲種球蛋白仍留於沉澱中 (IV-P)；

4. 將 II+III-S 及 IV-S 混合，試用不同的乙醇濃度使其完全沉澱，上清液即不含任何有效成份。

圖 3 白喉抗毒素馬血漿試驗提煉程序圖解



關於各種條件的試驗結果見表 3, 4, 5, 6。

表 3 第一次沉澱 (I) 條件的選擇試驗結果

試驗條件: -3°C , 蛋白 1.5—2%, 乙醇濃度, pH 及 $r/2$ 變化。

試驗號	條 件			沉澱 (I) 中 含抗毒素%	上清液所含蛋白成份之電泳分析(克/公升血漿)						
	乙醇%	pH	$r/2$		A	α	β	ϕ	"T"	γ	總蛋白
64	10	5.0	0.05	5	13.5	15.6	13.1	1.1	26.3	17.3	86.9
79	10	5.5	0.05	2
65	10	6.0	0.05	0
66	10	7.0	0.05	0	14.2	17.2	14.9	1.4	26.6	17.1	91.4
67	12	5.0	0.05	9	13.9	15.1	12.2	0.2	26.0	16.8	84.2
68	12	5.0	0.10	11	13.5	14.0	11.3	0.3	26.5	16.9	82.5
80	12	5.5	0.10	8	13.5	15.5	12.3	0.9	25.2	17.3	85.7
69	12	6.0	0.10	12
70	12	7.0	0.10	13
71	14	5.0	0.10	62
72	14	6.0	0.10	29
73	14	7.0	0.10	21
74	14	7.0	0.15	23

註: A=白蛋白, α =甲種球蛋白, β =乙種球蛋白, ϕ =纖維元 "T"="T"球蛋白, γ =丙種球蛋白。

下面劃綫之試驗條件為被採用之條件

表 4 自沉澱 II+IIIw 中提取 "T" 蛋白之條件的選擇試驗結果

試驗條件: 蛋白濃度不矯正 (稀釋至原血漿量的 2 倍), 0°C , 不加乙醇, pH 及 $r/2$ 變化。

試驗號	條 件		溶液(II+III) 中抗毒素回收 率%	溶液的電泳分析(克/公升血漿)						
	pH	$r/2$		A	α	β	ϕ	"T"	γ	總蛋白
84	5.0	0.005	86	—	+	0.8	—	21.5	13.7	35.0
85	5.0	0.01	88	—	+	1.1	+	21.9	14.1	37.1
86	5.0	0.02	90	—	0.2	1.1	+	23.5	13.9	38.7
87	5.5	0.005	94	—	0.2	1.0	—	22.3	13.6	37.1
88	5.5	0.01	94
89	5.5	0.02	93
90	6.0	0.005	94	—	0.3	2.1	—	22.7	13.5	38.6
91	6.0	0.01	90
93	6.0	0.02	92

註: 下面劃綫之試驗條件為被採用之條件

表 5 自沉澱 (IV) 中提取乙種球蛋白之條件的選擇試驗結果

試驗條件：pH 5.0, -3°C , 蛋白濃度不矯正 (稀釋至原血漿量的 2 倍), 乙醇濃度及 $\frac{1}{2}$ 變化。

試驗號	條 件		溶液 (IV-S) 中 抗毒素回收率 %	溶液 (III-S) 之電泳分析 (克/公升血漿)						
	乙 醇 %	$\frac{1}{2}$		A	α	β	ϕ	"T"	γ	總蛋白
94	10	<u>0.0025</u>	84	0.9	0.3	10.5	—	0.8	+	12.5
95	10	<u>0.005</u>	84	0.8	0.5	9.9	—	1.1	+	13.3
96	10	0.010	90	0.9	5.4	10.3	—	1.2	+	17.8
97	15	0.0025	71
98	15	0.005	74
99	15	0.010	80
100	20	0.005	59
101	20	0.010	61

註：下面劃綫之試驗條件為被採用之條件。

表 6 自 II + III-S 及 IV-S 中沉澱全部蛋白之條件的選擇試驗結果

試驗條件： $\frac{1}{2}$ 及蛋白濃度不矯正, -5°C , pH 5.5 乙醇濃度變化。

試 驗 號	乙 醇 濃 度 %	抗 毒 素 在 沉 澱 中 之 回 收 率 %
102	30	70
103	35	81
<u>104</u>	<u>40</u>	100
105	45	100

註：下面劃綫之試驗條件為被採用之條件。

由試驗結果可以得出以下結論：

1. 由表 3 得知乙醇 12%, pH 5.0, $\frac{1}{2}$ 0.10, 蛋白 2%, -3°C 能使纖維元沉澱而抗毒素蛋白損失不大;

2. 由表 4 可見 pH 5.0, $\frac{1}{2}$ 0.01 可使丙種球蛋白及 "T" 球蛋白溶解, 溶液中僅含少量之甲種及乙種球蛋白, $\frac{1}{2}$ 0.005 以下雖似更有效但容量過大處理困難, 似仍以採用 $\frac{1}{2}$ 0.01 為宜;

3. 由表 5 可見乙醇 10%，pH 5.0， $\frac{1}{2}$ 0.0025—0.005， $-2.5-3^{\circ}\text{C}$ 可使乙種球蛋白及少量之甲種球蛋白溶解，大部分甲種球蛋白仍留於沉澱中；

4. 由表 6 可見乙醇 40%，pH 5.5 可使溶液中之全部蛋白沉澱。廢液中僅含微量之蛋白。

(三) 用上述方法試行較大量的提煉(見上文“大量試驗操作方法”) 試製白喉抗毒素三批，# 1092，# 1105 及 # 1144，每批為 15 公升，結果如下表：(表 7)

表 7 大量試驗純製三批白喉抗毒素之結果

批 號	原血漿效價 (單位/克蛋白)	純製後效價 (單位/克蛋白)	純製回收率%
# 1092	7,200	15,300	83
# 1105	4,300	11,200	76
# 1144	5,800	11,900	80

(四) 試製的三批純製白喉抗毒素檢定結果如下：

1. 單位檢定及動物體內試驗與試管試驗之比值如表 8：

表 8 純製白喉抗毒素效價檢定結果

批 號	效 價 (單 位 / 克 蛋 白)		動 物 體 內 / 試 管 內 之 比 例
	家 兔 皮 內 法 結 果	絮 狀 反 應 結 果	
1092	15,300	16,700	.916
1105	11,200	12,600	.892
1144	11,900	14,000	.848

2. 試製的三批抗毒素測定熱原質及過敏性反應與普通血清、胃酶消化白喉抗毒素及硫酸銨濃製抗毒素相比較，結果如表 9：

表 9 乙醇低溫法純製白喉抗毒素之熱原質及過敏性反應試驗結果

血清批號	熱原質試驗, 注射後體溫增高 (°C)				過敏性反應試驗結果		
	1 小時	2 小時	3 小時	平均	24小時	48小時	72小時
# 1092	0.5	0.7	0.6	0.6	++	+++	+++
# 1105	0.8	1.0	0.9	0.9	+++	+++	+++
# 1144	0.5	0.8	0.5	0.6	++	+++	+++
# RAG8 胃液消化前	+++	+++	+++
# RAG8 胃液消化後	○	○	○
ASC 1	0.8	1.1	1.0	1.0
ASC 2	0.8	0.9	0.7	0.8
ASC 3	0.9	1.0	1.1	1.0
健馬血清	+++	+++	+++

註：過敏反應試驗係由 A.Glaubiger 氏之試驗室代作，本表係根據其所給報告結果；

+ 紅， ++ 紅腫， +++ 紅腫變死， ○ 無反應；

RAG：硫酸鉍鹽析法濃製抗毒素；

ASC：硫酸鉍鹽析法濃製抗毒素。

討 論

(一) 一般試驗室純製抗毒素都是以鹽析法 (Salting-out) 為主，輔以透析 (Dialysis) 及等電沉澱 (Isoelectric Precipitation)，有的還利用吸著作用 (Adsorption) 超過濾 (Ultrafiltration) 等方法。所有這些方法基本上都是利用各種血漿蛋白的物理性質，特別是溶解性的不同而把它們分開。

影響蛋白的溶解性的因素主要的有鹽類濃度、pH、蛋白濃度、溫度等。有的蛋白可以利用其等電點使其自水溶液中分離出來，在這種情況下鹽的濃度影響最大， $\frac{1}{2}$ 愈低等電點愈分明愈易分離。反之如鹽的濃度較大則蛋白的溶解度最低之點常常遠距等電點而不易掌握。其次，溶液中如同時有幾個等電點不同的蛋白存在，則它們也會互相影響；兩個等電點相近的蛋白在水溶液中可以形成混合體共同沉澱出來，而這混合體溶解度最低之 pH 是在兩個蛋白單獨存在時的兩個等電點之間。此外還有一些其他因素如非電解質濃度等也有影響。所以各種外在

因素是相當複雜的。在分離各種蛋白時須造成不同的條件使某種蛋白之溶解度最高而另種之溶解度最低。換句話說就是利用各種可以隨意調節的因素。蛋白混合物的成份愈複雜所需利用之因素也愈多，才能達到有效的分離。

可以判斷，一個複雜的混合物如馬血漿，要把它的各種蛋白成份很好的分開，將不是用很簡單的方法所能做到的。必須充分利用一切可以利用的因素。但在鹽析法中由於使用了很高的鹽濃度，使得其他因素如 pH，蛋白濃度、溫度等的作用大為減低甚至不能被利用。同時鹽析法的主要目的是把假性球蛋白與優性球蛋白、白蛋白、纖維素等分開以得到較純的抗毒素蛋白。但實際上抗毒素不但存在於假性球蛋白中，同時也存在於優性球蛋白中^[11,23,24]，而且所謂假性及優性球蛋白在溶解性上是並不能劃然分開的。由此可見鹽析法用於純製抗毒素在理論上是有很大的限制的。在實際工作中用鹽析法純製抗毒素也有許多重要問題不能解決，如製造過程長，純度與回收率不易掌握，在操作時不能保持無菌，特別在透析時易於產生熱原質。

使用醇低溫法則 pH, $\frac{1}{2}$, 蛋白濃度、溫度及醇濃度均可自由控制，故可以造成無數的不同條件用來適合不同的目的。因此醇低溫法無論在方法上或在理論上都提供了遠較鹽析為優的條件，使我們有可能利用來解決鹽析法所未解決的問題。

(二) 由 V. d. Scheer, Wyckoff, Kekwick 及 Record 等氏之電泳分析, Smith 及 Gerlough 氏之研究及本文的試驗結果均可清楚看出抗毒素在馬血漿蛋白中的分佈遠較在人血漿中為複雜。在馬血漿中抗毒素不但存在於丙種球蛋白中而且還存在於乙種及“T”球蛋白中；用 Cohn 氏提煉法不能從某一個單獨的成份 (Fraction) 內得出全部的抗毒素蛋白，試驗證明除第 II 份外第 III 及第 IV 份均含抗毒素。此外馬血漿中有抗毒素作用的丙種，“T”及乙種球蛋白之相對濃度是不固定的，它們之間的比例因馬的免疫狀態不同而異，因此使得情況更形複雜。提煉抗毒素的方法須能適應這些複雜情況才能是完全適用的方法。作者所用的方法仍不能認為滿意，提煉步驟仍嫌複雜，提煉出的製品純度仍不夠高，還應繼續改善。

在人血漿提煉上自 1947—1948 以來已經又有了新的發展^[25]：由於用分層抽取法 (Fractional extraction) 代替分層沉澱法 (Fractional Precipitation) 已使所需處理的容量大為減少但仍可保持很低的 $\frac{1}{2}$ ；利用二價陽離子 (如 Ca^{++} , Ba^{++}) 與蛋白之間的比較特異的作用能更進一步的控制所形成之蛋白鹽的溶解性，因而使

得所需的乙醇濃度及氫游子濃度大為降低；用新的方法 (Method 10)^[25] 只須用一個步驟 (乙醇 19%，pH 5.8, $\frac{1}{2}$ 0.042, 蛋白 1.2%， -5°C) 即將白蛋白與其他蛋白分開，所有球蛋白均在初次沉澱中，上清液為 97% 以上的白蛋白。以後再由初次沉澱中用分層抽取法提煉出各種蛋白成份。這個方法的原則同樣也應當可以用於提煉抗毒素馬血漿。作者曾進行了一些試驗，初步結果證明用同樣條件也可以將馬血漿中的球蛋白幾乎全部沉澱於初次沉澱中，再用分層抽取法可將纖維元及類脂蛋白洗出，而使抗毒素蛋白逐漸純化。所以只要繼續研究醇低溫法是可以不斷改善，而能適用於各種場合的。

(三) 抗毒素在馬血漿中至少分佈於三種球蛋白中 (γ , β , "T")。據 Kekwick 等氏^[11,26] 的研究，這三種蛋白在作用上是有區別的，丙種球蛋白之親合力 (Arvidity) 較高，乙種較低，在治療或預防上效果是否亦有差別也還是個問題。

用乙醇低溫法提煉抗毒素馬血漿可將這三種有抗毒素作用的蛋白分別提煉出來可得到相當的純度。這就給我們提供了可能，對這三種蛋白作比較系統化的研究 (特別是在血清的效力方面)，而為了保證血清在臨床應用上充分發揮作用，這種研究又是非常必要的。

總 結

(一) 本文描述用乙醇低溫法純製白喉抗毒素的方法及試驗經過。

(二) 根據試製三批之結果，用乙醇低溫法純製白喉抗毒素純度可增加 2—2.6 倍，回收率為 76—83%。熱原質似較用硫酸銨鹽析法所製者為低，過敏性反應未見減弱，但須作更多的比較方能肯定。

(三) 用乙醇低溫法按本試驗所採之提煉程序純製抗毒素其結果雖與一般用硫酸銨鹽析法所得者無大差別，但乙醇低溫法可以改善之可能性遠較一般鹽析法為大，而且可以將三種雖皆含抗體但物理性質不同之球蛋白單獨分開。

關於乙醇低溫法之優點，其在純製抗毒素上之應用以及可能的發展，本文曾就理論方面加以討論。

參 考 文 獻

- [1] Cohn, E. J., Strong, L. E., Hughes, Jr., W. L., Mulford, D. J., Ashworth, I. N., McLin, M., Taylor, H. L., 1946, *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 459.

- [2] Cohn, E. J., *Science*, 1945, **101**, 51.
- [3] Mulford, D. J., *Ann. Rev. Physiol.*, 1947, **9** 327.
- [4] Cohn, E. J., *Experientia*, 1947, **3**, 125.
- [5] Pillemer, L., *J. Immunol.*, 1946, **53**, 237.
- [6] Pillemer, L., *Science*, 1947, **105**, 102.
- [7] Smith, E. L. and Gerlough, T. D., *J. Biol. Chem.*, 1947, **167**, 679.
- [8] Enders, J. F., *I. Clin. Invest.*, 1944, **23**, 510.
- [9] v. d. Scheer, J., and Wyckoff, K. W. G., *Science*, 1940, **91**, 485.
- [10] v. d. Scheer, J., *J. Immunol.*, 1940, **39**, 65.
- [11] Kekwick, R. A. and Record, B. R., *Brit. J. Exp. Path.*, 1941, **22**, 29.
- [12] Mellanby, J., *Proc. Roy. Soc. Lond., S.B.*, 1908, **80**, 399.
- [13] Hardy, W. B. and Gardiner, S., *J. Physiol.*, 1910, **40**, 98.
- [14] Hartley, P., *Brit. J. Exp. Path.*, 1925, **6**, 180.
- [15] Boyd, W. C., *J. Am. Chem. Soc.*, 1945, **67**, 1035.
- [16] Longworth, L. G., *Chem. Rev.*, 1942, **30**, 323.
- [17] Armstrong, Jr., S. H., Budka, M. J. E., and Morrison, K. C., *J. Am. Chem. Soc.*, 1947, **69**, 416.
- [18] Minimum Requirements: Diphtheria antitoxin, 2nd Revision, 1946, *National Institute of Health, U.S.A.*
- [19] Glaubiger, A., 個人提供資料, 部分發表於 *J. Clin. Med.*, 1948, **33**, 757.
- [20] Oncey, J. L. 個人提供資料, Oncey, J. L., Melin, M., Richert, D. A., Cameron, J. W. and Gross, Jr., M. P., *J. Am. Chem. Soc.*, 1949, **71**, 541.
- [21] Deutsch, H. F., Gosting, L. J., Alberty, R. A., and Williams, J. W., *J. Biol. Chem.*, 1946, **164**, 109.
- [22] Cohn, E. J., *American Scientist*, 1945, **33**, 61.
- [23] Cohn, E. J., *Chem. Rev.*, 1941, **28**, 395.
- [24] McCoord, A. B., *Biological Abstract*, 1946, **20**, 2155. (原文見 *Biochem. Zeitschr.*, 311(1/3), 188, 1942).
- [25] Cohn, E. J., Guard, F. R. N., Gillespie, J. M., Mittleman, D., Derouaux, G., Mouton, R. F., Liu, C. H., Uroma, E., Lever, W. F., Kahnt, F. W., Barnes, B. A., Brown, R. K., Schmid, K. and Surneror, D. M., 1950, *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 465.
- [26] Kekwick, R. A., Knight, McFarland and Record, B. R., *Lancet*, 1941, **1**, 571.

THE APPLICATION OF COHN'S ETHANOL-WATER SYSTEM TO PURIFICATION OF EQUINE ANTITOXIC SERUM

LIU, C. H.

National Vaccine and Serum Institute, Peking

1. The system introduced by Cohn and co-workers for the separation of the components of human plasma in ethanol-water mixture at low temperature has been applied in purification of equine diphtheria antitoxin.

It has been shown that antitoxic activities were present not only in Fraction II but also in Fraction III, IV-1 and IV-4. The main components in these fractions are gamma, "T" and beta globulins respectively. These findings coincided well with the electrophoretic studies of horse antitoxic plasma by Kekwick and Record, and von der Scheer and Wyckoff.

2. A provisional procedure for fractionation of antitoxic horse plasma has been devised which promised a 2 to 2.6 fold purification and 76-83% yield.

As compared with antitoxin concentrated by salting out with ammonium sulphate, the antitoxin prepared by the present method seemed less pyrogenic, but the allergic properties have not been reduced.

3. The advantages of the ethanol method and its possible application in the purification of antitoxin have been discussed.