

利用冰凍乾燥方法製造乾血漿

王克勤 楊進生 梁文熙 陳鴻書 華復一 劉關智
蔣滋慧 程伊洪 范啓修 林國鎬 楊叔雅*

冰凍乾燥是一種使物質在冰凍狀態下經過高真空昇華除去水分（或其他蒸氣壓力較高的物質），以獲得乾燥的方法。這種方法目前已成爲乾燥和保存若干不穩定物質——特別是蛋白質——的良好方法。

用冰凍乾燥的方法來乾燥蛋白質和生物製品，是1909年Shackell⁽¹⁾創始的。但當時由於種種條件的限制，這法直到1931年後，始獲得發展。Craigie⁽²⁾，Elser，Thomas 同 Steffen⁽³⁾，Flosdorf 同 Mudd⁽⁴⁻⁷⁾，Greaves 同 Adair⁽⁸⁻¹¹⁾ 以及 Strumia 同 McGraw⁽¹²⁾ 等，在冰凍乾燥的技術上都相繼作了一定的貢獻，但由於儀器設備的限制，冰凍乾燥的方法只局限在實驗室內，使用在小量乾燥菌種、病毒、抗體、補體、蛋白質等處理工作上。到了第二次大戰，由於乾燥血漿和青黴素的需要，Flosdorf⁽¹³⁾ 和 Greaves^(14,15) 等分別發展了冰凍乾燥機的儀器，用冷氣機冷却冷凝器，使冰凍乾燥不但在實驗室中爲乾燥某些不穩定物質所必需，而且成爲生物製品技術中不可缺少的設備。目前冰凍乾燥的用途日益廣泛，已經是一個成熟的技術方法了。

液體血漿在輸血和治療休克中，有它特殊的價值，但它也是一種蛋白質的溶液，易染污、易變性，其中纖維蛋白元易沉澱，必須在一定溫度中保存，不便於運輸，利用

冰凍乾燥將血漿製成乾血漿後，才能長期保存。乾血漿的使用，在蘇聯和資本主義國家都有着愈來愈廣的範圍。不管在戰時，或在平時，供給遼遠邊區和沒有條件設立血庫的醫療機構，使用乾血漿，都有着重大的意義。用冰凍乾燥的技術製備乾血漿，雖然在蘇聯和資本主義國家早已成熟，一般的醫療機構都能用着乾血漿的製品，但是在我國，冰凍乾燥的機器還不能自製，乾血漿的製備也無人研究。因此，在1951年底，一方面由於抗美援朝的需要，一方面由於資本主義國家對我國進行禁運，作者用冰凍乾燥的方法進行了乾血漿的製造，爲滿足平時和戰時的輸血需要打下了基礎。

工作開始時，作者爲了要熟悉高真空技術操作，製造了玻璃冰凍乾燥器，並憑藉着這儀器，觀察了冰凍乾燥的基本現象。

接着，作者設計了小型冰凍乾燥機和旋凍機，並利用這機器，小規模地製備了動物和人的乾血漿，並用所製乾燥血漿對動物和人進行了同種靜脈內注射。小量的製備在1953年底基本完成。

作者不久前，又利用進口的較大型的冰凍乾燥機和旋凍機，中等規模地製備了乾血漿，並對所製的乾血漿分別作了幾種理化試驗和臨床注射。

這篇報告將重點地介紹冰凍乾燥的經驗，並討論小量和中量製備乾血漿的方法。

實驗材料

清洗消毒

無致熱原蒸餾水 新鮮製出。

玻璃類器材 先用重鉻酸鉀和濃硫酸所製清潔液泡浸過夜，然後用自來水、無致熱原蒸餾水相繼沖洗。

金屬類器材 混漿針、抽血針頭、注射針頭、不銹鋼濾網等用無致熱原蒸餾水煮沸，換水3次，每次煮沸半小時。

抗凝劑 化學純檸檬酸鈉用無致熱原蒸餾水溶解成0.1%溶液。

過濾 用 Seitz-EK 濾板。

消毒 用蒸氣消毒鍋。

致熱原試驗 家兔體重1.5公斤，實驗前一週分籠飼養在實驗室內。實驗前3日，每晨飼食前用肛表測體溫；體溫小於38.9°C，或大於39.8°C的家兔，都摒棄不用。

抽 血

血源 上海市市立醫學化驗所統一檢驗供應合格的獻血者，要求在清晨抽血前禁食。

抽血瓶 小量製備用250毫升離心瓶；中量製備用400毫升離心瓶。都用密合的反口橡皮塞蓋着。

離心全血

小量製備 用 International No. 2 離心機4頭，每頭250毫升，速度2,000轉/分。

中量製備 用 Martin Christ 離心機4頭，每頭400毫升，速度2,500—2,700轉/分。

混合血漿、分裝血漿

用自製混合血漿分裝血漿裝置進行

(如圖1)。小量製備在普通實驗室中操作；中量製備在無菌操作室中操作。操作室使用前，用紫外光燈照射1小時，同時用3%石炭酸噴霧消毒。

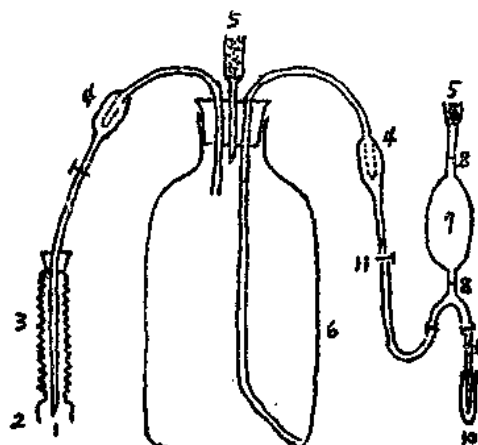


圖1. 混合血漿分裝血漿裝置示意圖

1. 混漿針 2. 護針罩 3. 護針橡皮塞 4. 不銹鋼濾血網 5. 空氣濾過管(內塞棉花,也可供抽氣用) 6. 混合血漿分裝血漿瓶 7. 定量分漿器 8. 定量分漿器上下刻度 9. 分漿針頭 10. 護針管 11. 夾子

血漿細菌培養

用肉湯和庖肉(嫩肉)基細菌培養。

預冷血漿

中量製備時，利用70%酒精液槽、冷氣機和恆溫繼電器維持在 $1^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。

預凍血漿

小量製備時，根據下列二原則、設計裝置：

(1) 根據 Flosdorf⁽⁴⁾ 原則設計，自製臥式手搖旋凍器——這器即一絕緣箱，內置酒精乾冰液，使溫度低於 -45°C ，每次可旋凍400毫升血漿一瓶；

(2) 根據 Greaves⁽¹⁰⁾ 原則設計，自製立式離心旋凍機——溫度 -18°C ，離心速度

980 轉/分，每次可旋凍 400 毫升血漿 4 瓶。

中量製備時，使用 Leybold 廠出品的臥式旋凍機。酒精浴用 F-22 壓縮機冷卻到 -45°C — -50°C 。每次可旋凍 400 毫升血漿 5 瓶。

冰凍乾燥

小量製備 用自製冰凍乾燥機，每次可乾燥血漿 8 瓶（每瓶 400 毫升）；Cenco Megavac 式油幫浦，排氣量 56 升/分。用國內自製麥氏真空表（旋轉式）測量真空度。並用 F-12 壓縮機二台：一台冷卻乾燥箱；另一台冷卻冷凝器（最大冷凝容積約 10 升）。用冷凝器和五氧化二磷共同去水。用直接加熱法，加熱筒共 8 個；每一加熱筒，可容一瓶血漿。筒是鐵皮焊成的；內繞以雲母片和電熱絲（No. 36 S. W. G. Chromel）。它的功能，在 110 伏特時，為 8.6 瓦。加熱量用可變變壓器調節。用銅-鎳熱電偶，一極插在血漿瓶冰凍血漿內，一極維持在 100°C （水蒸氣浴）恆溫，並用 0-5 微伏特表測量冰凍血漿的溫度。用水銀接觸器和電子繼電器直接控制乾燥箱溫度（也就是間接地控制了加熱器的溫度）。

中量製備 用德國 Leybold 廠 G-04 型冰凍乾燥機，每次可乾燥血漿 40—50 瓶（每瓶 400 毫升）；油幫浦 D-10 型，排氣量 10 立方米/小時；油幫散 OT 400 型，排氣量 400 升/秒。用比蘭尼氏真空表測量真空度。並用雙步（高、低壓）F-22 冷氣壓縮機（1）冷卻 49 容積% Glysantin（或 50 容積% 乙二醇），而使已冷卻的液體循環乾燥箱的夾壁內；（2）冷卻冷凝器（最大冷凝容積 20 升）。採用間接加熱法；即用電熱裝置插入上述 Glysantin（或乙二醇）液內加熱。有接觸恆溫器，控制該液的溫度在一定範圍；並加防止過熱的安全裝置。

血漿理化試驗

用下列二項試驗測定乾燥後血漿的實驗數值：

（1）水分測定 用油幫浦、玻璃真空乾燥器，工業用五氧化二磷作吸水劑。

（2）溶解速度 用 0.1% 檸檬酸為稀釋液。並用普通停錶。

用下列幾項試驗，分別測定乾燥前血漿和乾燥後重溶解血漿（稀釋液 400 毫升 0.1% 檸檬酸）的實驗數值：

（1）氫離子指數 用 Cambridge 氫離子指數計。

（2）黏度 用 Ostwald 氏黏度測定計。

（3）滲透壓力 用 Adair 氏滲透壓力測定器。

（4）紙上電泳 使用自製玻璃平板式紙上電泳儀、巴比妥緩衝液、華脫門 I 號濾紙、溴酚藍染料、氯化高汞、醋酸溶液、Lumetron 電光比色計、光密度計等儀器進行。

（5）凝血酶元時間 用凝血酶活素、0.025M 氯化鈣溶液、 37°C 的水浴缸、停錶。

（6）補體滴定價 用新鮮混合豚鼠血清、綿羊紅血球（保存在 Alsever 溶液中），溶血素效價在 2,000 倍以上。

（7）蛋白質總量測定

小量製備 用凱氏微量定氮儀。

中量製備 用雙縮脲比色法。

動物乾血漿的動物試驗

狗、家兔。

人乾血漿的臨床試驗

小量製備：

本實驗室和本院志願者 11 人次、上海

第一醫學院外科醫院病員 7 人次(前脈內注射)、上海第一醫學院兒科醫院病兒 7 人次(肌內注射)。

實驗方法

清洗消毒

在 4 小時內、結束各種同血漿接觸的器材的無致熱原蒸餾水沖洗。抗凝劑 4% 檸檬酸鈉經 Seitz-EK 濾板二層加壓濾過,分裝在離心瓶內(小量製備:離心瓶 250 毫升,裝抗凝劑 25 毫升。中量製備:離心瓶 400 毫升,裝抗凝劑 40 毫升)。稀釋液 0.1% 檸檬酸也經濾過處理,每 400 毫升分裝在血漿瓶內。所有器材都經用蒸氣消毒 15 磅 30 分鐘。為致熱原試驗用的(1)4% 檸檬酸鈉須先經無致熱原蒸餾水稀釋 10 倍;(2)0.4% 檸檬酸鈉和 0.1% 檸檬酸都須在消毒前接觸所有在操作時將同血漿接觸的器材一套。

致熱原試驗¹⁶⁾ 選體溫在 38.9°C — 39.8°C 間的家兔 3 隻,實驗日清晨和實驗期間禁食,各按體重每公斤注射 10 毫升 0.4% 的檸檬酸鈉(或 0.1% 檸檬酸)。注射前、注射後 1 小時、2 小時、3 小時,分別用肛表測家兔體溫。注射後 3 小時內、任何一小時體溫較注射前的體溫在一兔升高 0.6°C ,或三兔共升高 1.4°C 時,則試驗為陽性;否則為陰性。我們選擇致熱原試驗為陰性的器材、抗凝劑和稀釋液為製備乾血漿過程使用。

抽 血

用封閉式重力法抽血。小量製備:250 毫升離心瓶內置 25 毫升 4% 檸檬酸鈉抽血到 250 毫升。中量製備:400 毫升離心瓶內置 40 毫升 4% 檸檬酸鈉,抽血到 400 毫升。在抽血過程中,間歇地輕輕搖離心

(2) 中量製備

上海急症外科醫院病員 20 人次(靜脈內注射)。

瓶。抽血完成後,使離心瓶在血庫冰箱中稍置片刻。

離心全血

把上述置有全血的離心瓶在 2,500—2,700 轉/分離心,歷 50—60 分鐘,以獲得清晰的血球血漿層。離心後,使離心瓶在血庫冰箱內靜置過夜。

混合血漿

在無菌操作室內,從多瓶已離心的全血把血漿吸取到混合血漿分裝血漿的裝置中,並將它們混合。小量製備時,每一裝置中,混合 9—10 人血的血漿,約合 2,000 毫升(血型的分配為 AB 型 3—4 人, A 型 2 人, B 型 2 人, O 型 2 人)。中量製備時,每一裝置中混合 13—14 人血的血漿,約合 2,900—3,000 毫升(血型的分配不定, AB 型 2—7 人, A 型 1—6 人, B 型 2—6 人, O 型 0—3 人)。

分裝血漿

從上述裝置中把血漿注入預先抽空的血漿瓶內。每瓶注入血漿 400 毫升,每一裝置中的血漿足夠分裝 7 瓶。裝置中剩餘血漿分裝小瓶,留供作理化試驗和細菌檢驗時使用。

血漿細菌檢查

以無菌操作技術,用注射器從各瓶抽出 10 毫升血漿,注入消毒小瓶中,在室溫中攪置 2 日後、用消毒注射器抽出血漿少許,注入二組培養基中(每組包括瓊脂斜

面、肉湯和庖肉基管各一；每一培養基中、注射 1—2 毫升血漿)。一組置在室溫中；另一組置在 37°C 的培養箱中培養 7 日，每日觀察。如有細菌生長的可疑情況，即作塗片染色鏡檢。經 7 日培養，如無細菌生長，即認為細菌培養陰性。

預冷血漿

中量製備時，血漿瓶置血庫冰箱中 4 小時後，置在冷氣恆溫器的酒精浴 ($1^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$) 中約半小時，可使血漿預冷到 1°C 左右。血漿預冷後，應即在最短期間內預凍(預冷時間過長，血漿中纖維蛋白元有變性沉澱的危險)。預冷到 1°C 左右的血漿，在預凍時，才能達到超冷的程度，超冷後的血漿才能驟凍，驟凍的血漿結晶最為細緻、均勻和潔白。

預凍血漿

小量製備

臥式旋凍 使已經預冷的血漿一瓶平置在自製手搖臥式旋凍器的乾冰酒精浴(溫度低於 -45°C) 上緩慢旋轉(每分鐘 20—30 轉)約 30 分鐘，血漿就可在血漿瓶內壁驟凍成殼狀。

立式旋凍 預先把立式離心旋凍機冷到 $-18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，裝入 4 瓶已預冷到 1°C 左右的血漿，開動馬達，則血漿瓶以 980 轉/分的速度直立旋轉，約 2 小時，血漿就可在血漿瓶內壁驟凍成殼狀。

中量製備

臥式旋凍 使已經預冷的血漿五瓶分別橫臥在藉機械傳動的臥式旋凍機的酒精浴(溫度 $-45^{\circ}\text{C} \rightarrow -50^{\circ}\text{C}$) 滾筒上緩緩旋轉(每分鐘 27 轉)約 20—25 分鐘，血漿就可在血漿瓶內壁驟凍成殼狀。

以上操作(自抽血到預凍血漿)在 72 小時

內完成。

預凍後的血漿，儲藏在低溫冰箱 ($< -30^{\circ}\text{C}$) 中，等待冰凍乾燥。

冰凍乾燥前的準備工作

用無菌操作技術拔除冰凍血漿瓶的反口橡皮塞。各瓶口都蒙以 900 孔/時² 的消毒紗布二層。

冰凍乾燥

小量製備 利用自製冰凍乾燥機，預先使乾燥箱和加熱器冷卻到 $-10^{\circ}\text{C} \rightarrow -20^{\circ}\text{C}$ ，冷凝器冷卻到 $-40^{\circ}\text{C} \rightarrow -45^{\circ}\text{C}$ ，在加熱器的 8 個加熱筒裏各裝一瓶已蒙上消毒紗布的冰凍血漿(8 瓶冰凍血漿中有一瓶是置有熱電偶的)。關閉乾燥箱門後，立即開動油幫浦。乾燥系統的真空度(用旋轉式麥氏真空表測量)在開始後半小時內，就可達到 1 毫米水銀柱以下；當真空度達 100μ 左右時，就停止冷卻乾燥箱的冷氣機，並開始加熱。當其他因素不變時(瓶口頸的大小、乾燥面到冷凝面的距離、活塞和連接管的口徑和瓶口有無紗布的蒙蔽等)，加熱的速度同乾燥系統的嚴密度有關。一般從 30 伏特慢慢昇到 110 伏特，使乾燥箱的溫度達 20°C 至 25°C ，加熱筒的溫度達 55°C 到 60°C 。冰凍血漿在置入乾燥箱時，它的溫度略上昇；但當乾燥系統的真空度達 100μ 左右時，血漿溫度逐漸下降。如乾燥系統嚴密，雖加熱，而血漿溫度也無顯著增高(維持冰凍血漿的溫度在 -20°C 左右)。直到冰凍血漿大部份乾燥時，它的溫度才迅速上昇，最終溫度達 55°C 到 60°C 。因此，當熱電偶指示溫度直線上昇時，就表示冰凍血漿已接近乾燥。這時調節可變變壓器控制加熱筒的溫度在 55°C 左右，再進行 12 小時的乾燥，把其中的剩餘水分除去，就可結束乾燥過程。整個乾燥過程約

歷4晝夜。

中量製備 利用Leybold廠冰凍乾燥機，預先把乾燥箱冷卻到 $-10^{\circ}\text{C} \rightarrow -20^{\circ}\text{C}$ ，冷凝器冷卻到 -55°C 。把冰凍血漿40—50瓶均勻的放置在乾燥箱內。關閉乾燥箱門，開動油幫浦。當比蘭尼真空表指示真空度達 100μ 時，就可停止冷卻乾燥箱，並轉而逐漸就乾燥箱加熱。加熱時，要使真空度維持 100μ 或更低的壓力。作者一般加熱到 55°C ，而冰凍血漿還不至熔化。在冰凍乾燥開始5天後，當真空度達 20μ 時，或當裝置在乾燥箱和冷凝器油幫浦間的二真空測量點，所測真空度相近時，指示只有極少量水分在冷凝器中冷凝時，就可使用油灑散幫浦，並隔斷冷凝器途徑。當油灑散幫浦工作 $1\frac{1}{2}$ 天後，真空度就可達 $8-9\mu$ ，乾燥過程即行停止。

冰凍乾燥後標本的處理

冰凍乾燥系統的真空狀態用乾燥放氣濾過系統（使空氣先後經過濃硫酸、棉花、矽膠、五氧化二磷、沙氏濾器等組成的系統去水分濾過的裝置）消除。此時就可打開乾燥箱門，取出乾燥的血漿；去紗布，加乾燥消毒的橡皮塞後，迅速轉入置有五氧化二磷的乾燥器內，以後取出血漿瓶，用12號注射針頭抽空到 $10-50\mu$ （麥氏真空表測量），用真空膠（蜂蠟和松香各半）封密（中量製備時，封密前並加鋁蓋）。

血漿的理化試驗

水分 6厘米直徑稱瓶（其重量已恆定）以分析天平稱取乾血漿1.5—2.0克，置入玻璃真空乾燥器，用油幫浦經過五氧化二磷抽空，在室溫中除去乾血漿標本的剩餘水分。真空度在1毫米水銀柱以下，抽空時間為6小時左右；每抽6小時後，即關閉真空乾燥器活塞，靜置過夜，稱它的重

量。如此重覆多次，直到重量不減為止。每種樣品，取3個標本來測定，並取均值。

溶解速度 從稀釋液完全注入乾燥血漿開始，用手猛烈振搖血漿瓶，計算乾燥血漿完全溶解所需時間（註：由於觀察到乾血漿有完全溶解現象的時候，已經在乾燥血漿完全溶解瞬間之後，所以實驗所得時間往往較實際時間為長）。

氫離子指數 用Cambridge氫離子指數計測定。

黏度 採用Ostwald測黏度法⁽¹⁷⁾測定血漿對水黏度的比較。

滲透壓力 採用Adair測滲透壓力法⁽¹⁸⁾。

紙上電泳 係採用Hardwicke平板式電泳儀⁽¹⁹⁾和Hirsch和Cattaneo⁽²⁰⁾，以紙上電泳測定血漿中纖維蛋白元的方法作血漿的紙上電泳。以白金絲為電極，巴比妥為緩衝液，離子強度0.1，pH值8.6。用華氏1號濾紙（每條為 23×2.9 厘米），每次電泳6條。乾燥前和乾燥後的血漿、在同一電泳池中電泳。電壓為170—180伏特，總電流強度為6.0—6.5毫安（每厘米紙條為0.3—0.4毫安）。血漿量為0.01毫升。

電泳前，將紙條先浸入1%檸檬酸鈉溶液中，5分鐘後取出，用普通濾紙吸得半乾。次用緩衝液浸濕，再吸得半乾。置各紙條在電泳儀中，把0.01毫升的血漿滴在每條紙上，等10分鐘後，開始電泳。經9小時後，停止通電。電泳畢，置紙條在 110°C 烘箱中烘20分鐘，把各紙條浸入1%溴酚藍的氯化高汞酒精飽和溶液中，經10分鐘後取出；再浸入0.5%醋酸溶液，洗去不曾同血漿蛋白結合的多餘的染料，置室溫中晾乾。

染色後測定血漿中各蛋白質的百分比，兼用電泳圖譜洗釋法和光密度法：洗釋法、係將紙上着色各帶剪下，分別置在試

管中,每管加入適量的甲醇碳酸鈉溶液,時常攪動,使紙上染料全部溶解在溶液中,再用 Lumetron 比色計比色——用 Lumetron 580 濾色板;求出血漿中各蛋白的百分比,並比較乾燥前、後各蛋白質的數值。光密度計算法,則將各條濾紙在濃氫氧化銨上熏 1—2 分鐘,使成藍色。再塗上液體石蠟,置玻璃真空乾燥器中抽空 10 分鐘,將過多的液體石蠟吸去,置光密度計中測定;由光密度的數值,繪成電泳圖譜。以求積儀測定血漿各蛋白質所佔的面積;再由各蛋白質的面積求得各蛋白質的百分比,並比較乾燥前、後各蛋白質的數值。

凝血酶元時間 用 Quick 一級凝血酶元時間測定法⁽²¹⁾測定。凝血酶活素是用 Stefanini 的方法⁽²²⁾,從新鮮兔腦中製備。當測定凝血酶元時,先將血漿、0.025M 氯化鈣溶液和凝血酶活素溶液分別置在 37°C 水浴中,取 0.1 毫升血漿、放在 10 × 75 毫米試管中,加入凝血酶活素 0.1 毫升,輕輕搖勻,靜置兩分鐘,再加入 0.1 毫升氯化鈣溶液,同時用停錶開始計算時間。將試管下部在水浴中繼續搖動 10 秒左右,取出、繼續搖動,並置試管在視線最適宜地方、以便觀察凝固現象。凝固時間以管中凝血酶活素小顆粒停止跳動為標誌。

補體測定價⁽²³⁾ 用一般古典方法觀察

結

當血漿是清明的,並確切預冷到 1°C 左右,當在臥式旋凍酒精浴溫度低於 -45°C 時,或當立式離心旋凍溫度在 -18°C 時,作者所得到的血漿預凍結晶是細緻的、均勻的、潔白的。冰凍乾燥後,中量製備的乾血漿在 1 分鐘內重新溶解。水分含量,在中量製備標本,為 0.91% 至 1.88%;在小量製備標本,為 0.84% 至 1.48%。血漿乾燥前、後各種理化分析,如氫離子濃度、

產生全溶血的血漿量來測定入血漿內補體價,先藉豚鼠血清中的過量補體測定溶血素價,再測定在 0.6 毫升中有 1:30 溶血素存在時,使羊血球全溶血時所需的人血漿量,從入血漿量再計算入血漿中補體的濃度。

蛋白質總量測定 用改良的雙縮脲比色法⁽²⁴⁾測定。

中量製備時,每批標本乾燥前、後皆作氫離子指數、黏度、滲透壓力、紙上電泳、凝血酶元時間、補體滴定價等試驗。

動物乾血漿的動物試驗

狗 5 隻,每隻按體重每公斤 6—15 毫升,作狗乾血漿的靜脈內注射,觀察效果和反應。

家兔 6 隻,每隻按體重每公斤 10 毫升,作兔乾血漿的靜脈注射,觀察效果和反應。

人乾血漿的臨床試驗

小量製備 靜脈內注射健康人 11 人次,病員 7 人次,每次 200 毫升。肌內注射病兒 7 人次,每次 30—50 毫升。

中量製備 靜脈內注射病員 20 人次,每次 400 毫升。選擇臨床試驗的對象無一定的準則,視當時醫院的需要而定。

果

黏度、滲透壓、蛋白質總量和補體滴定價等都沒有顯著的改變。血漿蛋白的電泳分析和凝血酶元時間略有改變。動物試驗和臨床試驗結果顯示自製的動物和人乾血漿,除有致熱原和蕁麻疹反應外,都沒有其他不良反應。現在把理化試驗、動物試驗和臨床試驗結果敘述如下:

I. 小量製備

1. 理化試驗 曾作了水分含量、溶解速度、粘度和滲透壓力的測定。水分含量為 0.84% 至 1.48%。溶解速度為 1.5—3 分鐘。粘度(37°C 時同水比較)、乾燥前均值为 1.61; 乾燥後為 1.58。滲透壓力(毫米水銀柱)、乾燥前均值为 23.1; 乾燥後為 22.3。

2. 動物試驗

狗: 按體重每公斤注射 6—15 毫升重溶解的狗乾血漿

日期	狗名	體重(公斤)	靜脈內注射量(毫升)	致熱原反應	其他反應
53.9.2	黃狼	20	200	—	—
53.9.14	陪奇	30	200	—	精神不佳, 約 20 分鐘, 可能由於注射太速(8 分鐘)。
53.9.22	大黑	22	200	—	—
53.9.23	小生	14	200	+	—
53.11.23	大生	22	200	—	—
53.11.6	小生	14	140	—	—
53.11.6	大黑	22	220	+	—
53.11.6	大生	22	220	+	—
53.11.9	陪奇	30	300	—	—
53.11.9	黃狼	20	200	—	—

兔: 按體重每公斤注射 10 毫升重溶解的兔乾血漿

兔號	體重(克)	致熱原反應	其他反應
1	2,170	+(體溫升高 0.95°C)	—
2	1,750	+(體溫升高 0.8°C)	—
3	2,030	—	—
4	2,910	—	—
5	1,870	+(體溫升高 1.4°C)	—
6	2,260	—	—

3. 臨床試驗

(1) 靜脈內注射:

實驗室志願注射者的情况:

志願者	血漿批號	注射量(毫升)	反應
張雪祥	臨 1B	200	—
舒振達	臨 1C	200	—
華復一	臨 2A	200	輕度蕁麻疹反應
劉蘭智	臨 2B	200	輕度蕁麻疹反應
王克勤	臨 3A	200	體溫最高達 38.7°C
陸欽基	臨 4A	200	—
閔榮強	臨 4C	200	—
楊進生	臨 4E	200	—
金敦榮	臨 4F	200	輕度蕁麻疹反應
楊進生	B 批 60	200	輕度蕁麻疹反應(此次注射在上次注射 6 日後)
陳鴻書	臨 5F	200	輕度蕁麻疹反應

另在上海第一醫學院中山醫院病員作臨床注射 7 瓶(每瓶 200 毫升), 沒有一例有反應的報告。

(2) 肌肉注射:

上海第一醫學院兒科學院為病兒作乾血漿肌肉注射 7 例, 沒有一例有反應的報告。

II. 中量製備

1. 理化試驗

批 號	中一	中二	中三	中四	中五	總均值
水分含量(乾血漿中含水分的%)	1.32	1.88	1.03	1.78	0.91	1.38
溶解速度(稀釋液 0.1% 檸檬酸溶解乾血漿所需時間)	1 分鐘以內	1 分鐘以內	1 分鐘以內	1 分鐘以內	1 分鐘以內	—
	⑦	⑥	⑥	⑤	⑤	—

批 號	中 一		中 二		中 三		中 四		中 五		總 均 值	
	乾	燥	後	前	後	前	後	前	後	前	後	前
氫離子指數均值	7.56 ⑦	7.47 ⑦	7.49 ⑥	7.63 ⑥	7.38 ⑥	7.52 ⑥	7.45 ⑥	7.55 ⑥	7.44 ⑥	7.48 ⑥	7.46	7.53
粘度均值(相對粘度37°C 時相當於水)蛋白質濃 度克/100毫升血漿	1.64 6.58	1.69 6.80	1.62 6.55	1.70 6.91	1.61 6.54	1.71 6.93	1.61 6.95	1.83 7.18	1.68 7.19	1.86 7.25	1.65 6.76	1.70 7.01
滲透壓力(以毫米水銀柱 計)均值, 蛋白質濃度 克/100毫升血漿	21.80 6.55	21.25 6.44	20.40 6.75	20.05 6.71	20.90 6.23	21.70 6.35	20.67 6.19	22.03 6.76	21.70 5.73	22.75 6.22	21.09 6.29	21.56 6.50

〔續上表〕

批 號	中 一		中 二		中 三		中 四		中 五		總 均 值	
	後	前	後	前	後	前	後	前	後	前	後	前
凝血酶元時間均値(以秒計)	17.2 (7)	13.9 (7)	14.9 (6)	15.3 (6)	16.8 (6)	15.6 (6)	17.1 (6)	14.6 (6)	15.7 (6)	14.9 (6)	16.5	14.9
補體滴定效價均値	16.6 (5)	18.2 (5)	15.5 (6)	15.5 (6)	17.7 (3)	18.7 (3)	17.2 (6)	19.3 (6)	20.5 (6)	21.7 (6)	17.5	18.7

- 【註】 (1) 乾燥後的血漿用 400 毫升 0.1% 檸檬酸稀釋。
 (2) ③④⑤⑥⑦等○內數字表示測定標本的數目。
 (3) 均値從測定數據中得出。但粘度、滲透壓力一項，雖測定標本的數目和電離子指數項相同，而均値却從諸測定數據中根據統計原則選擇部分測定數據平均得出。
 (4) 補體滴定效價的數據為整數(15, 18, 20, 25 等)。表中所列，因為是均値，所以數字帶有小數。

電泳分析結果(稀釋法):

批 號	清蛋白%		α_1 球蛋白%		α_2 球蛋白%		β 球蛋白%		纖維蛋白元%		γ 球蛋白%	
	前	後	前	後	前	後	前	後	前	後	前	後
中一 1L1P2	61.0	59.2	3.82	3.95	6.13	6.57	8.42	8.54	6.94	7.97	13.5	13.8
中二 2L4P6	52.0	61.7	5.10	4.17	6.96	5.95	10.3	8.81	10.4	7.57	15.3	11.8
中三 3L1P6	61.5	56.3	2.86	4.17	5.12	6.25	8.03	10.7	8.69	9.70	13.7	13.0
中三 3L5P5	59.0	55.1	3.94	4.67	5.84	6.62	8.92	9.50	8.97	10.9	13.4	13.3
中四 4L6P7	57.2	57.4	2.97	4.15	6.58	6.53	9.55	9.55	8.04	10.4	15.8	12.0
中五 5L4P6	58.3	56.0	4.22	4.47	6.60	6.64	8.88	9.79	8.06	9.84	14.0	13.3

電泳圖譜：用光密度法測得。

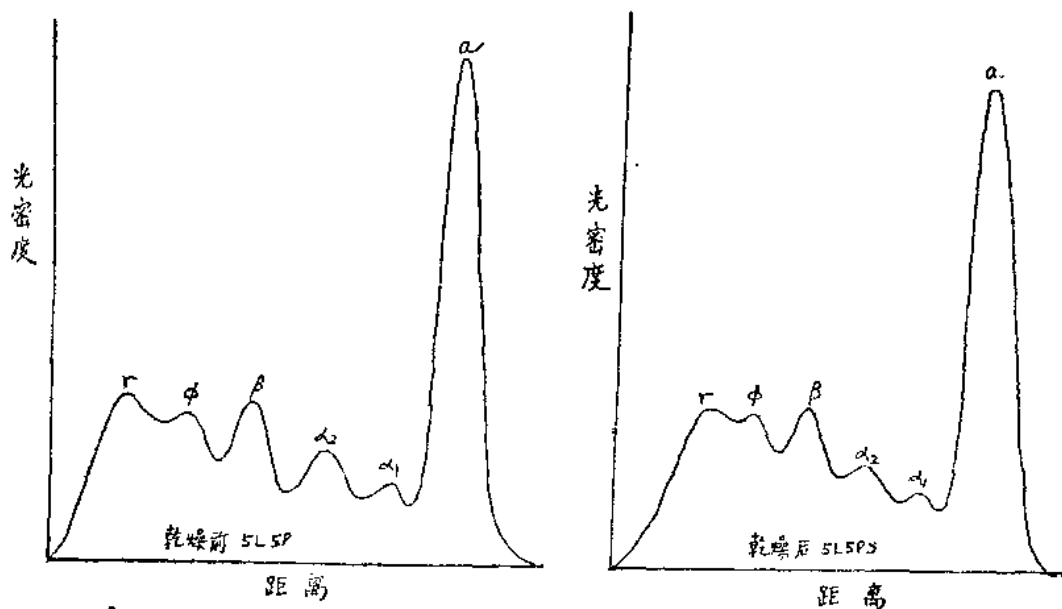


圖 2

蛋白質總值

批 號		蛋 白 總 值		%變化	批 號		蛋 白 總 值		%變化
		乾燥前	乾燥後				乾燥前	乾燥後	
中 一	LPN111	6.88	6.83	-0.7	中 四	LPN411	7.25	7.18	-1.0
	LPN121	6.92	6.80	-1.7		LPN421	7.05	7.08	+0.4
	LPN131	6.71	6.46	-3.7		LPN431	7.39	7.53	+1.9
	LPN141	6.88	6.52	-3.8		LPN441	6.98	—	—
	LPN151	6.78	6.80	+0.3		LPN451	7.01	6.53	-6.8
	LPN161	6.92	6.63	-4.2		LPN461	7.49	7.50	+0.1
					LPN471	7.32	7.43	+1.5	
中 二	LPN211	7.29	6.98	-4.2	中 五	LPN511	7.20	7.28	+1.1
	LPN221	7.32	7.12	-2.7		LPN521	7.32	7.38	+0.8
	LPN251	7.00	6.83	-2.3		LPN531	6.15	6.27	+2.0
	LPN261	6.81	6.45	-5.3		LPN541	7.32	7.48	+2.2
	LPN271	6.81	6.49	-4.7		LPN551	6.85	7.12	+3.9
中 三	LPN311	6.81	6.95	-2.0		LPN561	6.95	—	—
	LPN321	6.95	6.78	-2.4		LPN571	6.98	7.23	+3.6
	LPN331	6.47	6.57	+1.5					
	LPN341	6.36	—	—					
	LPN351	7.02	7.09	+1.0					
	LPN371	6.91	—	—					

2. 臨床試驗結果 表列如下:

病人姓名	性別	年齡	血漿批號	每次注射量(毫升)	稀釋液	注射原因和住院原因	反 應
張秀英	女	55	LPN001	400	1%檸檬酸	總胆管結石, 低血蛋白	注射後一小時有輕度蕁麻疹反應
張秀英	女	55	LPN002	400	同上		
呂正球	女	27	LPN451	400	同上	右髖關節中心脫位, 低血蛋白	無不良反應
徐金娥	女	36	LPN003	400	同上	胆管總胆管結石, 胆道出血, 手術性休克, 低血蛋白	同上
徐金娥	女	36	LPN004	400	同上		
謝劍華	女	40	LPN005	400	同上	頭皮撕裂傷, 出血過多	3小時後, 有發熱反應
趙正朝	男	27	LPN431	400	同上	第十二胸椎骨折併發截癱, 失血, 低血蛋白	1小時後, 有局部蕁麻疹
黃富全	男	23	LPN334	400	同上	慢性胆囊炎, 低血蛋白	1½小時後, 有蕁麻疹反應
蕭仁賢	男	22	LPN563	400	同上	急性胆囊胆管炎, 十二指腸瘻	1½小時後, 有蕁麻疹反應
蕭仁賢	男	22	LPN006	400	同上	腸胃道出血, 低血蛋白, 手術性休克	
王鳳雲	女	55	LPN007	400	同上	總胆管結石, 低血蛋白	40分鐘後, 有蕁麻疹反應
陳茂生	男		LPN008	400	同上	第六頸椎骨折併發截癱, 褥瘡	有輕度蕁麻疹反應
俞惠章	男	47	LPN368	400	同上	慢性乙狀結腸癌梗阻, 營養不良	有致熱原反應
陳麗華	女	21	LPN441	400	蒸餾水	燒傷, 第二、三度、80%; 大量失水; 血液稀	無不良反應
陳麗華	女	21	LPN442	400	同上		同上
陳麗華	女	21	LPN443	400	同上		同上
陳麗華	女	21	LPN364	400	同上		同上
陳麗華	女	21	LPN362	400	同上		同上
病人甲			LPN172	400	同上		同上
病人乙			LPN171	400	同上		同上

上述臨床試驗, 是 1956 年 6—8 月間, 在上海市急症外科醫院進行的。

討 論

1. 作者認為在使全血離心時, 盡可能獲得清明的血漿。在血漿預凍前, 使血漿

預冷至 $1^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 則預凍時可獲得超冷的現象, 使血漿驟凍而獲得結晶組織、均勻、潔白的冰凍血漿, 這對冰凍乾燥的迅速進行、和乾燥血漿的達到最低水分含量有着非常巨大的作用。這方面觀察同國外文獻報道相符合。

2. 由於①冰凍乾燥過程的迅速進行有賴於合適的加熱, ②真空狀態時, 空氣的熱傳導能力大大減小, ③藉血漿瓶玻璃的熱傳導所得熱量遠不及直接加熱所得熱量, ④只有均勻加熱, 才能使血漿瓶內冰凍血漿的各個部分在冰凍乾燥過程中乾燥速度相等, 作者認為對於血漿的冰凍乾燥, 精密合於血漿瓶外周的加熱筒的加熱方式、常較藉血漿瓶底部自下而上的熱傳導的加熱方式為有效。

3. 根據作者所作多項理化試驗、數據(凝血酶元時間除外)雖有小的參差和矛盾, 但這些也都在各該試驗正常誤差之內。總起來說, 血漿蛋白質經冰凍乾燥後, 它的理化性質無顯著改變。

4. 由凝血酶元時間數字顯示: 乾燥後, 凝血酶元損失較多, 這點可能由於①作者的冰凍乾燥過程對凝血酶元或其他凝血因素有損壞, ②測定方法本身缺點, ③檸檬酸對凝血系統各因素可能有抑制作用。

5. 由臨床試驗結果顯示: 本文所報告的乾血漿還沒有出現和液體血漿或冰凍血漿反應類型不同的反應。但蕁麻疹反應發病率多到 45%, 遠遠超過一般文獻報告。由於發病率之多、和混合血漿分裝血漿的裝置中混合血漿太多 (2 000—3,000 毫升, 13—14 人的血漿), 作者揣測蕁麻疹反應率之高、可能由於獻血者未能嚴格禁食之故。

6. 在動物試驗時的致熱原反應、可能由於本研究所用無致熱原蒸餾水質量欠佳

所致。因改善質量後, 無論小量或中量製備人血漿製品的致熱原反應率, 都大大減小。中量製備製品的臨床試驗雖有 2 例致熱原反應, 但將其中 1 例注射過的同批血漿注射於其他患者, 則未曾有致熱原反應。作者揣測: 這致熱原反應可能由於①輸血器有致熱原污染; ②該例為晚期直腸癌病人, 嚴重惡液質, 對致熱原或蛋白質溶液注射特別敏感。

7. 各國文獻、迄今未有對同種血清黃疸病毒根本有效控制的報告。作者除儘量減少混血人數及注意獻血者有無黃疸病史、面容和檢驗外, 對該病毒並未進行探討。在中量製備的臨床試驗中, 因沒有條件繼續觀察受血者以後的情況, 不能斷定有無同種血清黃疸病發生。在小量製備時, 每次混血為 9 人至 10 人, 臨床試驗 11 人次, 受血者都是本院工作同志, 受血後經過 1 年餘的觀察, 無 1 例有黃疸病發生。因此, 注意獻血者的健康和減少混血量對預防同種血清黃疸病的發生, 有一定的作用。

8. 由於血漿預凍結晶的大小、乾燥的情況、剩餘水分的含量 (1% 左右) 和乾燥後標本的處理都和國外製品相似, 作者推測自製乾血漿的保藏時間的久暫、應和國外製品相近。國外製品的有效期、一般為 5 年。但最近據 Strumia 等⁽²⁶⁾關於乾血漿和冰凍血漿保存期限的試驗結果, 證明乾血漿的有效期可以延長到 7 年或 10 年, 並指出乾血漿儲藏的期限, 除了乾血漿本身的品質外, 還決定於包裝中橡皮塞的質量。我國在製造適合於保持真空度, 耐久的醫用橡皮塞還是首次, 因此, 自製的乾血漿是否也能保持 7 年或 10 年有效, 還有待儲藏試驗的結果予以證實。

結 論

控制清明的液體血漿預冷的溫度在 1°C 左右，可在預凍血漿時產生超冷的現象。超冷的現象能使血漿冰凍得非常快（驟凍），獲得細緻、均勻、潔白的結晶。無論從乾血漿的顏色、溶解速度、結晶大小、最終水分含量、血漿乾燥前、後的理化性質或臨床試驗的結果作比較，都顯示自製的乾血漿的質量和國外進口的乾血漿一樣。乾燥後的重溶速度、在小量製備時，不

超過3分鐘；中量製備時，不超過1分鐘。剩餘水分含量在1%左右。乾燥前、後，血漿的幾種理化性質無顯著改變。臨床試驗結果除有致熱原反應、蕁麻疹反應外，無其他嚴重不良反應。因此、用冰凍乾燥的技術作乾血漿中量製備，已經成熟，有必要時，可在大城市中設立乾血漿製備廠，以期在平時能滿足國內各醫療機構的需要，並為戰時儲備足夠的乾燥血漿。

誌謝 張美會工程師在本研究中，曾協助設計小型冰凍乾燥機，夏壽萱同志對本研究中紙上電泳部份曾予協助，謹致謝意！

參 考 文 獻

- (1) Shackell, L. F.: An improved method of desiccation, with some applications to biological problems. *Amer. J. Physiol.*, **24**: 325, 1909.
- (2) Craigie, J.: Method of drying complement from the frozen state. *Brit. J. Exp. Path.*, **12**: 75, 1931.
- (3) Elser, W. J., Thomas, R. A., and Steffen, G. I.: The desiccation of sera and other biological products (including micro-organisms) in the frozen state with the preservation of the original qualities of products so treated. *J. Immunol.*, **28**: 433, 1935.
- (4) Flosdorf, E. W., and Mudd, S.: Procedure and apparatus for preservation in "lyophile" form of serum and other biological substances. *J. Immunol.*, **28**: 389, 1935.
- (5) Flosdorf, E. W., and Mudd, S.: An improved procedure and apparatus for the preservation of sera, micro-organisms and other substances—the "Cryochem" process. *J. Immunol.*, **34**: 469, 1938.
- (6) Flosdorf, E. W., Stokes, F. J., and Mudd, S.: The "Desivac" process for drying from the frozen state. *J. Amer. Med. Ass.*, **115**: 1095, 1940.
- (7) Flosdorf, E. W., Hull, L. W., and Mudd, S.: Drying by sublimation. *J. Immunol.*, **50**: 21, 1945.
- (8) Greaves, R. I. N., and Adair, M. E.: A simple method for preservation of sera by desiccation in the frozen state without the use of refrigerants. *J. Hyg., Camb.*, **36**: 507, 1936.
- (9) Greaves, R. I. N., and Adair, M. E.: High-vacuum condensation drying of proteins from the frozen state. *J. Hyg., Camb.*, **39**: 413, 1939.
- (10) Greaves, R. I. N.: The freezing of human serum and plasma in Medical Research Council transfusion bottles, before drying by sublimation from the frozen state. *J. Hyg., Camb.*, **41**: 489, 1942.
- (11) Greaves, R. I. N.: Centrifugal vacuum freezing. Its application to the drying of biological materials from the frozen state. *Nature*, London, **153**: 485, 1944.
- (12) Strumia, M. M., and McGraw, J. J.: A method and apparatus for shell-freezing and rapid drying of plasma and other products from the frozen state by low temperature water vapor condensation in vacuo. *J. Lab. Clin. Med.*, **28**: 1140, 1943.
- (13) Flosdorf, E. W.: *Freeze-drying (drying by sublimation)*. N. Y. Reinhold, 1949.
- (14) Greaves, R. I. N.: Production of blood derivatives to meet war requirements in Great Britain. *J. Amer. Med. Ass.*, **124**: 76, 1944.

- (15) Greaves, R. I. N.: *The preservation of proteins by drying with special reference to the production of dried human serum and plasma for transfusion*. Medical Research Council (Brit.) special report series No. 258, 1946.
- (16) DeGowin, E. L., Hardin, R. C. and Alsever, J. B.: *Blood transfusion*. p. 390. W. B. Saunders Co. Philadelphia and London. 1949.
- (17) Weissberger, A.: *Technique of organic chemistry*. Vol. I. "Physical methods of organic chemistry" Part I. Inter. Pub. Ltd., London. 1949.
- (18) Roughon, F. J. W., and Kendrew, J. C.: "Hemoglobin" p. 191. Butterworths scientific publications, London. 1949.
- (19) Hardwicke, J.: The estimation of serum protéins by electrophoresis on filter paper. *Biochem. J.* **57**: 166, 1954.
- (20) Hirsch, A., and Cattaneo, C.: The quantitative determination of plasma fibrinogen through the electrophoresis of blood plasma on filter paper. *Arch. Biochem. & Biophysics* **61**: 27, 1956.
- (21) Darmady, E. M., and Davenport, S. G. T.: *Haematological Technique.*, p. 152. J. & A. Churchill, London: 1954.
- (22) Stefanini, M., and Dameshek, W.: *The hemorrhagic disorder*. p. 277. Grune & Stratton, London. 1955.
- (23) Kabat, E. A., and Mayer, M. M.: *Experimental Immunochemistry*. Springfield, Thomas. 1948.
- (24) 華復一: 血漿或血清蛋白的微量簡確測定法, 中華醫學雜誌, **38** (6): 473—484, 1952.
- (25) Ma, F. S., and Zuazaga.: Micro-Kjeldahl determination of nitrogen. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* **14**: 280, 1942.
- (26) Strumia, M. M., McGraw, J. J., and Heggstad, G. E.: Preservation of dried and frozen plasma over a ten-year period. *Amer. J. Clin. Path.* **22**: 313, 1952.

動物性纖維蛋白海綿和纖維蛋白膜的製備和性質研究的初步報告

范啓修 梁文熙 盛志勇 許筱珊

I. 前言

止血劑是外科手術重要工具之一。在各種重要止血劑(明膠海綿⁽¹⁴⁾, 氧化纖維⁽²²⁾和纖維蛋白海綿⁽⁷⁾)中, 不論單獨應用, 或吸附凝血酶後應用, 都以人的纖維蛋白海綿⁽²⁰⁾為較合理想; 因為它不但具有優越的止血功效, 並且對於組織不引起不良反應。獸血纖維蛋白海綿的止血功效同人血製品無異, 材料來源又較豐富, 因此、國外進行

這項研究工作的很多, 並且已經成功地應用在臨床上⁽²⁹⁾⁽²⁷⁾⁽²⁸⁾⁽⁸⁾⁽⁵⁾。

纖維蛋白膜在神經外科上, 已經獲得廣泛的應用⁽¹⁸⁾。獸血製品應用於燒傷的治療, 也得到了肯定的結果⁽²⁹⁾。

本文目的企圖從豬血製備適合臨床應用的纖維蛋白海綿和纖維蛋白膜。

II. 實驗

(I) 製 備

1. 纖維蛋白原⁽³⁾ 取9份新鮮血液, 加1份抗凝劑($1.85\% \text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + 0.5\% \text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 旋離30分鐘(每分鐘2,500轉), 得清明血漿, 放入內壁塗有石蠟的金屬筒中。在 -30°C 冰箱中冷凍成固體後, 移入 5°C 冰箱, 待全部冰塊融化完全, 旋離、收集沉澱物。每次旋離1分鐘(每分鐘2,500轉)後, 傾去上層清液、添加冷血漿液, 重覆操作到全部沉澱物收集完。加進同沉澱等體積的生理鹽水, 用一端附有適當橡皮塞(塗有火棉膠)的玻璃棒, 上下輕微攪動, 來洗去其他蛋白質和雜質。旋離1分鐘, 傾去上層清液, 再加進生理鹽水, 洗滌, 離心, 重覆操作4, 5次, 便可得到相當純粹

的纖維蛋白原。最後一次旋離3分鐘(以上操作必須嚴格控制溶液溫度, 勿使超過 5°C)。加進適量生理鹽水, 製成濃度約為2%的溶液。稍加攪動, 使成混懸液, 放入 35°C 恆溫水槽中, 繼續不停、加以攪動, 待溫度上升到 $33-35^\circ\text{C}$ (溶液變成清液)。在室溫中旋離1小時, 取出清液、分裝在 -30°C 冰箱中, 經冰凍乾燥、密封保存。

可凝蛋白的定量⁽¹⁵⁾ 取定量纖維蛋白原液, 用生理鹽水稀釋30倍, 每10毫升稀釋液加1毫升 $0.25M \text{CaCl}_2$ 溶液, 或1單位凝血酶溶液。放進玻璃棒一支, 在室溫中靜置半小時, 把凝固的纖維蛋白捲在玻璃棒上, 用濾紙擠去水分後, 依次用生理鹽水、蒸餾水、酒精、乙醚洗滌。用微量定氮法測氮含量, 並乘以6, 或在 110°C 烘箱中加

熱 2 小時，稱它的重量，即得。

2. 凝血酶⁽²¹⁾⁽⁴⁾ 取血液 9 份，加抗凝劑(3.8% 枸橼酸鈉) 1 份，旋離得血漿。用蒸餾水稀釋 10 倍，來減低抗凝血酶的活力。在室溫中操作時，可用加進乾淨冰塊在溶液中的方法來控制溶液的溫度，使在 0°C 到 5°C 之間。攪拌溶液，並徐徐加進 2% 醋酸溶液(每 100 毫升原血漿約需 85 毫升)，使 pH 為 5.3。這時出現大量沉澱物，靜置，待沉澱完全，傾去上層清液，旋離，收集沉澱物，並溶解在 1/10 原血漿體積的生理鹽水中。用 1% 醋鹽和 2% 碳酸鈉溶液調節它的 pH 到 7.2 左右。每 100 毫升溶液加 3.5 毫升 0.25M CaCl₂ 溶液，靜置在 37°C 水浴中。待凝塊形成後，用乾淨紗布擠出凝塊中的液體，加等體積純粹冷丙酮在溶液中，旋離，收集沉澱物。加 1/10 原血漿體積的生理鹽水，置在 5°C 冰箱中約 24 小時後(時常加以攪拌)，旋離得清液，放置在一 30°C 冰箱中，或冰凍乾燥，密封保存。

凝血酶單位的測定⁽²⁷⁾ 取 0.5 毫升 0.2% 豬纖維蛋白元溶液(含 0.2% 異吡唑⁽⁹⁾⁽²⁾)，加 0.5 毫升凝血酶，放在內徑 1 厘米玻管中，在 37°C 水浴中記下凝固時間；能使在 15 ± 0.5 秒凝固的凝血酶量，為 1 單位(在這混合溶液中，pH 7.3，離子濃度 0.15)。在本實驗中，用豬纖維蛋白原代替標準纖維蛋白原(人或牛)溶液，測定結果每毫克蛋白質約含凝血酶 3.3 單位，符合於海綿和膜製備的要求。

3. 纖維蛋白海綿⁽²⁶⁾ 用生理鹽水配製 1% 左右的纖維蛋白溶液，置在 37°C 恆溫水浴中。小心加以振盪，使溶液溫度均勻，而後取一定量的溶液，置在適宜的組織搗碎機(waring bleuder)中搗擊 30 秒左右(這時總體積約為原體積的 2.3 倍)，每百毫升液體加進 100 單位(1—3 毫升)凝血酶液，繼續搗擊 60—90 秒。在 5 分鐘內取出海

綿狀物，並置在 -30°C 冰箱中。經冰凍乾燥後，在乾燥室中切成適當厚度的薄片，包裝後，在 $165 \pm 3^\circ\text{C}$ 乾熱 3 小時，密封保存。

4. 纖維蛋白膜⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾⁽¹²⁾ 配製 0.5—1.0% 纖維蛋白原溶液，每百毫升溶液加進 50 單位(1—3 毫升)凝血酶溶液，小心反覆傾到數次，使酶液平均分佈在纖維蛋白原溶液中，迅速倒入 2 厘米厚的玻璃平盤中(如有氣泡，應立刻用乾淨濾紙拭去)。靜置室溫中 1—2 小時，取出堅實凝塊，夾在兩塊貼有濕綢布的玻板間，加壓，使成薄膜。壓力從小到大，以不使凝塊變形或面積變大為限度。待膜的厚度達 0.1—0.2 厘米時，每平方吋加壓力 1 磅。10—14 小時後得乳白色薄膜(這時水分含量約為 80%)，大部分鹽分和其他不凝蛋白已被擠去。取開玻板，將薄膜連綢布一起晾在空氣中，待水分含量降到 25% 時，置入 3—5°C 冰箱中。待膜同綢布易被分離時，取去綢布，薄膜仍留放冰箱中。待膜的水分含量為 20% 時(膜中水分已達平衡狀態)，從冰箱中取出，加一張面積稍大的硫酸紙(parchment paper)，捲成一卷，放進試管，加棉花塞，置在蒸汽高壓釜(15 磅 120°C)中加熱 20 分鐘(這時水分含量應為 20—25%)，移入厚壁玻璃瓶，用抽氣馬達或水邦浦抽氣 1—1½ 小時(真空度 50—70 μ)。燒熔試管口(棉花不封入試管中)，密封。這時膜的水分含量應為 $11 \pm 4\%$ 。

纖維蛋白膜水分含量 用固定大小的軟木塞打洞機從纖維蛋白膜取下圓形薄膜一小塊，在 110°C 烘箱中加熱 2 小時，加熱前後，膜的重量差就是水分含量。

硫酸紙的製備 取上等濾紙，放入 70% 硫酸溶液中，經 20—30 秒，立刻用大量自來水沖洗，晾在空氣中，燙平應用。

在製備過程中，該注意勿使灰塵染污製品。

(II) 製品性質的檢查

1. 纖維蛋白海綿經加熱處理後的消化情況 取定量海綿(7毫克)放在大號試管中,各加入5毫升,pH7.5,1%的胰蛋白

酶溶液⁽¹¹⁾⁽¹²⁾(含0.1%乙醯汞硫代水楊酸鹽)或1%胃蛋白酶稀鹽酸(0.1N)溶液,置在37°C保溫箱中,時常加以輕微搖動,記下它全部被消化的時間,並用不含酶的溶液作空白對照。現在把試驗結果列表表1。

表1. 纖維蛋白海綿經加熱處理後的消化時間

種類	加熱情況	胰蛋白酶消化時間(小時)		胃蛋白酶消化時間(小時)		備註
		酶溶液	不含酶的溶液	酶溶液	不含酶的溶液	
豬血製品	130°C, 1小時, 3次	4.5	不消化	0.5	72	三天內每天加熱一次(25)
豬血製品	165°C, 3小時	50	不消化	2.0	72	
牛血製品	165°C, 3小時	22	不消化	3.0	72	
兔血製品	165°C, 3小時	40	不消化	3.0	72	

2. 動物對纖維蛋白海綿的過敏性反應試驗 取定量海綿在研鉢中加適量生理鹽水,研磨成微細混懸液,取定量混懸液注射在動物皮下。經14天後,靜脈注射原血清,血漿和其他靜脈注射物,觀察動物的反應。試驗分家兔和豚鼠兩組。現在把試驗結果分別列表表2和表3。

3. 動物體內使用經165°C加熱3小時的纖維蛋白海綿後的組織反應。

(1) 異種纖維蛋白海綿在家兔腦組織內所引起的反應 家兔10只,在無菌操作下把體積6×4×4毫米的豬血製品埋在右側頂葉的後側端。經3天,1週,2週,3週和4週後,分批殺死動物,作局部檢查,並取埋藏處和四周的組織作切片觀察。

肉眼所見 經埋藏後,除一例(三天的)因手術引起腦出血(解剖時證實)而致四肢癱瘓外,沒有任何症狀。到第四週末查見被埋藏的纖維蛋白海綿只佔原體積一半。

顯微鏡觀察 纖維蛋白海綿本身的消失是由外週向中央漸進,表現在纖維蛋白網眼中的滲出增多,纖維腫脹,染色模糊,斷裂,破碎和溶解。它的歸宿可分為兩方面:一、是碎片被異物多核巨細胞吞噬,一、是斷裂的纖維腫脹和溶解。周圍組織的表現首先是急性發炎的反應,包括充血,水腫,有無數嗜中性白血球和它的破碎片分佈在纖維海綿的網眼中,並可見到周圍腦組織中有小的壞死區。一週後可見到修復過程,包括吞噬細胞的浸潤,纖維母細胞和

表2. 家兔組⁽²⁷⁾

實驗日期	體重(公斤)	皮下注射物和劑量 (每只動物蛋白質毫克數)	靜脈內注射物和劑量 (每公斤體重毫升數)	動物數	一般觀察		
1956—4—5	2.0—2.5	165°C加熱的豬血製品	25	豬血清	1.0	4	5分鐘躺下不活動
1956—4—5	2.0—2.5	165°C加熱的豬血製品	25	豬血清	2.0	1	3分鐘抽搐死亡
1956—4—5	2.13—2.4	豬纖維蛋白原溶液	25	豬血清	1.0	2	3分鐘抽搐死亡
1956—4—5	2.13—2.4	豬纖維蛋白原溶液	25	豬血清	0.5	3	1只抽搐死亡,2只躺下不活動
1956—4—5	2.0—	O		豬血清	2.0	2	沒有不正常反應發現
1956—4—23	1.15—1.35	165°C加熱的牛血製品	25	牛血清	2.0	8	5分鐘躺下不活動
1956—4—23	1.15—1.35	165°C加熱的牛血製品	25	牛血清	3.0	1	4分鐘抽搐死亡
1956—4—23	1.15—1.35	牛纖維蛋白原溶液	25	牛血清	2.0	6	2只抽搐死亡,4只躺下不活動
1956—4—23	1.15—1.35	O		牛血清	2.0	2	沒有不正常反應發現

表 3. 豚鼠組⁽²³⁾

試驗日期	體重(克)	皮下注射物和劑量 (每只動物蛋白質毫克數)	靜脈注射物和劑量 (每只動物毫升數)	動物數	一般觀察
1956—4—5	250	豬纖維蛋白原溶液	5 豬血清	0.3	9 全數抽搐死亡
1956—4—5	250	O	豬血清	1.0	4 沒有不正常反應發現
1956—8—25	200	165°C加熱的豬血製品	7 豬血清	1.0	30 28只抽搐死亡
1956—8—25	200	O	豬血清	1.5	5 沒有不正常反應發現
1956—12—10	200	165°C加熱的豬血製品	7 豬血清	0.5	12 全數抽搐死亡
1956—12—10	200	165°C加熱的豬血製品	7 213醫用異種血清 ⁽²³⁾	1.0	6 全數抽搐死亡
1956—12—10	200	O	213醫用異種血清	1.0	4 沒有不正常反應發現
1956—12—10	200	165°C加熱的牛血製品	7 牛血清	1.0	2 全數抽搐死亡
1956—12—10	200	165°C加熱的牛血製品	7 牛血清	0.5	9 3只抽搐死亡, 4只次日死亡, 2只打噴嚏
1956—12—10	200	165°C加熱的牛血製品	7 牛非特异性血清	1.0	10 2只打噴嚏、餘都沒有明顯不正常反應發現
1957—3—18	200	165°C加熱的豬血製品	7 豬血漿	0.2	5 抽搐死亡
1957—3—18	200	130°C加熱的豬血製品	7 豬血漿	0.2	10 抽搐死亡
1957—3—18	200	O	豬血漿	1.0	5 沒有不正常反應發現
1958—1—2	250	165°C加熱的豬血製品	7 豬血漿	1.0	4 3只抽搐死亡, 1只有嚴重的呼吸困難
1958—1—2	250	165°C加熱的豬血製品	7 SK II ⁽²³⁾	2.5	13 沒有不正常反應發現

表中所指“抽搐死亡”的反應都在靜脈注射後3—5分鐘內發現。

膠質細胞的增生。兩週後可見到異物多核巨細胞的反應,並有嗜酸性白血球和淋巴球逐漸增加,在纖維蛋白海綿外圍形成含有無數嗜酸性白血球的肉芽腫。

(2) 同種和異種纖維蛋白海綿在家兔肝臟和腎臟的止血功效和組織反應 家兔4只分2組,在無菌操作下剖腹,刈除一定大小的肝臟和腎臟組織,並用同樣大小的海綿緊貼切口,觀察它的止血功效。試驗動

物的腹腔手術部位經縫合後,繼續飼養,經一定時期、重行剖腹觀察內臟的手術處的變化。在最後一次觀察後,取下切口處和它的周圍組織作形態觀察。

異種或同種纖維蛋白海綿在上述實驗條件下,止血功效都很良好,平均在30秒左右出血停止,海綿緊貼在切口上。在手術後第40天,肉眼已難看到同種海綿的痕跡,局部組織已變軟。在相同時間中,異種海

表 4. 異種和同種纖維蛋白海綿在家兔肝臟和腎臟埋藏 123 天後的組織形態學觀察

組別	動物號	埋藏臟器	臟器切口大小(厘米)	解剖時的發現	組織切片的顯微鏡觀察(參看本文附圖)
同種纖維蛋白海綿	1	肝	(長)(闊)(深) 1.2×0.5×0.3	手術區沒有特殊發現	沒有查到纖維蛋白海綿,也沒有查到疤痕組織。發現相應的胃包膜增厚,其中可見到極少數的淋巴球浸潤和個別的多核巨細胞。
		腎	1.2×0.5×0.4	手術區沒有特殊發現	
	2	肝	0.5×0.5×0.2	手術區有粟粒大小的黃色物	
		腎	1×0.5×0.2	手術區沒有特殊發現	
異種纖維蛋白海綿	3	肝	1.2×0.4×0.3	手術區有米粒大小的黃色物	查到纖維蛋白海綿的存留,周圍組織反應明顯,形成了有許多嗜酸性白血球浸潤的慢性肉芽腫,並可查見許多異物多核巨細胞。在4號動物的肝臟切口區周圍組織中,有成片的壞死小區;這些小區周圍並給無數嗜酸性白血球包圍着。
		腎	1.0×0.5×0.4	手術區有米粒大小的黃色物	
	4	肝	0.8×0.5×0.3	手術區有米粒大小的黃色物	
		腎	0.7×0.5×0.1	沒有找到埋藏處	