

生化药物生产过程中控制热原的方法

邱丽娟

(广东江门生物技术开发中心 江门 529080)

热原是微生物的代谢产物,是微生物的一种内毒素,其主要成分是脂多糖,分子量一般为 10^6 左右。

去除热原的主要方法有:

1. 高温法。多在 250℃ 加热 30 分钟以上。
2. 酸碱法。用酸或碱进行处理,破坏热原。
3. 吸附法。常用 0.1% ~ 0.5% 的活性炭吸附处理。
4. 层析法。利用离子交换树脂或分子筛凝胶层析处理。
5. 超滤法。使用超滤装置滤除热原物质。

为了保证热原符合规定,往往要经过多次实验才能选择合适的方法,设计出适宜的工艺路线。在实际产品试制过程中,由于生化药物及基因工程药物多为核酸(核苷酸)类和蛋白质(肽、氨基酸)类物质,是微生物生长的优良培养基,控制热原成为一个生产难点。

控制热原可以从以下多个方面综合考虑:

1 在生产全过程中注意控制热原的整体水平

避免在过程中受到微生物污染可避免引入过多的热原物质。所有的去除热原的方法都是基于热原物质在一定水平下,如果热原污染严重,处理起来就相当困难。

药品生产的 GMP 管理,有效地加强了在生产全过程中对热原的控制。生产环境洁净度的控制、物料存放时温度的控制等,现在生产过程中已能严格执行,而对于时间的控制则往往忽视了。在洁净百级的环境下,环境温度一般要求在 18 ~ 26℃,沉降菌允许 3 个/皿(30 分钟)。在此温度下,蛋白质、核酸类物质有利于微生物的繁殖,也就是说本已是无菌的原料或上一工序已无菌处理的物料,可能出现微生物的生长。因此根据长期的生产经验,要求物料(液)在处理完毕后进行除菌过滤,而且从物料打开包装进行处理、配制到进行除菌过滤,时间宜控制在 3 小时内,如处理后仍需冷藏的物料,则处理过程最好控制在 2 小时内。

2 用具处理

一般教科书中所提供的方法对于已洗干净的物品均是适用的。而对于已污染微生物或久置未用的用具则需给予特别注意。即在清洗过程中,先使用一定的化学方法进行除热原处理。如用洗液浸泡 15 分钟以上或 1% 氢氧化钠溶液煮沸 15 分钟(建议不使用碳酸钠),处理完毕后用无热原水进行清洗。

3 选择去除原料、中间品中热原的方法

对于可能含有热原的原料或中间品,去除热原的方法受到多方面的限制。过酸、过碱、过热都会导致失活、降解、变性;吸附、超滤则导致含量损失、活性下降。常用的方法主要有凝胶过滤法、超滤法、吸附法。

3.1 凝胶过滤法

对于处理量少的样品(如几十毫升),在实验室条件下,该法较为适用。可根据分子量和化学性质选择凝胶(如 Sephadex G75),凝胶在装柱前煮沸灭菌或用稀酸、稀碱洗涤,配制洗脱液的盐可用高温法去除热原,配液用无热原水(溶剂),洗脱液容器的通气口用无菌脱脂棉封口,当用鲎试验法检查层析柱平衡液的流出液内毒素反应呈阴性时,方可进行凝胶过滤,过程中温度宜控制在 10℃ 以下,过滤时间控制在 3 小时内,并根据过滤时间来确定柱体积与上样量。曾测试层析时间为 4 小时的蛋白质类物质除热原,热原符合规定。

3.2 超滤法

目前生产上已广泛使用超滤法去除热原,超滤膜截留孔径多选用 7000 ~ 30000 分子量之间,效果较为令人满意。超滤装置与超滤膜的完整性是该法的关键。超滤前对样品进行预过滤以及超滤后即时进行清洗,可延长超滤膜的使用寿命。

对于组份复杂的蛋白质、肽类物质,超滤后,将发生一些变化。对于液态制成品,在贮存期内,可能会缓慢出现微量沉淀、白点、白块;对于固态制成品,则可能在溶解时存在微量不溶或白点、白块,从而导

致澄明度不合格,这需在工艺中另行克服解决。可能的原因是:超滤前的物质的稳态系统,在超滤过程中部分物质被除去或是除去的比例不同,致使平衡破坏,造成另一部分物质析出而达到新的平衡。

超滤时还需注意的是 pH。滤出液的 pH 差值可能变化 0.2 甚至 0.5。另外,待超滤液的 pH 不仅对超滤速度产生影响,还直接影响到产品收率、活性。

3.3 吸附法

吸附剂以活性炭最为常用,且成本低廉。活性炭吸附处理热原时的关键在于控制 pH 与温度。活性炭的用量为 0.1%~0.5%,一般不必超过 0.4%,用量较大时可分次加入。在使用前,将活性炭在 180℃ 烘烤 2 小时,一方面使活性炭本身去除热原,另一方面也使得活性炭活化,提高吸附力,使一定工艺条件下吸附力稳定。

活性炭吸附处理时,料液的 pH 应控制在酸性条件下,此时去除热原的效果比较理想。考虑到对

产品性质的影响,一般选择 pH5.0~6.5。如料液终点 pH>6.5,在活性炭吸附处理前,先将 pH 调到 pH6.5 以下;吸附处理后,去除活性炭,然后再回调 pH 至终点 pH。如在去除活性炭前就回调 pH 至终点 pH,则可能使已吸附的热原物质发生解吸附,从而使热原不合格。

活性炭吸附处理时的料液温度对吸附效果影响也十分重要。如 pH6.0、40℃ 吸附处理 20 分钟热原不合格的核酸类料液,于 pH6.0、80℃ 吸附处理 20 分钟,热原可符合规定。如果料液性质允许,吸附处理的温度可尽量提高,相应的可缩短处理时间;如不宜高温处理,则可降低吸附处理时的 pH,并适当延长吸附时间。

通过 pH、温度与吸附时间、活性炭用量的相互配合,在除去的同时,可使含量损失控制在 10% 以内。

(接第 73 页)

Effect of Homones on Callus Growth and Diosgenin Synthesis in Callus of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright

Li Mingfang Liu Xuanming Liu Bin Liu Zun

(The institution of biotechnology of Hunan University, Changsha 410081)

Abstract It was reported in the paper that the effect of different hormones on callus growth and diosgenin synthesis in callus of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright. For the callus growth, different auxins' effect were in order of NAA, IAA, 2,4-D (NAA > IAA > 2,4-D). Their effect on diosgenin synthesis were just converse with foregoing states. Low concentration auxins promoted synthesizing of diosgenin. With auxin existing, 0.5mg/L of BA and KT promoted the callus growth when the callus was exposed to light for 12 and 24 hours respectively. Oppositely, 0.5mg/L of BA and KT promoted diosgenin synthesis when the callus was exposed to light for 24 and 12 hours respectively. In general, The more exuberant the callus grew, the less the diosgenin synthesized.

Key words Hormone, *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright, Callus, Diosgenin