

由棉花製造分級濾膜的研究

湯飛凡 盧寶蘭 李一飛 李泰然

(衛生部生物製品研究所, 北京)

因爲應用結果準確, 製造方法簡單, 分級濾膜(Gradocol membrane)經 Elford 氏^[1]介紹後迄今歷時雖近 30 年, 但它在病毒學技術中的價值, 未曾因時候而稍減。相反, 目前對病毒研究工作, 它還是不可缺少的設備, 因此, 我們爲適應本國條件而在這方面做了一些工作。茲將結果簡報如次。

火 棉 的 製 備

Elford 的分級濾膜是由火棉膠商品“Necol”(12%—14%乙醚-乙醇(等量)火棉溶液)製備的, 而 Bauer 和 Hughes^[2]則採用 Parlodion (條狀固體火棉膠)。但二者在國內都購買不到, 因此火棉膠的供應成了推廣分級濾膜製造前需要解決的問題。從廢相片膠底所製成的火棉膠, 因爲雜質太多, 有的甚至於有毒性而不合用。

我們知道火棉膠是由火棉(Pyroxylin 或 Nitrocellulose)製造的, 而火棉又出於普通棉花。如將棉花用硝酸和硫酸處理, 則所得即爲火棉。據 Richter^[3], 火棉有兩種, 一種是能溶解, 一種是不溶解於乙醚、乙醇內的。溶解於乙醚、乙醇內的火棉, 是我們的目的物, 其主要化學成分爲四、五硝基(Tetra nitrate, $C_{12}H_{16}(O \cdot NO_2)_4O_6$; Pentanitrate, $C_{12}H_{15}(O \cdot NO_2)_5O_5$)纖維。不溶解於乙醚、乙醇內的火棉俗稱火藥棉花(Gun-cotton), 主要爲六硝基(Hexa nitrate, $C_{12}H_{16}(O \cdot NO_2)_6O_4$)纖維。在空氣內火藥棉極易燃燒但不爆炸, 惟在受限制的空間如彈壳內, 激動着火後則引起激烈的爆炸。如將棉花用冷却了的硝酸、硫酸處理一個短時間(3—10 分鐘), 結果則得火藥棉; 如用溫熱的酸液且加長處理時間至 1 小時, 則產生四、五硝基纖維。

我們做了幾次由棉花製造火棉的試驗。開始準備硝化液:

蒸餾水	11 份
濃硫酸 (比重 1.84)	66 份
濃硝酸 (比重 1.42)	23 份

先將蒸餾水量入預置冷浴中的玻璃缸內, 然後把酸加入, 先加硫酸後加硝酸, 邊加邊攪拌。待溫度降至 35°C 時, 把撕松的一定量(約 1 份棉花比 50 份酸液)的脫脂棉投入。保持在 35°C 水浴內 1 小時, 時常翻動促其硝化。

由玻璃缸內將硝化棉花取出, 放入大量的自來水中沖洗, 最後用蒸餾水沖洗至藍石蕊試紙不變紅爲止。將水擠乾, 用 99.5% 乙醇洗滌兩次, 末以無水乙醇再洗 1 次, 然後放置於室溫中, 待乙醇完全揮發後再乾燥於乾燥器內, 最後所得即爲可溶性火棉。6 次試驗共

1958 年 2 月 12 日收到。

用棉花 35 克,得可溶性火棉 49.6 克,平均產量為 143%,即每 100 克脫脂棉花可產生 143 克火棉。美棉和國棉或纖維長和纖維短的棉花,對火棉生產,按少數試驗,結果相差不多。

所獲得的火棉,色白,質脆,易溶解於等量的乙醚乙醇混合液中。

火棉溶液配製

爲了製造分級濾膜, Elford 氏在他的著作中敘述了三種火棉溶液即“原液”(Stock solution)、“母液”(Parent solution)和“亞液”(Secondary solution)。原液是 Necol 加等量(重量)丙酮(Acetone)稀釋,充分搖盪(在搖盪器上搖 4 小時)後的結果。母液是按照公式 $N8/40 (1:9)$ 配備的。N 代表 Necol。加 8 克戊醇(Amyl alcohol)於每 40 克的原液內,總量即等於 48 克,再加同量的乙醇、乙醚(按 1:9 的重量)混合液,置搖盪器上搖 4 小時,即爲母液。加微量(0.25%, 0.5%, 1%)的水,醋酸或他項促使膠膜孔度增大或減小的物質於母液內,振盪後爲亞液。

我們觀察到原液、母液和亞液可以直接由自製的火棉預備。方法如次:假如製配原液 40 克,則按 Necol 的火棉含量(12%),先稱取火棉 2.4 克,溶化於 8.8 克的乙醇和 8.8 克的乙醚內,搖勻混合後即得 20 克的火棉膠,再加 20 克的丙酮,即爲我們的原液。因爲此時的原液重量恰爲 40 克,故按公式 $N8/40 (1:9)$,可將戊醇 8 克、乙醇 4.8 克、乙醚 43.2 克一併加於其內,結果即等於母液。爲了簡化手續起見,我們可以把兩個步驟合而爲一,將 2.4 克火棉投入於 13.6 克乙醇和同量的乙醚內,放置一晚,使其溶化。次晨再將其餘的溶劑加入包括乙醚 38.4 克,丙酮 20 克,戊醇 8 克或 8 毫升,搖盪 4 小時,用四層玻璃棉過濾,最後所得的濾液即爲火棉膠母液。如法製備,由 46.3 克火棉,共得母液 1,500 克。

由母液製亞液是很容易的事情。由亞液,進行倒膜、切膜、洗膜和測定膜的平均孔度直徑等等,一切方法及仔細技術,可參考 Elford 氏等工作^[1,2-4]茲不贅。

新製濾膜的試用

將消毒好了的新製濾膜,在紫外光線下安裝於超濾器內。先於濾器的一半,置入一大一小與濾器內徑相稱的消毒過的橡皮圈,圈上加一多孔的不銹鋼墊,墊上靠邊的地方又置一橡皮圈,最後將濾器之另一半套入。必須注意凹處扣入凸處,緊上螺絲,接上抽氣管,即可進行過濾。需要過濾的懸液在過濾前,應當準備妥善,必須清晰,且黏度不要太高,否則過濾結果難以圓滿。必要時,事前可進行沉澱或用濾紙及石棉過濾以求得清晰的液體。所用的壓力或吸力不要太高,過濾的時間亦不要太長。

爲了試驗新製濾膜是否可靠,我們將沙眼病毒懸液和靈桿菌懸液在 25—28 厘米水銀柱壓力下過濾 10—15 分鐘,結果見表 1。

表 1 指出靈桿菌不能通過 0.65 或 0.75 微米孔度的濾膜,此與 Elford 所得的結果相似。沙眼病毒能通過 0.65 和 0.75 微米孔度的膜,但被 0.29 和 0.39 微米孔度的膜所留阻。照此數值計算則沙眼病毒的大小約爲 $0.39 \times 0.75 = 0.29$ 微米,此與 Thygeson 氏^[5]所得的結果相彷彿。

關於由棉花製成的濾膜的均勻度,即由大膜一部分所切出的濾膜孔度與自另一部位所切出的相比,最小差異爲 0.31%,而最大的爲 5.65%,完全合乎規定(5%±)。又關於

重製率，試驗結果證明在一次所製造的結果與另一次的結果，誤差亦極微；多則 4.6%，少則僅 2%，不到 Elford 所限制 (10%) 的一半。

表 1 沙眼病毒及靈桿菌過濾試驗

試驗次數	濾膜孔度 (微米)	材 料	結 果		
			鵝胚第一代	鵝胚第二代	斜面培養基
1	0.650	沙眼病毒 T 106 Y 18	0/5	2/5	
	0.396	沙眼病毒 T 106 Y 18	0/5	0/5	
	對 照 (未過濾)	沙眼病毒 T 106 Y 18	5/5		
2	0.751	沙眼病毒 T 106 Y 21	2/5	5/5	
	0.290	沙眼病毒 T 106 Y 21	0/5	0/5	
	對 照	沙眼病毒 T 106 Y 21	5/5		
3	0.650	靈桿菌懸液			—
	0.751	靈桿菌懸液			—

討 論

分級濾膜是病毒學試驗室中不宜缺少的設置，它既可把細菌與病毒分開，又能將小的病毒和大的病毒區別，但主要是人們用它來測定病毒體積的大小。因為此項測定結果與用電子顯微鏡及超速沉澱所得者相類似，所以火棉膠膜濾的應用受到了廣泛的歡迎。

在試驗室中分級濾膜可以由棉花製備，這對病毒研究工作，增加了不少方便。火棉的形成是由於硝酸對棉花的酯化或鹽化 (Esterification) 作用，但影響火棉的形成則有下列幾點：

1. 硝化劑的成分：硝化劑是由一定量的硝酸及水所配成的，硫酸僅以加強硝化作用。在一定範圍內硝酸的多寡與可溶性火棉的含氮量成正比，硝酸多則氮高，反之則氮低。火棉的含氮量達 11—12% 者，溶解度高，凝結度強，極合乎製造濾膜之用，因此硫酸與硝酸之比應為 3:1。

2. 硝酸的比重：按試驗結果，硝酸的比重似乎與棉花的硝化作用有密切關係。如用比重 1.42 “製劑純”的硝酸作硝化劑，結果極其順利，如以比重 1.37 “分析純”的硝酸作試驗，結果反為不好：大部分的棉花被溶解，剩下來的已是六硝基纖維，因為它不溶解於乙醇-乙醚之內。

3. 硫酸因素：硫酸加強硝酸的酯化作用是因為吸收附在硝酸內的水分至一定程度時變成“偽酸” (Pseudo acid) 開展酯化，因此在硝化劑中的水分應保持在 10—15% 之間。如水分過多，反應就會變向氧化或水解。不特在配備硝化液時水量要一定，即在硝化進行中，也要注意時常攪拌，使在化學作用中所產生的水不至積存於棉花附近，引起溫度過高，發生氧化和水解作用，使大部分棉花溶解。

再須注意的是硝化時間不要太長。結束時，將作用了的棉花很快地轉入於大量的水內，把酸沖掉，避免水解。

此外，硝化時作用溫度 (Reaction temperature) 也會影響酯化。溫度愈高，火棉的形成愈小，因此應控制其不超過 40°C。棉花的性質也影響硝化，最好用脫脂棉，否則普通

棉往往浮於酸液表面,引起局部發熱,甚至燃燒。

在火棉製備工作中,我們未十分顧慮到爆炸問題,因為我們的目的物是可溶性四、五硝基纖維。即使有微量的六硝基纖維或火藥棉產生,它在無限制的空氣中是不會爆炸的。關於火警我們自然要格外小心,因為除火棉外用以製膜的其他原料如乙醚、乙醇等,都是易燃物質。

製造分級濾膜所用的一切儀器和設備,除測微計外都可以在國內製購。膜的厚薄可以用顯微鏡測定,故測微計之有無,無關重要。

製膜用的各種化學品,Elford 主張用質量化學純的,但 Bauer 則認為普通試劑純的材料亦能解決問題。我們用的乙醇是用石灰新鮮乾燥的,乙醚和丙酮則先加鈉片或碳酸鉀處理然後分別蒸餾的。

肖俊和朱既明氏^[6]在測定他們的小鼠病毒的大小時,曾使用我們所製備的濾膜作過濾試驗;結果證明該病毒的體積約在 150—200 毫微米之間。最近葉宗藩氏等^[7]亦利用了同樣濾膜以比較丁型流行性感冒病毒和朱氏小鼠病毒^[6]的大小,也獲得了相同的結果(110—200 毫微米)。所得的數字與日本學者 Kuroya 和 Ishida^[8]用電子顯微鏡所獲得關於丁型流感病毒的大小恰恰相符(150—200 毫微米),這似可以充分說明我們所製的分級濾膜的可靠性。

總 結 和 摘 要

本文報告了由棉花製造分級濾膜的方法。先把脫脂棉花硝化成可溶性火棉,再由火棉製成膠液然後進行倒膜、切膜、洗膜和求得膜厚薄、含水量及經過膜的水流速度;由這些數值再計算出膜的平均孔度。所製出的濾膜結構均勻,重製率亦好,且質量堅強而稍帶彈性。根據各方面應用的結果證實了濾膜的可靠性。關於製備火棉時爆炸和火警問題,文中有所討論。

參 考 文 獻

- [1] Elford, W.J.: *J. Roy. Micro. Soc.*, **48**:36, 1928; *Brit. J. Exp. Path.*, **10**:126, 1929; *Proc. Roy. Soc. Lond., Series B: Biol. Sci.*, **106**:216, 1930; *J. Path. Bact.*, **34**:505, 1931; *Handbuch der Virusforschung*, Julius Springer, Wien, 127—230, 1938.
- [2] Bauer, J. H. and Hughes T. P.: *J. Gen. Physiol.*, **18**:143, 1934.
- [3] Richter, Victor von: *Organic Chemistry or Chemistry of Carbon Compounds*, Edited by Anschutz and Reindel, Vol. I, p. 735—736, 1934.
- [4] Van Rooyen and Rhodes: *Virus Diseases of Man*, 2nd ed. p. 40—47, 1948.
- [5] Thygeson, P.: *Viral and Rickettsial Infections of Man*, p. 467—468, 2nd ed., 1952.
- [6] 肖俊、朱既明:微生物學報, 49—50, 1956.
- [7] 葉宗藩、梁榮根、湯飛凡:中華醫學雜誌,待發表.
- [8] Kuroya, M. and Ishida, N.: *Yokohama Med. Bull.*, **4**:217, 1953.

PREPARATION OF GRADOCOL MEMBRANE FROM COTTON

T. F. TANG, P. L. LU, Y. F. LI & T. Y. LI

(*National Vaccine and Serum Institute, Peking*)

On account of the shortage of Necol or other forms of collodion solution and because gradocol membranes are considered to be an indispensable tool for virus laboratories, an attempt was made to prepare Elford filters from cotton. When cotton, preferably absorbent cotton, was treated with nitric and sulfuric acids in certain proportion for a short length of time, tetra- and penta-nitrate cellulose were formed. When freed from the acids and properly dried in alcohol, absolute alcohol and dry oven, the final product was white in color and brittle in consistency and readily soluble in alcohol-ether mixture. A 12% by weight of the nitrocellulose in alcohol-ether mixture constituted our stock collodion solution from which parent and secondary solutions were made. Membranes of various permeabilities were poured and calibrated. It was found to be very uniform and the reproducibility, within 5%. Results of filtration experiments with *B. prodigiosus*, influenza and trachoma viruses, testified to the reliability of the membranes thus prepared. Finally, mechanism of nitrication of cotton and chance of explosion were briefly discussed.