



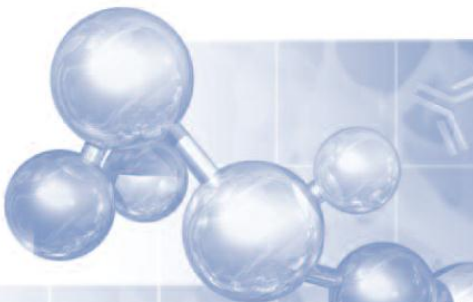
Life Sciences

验证指南

USTR 2432b⁽¹⁾-CHN

Omega™ T-系列膜包

用于Centramate™和Centrasette™ TFF系统



目录

1.本文件编写目的	5
1.1过滤工艺验证——基本概念	5
1.2安装确认 (IQ)	5
1.3操作确认 (OQ)	6
1.4性能确认 (PQ)	6
2.产品参数	6
2.1包装	6
2.2产品型号	7
2.3序列号	8
2.4结构材质	8
2.4.1膜	8
2.4.2筛网	8
2.4.3边封	8
2.4.4密封件	8
2.4.5垫片	8
2.5规格	8
2.6操作压力和温度	9
2.7标准水通量 (NWP) 范围	9
2.7.1 用于T-系列膜包的Omega膜的NWP说明	9
2.8膜溶质渗透说明	10
2.9测试用溶质浓度及检测方法	10
2.10膜完整性——前进流测试值	11
2.11新膜包和旧膜包的寿命	11
2.12对0.5N NaOH+500ppm NaOCl在45°C条件下的化学兼容性	12
2.12.1结果	12
2.13常用化学兼容性	12
2.14蛋白质吸附特性	13
3.验证程序	14
3.1最大推荐操作压力下高/低温操作测试	14
3.1.1进料端压力为6 barg (87 psi) 时的低温测试	14
3.1.1.1步骤	14
3.1.1.2结果	14
3.1.2进料端压力为4 barg (58 psi) 时的高温测试	15
3.1.2.1步骤	15
3.1.2.2结果	15
3.2环境温度下的最大压力测试	15
3.2.1步骤	15
3.2.2结果	16

3.3化学兼容性	16
3.3.1介绍	16
3.3.2范围	16
3.3.3方法摘要	17
3.3.4结果	18
3.4清洗剂兼容性——高/低pH	19
3.4.1低pH清洗研究	19
3.4.1.1步骤	19
3.4.1.2结果	20
3.4.2高pH清洗研究	20
3.4.2.1步骤	20
3.4.2.2结果	21
3.5去除保存液的膜包冲洗步骤	21
3.5.1安装膜包	21
3.5.2结果	22
3.6溶出物测试	22
3.6.1介绍	22
3.6.2方法摘要	22
3.6.3结果	22
3.7消毒处理——内毒素去除——新膜包冲洗步骤	24
3.7.1介绍	24
3.7.2方法摘要	24
3.7.3结果与结论	25
3.8消毒处理——内毒素挑战步骤	25
3.8.1介绍	25
3.8.2方法摘要	25
3.8.3结果	26
3.8.4结论	26
3.9T-系列膜包的颗粒脱落	26
3.9.1结果	27
4.质量保证 (QA)	27
4.1质量控制方法	27
4.1.1标签	28
4.1.2质量保证书	28
5.生物安全性评估及测试步骤	29
5.1介绍	29
5.2测试步骤概要	29
5.2.1结果	30
5.3结构材质标准概要	30
6.具体方法	31
6.1膜包冲洗步骤 (预处理)	31

6.1.1初步冲洗	31
6.1.2NaOH循环 : 0.1-0.5N	31
6.1.3NaOH循环后的冲洗	31
6.1.4水循环 (3X)	32
6.1.5最终冲洗	32
6.2Omega膜T-系列膜包的溶出物测定步骤	32
6.2.1设备	32
6.2.2装置和材料的准备	33
6.2.3溶出测试步骤	33
6.3测定NVR的步骤	34
6.3.1常用清洁剂化学兼容性的测定	35
兼容性测定方法	35
7.检测方法	35
7.1清洁剂和保存液的检测方法	35
7.1.1氢氧化钠	35
7.1.2甘油	36
7.2内毒素分析流程——ThermoMax显色分析	36
7.2.1介绍	36
7.2.2检测限值	36
7.2.3实验准备	36
7.2.4试剂	37
7.2.5Endochromeu测试	37
7.2.6ThermoMax设置	38
7.2.7LAL测试	38
7.2.8结果阐释	39
7.2.9分析水平限定	39
8.生物安全性测试	39
9.术语表	42

1. 本文件编写目的

本文件为Pall Omega T-系列切向流（TFF）膜包提供了验证支持信息，包括支持各项测试的简要数据，如生物安全性、溶出物、化学兼容性、物理性质与性能品质，以及使用条件（比如温度限值、化学性限值、清洗、冲洗、完整性检测和操作方法）等。本指南中所涉及的数据，均是在标准条件和规范下测试所得。本指南中所涉及的方法和信息，其设计目的是为使用者提供Omega T-系列TFF膜包在实际使用条件下进行验证的相关指导。

颇尔生命科学部为用户TFF技术的工艺开发、故障解决以及验证等提供技术支持。

1.1 过滤工艺验证——基本概念

TFF膜包在生物制药溶液及产品的纯化、浓缩和分离方面扮演着重要角色。其典型应用包括浓缩人血浆组分，酶和蛋白质溶液的下游工艺，以及收获哺乳动物或细菌细胞等。因此，利用膜包进行的TFF工艺验证是确保产品安全性、产品有效性的关键环节。

美国食品药品监督管理局将验证定义为：“建立备有证明文档的记录，该记录可为某一特定的生产工艺进行持续生产提供高度保险，以符合预订标准和质量要求。” [成品药品现行的优良生产质量规范（cGMP），21 CFR 210.3]。就TFF工艺而言，其验证还为过滤工艺的重复性和持续性提供保证。

对于任何已存在的工艺，功能性设计标准必须要根据中试规模的工艺需求及其产生的数据而编写。对于使用Omega T-系列膜包的TFF工艺而言，该标准应包括对膜包性能限值内的操作方法的开发，而相关限值包含于本验证指南、每个膜包的操作说明以及随膜包提供的保养与使用手册。

随后便可设计并建立一套工艺系统从而能够将中试或小试规模所建立的参数条件直接进行放大。由于TFF膜包需要整合到复杂的系统中，因此三个阶段的系统验证需按如下顺序执行：安装确认（IQ），操作确认（OQ），以及性能确认（PQ）。

1.2 安装确认（IQ）

执行IQ时应检查为工艺所选择的膜包到位并安装在系统内，并且应附有诸如扭力设置等详细的安装步骤。另外，该环节需要确认所有膜包所需的文件都已收到（操作说明和资质证明）。

1.3 操作确认 (OQ)

在OQ期间，验证人员将测试膜包在线工艺的参数范围和操作限值并将其归档。OQ并非一定要在客户生产工艺区域内完成。验证人员通常会模拟生产条件下的最恶劣条件进行相关研究，如采用水或其它模拟工艺流体进行恶劣条件下操作。作为OQ的一部分，验证人员也需要对操作方法进行验证并归档，例如与膜包操作相关的冲洗和消毒等步骤。

1.4 性能确认 (PQ)

PQ包括在实际操作条件下，对使用膜包生产终端产品的过滤工艺参数进行测试，包括安装、消毒、平衡、浓缩、洗滤、产品回收及清洗等等。PQ阶段所涉及的首要要素包括化学兼容性和截留特性。由于验证某工艺的目的是为保证达到该工艺的预期目标，因此PQ提供了最深入的工艺验证数据（由系统运行过程中所收集的实时的性能参数加以确认），而这些数据来自预期操作条件下的工艺本身。PQ并非必须提供系统运行时的设计限值（警报条件）数据，因为工艺条件可能根本不会达到这些限值。

常规产品的生产商必须要为他们特定的产品制定并递交方案、资质文件以及验证文件，以获得生产制造和产品上市的批准。

2. 产品参数

为了便于准备IQ文件，此章节提供了Omega T-系列膜包的结构材质、物理特性以及基本性能等信息。

2.1 包装

膜包均用热封塑料袋独立包装，膜包侧面印有如下信息（图1）：

- 公司名称
- 膜包类型
- 标准截留分子量 (NMWC)
- 膜包形式
- 膜面积
- 型号
- 序列号

交付的膜包还附有两片塑料袋包装的硅胶垫片、测试证明、T-系列膜包保养与使用手册（USD 2433b）和MSDS文件（需要时）等。

图1 膜包侧面印刷的信息举例：

PALL	OMEGA 30kD T-SERIES	CENTRASETTE TET	0.5 SQ.M/5.38 SQ.FT PART # OS030T06	SER#	36172001R
-------------	------------------------	--------------------	--	-------------	-----------

2.2 产品型号

产品型号提供了膜包的具体信息。例如，型号OS030T12代表30kD Omega膜、Centramate T-系列筛网通道及0.1m²（1.1ft²）膜面积（图2）。

产品型号可解读膜包的具体信息。

图2 产品型号

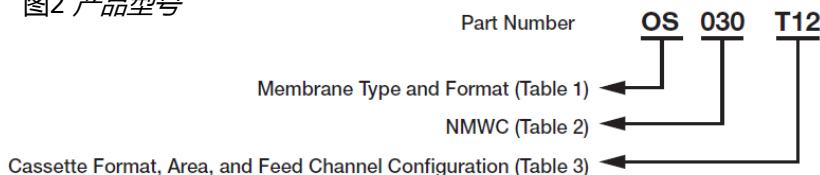


表1 膜类型的鉴别码

Part Number (Digits 1 – 2)	Membrane Type
OS	Omega

表2 NMWC的鉴别码

Part Number (Digits 3 – 5)	NMWC
001 – 300	1 – 300 kD

表3 膜包形式和进料流道结构的鉴别码

Part Number (Digits 6 – 8)	Cassette Format, Feed Channel Configuration	Membrane Area (Nominal)
T02	Centramate Screen Channel	186 cm ² (0.2 ft ²)
T12	Centramate Screen Channel	0.1 m ² (1.1 ft ²)
T06	Centrasette Screen Channel	0.5 m ² (5.4 ft ²)
T26	Centrasette Screen Channel	2.5 m ² (27 ft ²)

2.3 序列号

可通过唯一的序列号追溯膜包的下列信息：

- 生产日期
- 生产时使用的组件
- 制造时膜批次的水渗透性
- 2barg (30psi) 时空气完整性 (前进流) 测试结果
- 膜标记保存
- 制造工厂地点

根据序列号和生产记录，各组件可以追溯其材料来源。

2.4 结构材质

2.4.1 膜

Omega膜为聚醚砜材质。基质为多孔聚烯烃，从而赋予膜产品良好的强度和硬度。包括支撑层标称厚度为220 μm 。

2.4.2 筛网

筛网为聚丙烯材质，标称厚度为400-425 μm 。

2.4.3 边封

边封由聚氨酯添加白色颜料——TiO₂构成。

2.4.4 密封件

密封件由铂封硅胶构成，符合70 $^{\circ}\text{C}$ 下USP VI级相关规定。

2.4.5 垫片

垫片由医疗等级的铂封硅橡胶构成，符合70 $^{\circ}\text{C}$ 下USP VI级相关规定。标称厚度1.6mm (0.063 in.) 。

2.5 规格

Pall公司生产一系列不同结构和膜面积的膜包（表4）。这使其具有可根据需求而直接线性放大或缩小的能力。

图3 膜包筛网通道结构

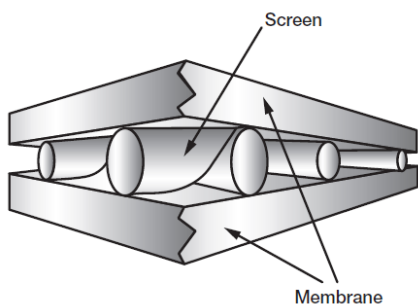


表4 Omega T-系列TFF膜包物理规格 (标称)

Cassette Format	Centramate	Centramate	Centrasette	Centrasette
Part Code	T02	T12	T06	T26
Area	186 cm ² (0.2 ft ²)	0.1 m ² (1.1 ft ²)	0.5 m ² (5.4 ft ²)	2.5 m ² (27 ft ²)
Weight — kg (lb)*	0.083 (0.183)	0.16 (0.35)	0.47 (1.04)	2.00 (4.41)
Thickness — cm (in.)	0.316 (0.124)	1.6 (0.6)	1.6 (0.6)	7.4 (2.9)
Length — cm (in.)	20 (7.9)	20 (7.9)	20 (7.9)	20 (7.9)
Width — cm (in.)	5.6 (22)	5.6 (2.2)	18 (7.1)	18 (7.1)
Flow Path length — cm (in.) (port center to center)	17 (6.7)	17 (6.7)	17 (6.7)	17 (6.7)
Flow path width — cm (in.)	3.2 (1.3)	3.2 (1.3)	16 (6.3)	16 (6.3)
Port diameter feed — cm (in.)	1.1 (0.4)	1.1 (0.4)	1.1 (0.4)	1.1 (0.4)
Number of feed ports	1	1	5	5
Port diameter retentate — cm (in.)	1.1 (0.4)	1.1 (0.4)	1.1 (0.4)	1.1 (0.4)
Number of retentate ports	1	1	5	5
Port diameter permeate — cm (in.)	0.8 (0.3)	0.8 (0.3)	0.8 (0.3)	0.8 (0.3)
Number of permeate ports	2	2	8	8

* Approximate weight of a cassette as shipped in a bag (no outer packaging). The cassette is wetted with a storage solution and drained. Weights may vary due to different amounts of storage solution remaining in the cassette.

2.6 操作压力和温度

膜包对压力、温度、压差（进料端压力减去回流端压力）和PH值具有操作限制要求（表5）。

表5 Omega 膜（所有形式）的T系列膜包的压力、温度和PH值的操作限值。

Maximum Recommended Operating Pressure**	Maximum TMP	Temperature Range	pH Range
6 barg (87 psig) @ 23 °C	4 barg (58 psig) @ 55 °C	-5 to 55 °C	2 to 14 @ 4 barg (58 psig) @ 55 °C

** Torque value must be set to the recommended level to avoid leaks.

2.7 标准水通量 (NWP) 范围

NWP是测量膜的水透过率。水质、温度和压力均影响NWP。最低限度下，用于测量NWP的水应该是经蒸馏、去离子（DI）、0.2微米滤膜过滤，或最好是制药级别（USP注射用水、以下简称WFI）。水中的微生物、有机物，或矿物质的存在均可能影响NWP。

2.7.1 用于T-系列膜包的Omega膜的NWP说明

NWP在超滤装置中使用43 mm膜片进行测量，所抽取的膜片样品来自每批次膜生产的初段、中段和末段。（表6）

表6 Omega膜T系列膜包的NWP参数

Membrane	NWP on Disc Membrane		
	mL/min/cm ² @ 25 °C	LMH/psig @ 25 °C	LMH/barg @ 25 °C
1 kD	> 0.03 at 3.74 barg (55 psig)	> 0.33	> 4.8
5 kD	> 0.15 at 3.74 barg (55 psig)	> 1.6	> 24
10 kD	> 0.65 at 3.74 barg (55 psig)	> 7.1	> 100
30 kD	> 1.5 at 3.74 barg (55 psig)	> 16	> 235
50 kD	> 1.8 at 3.74 barg (55 psig)	> 19	> 280
70 kD	> 1.8 at 3.74 barg (55 psig)	> 19	> 280
100 kD	> 5.0 at 3.74 barg (55 psig)	> 55	> 810
300 kD	> 0.7 at 0.68 barg (10 psig)	> 42	> 620

2.8 膜溶质渗透说明

由于该试验具有破坏性，因此在成形的膜包不进行该测定。但是，如需要，可以对膜包进行溶质渗透测定以鉴定其溶质渗透特性。来自膜片的溶质渗透数据因其不同结构间的压力差的不同而有所差异；例如，在渗透通道上的压差。由于试验为破坏性行为，所以接触到不同物质的膜包可能无法在其他方面重复使用（如制药工艺）。要诊断特定的问题，可以切开膜包，取出膜层用于试验。如果需要了解该试验，请联系颇尔公司获得支持。

表7 溶质渗透特性——超滤

NMWC and Pore Size	Primary Solute	Passage (%)	Secondary Solute	Passage (%)	Test Pressure barg (psig)
1 kD	Bacitracin	< 35	N/A*	N/A	3.8 (55)
5 kD	PVP K15	25 – 40	N/A	N/A	3.8 (55)
10 kD	PVP K15	50 – 80	N/A	N/A	3.8 (55)
30 kD	BSA	< 5	PVP K30	15 – 35	3.8 (55)
50 kD	BSA	< 25	PVP K30	< 35 – 80	3.8 (55)
70 kD	BSA	< 25 – 80	PVP K30	< 50	3.8 (55)
100 kD	BSA	> 85	IgG	≤ 30	3.8 (55)
300 kD	IgG	< 82	Blue Dextran	< 15	0.68 (10)

* N/A Not Applicable

2.9 测试用溶质浓度及检测方法

表8列出了用于测试膜溶质渗透的溶质浓度和检测方法。

表8 用于测试膜的溶质浓度和检测方法

Test Solute	Source*	Concentration (%)	Detection Method	Solvent
PVP K15	ISP Tech.	0.17	Refractometer	DI water
BSA	Sigma	0.2	UV @ 280 Nm	PBS
IgG	Sigma	0.1	UV @ 280 Nm	0.85% salt (w/v) in DI water

* or equivalent

2.10 膜完整性——前进流测试值

膜的完整性试验是指测量空气在指定压力下的前进流以判断膜的完整性。空气的前进流是对通过膜孔内液体的空气扩散、通过开放孔的空气流量、加上密封圈周围的空气泄漏进行的测量。该试验用于鉴别膜包或膜密封圈的总体缺陷。不同型式的膜包其膜前进流完整性测试值见表9。

当使用带质量流量计的完整性检测仪进行测量时，只能使用容器（优良品质的设备）里经过滤的干燥空气或氮气。在夹具内部的空气和氮气的波动及温度变化可能会导致不一致的结果。应先对膜包充分润湿，然后再进行膜的完整性测试，否则所测得前进流值将会很高。润湿膜包和测量前进流的步骤详见“使用及保存手册”（USD 2433b）。

表9 膜完整性测试——前进流限值

Membrane NMWC	Test Pressure	Allowable Air Forward Flow Rate per unit area of membrane (*, **)
< 300 kD	2.0 barg (30 psig)	< 1600 sccm/m ² (< 150 sccm/ft ²)

* Nitrogen can be used in place of air.

** sccm = standard cubic centimeters per minute.

2.11 新膜包和旧膜包的寿命

对于储存在氢氧化钠溶液中的膜包，其推荐保存寿命是从生产之日起至少一年。为了保证其性能，建议在4到25°C下将膜包封存在其未开封的原包装中，并且避免光线直射。使用寿命的研究还在进行中。用户应该在使用前先测试膜完整性。

在适当的条件、使用、清洗、存储、及维护下的膜包的使用寿命通常超过一年。然而，已经使用或从原包装取出的膜包，其货架期或使用寿命则无法确定。膜包的实际使用寿命将取决于如下诸多因素，如所接触的料液的品质和复杂性、工艺流体的组成、工艺温度、操作压力及清洁方案。因此，客户应该在其工艺中验证膜包重复使用的寿命。颇尔生命科学部对于重复使用的膜包的性能不作任何的担保或保证。请参考“使用及保存手册”（USD 2433b）中所推荐的储存条件。

2.12 对0.5N NaOH+500ppm NaOCl在45°C条件下的化学兼容性

生物学范畴内，氢氧化钠是一种常用并有效的清洁剂，可用于膜包的清洗、消毒及除热原。若加以次氯酸钠氧化剂则可以提高清洗和消毒的有效性。为了评估Omega T系列TFF膜包在上述混合溶液中的化学耐受性，曾进行过一项研究：使用新的Omega 100 kD T系列Centrasette膜包以测定其水通量、完整性及压差。将膜包安装在一个夹具中，在室温下用水冲洗一定时间后使用0.5N氢氧化钠+500 PPM次氯酸钠在45°C下循环2小时。这个过程重复10次或保证共20小时接触时间。在第五次和第十次循环结束后对膜包进行测定。

2.12.1 结果

0.5N氢氧化钠+500PPM次氯酸钠在45°C经过10个循环（20小时接触时间）后，膜包的所有测试参数如完整性、压差及标准水通量均在正常的运行参数范围内。

2.13 常用化学兼容性

在与化学溶液持续接触几个小时之后，膜包的化学兼容性可根据物理特性的变化进行描述。该变化可能影响尺寸、硬度、溶胀、内部密封的完整性及膜的完整性。此变化也可以从膜的功能性的角度予以描述（如水通量和截留特性）。

表10说明了Omega T系列TFF膜包在23°C（除非另有说明）时关于物理性质的化学兼容性。膜化学兼容性表仅作为参考。膜包应该在适当的溶剂和产品中根据实际操作条件和适当的时间进行试验，以确定其特定应用中的兼容性。膜的孔隙及相应的水通量和截留特性都可能会受到影响。膜包的物理变化可能是永久性的或可逆的。要确定是否为永久性的变化，应将膜包在水中冲洗并浸泡一到两天，然后再进行测试。水通量和溶质截留方面的改变可能是由于膜的物理变化所致。

表10 膜的化学兼容性图表

Reagent	Compatible*
Acetic Acid (5%)	✓
Alconox [◆] (1%)	✓
Citric acid (1%)	✓
Ethanol (70%)	✓
Formaldehyde (1%)	✓
Glycerine (50%)	✓
Guanidine HCl (6 M)	✓
Hydrochloric acid (0.1 N)	✓
Hydrogen peroxide (1%)	✓
Phosphoric acid (0.1 N)	✓
Sodium dodecyl sulfate (0.01 M)	✓
Sodium hydroxide (0.5 N @ 50 °C)	✓
Sodium hypochlorite (0.05%)	✓
Terg-a-zyme [◆] (1%)	✓
Triton [◆] X-100 (0.002 M)	✓
Urea (25%)	✓

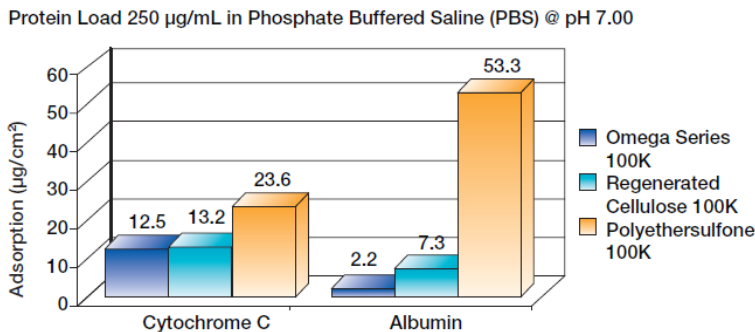
* Data for cassette membrane and components at 20 °C, 24-hour exposure, unless otherwise noted. There may be changes in porosity and/or selectivity of membrane.

2.14 蛋白质吸附特性

Omega膜具有较低的非特异性吸附特性。蛋白质或其他物质吸附（非特异性结合）到膜的实际数量取决于该物质的具体性质。膜对某分子的吸附性的差别在很大程度上依赖于其环境条件（即，所处溶液的化学成分，以及溶液中存在的其他溶质的数量和浓度）。PH值、离子强度、温度和浓度的变化对结合特性有重大影响。缓冲物质、清洁剂及有机溶剂也影响结合。如果吸附是关注的焦点，那么可以对膜片进行研究，使用实际样品或缓冲液以测定非特异性吸附水平。

图4对比了在PH7.0磷酸盐缓冲液中白蛋白和细胞色素C对三种不同膜材料的非特异性吸附特性。白蛋白和细胞色素C的等电点分别为4.6和10。在PH7时，白蛋白带负电，细胞色素C带正电。

图4 三种膜材料的非特异性吸附特性



Reference: Strumeyer, Dr. David H, Department of Biochemistry and Microbiology, Rutgers University. Paper presented at 1986 Membrane Conference, Boston, MA.

3. 验证程序

本节介绍了颇尔公司用于验证Omega T系列TFF膜包特定的化学和物理特性的方法。

3.1 在推荐的最大操作压力下高、低温的操作测试

Omega 10 kD膜T系列Centrasette 膜包 (型号 OS010T26 , 高温) 和 Omega 30 kD 膜 (型号OS010T26 , 低温) 在水中低温和高温循环实验为条件, 进行空气前进流完整性测试 (IT), 压降 (DP) 及标准水通量 (NWP) 值的测定。在推荐的最大操作压力下, 每个膜包经预处理后, 再经6次3小时的循环运行。测试重复3次。每个膜包均经过如下的测试方案:

低温度 : : -7 到 -5°C @ 6 bar (87 psig) 的进料端压力

高温度 : 55 到 60°C@ 4 bar (58 psig) 的进料端压力

3.1.1 进料端压力为6 barg (87 psi) 时的低温测试

测试条件 : 水温在-7 到 -5°C之间 ; 进料端压力为6 bar (87 psig) ; 10 x 2小时循环周期

3.1.1.1 步骤

1. 测定膜包初始的IT、DP和NWP值。
2. 在夹具内安装膜包。
3. 打开进料端、回流端和滤出端阀门。
4. 调节泵速、回流阀和滤出阀以使进料端压力达到6bar (87 psig) , 并且使回流流速达到5-10L/min/m² (0.5-1.0L/min/ft²) 。
5. 使用冷却器以使温度降至-7到-5°C之间。当水温至此温度范围内启动计时器。
6. 循环2小时。过程中视情况所需, 可调整压力和回流流速。
7. 2小时后, 排空系统并将膜包从夹具内取出。
8. 环境温度条件下将膜包安装到另一个夹具内。
9. 单独测定每个膜包的相关参数。
10. 重复步骤2到9至少九次 (共10 x 2小时循环周期)

3.1.1.2 结果

在低温循环操作条件下对两个Omega 30 kD膜的T系列Centrasette膜包进行测定。在-7 到 -5°C的水中进行10 x 2小时循环后, 所有膜包的完整性、压差及标准水通量均在正常操作限值以内。

3.1.2 进料端压力为4bar (58 psig) 时的高温测试

测试条件：水温在55 至60°C之间；进料端压力 4 bar (58 psig) ；
6 x 3小时循环周期。

3.1.2.1 步骤

1. 测定膜包初始的IT、DP和NWP值。
2. 在夹具内安装膜包。
3. 打开进料端、回流端和滤出端阀门。
4. 调节泵速、回流阀和滤出阀以使进料端压力达到4bar (58 psig) ，并且使回流流速达到5-10L/min/m² (0.5-1.0L/min/ft²) 。
5. 使用加热器以使温度升至55到60°C之间。当水温至此温度范围内启动计时器。
6. 循环3小时。过程中视情况所需，可调整压力和回流流速。
7. 3小时后，排空系统并将膜包从夹具内取出。
8. 环境温度条件下将膜包安装到另一个夹具内。
9. 单独测定每个膜包的相关参数。
10. 重复步骤2到9至少五次 (共6 x 3小时循环周期) 。

3.1.2.2 结果

在高温循环操作条件下对三个Omega 10 kD膜的T系列Centrasette膜包进行测定。在55到60°C的水中进行6 x 3小时循环后，所有膜包的完整性、压差及标准水通量均在正常操作限值以内。

3.2 环境温度下的最大压力测试

为确认膜包在最大操作压力下的性能，使用三个 (3) Omega 10 kD 膜Centrasette T系列膜包 (型号OS010T26) 在6bar的进料端压力及环境温度下，进行20 x 1小时循环。

3.2.1 步骤

1. 将膜包安装在夹具内。
2. 测定膜包初始的IT、DP和NWP值。
3. 连接系统以进行循环运行。
4. 调节泵速使回流流速大约至5 L/min/m² (0.5 L/min/ft²) 。

5. 调节回流阀和泵速以使达到6bar (87 psig) 的进料端压力，并且使回流端流量占总流量的75%，使滤出端流量占总流量的25%。保持此状态1小时。
6. 经过一小时后，降低进料端压力至1.7bar (25 psig) 保持5分钟。此为一个循环周期。
7. 测定膜包的IT、DP和NWP值。
8. 重复进行步骤3到7。分别在循环进行5, 10, 15, 16, 17, 18, 19及20小时后测定膜包的IT、DP及NWP值。

3.2.2 结果

在6bar (87 psig) 的进料端压力和环境温度下经过二十 (20) 次1小时的循环，所有膜包的完整性、压差及标准水通量均在正常操作限值以内。初始测量值和经20次循环后的测量值之间并无显著变化。

3.3 化学兼容性

3.3.1 介绍

在消毒和清洁过程中膜包可能会接触很多化学品。为了评估常用化学品对膜包性能的影响，将膜包在模拟的典型恶劣情况下与化学物品相接触。用于评估膜包在接触化学品后的性能标准是水通量和膜完整性测试。

3.3.2 范围

在不同的条件下选择了三种不同的具有常用清洁剂代表性的溶液。这些溶液和接触条件为：

1. 1.0 N NaOH 溶液在23°C下 28 天
2. 0.1 N H₃PO₄ 溶液在45°C下 28 天
3. 25% EtOH 溶液在23°C下 28 天

典型的清洁方案所耗时均小于三小时。通常在清洁过程中除了须进行腐蚀性的清洗外，很少用到如磷酸等酸物质，且清洗时间较短（1至1.5小时）。因此，在这项研究中接触时长大约相当于每年内一个清洗周期/天（每周以4到5天计）。选用Omega 100 kD 膜 Centrasette T系列膜包（Part No. OS100T06）进行本研究。具有不同截留分子量的Omega膜T系列膜包的组件和结构的材料是相同的；因此，其所受测试溶液影响的效果应相同。本研究以平行实验方式进行。

3.3.3 方法摘要

选用新的Omega 100 kD膜T系列 Centrasette 膜包以进行三种溶液的测试。膜包在水中完整性、压差及标准水通量的测定。

膜包安装在夹具内，测试溶液在膜包内循环15分钟。然后将膜包从夹具内取出，并浸泡在含有该测试溶液的塑料包装中。密封塑料包装后将其保存在相应的温度条件下。经过指定的时长后，从塑料包装中取出膜包，安装在夹具内，用经0.2μm滤膜过滤的DI水冲洗，并根据相应方法再次对膜包进行测定。

表11 与1.0 N NaOH 溶液 (23°C) 的兼容性

Cassette and Serial Number	NWP @ 10 psig (LMH/psig)		
	Initial	After 14 days	After 28 days
Omega T06, 100 kD			
36036044R	34	35	
36019072R	37		36

Cassette and Serial Number	DP 5 L/min/m ² (0.5 L/min/ft ²) CFF (psig)		
	Initial	After 14 days	After 28 days
Omega T06, 100 kD			
36036044R	7.0	6.0	
36019072R	7.0		6.0

Cassette and Serial Number	Air Forward Flow IT @ 2 barg (30 psig) sccm/ft ²		
	Initial	After 14 days	After 28 days
Omega T06, 100 kD			
36036044R	45	9.0	
36019072R	45		16

表12 与0.1N H₃PO₄ 溶液 (45°C) 的兼容性

Cassette and Serial Number	NWP @ 10 psig (LMH/psig)		
	Initial	After 14 days	After 28 days
Omega T06, 100 kD			
36020074R	26	29	
36038080R	34		36

Cassette and Serial Number	DP 5 L/min/m ² (0.5 L/min/ft ²) CFF (psig)		
	Initial	After 14 days	After 28 days
Omega T06, 100 kD			
36020074R	5.0	6.0	
36038080R	7.5		4.2

表12 与0.1N H₃PO₄ 溶液 (45°C) 的兼容性

Cassette and Serial Number	Air Forward Flow IT @ 2 barg (30 psig) sccm/ft ²		
	Initial	After 14 days	After 28 days
Omega T06, 100 kD			
36020074R	9.0	11	
36038080R	6.7		16

表13 与 25% Ethanol溶液 (23°C) 兼容性

Cassette and Serial Number	NWP @ 10 psig (LMH/psig)		
	Initial	After 14 days	After 28 days
Omega T06, 100 kD			
36039049R	33	33	
36020077R	36		38

Cassette and Serial Number	DP 5 L/min/m ² (0.5 L/min/ft ²) CFF (psig)		
	Initial	After 14 days	After 28 days
Omega T06, 100 kD			
36039049R	8.0	9.1	
36020077R	7.5		7.2

Cassette and Serial Number	Air Forward Flow IT @ 2 barg (30 psig) sccm/ft ²		
	Initial	After 14 days	After 28 days
Omega T06, 100 kD			
36039049R	17	16	
36020077R	26		8.0

3.3.4 结果

选择三种常用清洗剂溶液作为代表。溶液与相应的接触的条件是：1. 1.0 N NaOH 溶液在 23°C下28天；2. 0.1 N H₃PO₄ 溶液在 45°C下 28天；3. 25% EtOH 溶液在23°C 28天。在指定的温度和时长下接触这些化学溶液后，所有膜包的IT、DP及NWP值均在正常操作限值之内。初始测量值和测试溶液中经指定时间浸泡后的测量值之间并无显著变化。

3.4 清洗剂兼容性——高/低pH值

在实际的清洗过程中，为去除残留的产品和堵塞物，膜包经常会接触到极端pH值（2到14）、高温和高压等极端恶劣条件。为了评估这些条件对T系列膜包的影响，选用Omega 30 kD 膜 Centrasette T系列膜包（型号OS030T06）在模拟条件下进行研究。此研究中低pH值实验为：在45°C下进料端压力为4 bar（58 psig）时，于0.1 N磷酸溶液中循环6×3小时。高pH值实验为：在55°C下进料端压力为4bar（58 psig）时，于0.5 N氢氧化钠溶液中循环6×3小时。测试步骤和结果总结如下。

3.4.1 低pH值清洗研究

测试条件。

0.1 N 磷酸；45°C ±5；进料端压力 4bar（58 psig）；6 x 3小时循环周期

3.4.1.1 步骤

1. 分别测定每个膜包的IT、DP及NWP值。
2. 准备4L 0.1 N磷酸溶液，并加热到45 ± 5°C。
3. 将膜包安装到夹具内。
4. 打开进料端、回流端和滤出端阀门。
5. 调整回流阀和泵速使进料端压力在4bar（58 psig）时流速达到10 L/min/m²（1 L/min/ft²）。
6. 当酸溶液温度达到45°C时启动计时器。不要超过50°C。根据需要调整力矩。
7. 循环运行3小时。视情况需要调整压力/流速。
8. 排空系统。将进料液罐内注入水。
9. 在环境温度下，用5 L的DI水冲洗回流端直至系统排空（滤出阀部分关闭），过程中保持进料端压力为1bar（15 psig）。
10. 在环境温度下，用5 L的DI水冲洗滤出端直至系统排空（关闭回流阀），过程中保持进料端压力为1.4-2.0bar（20-30 psig）。
11. 取出膜包。
12. 单独安装膜包。
13. 循环水；测试PH值，排空水后再用清水冲洗，直到PH值达到7。
14. 测定每个膜包的IT、DP及NWP值。
15. 再将步骤2到14重复5次（共6 x 3小时循环周期）。

3.4.1.2 结果

在高温 (45°C ± 5) 和进料端压力4bar (58 psig) 下, 经低PH值 (~2) 溶液对Omega 30 kD膜Centrasette T-系列膜包循环6次之后, 其NWP大约降低了25-30%。压差有所上升但是未超过规定的范围。完整性未受影响。

表14 低pH值, 0.1 N H₃PO₄溶液, 进料端压力4bar (58 psig), 45°C

Cassette and Serial Number	NWP @ 10 psig (LMH/psig)		DP 5 L/min/m ² (0.5 L/min/ft ²) CFF (psig)		Air Forward Flow IT @ 2 barg (30 psig) sccm/ft ²	
	Initial	After 6 cycles	Initial	After 6 cycles	Initial	After 6 cycles
Omega T26, 10 kD						
35068064R	31	24	9.5	14.5	95	68
35068065R	32	23	9	15	88	50

sccm = standard cubic centimeters per minute

3.4.2 高pH 值清洗研究

3.4.2.1 步骤

1. 分别测定每个膜包的IT、DP及NWP值。
2. 准备4L 0.5 N氢氧化钠溶液并加热至55°C ± 5。
3. 将膜包安装到夹具内。
4. 打开进料端、回流端和滤出端阀门。
5. 调整回流阀和泵速使进料端压力在4bar (58 psig) 时流速达到10 L/min/m² (1 L/min/ft²) 。
6. 当0.5N氢氧化钠溶液温度达到55°C时启动计时器。
7. 不要超过60°C。根据需要调整力矩。
8. 循环运行3小时。视情况需要调整压力/流速。
9. 排空系统。将进料液罐内注入水。
10. 在环境温度下, 用5 L的DI水冲洗回流端直至系统排空 (滤出阀部分关闭), 过程中保持进料端压力为1bar (15 psig) 。
11. 在环境温度下, 用5 L的DI水冲洗滤出端直至系统排空 (关闭回流阀), 过程中保持进料端压力为1.4-2.0bar (20-30 psig) 。
12. 取出膜包。
13. 单独安装膜包。
14. 循环水; 测试PH值, 排空水后再用清水冲洗, 直到PH值 < 9。
15. 测定每个膜包的IT、DP及NWP值。
16. 再将步骤2到14重复5次 (共6 x 3小时循环周期) 。

3.4.2.2 结果

在高温 (55°C ± 5) 和进料端压力4bar (58 psig) 下, 经高PH值 (~13) 溶液对Omega 30 kD膜Centrasette T-系列膜包循环6次之后, 其NWP大约降低了25-30%。压差有所上升但是未超过规定的范围。完整性未受影响。

表15 高PH值, 0.5N氢氧化钠, 进料端压力4bar (58 psig), 55°C

Cassette and Serial Number	NWP @ 10 psig (LMH/psig)		DP @ 5 L/min/m ² (0.5 L/min/ft ²) CFF (psig)		Air Forward Flow IT @ 2 barg (30 psig) sccm/ft ²	
	Initial	After 6 cycles	Initial	After 6 cycles	Initial	After 6 cycles
Omega T26, 10 kD						
35049040R	36	25	9.2	12	39	20
35049041R	36	23	9.0	12	50	26

3.5 去除保存液的膜包冲洗步骤

在应用TFF工艺之前, 已对新的和所保存的T系列膜包开发出相应的预处理流程, 其目的是为了去除保存液并降低总有机碳含量 (TOC)。该流程包括以下步骤:

3.5.1 安装膜包

预处理流程的详见第6.1章节。

1. 用DI水冲洗系统并排净 (冲洗出大量保存液)。
2. 用40-45°C的0.5 N NaOH溶液进行消毒。
3. 用DI水冲洗系统并排净 (冲洗氢氧化钠)。
- 4-6. 用水循环清洗30分钟 (3次循环)。
7. 最后用水冲洗并排净。

为了评估冲洗/消毒步骤的有效性, 将Omega 10 kD 膜Centramate T系列膜包采用该流程进行预处理。每个步骤结束后对冲洗或循环溶液在回流端及滤出端取样以进行TOC分析。结果见表16。

表16 膜包冲洗研究的TOC结果

Cassette Serial No.	36017055R		36013056R		36013060R	
	TOC (PPM) Retentate	Permeate	TOC (PPM) Retentate	Permeate	TOC (PPM) Retentate	Permeate
Pre-conditioning Step						
Step 1	1.0	283	1.59	279	0.8	195
Step 3	0.2	18.3	0.3	19.7	0.33	5.3
Step 4	23.7	21.3	14.3	16.4	12.4	11.9
Step 5	11.2	10.8	15.0	16.9	9.2	9.5
Step 6	7.1	7.6	9.1	10.9	7.0	8.0
Step 7	< 0.1	2.57	< 0.1	1.96	< 0.1	1.96

TOC of flushing water is < 0.1 PPM

3.5.2 结果

按照第6.1章节中介绍的预处理流程进行实验，最终冲洗后其回流端和滤出端的TOC含量低于1 PPM。

3.6 溶出物测试

3.6.1 介绍

该测试的目的是为了对Omega T系列膜包按流程经预处理后，对水基溶液可能产生的非挥发性残留物（NVR）进行定量和定性分析。

T系列膜包采用聚氨酯密封将多层膜和筛网支撑层压缩成形。

Centramate 和 Centrasette膜包采用相同的材料，并经相同的方法而制成。因此，对于一种型式的膜包，其溶出物检测结果可适用于所有型式的膜包。

3.6.2 方法摘要

采用Omega 10 kD Centrasette T系列膜包（型号 OS010T26）进行溶出物测试。按推荐的标准方法对膜包进行冲洗和消毒。然后按照第6.2.3章节介绍的溶出测试方法对膜包进行溶出测试，即用50°C下的水或23°C下25%的乙醇在膜包内循环运行16个小时。经此溶出操作后，将液体排出并收集以便分析。进行第二次16小时溶出测试（在相同的条件下使用更多的同种溶液）以阐明其是否具有可再溶出的特性。之所以采取上述测试条件其目的在于将溶出量最大化。使用每种溶剂进行测试时都设有阴性对照（仅有夹具和冲洗垫圈，不含膜包）。将每1000 mL溶出液分装进行蒸发至干，对NVR称量并采用红外光谱进行测定。第二个样品进行TOC分析。测试方法详见第6.3章节。每种溶液在新膜包上重复测试三次。

3.6.3 结果

对于Omega 10 kD Centrasette T系列膜包，分别取三块在50°C水中和环境温度下25%的乙醇溶液中完成连续两次16小时的溶出测试。对于2.5 m²的膜面积的膜包而言，其所溶出的NVR低于120 mg/ft²（H₂O）和 92 mg/ft²（EtOH/H₂O）。经傅立叶变换红外光谱（FTIR）及配套的分析表明：溶出物主要成分为甘油。

第一次的水溶液和乙醇溶出测试的NVR FTIR光谱吸收结果如图5和6所示。甘油的光谱吸收曲线如图7所示。NVR样品涂布于KBr压片上，并在Nicolet 6700 型号FTIR光谱仪上进行检测。

图5 NVR (水提取物) KBr压片的红外光谱

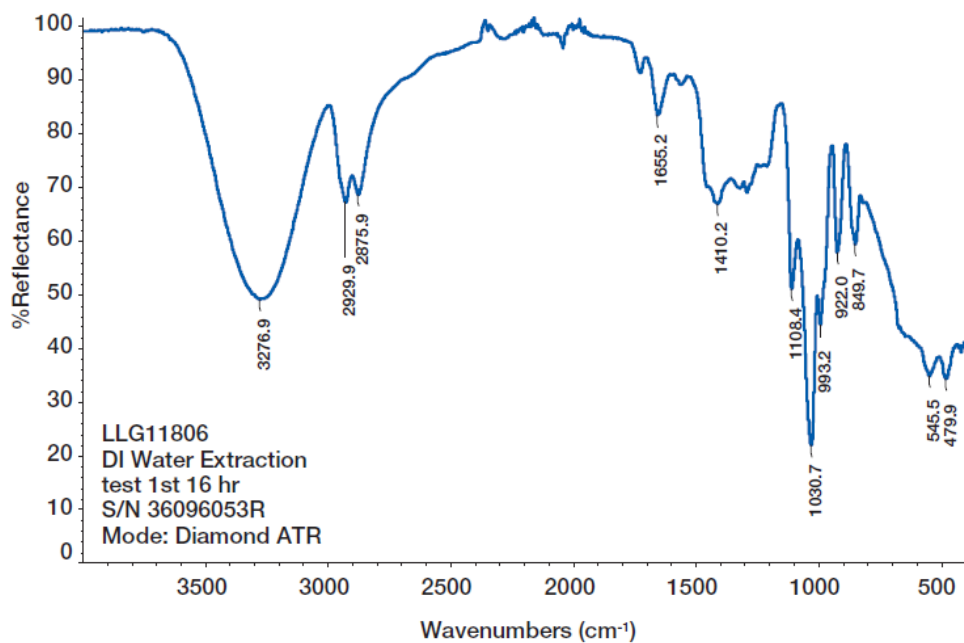


图6 NVR (25%乙醇提取物) KBr压片的红外光谱

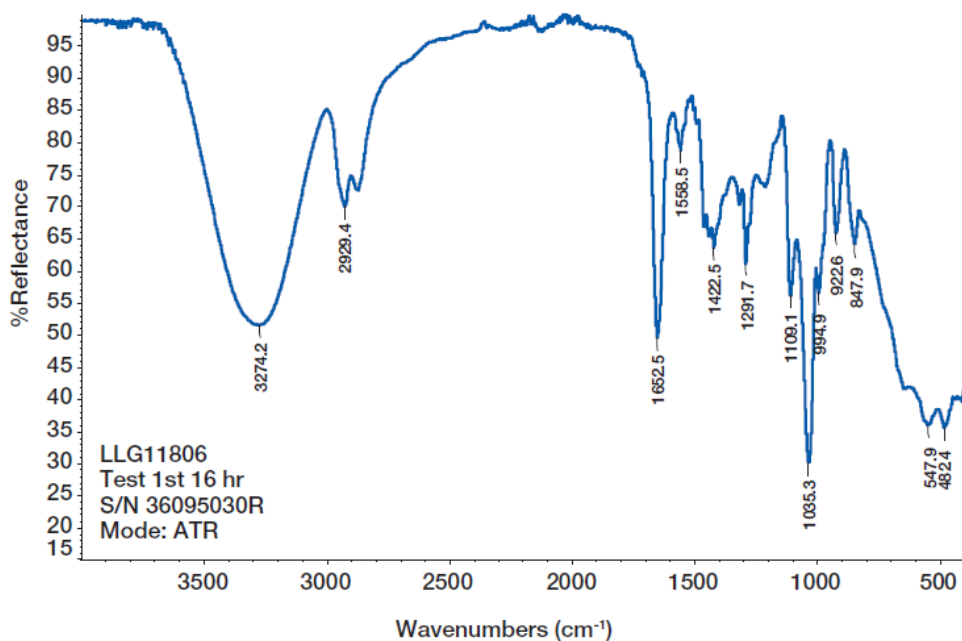
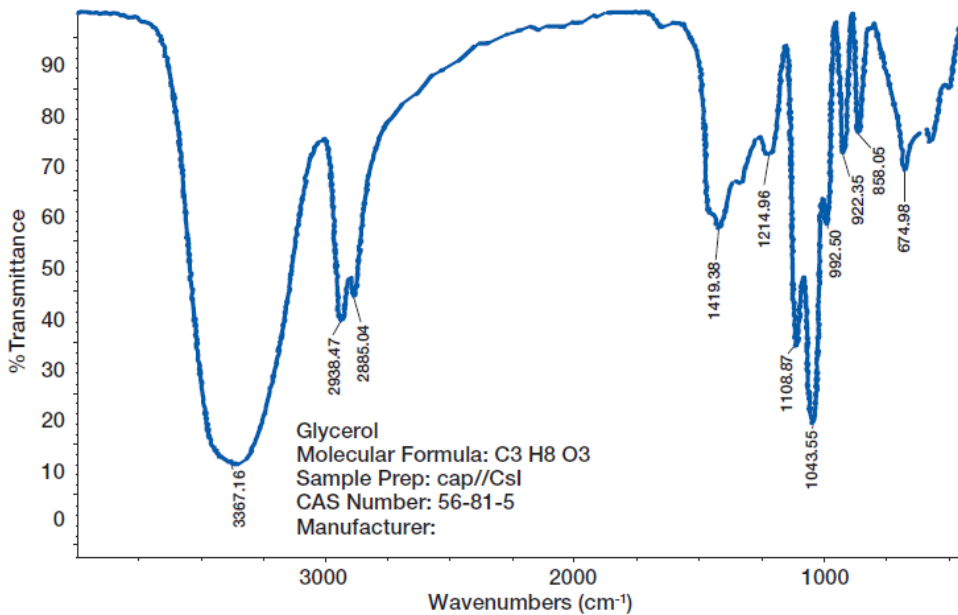


图7 甘油(丙三醇)的红外光谱



3.7 消毒处理——内毒素去除——新膜包冲洗步骤

内毒素——一种高分子脂多糖——与革兰氏阴性菌的细胞壁相关。在细胞分解过程中内毒素会释放到环境中。未经纯化的内毒素含有脂、碳水化合物和蛋白质。内毒素聚集体分子量范围约从30,000到1,000,000道尔顿。活性亚基分子量可以低至10,000道尔顿。内毒素具有致热性，也就是说它可以引起人类和动物发热，因此尤其是注射剂类医药产品必须除内毒素。内毒素可以通过鲎变形细胞溶解物试验（LAL）进行检测。检测下限依赖于所使用的溶解方法及其灵敏度。1 EU（内毒素单位）=100皮克内毒素。

3.7.1 介绍

膜包非无菌，且颇尔公司并不声明膜包无内毒素。因此使用前应对其冲洗并消毒。为了评估初始内毒素含量和所推荐冲洗步骤的有效性，需进行以下研究：

3.7.2 方法摘要

采用以下方法对Omega 10 kD Centramate T系列的新膜包（型号OS010T12）进行测试。使用ThermoMax 1法根据LAL检测对内毒素含量进行测定。LAL检测见第7.3章节。

先将Centramate夹具和系统进行清洗并检测以保证无内毒素，然后将膜包安装到夹具内。

然后对膜包执行标准预处理操作。

1. 用DI水冲洗系统并排净。
2. 用0.5 N NaOH 溶液在 40-45°C下消毒60分钟。
3. 用DI水冲洗并排净。
4. 用水循环清洗30分钟（3个循环）。
5. 最后用水冲洗并排空系统。

预处理步骤详见第6.1章节。

用无内毒素的水（ ± 0.01 EU/mL）对膜包进行冲洗并在每步冲洗后从排出液中取样。

3.7.3 结果与结论

按上述预处理步骤对新膜包首次冲洗的排出液进行内毒素含量检测。膜包冲洗排出液的内毒素含量低于检测限度（ < 0.005 EU/mL）。

3.8 消毒处理——内毒素挑战步骤

3.8.1 介绍

膜包通常会经清洗后重复多次使用。则其具有被以往所处理的样品或存储过程中细菌孳生的内毒素污染的危险。因此，膜包使用后及用于处理新样品前应降低其内毒素含量。采用以下研究以分析用0.5 N氢氧化钠进行典型的清洗流程的有效性，该流程为“使用与保存手册”（USD 2433b）中所推荐的方法。此研究也适用于对膜包预处理所推荐的标准冲洗和消毒方案（第6.1章节）。

3.8.2 方法摘要

将经过第6.1章节中介绍的标准流程进行预处理后的Omega 30 kD膜Centramate T系列膜包（型号 OS030T12）安装在Centramate夹具内。对膜包的挑战方式是用3L含约600-800 EU/mL内毒素的溶液对膜包进行1小时循环运行。TFF系统回流流速约500 mL/min（5 L/min/m²），滤出端流速约75 mL/min（0.75 L/min/m²），回流端流量为85%，滤出端流量为15%。用挑战溶液对膜包循环之后，再用水冲洗并排净（8 L通过回流端，4 L通过滤出端）。冲洗结束后对滤出端和回流端取样（以冲洗用水作为对照）。

排空系统后添加4L的0.5 N氢氧化钠溶液至进料液罐。在40-45°C下以575 mL/min (流量分配为回流端75%/滤出端25%) 的流速对膜包循环1小时以消毒。再用水冲洗膜包并排净 (8 L通过回流侧, 4 L通过滤出侧)。冲洗结束后对滤出端和回流端取样 (以冲洗用水作为对照)。

氢氧化钠溶液循环并冲洗步骤重复进行第二次, 随后用4L经0.2微米过滤的DI水中循环2小时以作为最终步骤。冲洗结束后对滤出端和回流端取样 (以冲洗用水作为对照)。

重复该流程三次, 每次测试均使用新膜包。

3.8.3 结果

内毒素挑战后用水冲洗Centramate膜包使回流端通过80 L/m² (7 L/ft²)、滤出端通过40 L/m² (4 L/ft²) , 使得冲洗液中的内毒素含量低于检测限, 即 < 0.005 EU/mL, 其中仅有一个样品内毒素含量为0.007 EU/mL。以氢氧化钠进行循环并且冲洗也是确保从膜包中清洗并去除其他污染物及微生物之所需。

3.8.4 结论

颇尔公司生命科学部所建议的冲洗、消毒和清洗流程可有效降低内毒素含量。使用上述清洁流程对经3L内毒素含量约800 EU/mL的溶液处理后的膜包进行清洁, 最终冲洗液的内毒素含量降低至最低检测限 (< 0.005 EU/mL)。

3.9 T系列膜包的颗粒脱落

膜包无纤维脱落, 因此需进行无颗粒脱落测试。原理上讲, 任何从膜包释放到产品的颗粒脱落, 已在下游工艺的终过滤之前被去除。对经正确预处理后的膜包颗粒脱落情况进行分析。

用如下方法建立最大颗粒释放的标准。此标准在USP <788> 注射剂颗粒物中被推荐使用。

表17 标准预处理冲洗后的最大颗粒释放标准

Particle Size Range (µm)	Specification Particles/mL
> 25	< 3
10 – 25	< 25

为了评估可能来自经标准流程进行预处理后的Omega T系列膜包的颗粒脱落情况，可进行如下测试。

使用三个Omega 10 kD 膜Centramate T系列膜包（型号 OS010T12）按照第6.1章节所述的标准方法进行冲洗。预处理之后，冲洗系统并排空。调整泵速使回流端在压力为0.5 barg（7 psig）下流量达到5 L/m²（0.5 L/ft²）。用20L水冲洗膜包。冲洗结束后，分别收集1L回流端和滤出端的样品用以分析。

表18 预处理后冲洗液的颗粒计数

Particle Size Range	Particle Analysis* (particles/mL)					
	1 – 10 µm		10 – 25 µm		> 25 µm	
Test Cassette	OS010T12					
Serial Number	Retentate	Permeate	Retentate	Permeate	Retentate	Permeate
36017053R	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
36013059R	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
36013061R	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1

* A sample volume of 1L was drawn down and analyzed

3.9.1 结果

遵循标准预处理方法，将T系列Centramate膜包用经0.2 µm 过滤的DI水进行冲洗，并对回流端和滤出端分别取样。将每1 L样品用过滤器抽滤后进行分析。所有分析样品在上述三种粒径范围内均少于1颗粒/mL。

4. 质量保证 (QA)

膜和膜包的生产与颇尔公司的制造说明书一致。膜包组件符合现行USP VI级对于塑料制品在70°C下的生物安全性测试的标准。

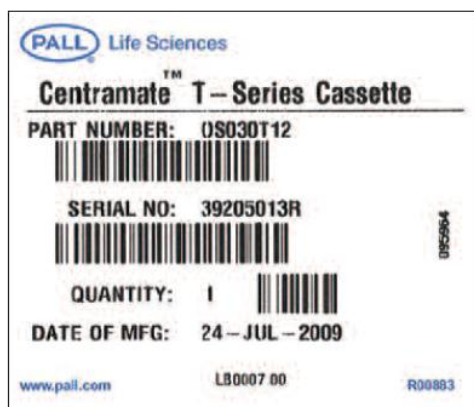
4.1 质量控制方法

用于生产的原材料在接收后都具有可追溯性并且经过检验。质量控制部检查后，经检验的原材料放行以进入仓库保存。在制造过程中，每批膜从初期、中期到末期所取的多个样品都须经质检。检测内容包括水通量和适用于特定截留分子量的溶质分子的截留/透过特性。根据需要，将质检合格的膜从库存取出，并送到装配处。将经检验的膜和其他原材料按照装配流程进行组装，并在批次质控卡上进行记录。完成组装的膜包经外观检查、加盖膜包编号后，带着批次质控卡从组装工艺进入到质量控制环节。质量控制环节检查每个膜包及其是否具有批次质控卡。然后用0.3 N 氢氧化钠（NaOH）溶液冲洗膜包，并进行完整性测试。之后，将膜包装入塑料包装并热密封。

4.1.1 标签

每个膜包密封在双层塑料袋内，并使用泡沫垫保护后封装在纸盒中。贴在支架、纸盒及塑料袋上的标签注明了其所含内容（图8）。标签上标明膜包形式，并包含型号和序列号。这些信息应该与膜包侧壁标记的信息一致（图1）。

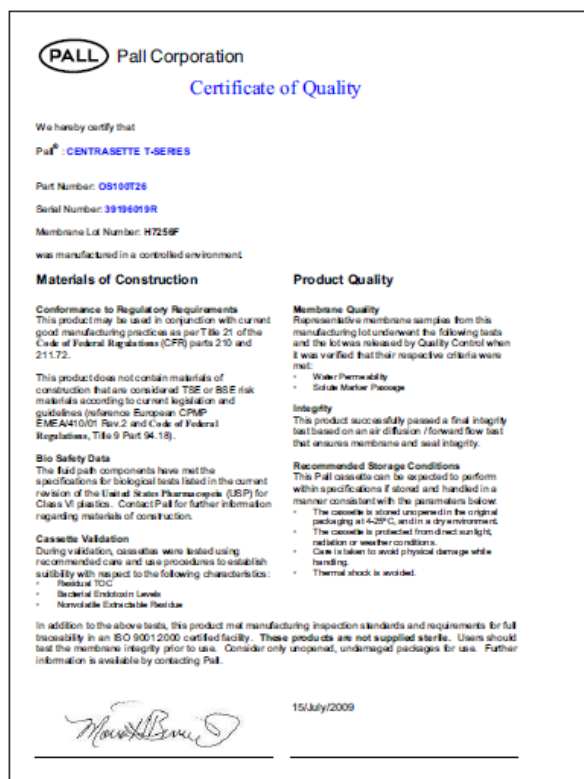
图8 纸箱标签示例



4.1.2 质量保证书

质量保证书同每个TFF膜包一起放入包装。（图9）

图9 证书的示例



5. 生物安全性评估及测试步骤

5.1 介绍

生物评估和测试的目的是评估Omega T系列膜包材料的生物适用性。测试在第三方实验室进行，旨在对生物安全性方面评估Omega T系列膜包结构材料的适用性。测试包括对塑料在生物体内的生物反应性检测（以下简称生物反应性测试），如美国药典第<88>章中描述的方法；同时还包括溶血试验，和L929 MEM-细胞毒性试验（以下简称细胞毒性试验）。

此外，测试内容还包括物质氧化性水平检测和膜包经正确方法清洗和冲洗后内毒素的检测。

5.2 测试步骤概要

美国药典中介绍的生物反应性测试包括将塑料材料溶出物注射及将材料本身植入到动物组织内。所列举溶出溶液为模拟的注射溶液和体液，包括：（1）氯化钠注射液，（2）20倍氯化钠溶液稀释的乙醇注射液，（3）聚乙二醇400，（4）植物油（芝麻油或棉籽油）。用三种标准条件中的一种来进行：50°C 72 小时，70°C 24 小时，或121°C 1小时。由于Omega T系列膜包推荐的操作温度限制为55°C，所以膜包组件在70°C进行溶出测试属最严格的测试条件，同时该条件不会导致塑料本身的物理变化。

急性全组织注射试验是为评估单一溶出物导致全组织中毒的可能性。使用静脉注射氯化钠注射液和20倍氯化钠溶液稀释的乙醇注射液。腹腔注射植物油溶出物和聚乙二醇400溶出物。

皮内试验是为评估单一溶出物导致组织刺激的可能性。使用上述四种指定溶液。

植入试验是按照美国药典中介绍的最严格的条件对构造材料进行测试。膜包的每种组件的成分分别植入。

溶血试验和细胞毒性试验用以判断由于结构材料与血液或组织接触而造成的潜在毒性。溶血试验用以确定由于接触测试材料而导致的血红细胞的溶解程度。利用细胞培养技术的细胞毒性测试用以由测试材料溶出物而导致的细胞溶解和细胞的生长抑制。

内毒素和易氧化物检测重复进行，可显示这些物质在Omega 10 kD 膜Centramate T系列膜包中经推荐的冲洗流程后在回流端和滤出端中的含量。回流端和滤出端内毒素的含量是使用ThermoMax显色法（第7.3章节）对经250 L/m²（23 L/ft²）水冲洗的膜包进行检测。易氧化物质的含量是使用比色法经相同的冲洗溶液处理后进行检测（经硫酸酸化的高锰酸钾试液）。

5.2.1 结果

所有Omega T系列膜包组件均通过生物反应性测试的要求，从而满足了USP VI级-70°C下对塑料制品的相关要求。此外，测试样品符合溶血试验和细胞毒性试验的要求。经清洗和冲洗后其细菌内毒素含量约0.018 EU/mL。滤出端无内毒素。滤出端无易氧化物质。

这些测试由以下公司进行：

Ethox International STS部门

7500 W. Henrietta Road

Rush, NY 14543

Toxicon

225 Wildwood Ave

Woburn MA 01801

如下测试结果见附录。

- USP塑料的体内生物测试
- L-929-MEM细胞毒性试验
- 溶血试验--直接与兔血接触
- 内毒素含量和易氧化物质总量

5.3 结构材质标准概要

- 聚醚砜——符合FDA 21 CFR , 177.2440部分。USP VI级-70°C下的塑料制品。
- 聚烯烃膜支持物——符合21 CFR , 176.170、177.1520、177.2800部分。USP VI级-70°C下的塑料制品。
- 聚丙烯筛网——符合21 CFR , 177.1630部分。USP VI级-70°C下的塑料制品。
- 聚氨酯密封材料——符合21 CFR , 175.103、175.300、177.2600部分。USP VI级-70°C下的塑料制品。
- 硅橡胶密封件——符合21 CFR , 175.103、175.300、177.2600部分。USP VI级-70°C下的塑料制品。
- 铂封硅橡胶，医疗级，符合21 CFR , 177.2600部分。USP VI级-70°C下的塑料制品。
- 甘油——CP/USP 级，植物来源，（作为湿润剂；冲洗即可去除）。
- 叠氮化钠——0.05到 0.1% 氢氧化钠和0.3N的叠氮化物（作为抑菌剂添加，冲洗即可去除）。

6.具体方法

6.1 膜包冲洗步骤（预处理）

处理产品之前推荐使用该步骤对膜包进行冲洗和预处理。经研究发现该方法对去除保存液和溶出物非常有效，同时可保持用水量在 150 L/m^2 （ 14 L/ft^2 ）之内。

6.1.1 初步冲洗

系统设置：将回流端和滤出端置于排放状态

用量： 25 L/m^2 （ 2 L/ft^2 ）经 $0.2 \mu\text{m}$ 滤膜过滤的DI水

温度：环境温度

1. 向进料罐添加相应量的DI水。
2. 100%打开回流阀和滤出阀。
3. 用经 $0.2 \mu\text{m}$ 滤膜过滤的DI水以 5 L/min/m^2 （ 0.5 L/min/ft^2 ）的流速冲洗回流端并排放。
4. 调整泵速和回流阀以实现流量分配为：75%流量通过回流端，25%流量通过滤出端。
5. 调整进料端压力至约 1.4 barg （ 20 psig ），回流端压力 0.8 barg （ 4 psig ），滤出端 0 barg （ 0 psig ）。
6. 冲洗后排空系统。

6.1.2 氢氧化钠循环：0.1-0.5 N

系统设置：将回流端和滤出端置于进料罐

用量： 8 L/m^2 （ 0.7 L/ft^2 ）

温度： $40\text{-}45^\circ\text{C}$

1. 向进料罐添加相应量的氢氧化钠溶液。设置系统使回流端和滤出端循环运行。
2. 调整泵速使回流端（滤出阀打开）循环流速达 5 L/min/m^2 （ 0.5 L/min/ft^2 ）。
3. 运行60分钟。
4. 停泵。排空系统。

6.1.3 氢氧化钠循环后的冲洗

系统设置：将回流端和滤出端置于排放状态

用量： 35 L/m^2 （ 3 L/ft^2 ）

温度：环境温度

1. 向进料罐添加相应量的DI水。
2. 100%打开回流阀和滤出阀。
3. 用经0.2 μm 滤膜过滤的DI水以5 L/min/m² (0.5 L/min/ft²) 的流速冲洗回流端并排放。
4. 调整泵速和回流阀以实现流量分配为：75%流量通过回流端，25%流量通过滤出端。
5. 冲洗足量停泵。

6.1.4 水循环 (3X)

系统设置：将回流端和滤出端置于进料罐

用量：8 L/m² (0.7 L/ft²)

温度：环境温度

时间：30分钟/循环 (3次循环)

1. 向进料罐添加相应量的DI水。
2. 100%打开回流阀和滤出阀。
3. 用经0.2 μm 滤膜过滤的DI水以5 L/min/m² (0.5 L/min/ft²) 的流速冲洗回流端并排放。
4. 调整泵速和回流阀以实现流量分配为：75%流量通过回流端，25%流量通过滤出端。
5. 30分钟后停泵。
6. 排空系统。
7. 再重复步骤1-6两次。

6.1.5 最终冲洗

系统设置：将回流端和滤出端置于排放状态

用量：40 L/m² (4 L/ft²)

1. 向进料罐添加相应量的DI水。
2. 100%打开回流阀和滤出阀。
3. 用经0.2 μm 滤膜过滤的DI水以5 L/min/m² (0.5 L/min/ft²) 的流速冲洗回流端并排放。
4. 冲洗结束后在回流端和滤出端取样以检测TOC和pH值。

6.2 Omega T系列膜包的溶出物测定步骤

6.2.1 设备

- Centrasette 夹具和压力表
- 接触面为惰性材质的蠕动泵或隔膜泵

- 惰性材质（PTFE 或 FEP）管路和接头以便对法兰连接处消毒
- 硅胶管
- 硼硅玻璃器具
- 计时器/秒表
- TOC仪（以CO₂检测）
- pH计
- 旋转蒸发仪
- 带阀门真空泵
- 马弗炉
- 烘箱
- 干燥器
- 带盖陶瓷坩埚
- 分析天平
- 紫外可见分光光度仪
- 红外分光光度仪
- 无颗粒取样瓶（250 或 500 mL）

6.2.2 装置和材料的准备

1. 对玻璃器皿、泵、管路及夹具的液体接触面彻底清洁。条件允许的情况下，用经DI水润洗的TOC检测仪进行测定以保证清洁度。在500 °C或更高的炉中加热陶瓷坩埚约30分钟以进行清洁，并在干燥器中冷却。
2. 配制0.1 N NaOH/200 PPM次氯酸钠消毒液，具体方法是将16.8克的氢氧化钠溶解于3L的DI水中，添加16 mL 5.25%的次氯酸钠（市售漂白剂），定溶终体积至4L。使用0.2 μm过滤器过滤溶液。
3. 用过滤的DI水配制6L的25%乙醇溶液。

6.2.3 溶出测试步骤

如下溶出测试可在45-50°C 的DI水中或20-25°C的25%乙醇溶液中进行。须首先进行空白样品实验。空白样品来自对膜包的冲洗垫圈进行在线运行。所有其他程序步骤适用于上述两种溶液。

该测试重复三次。

所有玻璃器皿使用前必须用铬酸清洁。

1. 准备6L溶液（水或25%乙醇）。
2. 从6L的溶出液（或空白样品）中收集两个1L的样品。
3. 记录实际使用的溶液量。
4. 将剩余的4L溶液倒入玻璃容器中。
5. 调节流量约 2 L/min：90%的滤出端流量，10%的回流端流量。
6. 对于水溶液，温度升至50°C。对于25%乙醇溶液，温度应控制在20-25°C之间。
7. 循环进料16小时。整个循环过程保持温度恒定。
8. 16小时后，排空系统内溶液至进料罐，并记录终体积。
9. 从进料罐内取两个1L的样品进行分析。
10. 清空进料罐。
11. 用相同的溶剂重复步骤1到10以进行第二次测试。
12. 取出膜包并妥善保存。
13. 在下一轮溶出测试的循环之前用DI水冲洗系统至少1小时。对样品进行FTIR、气相色谱/质谱（GC/MS）、NVR和高效液相色谱（HPLC）分析。

6.3 测定NVR的步骤

1. 对溶出液等量取样（如，1000ml），并使用旋转蒸发器以1000ml容积的清洁圆底烧瓶进行旋转蒸发。调整并保持水浴温度为80°C。每份体积蒸发至小于25ml。
2. 对坩埚称重精确到0.0002 g。重复操作直至恒重（± 0.0002 g）。存放在干燥器中。如第6章节。
3. 将浓缩后的溶出液全部转移至干燥器中的恒重坩埚内。如果圆底烧瓶中仍有残留物，则添加几滴新鲜的DI水，并旋转，然后转移到坩埚内。如果仍需要添加更多水，记录使用量。
4. 小心地把坩埚放置在烘箱（循环空气型）内并保持温度在60-80°C。将溶出物蒸发至干燥。将水分蒸发完全的坩埚从烘箱内取出，加盖放回到干燥器中，然后冷却到室温。
5. 对坩埚称重并精确到0.0001 g，记录重量。
6. 按如下方法计算蒸发体积的NVR：

$$\text{NVRV (mg)} = \text{CR (mg)} - \text{CC (mg)}$$
 NVRV = NVR的蒸发体积以毫克计，
 CR =坩埚和残留物恒重，CC =坩埚恒重。

7. 计算对照和每个样品的总NVR。

$$\text{NVRT (mg)} = \text{NVRV (mg)} \times \text{VI/VE}$$

NVRT (mg) = 总NVR以毫克计, VI = 用于溶出的初始溶剂体积, VE = 溶剂蒸发后的终体积。

8. 以如下方式计算每个样品的NVR :

$$\text{净NVR (mg)} = \text{NVRs} - \text{NVRc}.$$

NVRs = 样品总NVR以毫克计, NVRc = 对照NVR以毫克计。

6.3.1 常用清洁剂的化学兼容性的测定

采用以下溶液条件测定Omega T系列膜包的化学兼容性 :

- 1.0 N氢氧化钠溶液 23°C , 28 天
- 0.1 N H₃PO₄ 溶液 45°C , 14 天
- 25% 乙醇溶液 23°C , 28 天

兼容性测定方法 :

1. 测定膜包的IT, DP及NWP值。
2. 配制测试溶液。
3. 膜包安装到夹具内。连接系统回流端和滤出端以进行循环。
4. 100%打开进样阀、回流阀和滤出阀。
5. 调整泵速和回流阀以实现进料端压力约1.4bar (20 psig) , 回流端压力约0.7-1bar (10-15 psig) 。
6. 循环运行15分钟。
7. 将膜包从夹具内取出, 放入塑料袋内并密封。
8. 在指定的温度和时间范围内保存膜包。
9. 14天或28天后取出膜包。
10. 将膜包安装在夹具/TFF系统内。
11. 进样罐加满水。
12. 用经0.2 μm滤膜过滤的DI水冲洗膜包至少20分钟。
13. 测定膜包的IT, DP及NWP值。

7. 检测方法

7.1 清洁剂和保存液的检测方法

7.1.1 氢氧化钠

氢氧化钠的残留可通过对比进样端与膜包排放液体的pH值以测定。当两个值一致时, 残留氢氧化钠即被去除。pH值是直接测量氢氧根离子浓度, 并可用于计算残留氢氧根离子含量。

7.1.2 甘油

下面的步骤介绍了用于检测甘油浓度的分子排阻色谱法。该方法的灵敏度为1 PPM。

1. 准备100 PPM, 10 PPM和1 PPM的甘油标准品。
2. 将50 μ L的甘油标准品注入分子排阻色谱柱内 (TOSO Haas, G3000PWXL) 并连接具有折光度检测器 (流动相 : H₂O) 的HPLC系统 (Hewlett Packard , 型号 #1050) 。监测甘油的光谱吸收峰 , 计算每个标准品的峰面积。以峰面积对甘油浓度绘制标准曲线。
3. 将所收集的回流端和滤出端的样品分别以50 μ L注入色谱柱中。监测每个回流端和滤出端样品的甘油吸收峰。测量峰面积并根据标准曲线确定相应的甘油浓度。

7.2 内毒素检测流程——ThermoMax 显色分析

本节介绍了使用LAL试剂结合ThermoMax显色分析试剂盒 (Endochrome K) 测定溶液中内毒素的方法。

7.2.1 介绍

当前计算机技术发展出对多个样品的内毒素同时测定。这个流程提供了用ThermoMax 酶标仪对标准品、对照品及未知样品进行内毒素检测及定量的标准使用方法。

7.2.2 检测限值

检测限值基于所使用试剂的灵敏度。敏感度可达到0.005 EU/mL。该方法灵敏度至少比凝胶法高一个数量级。

7.2.3 实验准备

- 旋涡混合器
- Falcon稀释管 (编号2057或类似物)
- Falcon96孔酶标板 (编号3072)
- 1ml和5ml的移液器
- 100ml移液器及移液管
- Eppendorf带0.5ml和5ml Combitips移液管的重复上样移液器
- 37°C加热块
- 显色试剂盒 (Endochrome K)

- WFI
- Endosafe内毒素标准品 (1000 EU/mL)
- 带培养箱的酶标仪：分子设备，ThermoMax仪和SoftMax Pro 3.0 软件

7.2.4 试剂

内毒素标准品 (CSE)

5ml中含500 ng = 1000 EU/mL

用移液器吸取5.0 mL的WFI直接注入样品瓶。盖上瓶盖，再覆盖铝箔，使用旋涡混合器混合。该样品瓶备用。旋涡混合对照样品5分钟。

7.2.5 Endochrome 测试

轻轻敲击含有LAL粉末的样品瓶使其汇聚于瓶底。慢慢提起瓶塞以启封并释放真空。使用前在瓶内用移液器加入3.2 mL的含LAL水使其溶解。轻轻摇动样品瓶直到LAL溶解至无色溶液。如果溶解过程中发现密封性被破坏或具有颜色/不透明度则须弃掉该试剂。将溶解的LAL试剂置于冰上。未使用的LAL试剂可以被冷冻并解冻一次。

将用于绘制标准曲线的内毒素对照样品稀释并标记：500，50，5，0.5，0.05 EU/mL (包括Endochrome 检测的0.005 EU/mL)。如表19描述如何制备内毒素稀释品。旋涡混合每个稀释样品一分钟。

表19 内毒素对照样品标准曲线的稀释

To prepare >	Take (X) mL of solution containing specified EU/mL	Dilute with (X) mL of WFI	Volume after dilution (mL)	Endotoxin concentration (EU/mL)
Reconstituted Stock Solution	5.0	5.0	1000	
Dilution 1	1.0 of 1000 EU/mL	1.0	2.0	500
Dilution 2	0.1 of 500 EU/mL	0.9	1.0	50
Dilution 3	0.1 of 50 EU/mL	0.9	1.0	5
Dilution 4	0.1 of 5.0 EU/mL	0.9	1.0	0.5
Dilution 5	0.1 of 0.5 EU/mL	0.9	1.0	0.05
Dilution 6	0.1 of 0.05 EU/mL	0.9	1.0	0.005

7.2.6 ThermoMax 设置

1. 打开仪器电源开关。点击SOFTMAX FOR WINDOWS。然后点击SOFTMAX图标。
2. 点击CONTROL功能，打开OPEN DRAWER。
3. 点击CONTROL功能，打开INCUBATOR，然后将其激活。
4. 点击SET UP功能，打开INSTRUMENT，选择下列各项：
 - (i) 选择MODE下的KINETIC L1
 - (ii) 对于浊度计选择340 nm的波长
 - (iii) 对于显色分析选择405 nm的波长
 - (iv) 选择Automix: ONCE
 - (v) 设置：1小时的运行时间
 - (vi) 设置读取时间间隔：00:14秒
5. 点击SET UP功能，打开ANALYSIS
 - (i) 选择开始时间（秒）
 - (ii) 选择标准曲线拟合（对数形式）
 - (iii) 选择回收率分析
 - (iv) 选择起始OD: 0.05
 - (v) 选择起始限值：0.2
6. 点击SET UP功能，打开TEMPLATE
7. 点击和拖放以选择对应的孔：
 - (i) 空白
 - (ii) 标准曲线（0.05 到 5 EU/mL）
 - (iii) 未知+稀释
 - (iv) 对照（0.5 EU/mL）

7.2.7 LAL测试

按照以下步骤来完成LAL检测：

- 1.将带盖酶标板置于37°C的加热块上。
- 2.卸下盖子，用100 μ L的以下各项样品加入板的微孔内，每项样品均重复两份：
 - (i) 空白（WFI）
 - (ii) 0.005 EU/mL标准品
 - (iii) 0.05 EU/mL标准品
 - (iv) 0.5 EU/mL标准品
 - (v) 5.0 EU/mL标准品

- (vi) 未知样品
- (vii) PPC =未知样品+0.5 EU/mL
- (viii) (10 μ L 的 5.0 EU/mL 的 CSE 标准品)
- (ix) 冲洗用水 (阴性对照)

3. 加盖在37°C孵育10分钟。
4. 孵育后，使用重复进样移液器在2分钟内对上述每孔添加100 μ L 的LAL试剂。
5. 点击CONTROL功能，打开READ PLATE。
6. 将无盖的微孔板放置在读取器内。

7.2.8 结果阐释

如果确定符合下列条件则LAL检测结果准确：

1. 使用浓度范围内的标准曲线线性必须得到验证。不少于3个内毒素标准品，覆盖所需的浓度范围，实验重复两份进行。判断曲线相关系数是否大于或等于0.98。
2. 每个未知的样品必须附有相应的对照或阳性对照品 (PPC)。PPC的平均内毒素浓度必须在响应标准曲线浓度的 $\pm 50\%$ 内。

7.2.9 分析水平限定

重复测定标准曲线三次，独立选择标准值以对每个点 ($r > 0.98$) 进行回归分析 (即，标准品 1，标准品 2 和标准 3 = 0.05 EU/mL)。KTA LAL的标准曲线包含三个点 (2个对数值)，包括点：0.05，0.5 和 5.0 EU/mL，Endochrome-K包括四个点 (3个对数值)，包括点：0.005，0.05，0.5和 5.0 EU/mL。

验证可接受的相关系数必须大于0.98。重复实验直到确认可以接受。
(须以显色动力学和浊度动力检测两个方法进行验证工作。)

8. 生物安全性测试

以下结果是对Omega T系列膜包组件进行生物安全测试的报告参考。

进行测试的实验室为：

Toxicon公司

225 Wildwood Ave

Woburn, MA 01801

膜包Omega膜和聚烯烃支撑物

USP对VI级塑料制品的生物测试包括：

- 全身注射测试
- 皮下反应测试
- 肌肉植入测试
- 项目编号88G 0156

溶血试验——直接接触兔血

- 项目编号88G 0163

MEM洗脱物细胞毒性测试L929

- 项目编号88G 0164

LAL和总氧化物测试

- 项目编号94G 2269

对以下所列组件进行测试的实验室为：

Ethox International STS部门

7500 W. Henrietta Road

Rush, NY 14543

电话: (585) 533-1672

聚丙烯筛网

聚氨酯皮内（皮下）反应测试——USP方法

STS测试编号：T06-1391

STS研究编号：GLP-2006-0179

全身注射试验——USP方法

STS测试编号: T06-1392

STS研究编号：GLP-2006-0180

七天肌肉植入的外观评价——USP方法

全身注射试验——USP方法

STS测试编号: T06-1393

STS研究编号：GLP-2006-0181

USP类塑料指定

研究编号：GLP-2006-0179, GLP-2006-0180, GLP-2006-0181

溶血试验——盐提取方法

STS测试编号: T06-1394

STS研究编号：GLP-2006-0182

MEM洗脱细胞毒性试验——ISO方法

STS测试编号: T06-1395

STS研究编号：GLP-2006-0183

聚氨酯密封剂

聚氨酯皮内（皮下）反应测试——USP方法

STS测试编号: T06-1443

STS研究编号：GLP-2006-0186

全身注射测试——USP方法

STS测试编号: T06-1444

STS研究编号：GLP-2006-0187

七天肌肉植入外观评价——USP方法全身

注射测试（USP方法）

STS测试编号: T06-1445

STS研究编号：GLP-2006-0188

USP类塑料指定研究编号; GLP-2006-0186, GLP-2006-0187, GLP-2006-

0188 溶血试验——盐提取方法

STS测试编号: T06-1446

STS研究编号：GLP-2006-0189

MEM洗脱物细胞毒性测试——ISO方法

STS测试编号: T06-1447

STS研究编号：GLP-2006-0190

欲了解本测试报告的任何细节，请您与颇尔公司当地代表联系。

9.术语表

欢迎登陆www.pall.com/biopharm，访问颇尔公司的切向流过滤器（TFF）词汇表。



Life Sciences

颇尔中国生命科学

上海
地址：上海市张江高科技园区上科
路88号（201210）
电话：（021）5191 5656
传真：（021）5191 5984

北京
地址：北京市经济技术开发区宏达
南路12号（100176）
电话：（010）8722 5588
传真：（010）6780 2238

请浏览我们的网站：www.pall.com/biopharm

请发邮至我们的邮箱：Biopharm_China@ap.pall.com

广州
地址：广州市滨江中路308号海运
大厦16层K座（510220）
电话：（020）8410 2211
传真：（020）8410 2033

长春
地址：长春市亚泰大街6789号万晟
商务花园2号楼1207室（130021）
电话：（0431）8860 2233
传真：（0431）8860 2233

成都
电话：（028）8620 3737
传真：（028）8620 3717

石家庄
电话：（0311）8399 5931
传真：（0311）8399 5931