



The R&D Notebook

A publication of the Laboratory Water Division of Millipore

RD006

生产无热源超纯水的取水点超滤装置的条件研究

Stéphane Mabic, Daniel Darbouret, Ichiro Kano

Research & Development, Laboratory Water Division, Millipore S.A., Saint-Quentin en Yvelines, France

高灵敏度的生物学实验，需要无热源的超纯水。Pyrogard™ D 纯化柱就是为此目的设计的，它是嵌在一个 ABS 套中的聚砜（polysulfone）中空纤维超滤器。本文涉及的研究是对这种超滤设备的验证和认证。使用 ICP-MS 和离子色谱法检测，没有检测到 Pyrogard D 柱中有显著数量的溶出物。TOC 分析也显示它对有机物的去除有很好的效果。空气扩散测试证明，在一个相当宽的热源浓度范围内它可以有效地去除热源。Pyrogard D 超滤器在五个星期内具有完好的工作效率的，可持续获得热源浓度低于检测限(0.001EU/mL)的水。

引言

用活性炭，连续电流去离子，紫外线光氧化作用和微滤的方法连续处理得到的纯水可满足很多应用需要。但是对于某些特殊的应用，仍须更进一步的纯化步骤。为了满足生物测试的最佳条件，需要用特殊方法除去水污染物中的热源。内毒素主要也是最重要的组成部分是革兰氏阴性细菌细胞壁中的脂多糖（LPS）。¹ LPS 可划分成为三个部分：一是由脂类 A 构成的亲水高稳定结构(非极性的)，一是中间的寡聚核糖稳定部分，一是不稳定的杂多糖的表面结构，O 抗原(图 1)^{2, 3}，两个含糖苷的部分，其结构和大小会由于菌系和种类的不同而变化。这导致热源分子量的范围很大，从 3,000 到 25,000 Da (平均值 10~12 kDa)，而且生物活性各异。LPS 进入血液或者脊柱的流体会引发中毒反应并引起发热(即所谓的“热源”效应)。内毒素或热源在很大程度上已特指活性的 LPS 分子。由于 LPS 分子结构特别地稳定，经受得了用高压蒸煮过程(121°C, 3h)。在 180°C 下加热四个小时可以减少热

源 1,000 倍(对数减少值, LRV=3)。由于分支糖苷类物质上的负电荷磷酸盐，LPS 容易吸取二价的阳离子(Ca^{+2} , Mg^{+2})。这导致 LPS 的聚集和形成囊和泡，产生分子量为 100,000 到 1,000,000 Da 的大分子结构。用一套完整的过滤设备去除这些大分子结构可以使热源含量小于 0.02 个内毒素单元(EU/mL)。但是这类内置过滤器，需要经常和精心的维护。因此，设计一个超滤柱使其能容易地与水纯化系统的取水点相连并且具有高效去热源的能力，是挑战所在。事实上，内毒素的存在，即使是很低含量，对大部分生物实验如细胞培养，试管婴儿等都有决定性的影响。因此将热源的含量降至 0.001EU/ml 以下非常重要。由于在蛋白制备中去除热源非常困难，因此要尽量避免由于使用不纯净的水而引入更多的热源。这里将先着重介绍超滤柱 pyrogard D，一种新型的便于使用的终端纯化柱。接着介绍超滤器对离子和有机物的去除率，以及超滤设备对被检测热源指标的影响。

内毒素：化学和生物特性

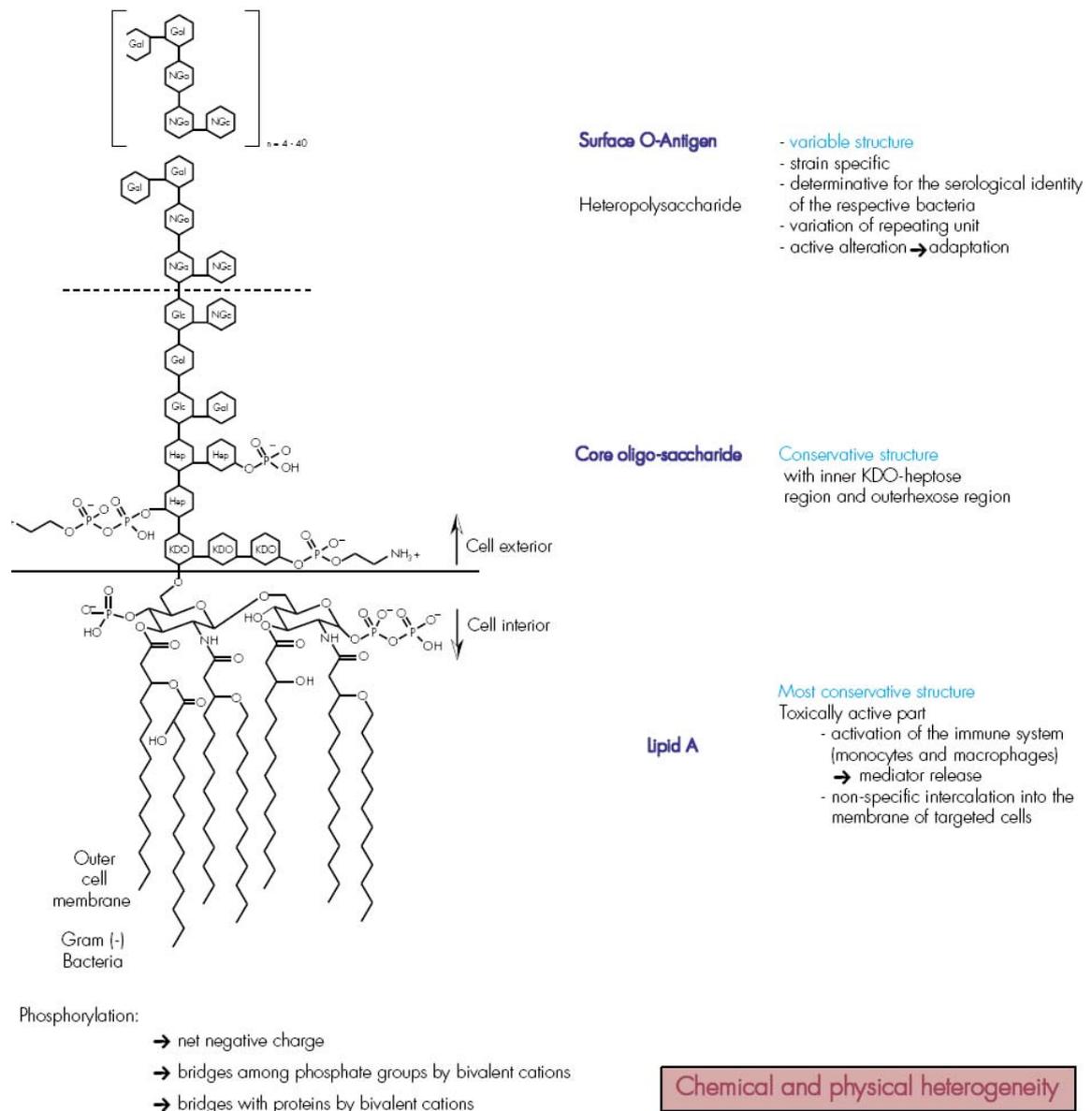


图 1：内毒素的化学结构的示意图。摘自 E. coli O111:B4 Ohno 和 Morrison (1989)。Hep, L-甘油 (glycero) -D 甘露庚糖 (manno heptose); Gal, 半乳糖; Glc, 葡萄糖; KDO, 2 酮 (keto) -3 脱氧核糖核 (deoxyoctonic) 酸; NGa, N-乙酰-半乳糖胺 (acetyl galactosamine;) NGc, N-乙酰-葡萄糖胺 (acetyl glucosamine)。

Pyrogard D 的化学条件

技术特点

柱子的核心部分是 13,000 Da 切割聚砜中空纤维超级净化膜 (图 2, 3)。超滤模块用 polyurethane 树脂固定在 ABS (丙烯腈丁二烯苯乙烯聚合物)套中。纯水进水的理论流

速极限可达 120 ml/分钟 · 公斤 · cm², 这使得它在大多数水纯化系统上可以做到产水量 300 mL/分钟。柱子存放在 1.5 %H₂O₂ 的水溶液中, 以防止微生物污染。

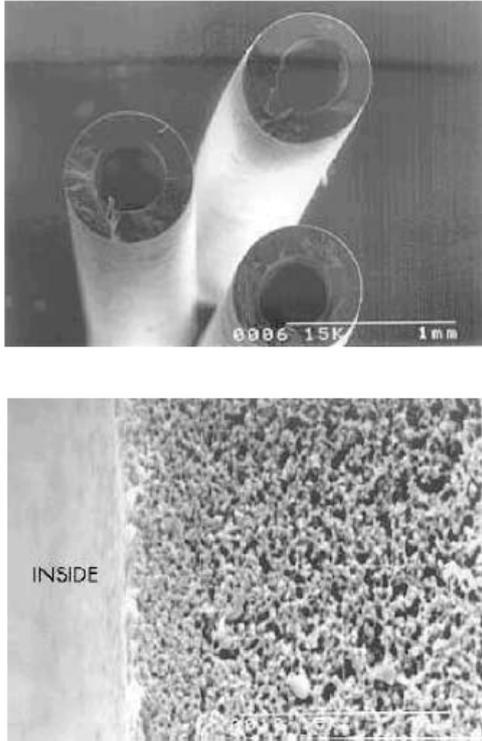


图 2-3: 显微镜下的 Pyrogard D 柱的聚砜中空纤维

超滤器的析出

在水纯化系统上增加一个终端过滤器后,对检测通过它的水质非常重要。有几个参数可作为评价标准,包括阴离子和阳离子含量,总有机碳(TOC),和电阻率。我们综合考虑了对于这些参数的要求,选择最合适的一款 Milli-Q 系统。⁵

材料和方法

超滤设备被连接到 Milli-Q Element⁵ 系统的终端取水点,每次采样时取水 3 升。采水样 100ml,用干净的塑胶瓶盛装,然后分别定容至 0 (stagnated portion), 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 和 3.0L。高密度 PE (聚乙烯)瓶子用于阴离子检测,而 PFA (perfluoroacrylate)瓶子则用于阳离子和金属分析。阴离子浓度测量使用离子色谱法(IC7000, Yokogawa 分析系统),阳离子和金属含量测量使用的 ICP-MS (HP4500, Agilent)。两次采样之间间隔 24 h,其间过滤器留在原位不动,共耗时 4 天。离子色谱法分析检出限为 0.01 μg/L,为检测电阻率和 TOC,超滤设备安装在 Milli-Q

Gradient 5 系统的取水点上,以经过反渗透处理后储存在水箱中的水为进水。流速被调节为 600 mL/min。在实验前,整个系统用 3L 的 1.5%过氧化氢保护液迅速冲洗。

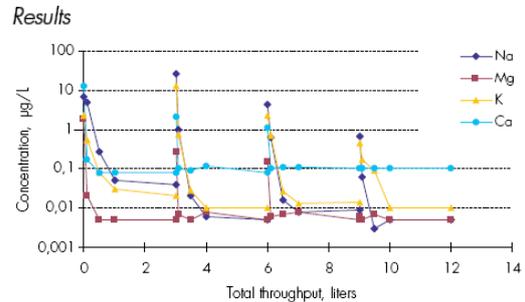


Figure 4A

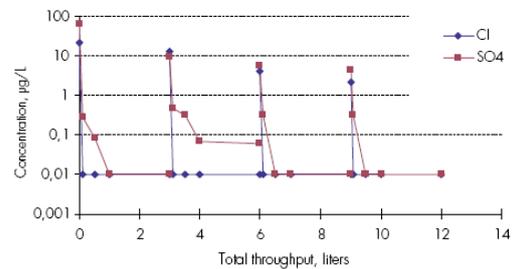


Figure 4B

图 4A 和 4B: 四天内从超滤器提取的主要的阳离子浓度(图 4A)和阴离子浓度(图 4B)

四天内,主要的无机阳离子(钠,钾,钙和镁)的浓度测量值见图 4A,阴离子(氯化物和硫酸盐)见图 4B。每一曲线代表一天(1 到 4 天),三升水分五份样品。

可以预料到,产水在第一部分重复表现出较高浓度的溶出,这是由于这部分水在柱子中停滞 24h。然而,在 1 天和 4 天之间,浓度减少了接近 10 个阶乘。同时,一次短时间的冲洗(从 100 mL 到 500 mL)大大减少阳离子和阴离子浓度。在用三升水冲洗之后获得一个较低离子含量的水。除了钙(0.1 μ/L),最后的量化极限在 0.01 μ/L 含量。推荐在水取样前,先弃去一升水以获得适合的水质量。

其它离子的浓度十分低,也没有发现特殊的元素。第 1 天在一升冲洗之后获得的几个元素和离子的浓度的数据归纳在表 1。在 ICP-MS 分析中的分析值或者检测限包括由于分子离子干扰引起背景的影响。对于从超滤器出来的水,大多数元素影响非常弱,在

分析的测定极限之下。主要的 TOC 释放在第一个 10 升冲洗后,可达到 10 ppb (图 5)⁷,当进水的 TOC 为 20 ppb 时,进一步的冲洗可提供 TOC 为 2.2 ppb 的水。

Ion/Metal	µg/L	Ion/Metal	µg/L
Li	< 0.005	Zn	< 0.05
Na	0.005	Sr	< 0.005
Mg	0.008	Ag	< 0.009
Al	< 0.005	Cd	< 0.01
K	0.008	Ba	< 0.005
Ca	< 0.1	Pb	< 0.005
Cr	< 0.007	chloride	< 0.01
Mn	< 0.007	nitrite	< 0.01
Fe	< 0.01	phosphate	< 0.01
Co	< 0.006	bromide	< 0.01
Ni	< 0.009	nitrate	< 0.01
Cu	< 0.009	sulfate	0.07

表 1 1 升冲洗后, Pyrogard D 过滤器产水的离子浓

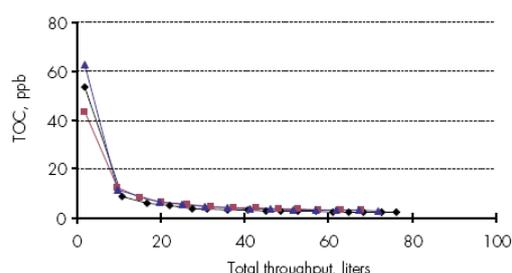


图 5 超滤器里产水的总有机碳含量

微生物污染的影响

材料和方法

在一个由连接到 Elix 系统的 60L 水箱供水的 Milli-Q Academic 系统的取水点上安装一个超滤柱 Pyrogard D。

初始的三升冲洗水被弃去。为了便于比较,在另一台 Milli-Q Academic 系统上安装 Millipak 0.22 µm 过滤器。两个系统在同一条件下面操作。连续取样 (100 mL)于体积为 0L, 0.1L, 0.2L, 0.5L, 1L 和 3 L 容器内, 检验在五星期内冲洗的效果。利用 Milliflex™ 确定细菌的存在与否。

充足的水样(有必要时用消毒水稀释,)用 HAWG 0.45 µm 过滤漏斗过滤后,在 30°C 下,用 R2A 琼脂孵化一个星期。

在显微镜下面计算菌落数。

结果

在超滤柱的滤液中没有找到细菌,虽然过滤器并非无菌的等级。用过氧化氢水溶液存储来防止在安装前的微生物污染。然而在一个星期之后,在第一个 100 mL 样品中观察到样品被轻微污染。

类似的污染也出现在使用 Millipak (无菌等级膜,孔径为 0.22 µm)过滤器的系统的产水中。

这种污染可能与过滤器效率无关,很可能来自环境和空气中。

Pyrogard D 完整性和热源去除率

确定了超滤设备的化学可靠性后,开始测试其热源去除率。通过空气扩散测试,可容易、系统地检测超滤器表面的改变,因为当一个过滤器有缺陷时,压力会有显著改变。这种压力变化是与超滤器的热源去除能力相关的。(对数减少值, LRV)。

在内毒素穿刺和恢复控制测试之后,空气扩散测试首先被用于检查超滤器的质量,然后,检查热源 (LRV)。用热源浓度的高低来检测超滤器的效率。

发色的 Limulus Amebocyte Lysate (LAL) 用来检测热源的浓度⁸。LAL 测试依赖于对热源诱发 horseshoe 螃蟹血液凝结的观察⁹。更具体地说,变形细胞的消散导致血的凝结。变形细胞是鲎中唯一的血液细胞类型¹⁰。作为凝结酶的自然胞内物质 (endosubstrate)称凝结剂(coagulogen)。在发色试验中,¹¹使用了一种与凝结剂 (coagulogen) 同源序列的,带有一个终端发色团的短合成肽。活化凝结酶催化 (Ac Ile Glu Ala Arg pNA)的一种降解的反应,然后,释放出一个肽和联硝基苯胺(pNA), pNA 是一种黄色的化学品(图 6)。pNA 的浓度用 405 nm 的 UV 检测。该方法非常灵敏 (0.0005EU/mL),并且热源浓度在 0.001 到 1.0EU/mL 范围内和 pNA 释放之间呈一种线性的相互关系。

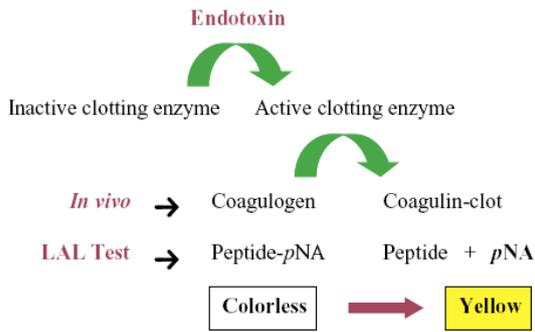


图 6: Limulus Amebocyte Lysate 热源测试的生物化学图

材料和方法

对于穿刺和恢复性测试，在 10L 水冲洗过后，浓度为 0.00625EU/mL 的热源被掺入到过滤器的透过水中。测量在掺入内毒素的和未掺入的抽样中热源含量，和潜在地可影响 LAL 测试的透过水的热源含量。不含内毒素水用做标准对照测试。在所有柱子上空气扩散穿过潮湿的膜的流量均为 2.0 公斤/cm。从 E. Coli O111:B4 (Sigma, 2.2EM/ng 活性) 分离并且纯化的 LPS 用于这些实验。LPS 溶液在一个大气压的压力下挑战超滤器，挑战浓度变化从 0.01 mg/L 到 10 mg/L (四个抽样)。200mL 挑战溶液通过 Pyrogard D 超滤柱，滤液做热源分析。热源浓度用有色的 LAL 试剂 QCL-1000 (Biowhittaker) 来分析。所有用于收集水样品，稀释标准和样品溶液，和化验的容器均为一次性的不含内毒素玻璃管 (Biowhittaker)。为了增加 QCL-1000 试剂成套用具的灵敏性，LAL 化验时间被延长到 45 分钟，检测极限达到 0.0005EU/mL。标准热源溶液被稀释成为 0.025, 0.0125, 0.00625, 和 0.003125EU/mL 以绘制标准曲线。100 mL 的样品，空白，或者标准的稀释溶液收集于不含热源的化验管中。校准曲线范围之外的样品用无热源水稀释 (Biowhittaker)。金属加热器的温度调整到 37°C 以用于 LAL 化验。用微量型透明小容器进行分光光度计法 (500 μL)。

结果

穿刺和恢复试验用不含热源的水和装

配有超滤柱的 Milli-Q Academic 系统的产水同时进行。

穿刺和未穿刺样品的浓度和恢复的百分比见表 2。超滤设备没有析出的热源，因此也没有原来预测的产生由过滤器引起的内毒素导致阻止或者加速 LAL 测试的因素。

内毒素恢复是很好的。初步的实验确认这种条件下纯化的水适合于内毒素分析，并且早 LAL 化验前不需要预处理。

	Sample ^a		Recovery
	no spike	spike	
Endotoxin free water	< 0.0005	0.0062	100 %
Milli-Q Academic system + UF	< 0.0005	0.0065	103 %

^a Concentration in EU/mL

表 2: 穿刺和恢复性测试数据

用一大批共 230 个柱子 (cartridge) 检查空气扩散分布，扩散值分布见图 7。频率最高的值分布在 0.06 到 0.1 mL/min/2kg/cm² 的范围中，最大扩散值为 0.40 mL/min/2kg/cm²。测试有良好的再现性：压力扩散低于 0.15 的样品占 95%，低于 0.18 mL/min/2kg/cm² 的样品占 98%。

再用一批 16 个柱子用来进行对热源浓度减少和空气扩散间关联的测试。(表 3)。如果用高热源浓度 (22 x 10³EU/mL) 做挑战性测定，其热源浓度 LRV 始终为 ca.6。在检查范围中，LRV 不依赖于压力扩散价值。

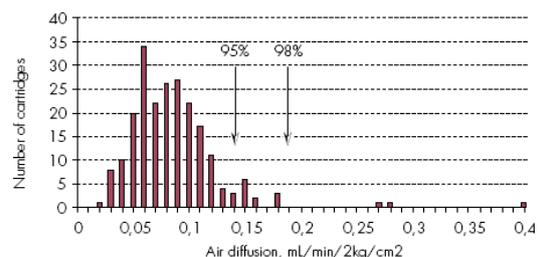


图 7: 230 个纯化柱的空气扩散值

有最高压力扩散值的三个柱子，(0.27, 0.28, 和 0.40 mL/min/2kg/cm²) 仍然显示好 LRV (> 5.7)。

为了评价超滤设备的对由高到低浓度热源的功效，要测试一个大的范围热源浓度。五个柱子挑战四个热源浓度 (22-22 x 10³EU/mL)。

Air diffusion ^o	LRV	Air diffusion ^o	LRV
0.01	5.9	0.11	5.8
0.03	5.7	0.11	5.9
0.04	5.9	0.12	5.6
0.05	5.9	0.12	5.5
0.07	6.1	0.14	6.1
0.10	5.6	0.27	5.9
0.11	6.1	0.28	5.7
0.11	6.2	0.40	5.9

^o mL/min/2kg/cm² ^o mL/min/2kg/cm²

表 3 空气散射值

Feedwater ^o	Filtrate ^o	LRV
22 × 10 ³	0.0291	5.9
22 × 10 ²	0.0032	5.8
22 × 10 ¹	0.0007	5.5
22	< 0.0005	> 4.6

^o Endotoxin Concentration in EU/mL

表 4 从 Progard 柱出来的热源浓度

取水点的内毒素浓度

在实际应用的条件下测量热源浓度。

热源含量的测量在一个比较长的时间段完成，同时比较超滤设备和微生物过滤膜 (Millipak) 的效果。

进水的热源浓度也经过测定与在超滤后获得的数据相比较。

材料和方法

任选一个超滤柱 (聚砜化合物 (polysulfone) 中空纤维, 13,000 Da cat-off) 或微滤设备 (Millipak, PVDF 膜, 0.22 μm), 分别安装在两个 Milli-Q 超纯水系统上。Milli-Q 系统连接到 60 L 水箱上, 该水箱的储水是由 Elix 系统 (结合反渗透与 EDI) 处理过的。

两个 Milli-Q 系统在同样的条件下操作: 相同的进水和水的分配。取几个连续的水样 (100mL) 来监控冲洗的效果。在五个星期内, 每星期 7 天抽样, 每天抽取水样的体积分别 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 3 L。热源的含量用前述的 LAL 方法检测。

结果

记录五星期内来自两个有代表性的抽样, 0.5 L 和 3 L 的数据 (图 8)。选择这两个量是因为他们代表了短和长的冲刷时间。

平均的压力扩散值是 0.09 mL/min/2kg/cm² (表 4)。LRV 值在高浓度下大于 5.5, 低浓度下接近 5。在十分宽阔的热源浓度范围内, 超滤器都显示较好的热源去除率。值得注意的是, 在实验中被测试的最低热源浓度 (22EU/mL) 仍然比通常在反渗透或者反渗透和连续电离子去离子作用 (EDI) 后储存于水箱中的水浓度 (< 10EU/mL) 高。

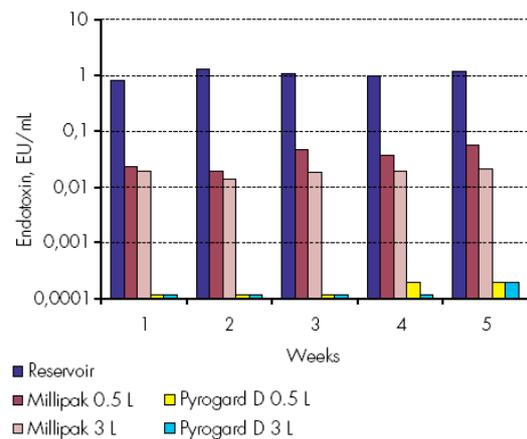


图 8 LAL 内毒素测试的生物化学图

通过两个 Milli-Q 系统的水中的热源浓度比进水低。来自装备 UF 套筒 (cartridge) 的 Milli-Q 系统的水明显含更低的含量热源。

配备了微滤设备的水纯化系统, 约三升水的冲洗使热源浓度减少到大约 0.01EU/mL。即使冲刷量很小, 热源含量也总在 0.06EU/mL 之下。另一方面, 超滤柱能提供几乎无热源的水 (< 0.0005EU/mL)。正常的使用条件下, 可持续五个星期获得这样低热源含量的水。

结论

在开发把纯水净化到无热源水平的新超滤设备 Pyrogard D 的过程中,我们特别注意了超滤设备的制作材料。

本文选用了聚砜的中空纤维(截流分子量为 13,000Da)。有效性检验显示在正常状态下没有大量的阴离子,阳离子及有机物质释放出。

空气扩散综合实验也被系统地运用在每一个超滤器上,超滤器的有效性在大范围的热源浓度下得到体现。

典型的热源 LRV 为 6,远大于经过 4

小时 180℃处理后的 LRV(为 3)。在 5 个星期内超纯水的热源浓度持续低于检测极限以下(<0.0005EU/ml)。

象这样的超滤装置可以为在一定的适宜条件下进行比较精密的实验提供安全和保障。

本研究还强调了在取样前先进行一个短暂的冲洗的重要性。

参考文献

- 1 Dawson, M.E.; Novitsky, T.J.; Gould, M.J. "Microbes, endotoxins, and water" *Pharm. Engineering*, 8 (2),145-148, (1988).
- 2 Petsch, D.; Anspach, F.B. "Endotoxin removal from protein solutions" *J.Biotechnol.*, 76, 97-119, (2000).
- 3 Ohno, N.; Morrison, D.C. "Lipopolysaccharide interaction with lysozyme" *J. Biol. Chem.*, 264, 4434-4441, (1989)
- 4 Mather, J.; Kaczarowski, F.; Gabler, R.; Wilkins, F. "Effects of water purity and addition of common water contaminants on the growth of cells in serum-free media" *Biotechniques*, 4, (1), 56-63, (1986).
- 5 Milli-Q systems are ultrapurification systems adapted to a variety of applications. The filters and purification devices vary within each Milli-Q system, according to the contaminant targeted. The basic Milli-Q system is the Milli-Q Academic, which includes activated carbon filtration and ion exchange. The Milli-Q Element system is specifically dedicated to the removal of ions at the ultratrace level (see ref 6).The Milli-Q Gradient system allows for the preparation of water suitable for HPLC, with high resistivity and low TOC (see ref 7). The Milli-Q Biocel and Milli-Q Synthesis systems both include a built-in Pyrogard TM 5000 ultrafiltration cartridge.
- 6 Darbouret, D.; Kano, I. "Ultrapure water for elemental analysis down to ppt levels" *The R&D Notebook*, Millipore RD002 (2000).
- 7 Darbouret, D.; Kano, I. "From tap to ultrapure water: tracking organic contaminants" *The R&D Notebook*, Millipore RD005 (2000).
- 8 Gould, M.J. "Microorganisms: evaluation of microbial/endotoxin contamination using the LAL test" *Ultrapure water*, 43-47, (1993).
- 9 Bang, F.B. "A bacterial disease of *Limulus polyphemus*" *Bull. John Hopkins Hosp.*,

98, 325-329, (1956).

10 Levin, J.; Bang, F.B. "A description of cellular coagulation in the *Limulus*" *Bull. John Hopkins Hosp.*, 115, 337-343, (1964).

11 Dawson, M.E. "Choosing an LAL test method" *LAL update*, 13, (3), (1995).

12 The sequence Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA is used in the BioWhittaker test kit. Other test kits also use the Boc-Leu-Gly-Arg-pNA peptide as a substrate for the clotting enzyme.

密理博中国有限公司翻译

Lit. 号: RD006EN00. 2001年9月法国印制, 版权©2001

Millipore, Milli_Q, Elix 和 Millipak是 Millipore 有限公司的注册商标。

Milliflex和 Pyrogard 是 Millipore 有限公司的商标

版权所有, 违者必究!