

T/CASME

中国中小商业企业协会团体标准

T/CASME XXXX—2023

琼脂糖-纤维素复合分离介质

Agarose-cellulose composite separation medium

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

中国中小商业企业协会 发布

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 要求 1

5 试验方法 2

6 检验规则 5

7 标签、标志、包装、运输、贮存 6

8 保质期 6

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利，本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由杭州纽龙生物科技有限公司提出。

本文件由中国中小商业企业协会归口。

本文件起草单位：杭州纽龙生物科技有限公司、XXX。

本文件主要起草人：XXX、XXX、XXX。

琼脂糖-纤维素复合分离介质

1 范围

本文件规定了琼脂糖-纤维素复合分离介质的要求、试验方法、检验规则、标签、标志、包装、运输、贮存和保质期。

本文件适用于琼脂糖-纤维素复合分离介质的生产与检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 191 包装储运图示标志

GB/T 5475 离子交换树脂取样方法

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 38170—2019 琼脂糖分离介质

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

琼脂糖-纤维素复合分离介质 agarose-cellulose composite separation medium
以琼脂糖、纤维素为主要原料制备的一类球形分离介质。

3.2

非特异性吸附量 amount of non-specific adsorption
琼脂糖-纤维素复合分离介质对细胞色素 C 的吸附量。

4 要求

4.1 外观要求

应球形饱满、表面光滑，在光学显微镜下应具有透明性。

4.2 性能要求

应符合表 1 的规定。

表 1 性能要求

项目		指标	
粒径	范围粒径比 ($W_{\text{粒径}}$) /%	≥ 90	
	平均粒径 ($\bar{d}$) / μm	90 ± 10	37 ± 5
压力/流速特性	最高流速 / (cm/h)	≥ 1200	≥ 300
	0.1 MPa柱压下的流速	≥ 300	≥ 100
凝胶分配系数 (K_{av})	葡聚糖 (Mw=102K)	0.62 ± 0.05	
	葡聚糖 (Mw=64K)	0.71 ± 0.05	
	葡聚糖 (Mw=13K)	0.88 ± 0.05	
非特异性吸附量 / ($\mu\text{g/mL}$)		≤ 18	
固含量/%		7.50 ± 1.00	
菌落总数 / (CFU/mL)		< 50	
对应基球的5-羟甲基糠醛脱落数 ($\mu\text{g/mL}$)	pH 3.0	≤ 0.25	
	pH 13.0	≤ 0.15	

5 试验方法

5.1 外观要求

5.1.1 样品处理

按照 GB/T 5475 直接从产品中抽取 5 mL 样品，置于 50 mL G3 型号砂芯漏斗中抽干 5 min。用符合 GB/T 6682 的三级水清洗 5 次，每次 2 min，最后用真空泵在 0.1 MPa 压力下抽干 5 min。将洗净的分离介质置于烧杯中，向其中补加三级水，保证分离介质上应有 2 cm 的三级水。混匀后得到分离介质与水的混合体系。

5.1.2 样品观测

用塑料吸管吸取混合体系置于载玻片上，调整显微镜放大倍数。以视野里 80% 以上面积均为琼脂糖分离介质为标准，用塑料吸管增减载玻片上的琼脂糖分离介质，最后用盖玻片压上。调节光学显微镜焦距，使视野中的影像清晰。拍摄琼脂糖分离介质照片并保存。

5.2 性能要求

5.2.1 粒径

5.2.1.1 样品处理

方法同 5.1.1。

5.2.1.2 测试仪器

测试仪器包括：
a) 激光粒度仪；
b) 生物显微镜。

5.2.1.3 平均粒径

设置激光粒度仪参数如下：测量颗粒类型为通用型，分散剂类型为水，分析模式为通用模式，添加样品进行测定。结果以 D50 作为平均粒径。

5.2.1.4 范围粒径比

用生物显微镜观察分离介质形貌，显微镜放大倍数为 40 倍，拍摄 3 张图像。图像来自不同样品，每张图像含 100 颗或分离介质占视野的 50% 以上。用图片处理软件识别并统计分离介质粒径，计算粒径在 45 μm ~165 μm 之间的分离介质占有所有分离介质的体积比。

5.2.1.5 结果计算

按 GB/T 38170—2019 中 6.2.3 的方法计算。

5.2.2 压力/流速特性

5.2.2.1 测试仪器

测试仪器包括：

- a) 蛋白层析系统；
- b) 层析柱：TRICORN 10/100 COLUMN。

5.2.2.2 样品装柱

称取 8.0 g 重力柱抽干的分离介质于 50 mL 离心管，加纯化水至 16.0 g。下端用堵头堵住，用塑料滴管将填料加入空柱中。装上适配器，连接管路，取下下端堵头，用 0.65 mL/min 流速装柱，至高度、压力稳定。卸下装柱器，重新安装适配器，用 6.5 mL/min 流速压柱子 5 min，至高度、压力再次稳定，与 0.65 mL/min 装柱后高度比，压缩比在 5%~10%。流速为 0，下端用堵头堵住，上端管路断开连接，将适配器下拧 2 mm 左右。上端管路在一段时间后再连接柱子，以免引入气泡。

5.2.2.3 样品测定

将层析柱连入蛋白层析系统。流速从 0.5 mL/min 开始，检测系统压力。测定时，从 0.5 mL/min 开始设定一定流速 v (mL/min)，保持该流速 5 min 后，记录此时柱压 p_x (MPa)。每 5 min 增加流速，直到系统压力急剧升高至 3 MPa，流速的升高顺序依次为 0.5 mL/min、1.0 mL/min、1.5 mL/min、2.0 mL/min、3.5 mL/min、4.0 mL/min、4.5 mL/min、5.0 mL/min、6.0 mL/min、7.0 mL/min、8.0 mL/min、9.0 mL/min、10.0 mL/min、12.0 mL/min、14.0 mL/min、16.0 mL/min、18.0 mL/min……66.0 mL/min。测定压力达到 0.1 MPa 的对应流速，记录为 $v_{0.1}$ ；测定压力达到稳定时的柱压，记录为 p_{max} ，压力稳定时对应的流速，记录为 v_{max} 。

5.2.2.4 计算结果

按式 (1) 计算最高流速：

$$F_{max} = \frac{60V_{max}}{S} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- F_{max} ——最高流速，单位为厘米每小时 (cm/h)；
- V_{max} ——在压力稳定下的体积流速，单位为毫升每分钟 (mL/min)；
- S ——层析柱截面积，单位为平方厘米 (cm²)；
- 60 ——分钟转化为小时的换算系数。

5.2.3 凝胶分配系数

5.2.3.1 测试仪器

测试仪器包括：

- a) 蛋白层析系统；
- b) 示差检测器；
- c) 层析柱：TRICORN 10/200 COLUMN。

5.2.3.2 样品装柱

称取 16.0 g 重力柱抽干的分离介质于 50 mL 离心管，加纯化水至 28.0 g。下端用堵头堵住，用塑料滴管将填料加入空柱中。装上适配器，连接管路，取下下端堵头，用 0.65 mL/min 流速装柱，至高度、压力稳定。卸下装柱器，重新安装适配器，用 5.25 mL/min 流速压柱子 5 min，至高度、压力

再次稳定，与 0.65 mL/min 装柱后高度比，压缩比在 5%~10%。流速为 0，下端用堵头堵住，上端管路断开连接，将适配器下拧 2 mm 左右。上端管路在一段时间后再连接柱子，以免引入气泡。

5.2.3.3 进样

20 μ L 样品中依次进样 3 mg/mL 蓝色葡聚糖、2% 丙酮、10 mg/mL 分子量为 102 K 的葡聚糖标准品、8 mg/mL 分子量为 64 K 的葡聚糖标准品、8 mg/mL 分子量为 13 K 的葡聚糖标准品，流速设定为 0.8 mL/min。

5.2.3.4 结果计算

按式（2）计算凝胶分配系数：

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_c - V_0} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

K_{av} ——凝胶分配系数；

V_e ——葡聚糖标准品的保留体积，单位为毫升（mL）；

V_0 ——蓝色葡聚糖的保留体积，单位为毫升（mL）；

V_c ——丙酮的保留体积，单位为毫升（mL）。

在重复性条件下获得的三次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

5.2.4 非特异性吸附量

5.2.4.1 测试仪器

测试仪器包括：

- a) 蛋白层析系统；
- b) 1 mL 预装柱。

5.2.4.2 溶液

溶液包括：

- a) 缓冲液 A，pH 7.0：20 mM 磷酸盐；
- b) 缓冲液 B，pH 7.0，20 mM 磷酸盐，150 mM NaCl；
- c) 细胞色素 C 标准工作溶液，用缓冲液 A 配置浓度为 0.8 mg/mL、0.5 mg/mL、0.25 mg/mL、0.1 mg/mL、0.05 mg/mL 的标准工作溶液。

5.2.4.3 绘制标准曲线

利用蛋白层析系统，流动相缓冲液 A，平衡后，依次测试 0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、0.25 mg/mL、0.5 mg/mL、0.8 mg/mL 的细胞色素 C。进样 100 μ L，走旁路，即进样质量分别为 0 μ g、5 μ g、10 μ g、25 μ g、50 μ g、80 μ g，流速 0.5 mL/min，计算峰面积，用峰面积和进样质量作标准曲线。

5.2.4.4 样品测试

0.5 mL/min 流速，以 mL 为基准。用缓冲液 A 平衡 10 mL，进样 0.5 mL 细胞色素 C 标准工作溶液（2 mg/mL），柱冲洗 10 mL，用缓冲液 B 洗脱 20 mL。通过洗脱峰的峰面积计算非特异性吸附量。

5.2.4.5 结果计算

按式（3）计算非特异性吸附量：

$$W_N = \frac{C_E V_E}{V_{gel}} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

W_N ——非特异性吸附量，单位为微克每毫升（ μ g/mL）；

C_E ——洗脱峰蛋白浓度，单位为毫克每毫升(mg/mL)，由标准曲线计算出；

V_E ——洗脱峰体积，单位为毫升(mL)；

V_{gel} ——分离介质的体积，单位为毫升(mL)。

5.2.5 固含量

按 GB/T 38170—2019 中 6.4 的规定执行。

5.2.6 菌落总数

按 GB/T 38170—2019 中 6.7 的规定执行。

5.2.7 对应基球的 5-羟甲基糠醛脱落数

5.2.7.1 样品处理

用 1 mM 的盐酸和 0.1 M 的 NaOH 处理分离介质（分离介质：溶液=1:1），于 40 °C 下培养一周后，测试上清液 200 nm~400 nm 的吸收。

5.2.7.2 溶液配制

配制 1 µg/mL、5 µg/mL、7.5 µg/mL、10 µg/mL、12.5 µg/mL、15 µg/mL、20 µg/mL 的 5-HMF 水溶液。

5.2.7.3 样品测定

建立 5-HMF 标准曲线。配制 1 µg/mL、5 µg/mL、7.5 µg/mL、10 µg/mL、12.5 µg/mL、15 µg/mL、20 µg/mL 的 5-HMF 水溶液。以蒸馏水作为空白试样，取 1 个已知质量浓度的 5-HMF 标准溶液置于石英比色皿中，在 200 nm~400 nm 波长范围内扫描，绘制光谱扫描曲线，根据扫描曲线确定最大吸收波长。以蒸馏水作为空白，在最大吸收波长下测定其他已知浓度 5-羟甲基糠醛水溶液的吸光度，绘制标准曲线，建立回归方程式。

6 检验规则

6.1 组批

同一工艺周期生产，质量均一的产品为一批。

6.2 抽样

按 GB/T 5475 的规定进行。

6.3 出厂检验

6.3.1 每批产品出厂前应进行检验，检验合格的产品方可出厂。

6.3.2 出厂检验项目为粒径、压力/流速特征和菌落总数。

6.4 型式检验

6.4.1 正常生产时，每半年进行一次型式检验，有下列情况之一时亦须进行型式检验：

- a) 新产品试制鉴定时；
- b) 正常生产后，如原料、工艺、设备有较大变化，可能影响产品性能时；
- c) 产品停产半年以上恢复生产时；
- d) 出厂检验结果与上次型式检验有较大差异时。

6.4.2 型式检验项目为要求中的全部项目。

6.5 判定规则

6.5.1 出厂检验判定和复检

6.5.1.1 出厂检验项目符合本文件要求，判定本批为合格。

6.5.1.2 出厂检验项目 1~2 项不符合要求，应复检，复检后如仍有 1 项不符合要求时，则判定该批为不合格品。

6.5.1.3 出厂检验项目超过 2 项不符合要求，判定该批为不合格品。

6.5.2 型式检验判定和复检

6.5.2.1 型式检验项目符合本文件要求，判定本批为合格。

6.5.2.2 型式检验项目 1~3 项（含 3 项）不符合要求，应复检，复检后如仍有 1 项不符合要求时，则判定该批为不合格品。

6.5.2.3 型式检验项目超过 3 项不符合要求，判定该批为不合格品。

7 标签、标志、包装、运输、贮存

7.1 标签、标志

7.1.1 产品标签应至少包括以下内容：

- a) 产品名称；
- b) 型号；
- c) 体积；
- d) 生产批号；
- e) 生产组织；
- f) 生产日期；
- g) 有效期；
- h) 注意事项等。

7.1.2 包装储运标识应符合 GB/T 191 的规定。

7.2 包装

宜选用塑料瓶包装，包装材料应确保产品在运输、贮存时不被污染和泄漏。

7.3 运输

应在常温环境下运输，避免过冷或过热，且采取措施防止产品失水。

7.4 贮存

应在 4℃~8℃ 环境下贮存。

8 保质期

在符合本文件规定的运输和贮存条件下，产品在包装完整和未经启封情况下，保质期按照销售包装标注执行。超过有效期可按本文件规定进行复验，若复验结果符合本文件要求，仍可使用。