

· 综述 ·

中药制药过程中超滤膜完整性评价手段的研究进展

马赞¹, 陈涛¹, 彭国平^{1,2}, 李红阳¹, 陈建伟¹, 李存玉^{1,2*}

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210023;

2. 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 南京 210023)

[摘要] 综述中药制药过程中超滤膜完整性评价手段,整理超滤膜完整性评价手段的文献,并结合中药制药过程中超滤技术应用特点进行发展趋势分析。直接、间接完整性检测法均具有一定的实用性,但是应用范围有待进一步评价,其中常用的气泡点法和扩散流法可对膜完整性进行快速评价,但无法在使用过程中进行检测;替代挑战实验法多采用外源性探针,灵敏度高却存在污染。现有的膜完整性检测方法无法满足中药制药过程中无外源性添加污染、指标灵敏、在线监控的要求,经分析发现间接检查法是未来膜完整性评价方法的研究方向,寻找内源性探针对提升膜完整性的检测水平具有重要意义。

[关键词] 超滤膜;完整性;中药;制药过程;评价手段

[中图分类号] R283.6;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)17-0208-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015170208

Review of Current Researches on Evaluation Methods of Ultrafiltration Membrane Integrity in Traditional Chinese Medicine Manufacturing Process

MA Yun¹, CHEN Tao¹, PENG Guo-ping^{1,2}, LI Hong-yang¹, CHEN Jian-wei¹, LI Cun-yu^{1,2*} (1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing 210023, China)

[Abstract] The purpose of this paper was to review evaluation methods of ultrafiltration membrane integrity in traditional Chinese medicine (TCM) manufacturing process. Practicality of direct and indirect integrity test of ultrafiltration membrane was obvious, but the range of application needed further evaluation. At present, membrane integrity could quickly be detected by bubble point method and diffusion flow method, but they can't be monitored during course of using. Exogenous probes were often applied in alternative challenge experiment with high sensitivity, but it was prone to contaminate the medicine. By studying literature information about evaluation methods of ultrafiltration membrane integrity in TCM manufacturing process, there was no method could make requirements of non-pollution, high sensitivity and on-line evaluation. Alternative challenge experiment was the future trend for membrane integrity and endogenous probe played a significant role in promoting technology level of ultrafiltration membrane integrity evaluation.

[Key words] ultrafiltration membrane; integrity; traditional Chinese medicine; manufacturing process; evaluation methods

超滤是借助滤过媒介(滤膜)的相对截留分子量对混合体系实现目的性精制和分离的技术,具有成分回收率高、常温操作等优势,在血液透析、蛋白纯化、药物制备、水净化等方面应用广泛^[1-4]。但随着超滤膜使用周期的增长或保存

方式不适宜等因素的影响,出现膜完整性问题(如截留相对分子量发生变化、破损等)导致分离效果变化的现象,影响了正常生产应用^[5-6],故需要灵敏、可靠的方法评价膜完整性。目前膜完整性的评价手段分为直接和间接检查法^[7-8],

[收稿日期] 20150127(016)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373980);南京中医药大学青年自然科学基金项目(13XZR24);江苏高校优势学科建设工程项目

[第一作者] 马赞,在读硕士,从事中药资源与制剂质量研究,Tel:15061099303,E-mail:544295413@qq.com

[通讯作者] *李存玉,博士,讲师,从事中药制药工艺研究,Tel:15380820765,E-mail:licunyuok@163.com

具体操作及评价方法 > 20 种,其中较为常用的是直接检查法中的泡点法。膜分离技术应用领域的多样性决定了具体评价方法的适用性和专一性,因此检查方法的应用范围有待进一步评价分析。

中药制剂尤其是中药注射液生产中膜技术的应用,多通过分子切割,去除不溶性微粒改善药液澄明度,截留细菌、微生物、内毒素、致敏性蛋白等有害物质来提升制剂安全性^[9-11]。膜完整性与制剂质量、安全性息息相关,要求中药制药生产过程需要监控系统。本文基于对已有的膜完整性评价手段进行分析,结合中药制药过程中对超滤膜完整性的要求,综述超滤膜完整性的检测方法,为制药行业中膜完整性的检测方法选择提供参考。

1 膜完整性检测方法分类及应用特点

1.1 直接完整性检测法

1.1.1 气泡点法^[12] 气泡点测试通常定义为最小气压克服全湿膜的膜孔毛细管压力和液体表面张力,强迫空气流穿过膜孔,简而言之就是膜孔内的溶液被空气替代,而以气泡穿过膜孔最小压力被称为气泡点,气泡点和膜的最大孔径或破损膜孔径相关,并可以通过毛细管方程^[13]计算。

$$P = \frac{4k\cos\theta}{d}\sigma$$

式中 P 为气泡穿过膜孔最小压力, k 为最大膜孔形状的修正系数, d 为最大膜孔径, θ 为液体与膜的接触角, σ 为液体表面张力。此方法优点在于操作简单,且有相对标准的测试步骤,在企业中应用较多,缺点在于指标较为模糊,受主观因素和外界影响因素多,在检测时需要脱离生产线操作,对超滤膜进行离线检测,进而影响生产效率。

1.1.2 压力衰减测试^[14] 压力衰减测试是基于溶液在一定压力作用下滤过后,检查压力前后的衰减。根据其具体操作模式又分为 2 种,包括填加-压力衰减测试模式和滤过-压力衰减测试模式,其具体操作方法为从膜的一侧进行水滤过,使用 1 个设定好的低于气泡点压力从完全浸湿膜的滤过端给予压缩气体,保持压力恒定(2~10 min)检测压力衰减曲线,此方法对损伤的中空纤维膜的完整性检测灵敏度较高^[15]。优点在于可以对损伤较小的超滤膜有效检测,针对不同构型的膜适用性好,灵敏度较高。缺点在于无法在线检测,缺少通用的检测限值和操作参数,测试时膜需要充分湿润,且影响因素偏多。

1.1.3 扩散气流测试法^[15-16] 扩散气流测试法和压力衰减测试法相似,但此方法不是通过检测压力衰减速率分析膜完整性,而是选择 1 个低于气泡点的压力,持续加压,检测扩散气体滤液流(气体取代的膜表面或者膜孔内的液体量),此方法的核心问题在于气流扩散的检测^[17]。方法灵敏度较压力衰减法有所提高,缺点在于无法在线检测,检测指标的控制尚无标准。

1.1.4 液体空隙率检测法 液体空隙率检测是 Dileo 和 Phillips 设计的用于检测膜完整性的方法^[18]。该方法中检测所用溶质和溶剂是可以混溶的,同时可以分析膜的孔径分布,特别是最大孔径,操作压力可以让溶液中成分选择性地

透过膜,而有些成分则无法通过如蛋白病毒等。通过筛选出可以衡量膜孔径分布的标准物质,采取参数计算分析来评价膜完整性。优点是对膜无损伤,灵敏度高;缺点是目前尚未出现其在生产中应用的实例,仅应用于离线操作。

1.1.5 其他^[19] 声学传感器检测是在膜的多个部位放有用于检测震动的加速计,通过耳机等其他方法倾听由于膜破损而引起的声音变化,但该方法灵敏度差,且需要专业人员检测,后来逐渐由声敏传感器代替。此外,还有超声波检测法根据声波图差异分析完整膜与破损膜。

1.2 间接完整性检测法

1.2.1 微粒计数法 微粒计数法和微粒检查法相似,均是通过系统中微粒计数器对待滤液和滤液中分布较为广泛的微粒进行计数,分析膜构件的完整性。如何解决微粒计数器的灵敏度及不同膜组件的适用性是提升此检测方法实用性的关键^[20]。虽然目前微粒计数法灵敏度高于浑浊度检测法^[21],但仍难以满足应用要求。此方法优点在于可以对膜的完整性实现在线检测,但灵敏度太低,检测结果与待滤液中微粒的浓度有关,且易受积压空气导致的气泡影响,同时,检测仪器昂贵,需对检测器进行定期清理,微粒计数器在开启和关闭时的仪器稳定性需进一步提高^[22]。

1.2.2 浑浊度检查法 浑浊度检查法是通过膜的滤前和滤后液进行浑浊度检测,对比分析二者差异,判断膜的完整性。一般完整膜的滤后液浑浊度要低于滤前液 90%。此检测方法有较好的推广性,但灵敏度太低限制了该方法的应用^[23]。目前采用的激光浊度计灵敏度较常规浊度计提高了 2 个数量级以上,可达到浊度 0~1 度,且大部分完整超滤膜的超滤水的浊度在 0.01~0.05 度,应用前景良好。此方法优点在于可以对膜的完整性实现在线检测,适用性好,不受膜构型限制。

1.2.3 替代挑战实验 替代挑战实验分为微生物挑战测试法、纳米探针挑战测试法和磁性颗粒挑战测试法。微生物挑战实验^[24]采用含有微生物的溶液,如噬菌体和卵囊等可适当避免对人体健康的损害,通过膜的滤过分析滤液中微生物的水平,判断膜的完整性。该方法灵敏度高,可在线检测,还可与其他检测方法实现同时检测^[25];但检测时间过长会导致结论可信度降低,且此方法有一定污染性,不适于中药制剂生产中膜完整性检测。纳米探针挑战测试法采用的纳米金具有背景噪音低、分散度高、价钱合理等特点,常采用柠檬酸盐或硫醇稳定的纳米金微粒作为纳米探针(12~15 nm)。该方法灵敏度高,可以在线检测。缺点在于纳米金离子易产生膜孔堵塞造成污染,目前尚处于试验阶段^[26-27]。此外,目前还有采用荧光纳米探针^[28]技术评价膜完整性,灵敏度较纳米金测试法有了明显提升。磁性颗粒挑战测试法^[29]区别于采用微粒计数器和浊度仪的检测方法,在待滤液中加入一定浓度磁性颗粒,在滤液端装有磁针感应单元,如超导量子干涉器(SQUID)、超大磁阻感应器(GMR)等,检测滤液中磁性颗粒的浓度,采用的磁性颗粒直径需大于完整膜的最大孔径以确保其无法透过。此方法可以在线检测且

灵敏度高、检查特异性高,目前尚处于探索阶段,对人体的健康危害性尚不明确。

2 制药生产过程中膜完整性检测方法

2.1 现状与发展趋势 在药品生产过程中,超滤膜依靠表面密布的细小微孔只允许水及小分子穿过,但是随着药液通过量的增加,截留物质在膜表面及膜孔内逐渐累积,造成通量逐步下降,因此在膜组件重新使用前需对其进行清洗、再生。在高频率使用后,导致超滤膜孔径增大,甚至出现膜渗漏的现象。目前,制药企业中膜完整性检测多采用气泡点法,在生产结束后,将膜组件清洗后进行检测。具体方法为打开完整性测试装置的气源,对系统加压。在系统加压过程中,完整性测试装置上显示的空气流速是先提高后下降至一个稳定的流速。测量到的这个稳定流速就是空气前进流(扩散流),如果这个稳定的流速降低到了可接受规范之下,并且与先前的量值一致,说明通过膜完整性测试。但在实际操作应用中,无法在膜生产应用中进行完整性评价,且方法灵敏度有待提高。药品生产过程控制决定了质量,在生产过程中如何实现各工序的在线控制也成为目前制药行业所关注的问题。膜的完整性也决定了药品的质量和安全性。因此,如何建立一种可在线控制、检测灵敏度高且无外加物质导致污染的膜完整性检测方法显得至关重要。

2.2 膜完整性在线检测方法 对已有检测方法进行分析,见表 1。能够满足适用于生产过程中评价超滤膜完整性方法为微粒检查法,但是该方法存在灵敏度偏低的问题。同时,由于制剂生产中品种的差异,尤其是中药注射剂,在制剂所含微粒数偏低的情况下,限制了微粒检查法的应用,而通过外加探针提升检测方法的灵敏度则会直接影响制剂的安全性。

表 1 膜完整性检测方法的应用特点

Table 1 Application characteristics of membrane integrity detection methods

检测方法	灵敏度	污染性	过程控制
气泡点	中	无	离线
压力衰减	中	无	离线
扩散气流	中	无	离线
液体空隙率	中	无	离线
微粒	中	无	在线、离线
微生物挑战	高	是	在线、离线
纳米探针挑战	高	是	在线、离线
磁性颗粒挑战	高	是	在线、离线

细菌内毒素是革兰氏阴性菌细胞壁的脂多糖成分^[30-33],广泛存在于水溶液中,且在中药制剂生产过程中细菌内毒素的适度污染是必然的,在生产时如不能有效去除,则会影响临床用药安全性^[34-35],目前多采用超滤技术去除细菌内毒素^[36-42]。研究发现细菌内毒素在水溶液中以团聚状态存在^[43-44],具有光散射特征。因此,选择细菌内毒素作

为膜完整性评价的内源性探针,针对超滤前后溶液中内毒素的浓度变化,采用光散射法检测分析,建立检测方法,研发适用于中药制剂用膜完整性评价的设备,可满足中药制药过程中在线评价膜完整性的方法,见图 1。

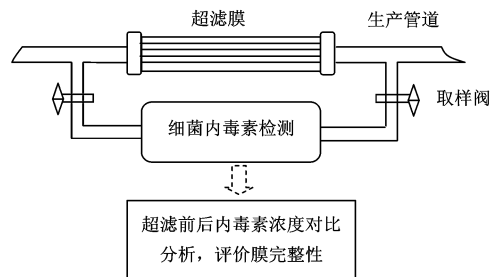


图 1 中药制药过程中在线评价膜完整性方法

Fig. 1 Online evaluation method of membrane integrity in traditional Chinese medicine manufacturing process

3 讨论

膜完整性在线检测中针对细菌内毒素团聚状态的光散射特征进行检测,因此需要排除中药成分的干扰,药材中皂苷类成分具有类表面活性性质,在水溶液中常以多分子缔合的胶粒、胶束存在,因此需要进一步分析内毒素的分子结构、光散射特征等参数与中药成分间的差异,建立针对性强、灵敏度高的检测方法。此外,需进一步明确超滤技术实际应用中膜材质、膜孔径、溶剂、温度、压力等因素对检测结果的影响。

通过对目前膜完整性检测的主要方法进行总结,发现直接检测法方法简便、可操作性好,但是无法在线检测制约了其在中药制剂生产中的应用。间接检测法中灵敏度均有大幅提高,且替代挑战法虽然研究尚未成熟,但是其技术优势和应用前景已逐渐凸显并得到认可。因此,应根据中药制剂生产中膜应用的特点,以替代挑战法为研究方向,筛选出适用于中药制药应用的膜完整性检测方法,并建立标准操作规范。基于探针技术的在线评价膜完整性技术也存在一些难以克服的缺陷,如探针易受污染而精密度下降,当膜截留分子量偏大时,探针在超滤前后未出现明显差异。因此需要进一步寻找溶液中普遍存在的内源性物质或者开发对溶液不造成污染的外源性探针,同时应与离线膜完整性检测方法相结合,保障检测结果的准确性^[45-46]。

[参考文献]

[1] 朱倩倩, 萧伟, 刘俊超, 等. 不同材质超滤膜对细菌内毒素与有效成分的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(11): 1-4.

[2] Loginov M, Boussetta N, Lebovka N, et al. Separation of polyphenols and proteins from flaxseed hull extracts by coagulation and ultrafiltration [J]. J Membr Sci, 2013, 442 (1): 177-186.

[3] 彭国平, 郭立玮, 徐丽华, 等. 超滤技术应用对中药成分的影响[J]. 南京中医药大学学报: 自然科学版,

- 2002, 18(6):336-341.
- [4] 张艳萍,戴志远,张虹.紫贻贝酶解物中降血压肽的超滤分离[J].食品与发酵工业,2010,36(9):46-51.
- [5] 黄明珠,叶挺进.浸没式超滤膜完整性检测与膜丝修补方法探讨[J].给水排水,2010,36(3):17-20.
- [6] 姜涛,潘晓宝.超滤膜爆破原因分析和处理对策[J].宁夏电力,2010(1):67-70.
- [7] United States Environmental Protection Agency. Membrane filtration guidance manual[Z]. EPA 815-R-06-009, 2005.
- [8] Guo H, Wyart Y, Perot J, et al. Low-pressure membrane integrity tests for drinking water treatment: A review[J]. Water Res, 2010, 44(1):41-57.
- [9] 陈伟,张鹏,彭国平,等.不同孔径超滤膜对栀子苷热原去除工艺的影响[J].中国实验方剂学杂志,2013, 19(10):11-13.
- [10] 陈伟,李存玉,彭国平,等.超滤工艺对双黄连注射剂致敏性的影响[J].医药导报,2012,19(10):11-13.
- [11] 宋刚,张宁,彭志英,等.超滤浓缩微生物胞外多糖 PS-9415 发酵液的研究[J].食品科学,2003,24(2):42-44.
- [12] Randles N. Large scale operating experience in membrane systems for water and waste water reclamation [J]. Desalination, 1997, 108(1/3):205-211.
- [13] Farahbakhsh K, Smith D W. Estimating air diffusion contribution to pressure decay during membrane integrity tests[J]. J Membr Sci, 2004, 237(1/2):203-212.
- [14] Adham S S, Jacangelo J G, Laïne J M. Low-pressure membranes: assessing integrity[J]. J Am Water Works Ass, 1995, 87(3):62-75.
- [15] Johnson W T. Predicting log removal performance of membrane systems using *in-situ* integrity testing [J]. Filtr Sep, 1998, 35(1):26-29.
- [16] Johnson W T. Automatic monitoring of membrane integrity in microfiltration systems [J]. Desalination, 1997, 113(2/3):303-307.
- [17] Cheryan M. Ultrafiltration and Microfiltration Handbook [M]. Florida: The Chemical Rubber Company Press, 1998:34-41.
- [18] DiLeo A J, Phillips M W. Integrity test for membranes: USA, US 5282380[P]. 1994-02-01.
- [19] Adham S S, Jacangelo J G, Lane J M. Low-pressure membranes: assessing integrity[J]. J Am Water Works Ass, 1995, 87(3):62-75.
- [20] Panglisch S, Deinert U, Dautzenberg W, et al. Monitoring the integrity of capillary membranes by particle counters [J]. Desalination, 1998, 119(1/3):65-72.
- [21] Landsness L B. Accepting MF/UF technology-making a final cut [C]. Texas: The American Water Works Association, Membrane Technology Conference, 2001.
- [22] Farahbakhsh K, Smith D W. Monitoring the integrity of low-pressure water treatment membranes [J]. Water Res, 2003, 37(6):95-107.
- [23] Hirata T, Hashimoto A. Experimental assessment of the efficacy of microfiltration and ultrafiltration for cryptosporidium removal [J]. Water Sci Technol, 1998, 38(12):103-107.
- [24] Bennett A. Drinking water: pathogen removal from water-technologies and techniques [J]. Filtr Sep, 2008, 45(10):14-16.
- [25] Gitis V, Adin A, Nasser A, et al. Fluorescent dye labeled bacteriophages-a new tracer for the investigation of viral transport in porous media: Introduction and characterization [J]. Water Res, 2002, 36(17):4227-4234.
- [26] Lohwacharin J, Takizawa S. Effects of nanoparticles on the ultrafiltration of surface water [J]. J Membr Sci, 2009, 326(2):354-362.
- [27] Vitaly G, Roy C H, Robert M C, et al. Nanoscale probes for the evaluation of the integrity of ultrafiltration membranes [J]. J Membr Sci, 2006, 276(1/2):199-207.
- [28] Changwon S, Byeonggyu C, Seockheon L, et al. Application of genetic programming to develop the model for estimating membrane damage in the membrane integrity test using fluorescent nanoparticle [J]. Desalination, 2011, 281(1):80-87.
- [29] Wang S L, Lu X Q, Zhou N, et al. Analysis of performance criteria for ultrafiltration membrane integrity test using magnetic nanoparticles [J]. Desalination, 2009, 353(2):21-29.
- [30] Anderson W B, Slawson R M, Mayfield C I. A review of drinking-water-associated endotoxin, including potential routes of human exposure [J]. Can J Microbiol, 2002, 48(7):567-587.
- [31] Rapala J, Lahti K, Rasanen L A, et al. Endotoxins associated with cyanobacteria and their removal during drinking water treatment [J]. Water Res, 2002, 36(10):2627-2635.
- [32] Gehr R, Yrjölä P U, Baptista I F D S, et al. Concentrations of endotoxins in waters around the island of montreal and treatment options [J]. Water Qual Res J Can, 2008, 43(4):291-303.
- [33] Toole J, Sinclair M, Jeavons T. Alternative water sources and endotoxin [J]. Water Sci Technol, 2008, 58(3):603-607.

- [34] 郭金转,郑秀端,陈定祥. 基层医院输液热原反应及其预防[J]. 临床和实验医学杂志, 2002, 1(3): 187-188.
- [35] 周述香,张勇,张宇靖,等. 中药注射剂不良反应报表175份分析[J]. 中医药导报, 2006, 12(11): 68-69.
- [36] 尹楠,李红阳,彭国平,等. 超滤法去除中药注射液中的细菌内毒素[J]. 中国医药工业杂志, 2008, 39(12): 927-929.
- [37] 宫凯敏,李红阳,尹楠,等. 超滤技术去除苦参素注射液的细菌内毒素[J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12(2): 18-19.
- [38] 姜翠莲,史新元,王耀,等. 超滤去除清开灵注射液中热原的研究[J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32(11): 776-778.
- [39] 尹沛松,田丰. 中空纤维超滤膜在华药制备无菌除热原水中的应用[J]. 膜科学与技术, 1999, 19(3): 54-56.
- [40] 龙琳,张响. 超滤法除热原对川参通注射液质量的影响[J]. 中成药, 2001, 23(5): 328-330.
- [41] 张英辉. 超滤法去除人参皂苷热原的研究[J]. 现代医药卫生, 2005, 21(16): 2220-2221.
- [42] Yun K, Robert G L. Effect of ionic strength and pH on endotoxin removal efficiency and protein recovery in an affinity chromatography[J]. Process Biochem, 2000, 36(1/2): 85-92.
- [43] Petsh D, Anspach F B. Endotoxin removal from protein solutions[J]. J Biotech, 2000, 76(2/3): 97-119.
- [44] Santos N C, Silva A C, Castanho MA, et al. Evaluation of lipopolysaccharide aggregation by light scattering spectroscopy[J]. ChemBio Chem, 2003, 4(1): 96-100.
- [45] Martin T, Pia L, Frank S, et al. Laser-induced breakdown-detection for reliable online monitoring of membrane integrity[J]. J Membr Sci, 2014, 466: 313-321.
- [46] 彭国平. 一种滤膜完整性的检测装置及其检测方法: 中国, 201310229666. X[P]. 2013-06-08.

[责任编辑 刘德文]

第三届中药材基地共建共享交流大会通知

2015年度中药材基地共建共享交流大会定于9月18—20日在山西太原召开,由山西振东制药股份有限公司董事长李安平担任执行主席。本次大会以中央关于加快转变农业发展方式,加快构建新型农业经营体系,推进农业现代化的要求和国务院办公厅转发的《中药材保护与发展规划》为指针,围绕以下主题开展交流:(1)大力推进现代中药农业、现代中药农业企业的建设;(2)大力推进中成药、中药饮片企业与中药农业企业的合作;(3)大力推进中医院、国医馆、中药堂与药材饮片企业的合作;(4)努力建立面向大健康需求的中药材、中药饮片现代商品品规、标准体系,促进中药工业、农业、商业现代化协调发展;(5)促进药用植物保育、可持续利用和中药农业科技进步。大会组织科技界与产业界、工业界与农业界、商业界与工农业界以及政府部门和产业、科技界和临床单位的对接交流。大会包括展览交流和会议交流二大部分。