

· 工艺与制剂 ·

不同材质超滤膜对细菌内毒素与有效成分的影响

祝倩倩^{1,3}, 萧伟^{1,2,3*}, 刘俊超^{2,3}, 孙永成^{2,3}, 伍清龙^{1,3}

(1. 南京中医药大学, 南京 210000; 2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001;
3. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001)

[摘要] 目的: 考察不同材质超滤膜对注射用芪红脉通的适用性。方法: 以细菌内毒素与有效成分透过率为指标, 采用截留相对分子质量 100 kDa 的聚砜、聚醚砜、聚丙烯、混纺 4 种不同材质的中空纤维超滤膜进行超滤, 以动态浊度法检测超滤前后细菌内毒素的去除情况, 并结合有效成分的透过率, 综合评价超滤膜材质对注射用芪红脉通的适用性。结果: 聚丙烯材质超滤膜去除细菌内毒素的效果好, 且有效成分的透过率较高, 适于本品的精制。结论: 超滤法去除细菌内毒素效果理想, 且不同材质超滤膜去除细菌内毒素的效果存在差异。

[关键词] 超滤; 膜材质; 细菌内毒素

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0001-04

[doi] 10.11653/syjf2013110001

Effect of Ultrafiltration Membrane with Different Materials on Bacterial Endotoxin and Active Ingredients

ZHU Qian-qian^{1,3}, XIAO Wei^{1,2,3*}, LIU Jun-chao^{2,3}, SUN Yong-cheng^{2,3}, WU Qing-long^{1,3}

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210000, China;
2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd, Lianyungang 222001, China;
3. State Key Laboratory of New-technology for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate applicability of ultrafiltration membrane with different materials in Qihong Maitong injection. **Method:** With transmissivity of active ingredients and bacterial endotoxin as indexes, 4 kinds of different materials (polysulfone, polyether sulfone, polypropylene and blending) hollow fiber ultrafiltration membrane with the same entrapped relative molecular mass of 100 kDa were selected to ultrafiltrate. The removal of bacterial endotoxin and transmittance of active ingredients before and after ultrafiltration was detected by kenitie-turbidimetry method, which were adopted to determine the best appropriate ultrafiltration membrane material. **Result:** Polypropylene-100 kDa ultrafiltration membrane not only could effectively remove bacterial endotoxin, but also had a higher transmittance of active ingredients, it was suitable for purification of Qihong Maitong injection. **Conclusion:** Ultrafiltration could effectively remove bacterial endotoxin, while removal effect of bacterial endotoxin with different materials of ultrafiltration membranec was different.

[Key words] ultrafiltration; membrane materials; bacterial endotoxin

[收稿日期] 20121212(008)

[基金项目] 国家科技部“重大新药创制”项目(2011ZX09401-097)

[第一作者] 祝倩倩, 在读硕士, 从事中药新型制剂研究, Tel: 15189025771, E-mail: nzy_zqq@gmail.com

[通讯作者] * 萧伟, 博士, 研究员级高级工程师, 从事中药新药的研究与开发, E-mail: wzhh-nj@tom.com

注射用芪红脉通为冻干粉针剂,由黄芪、红花组成,用于治疗冠心病心绞痛。近年来,超滤技术被广泛应用于中药注射剂的生产实践,该技术能有效去除杂质和热原,保留有效成分,提高中药注射剂的安全性。特别是在除热原方面,去除效率高、操作简单、且不受高温加热与热原浓度的影响^[1]。

超滤技术以膜为过滤介质,通过筛分原理达到分离,其分离效果除受膜孔径大小直接影响外,与膜材质的性能也密切相关^[2]。本实验采用动态浊度法,对 4 种不同材质的中空纤维超滤膜去除细菌内毒素的效果进行评价,并结合有效成分的透过率对超滤膜材质的适宜性进行筛选,为超滤膜的合理使用和除热原提供实验依据。

1 材料

BET-72 型细菌内毒素测定仪(天津市天大天发科技有限公司),中空纤维超滤膜组件(100 kDa,膜材质分别为聚丙烯、聚砜、聚醚砜、混纺,北京旭邦膜设备有限责任公司),XX80EL230 型蠕动泵(美国密理博),1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),ELSD-2000 型蒸发光散射检测器(美国奥泰公司),UV-2550 PC 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司)。

鲎试剂(湛江博康海洋生物有限公司,批号 1202101),细菌内毒素工作对照品(中国药品生物制品检定所,批号 150601-201174),细菌内毒素检查用水(湛江博康海洋生物制品有限公司,批号 1204080),黄芪、红花中间体配液(江苏康缘药业股份有限公司,批号 110601,110501),黄芪甲苷、羟基红花黄色素 A 对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为 111637-200905,110781-200613),乙腈为色谱纯,其他所用试剂均为分析纯,水为注射用水。

2 方法与结果

2.1 超滤液的预处理 取芪红脉通中间体配液适量,加注射用水使完全溶解,静置至室温后冷藏 24 h,滤过,于 $5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清液,用 0.3% 针用活性炭在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 吸附 30 min,过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜,即得。

2.2 羟基红花黄色素 A 含量测定^[3]

2.2.1 色谱条件 Phenomenex ODS 色谱柱($4.6\text{ mm}\times 250\text{ mm}, 5\text{ }\mu\text{m}$),流动相乙腈-0.1% 磷酸溶液(13:87),检测波长 400 nm ,柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$,进样量 $10\text{ }\mu\text{L}$,流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。理论塔板数按羟基红花黄色素 A 峰计不低于 1 000。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 真空干燥 3 h 的羟基红花黄色素 A 对照品适量,加水溶解并制成 $0.2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密量取超滤工序前后样品溶液 0.5 mL 至 50 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,用 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,即得。

2.3 黄芪总皂苷含量测定^[4]

2.3.1 对照品溶液的制备 取黄芪甲苷对照品 10 mg ,精密称定,置 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密吸取按 2.3.1 项下方法制备的各供试品溶液 10 mL ,用水饱和的正丁醇萃取 4 次,每次 20 mL ,合并正丁醇萃取液,用氨试液洗涤 2 次,每次 20 mL ,正丁醇液蒸干,以 50% 甲醇溶解并定容至 10 mL ,即得。

2.3.3 线性关系考察 精密量取对照品溶液 $0.0, 0.15, 0.30, 0.45, 0.60, 0.75\text{ mL}$,依次分别加入 50% 甲醇 $0.75, 0.60, 0.45, 0.30, 0.15, 0.0\text{ mL}$,分别加 8% 香草醛无水乙醇溶液 0.75 mL ,置冰水浴中,加 72% 硫酸溶液 7.5 mL ,摇匀,放入 $62\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中,保温 20 min,置冷水浴中立即冷却,于 540 nm 处测定吸光度(A)。以随行试剂作空白,对照品进样质量为横坐标,A 为纵坐标,得回归方程 $Y = 2.424X - 0.01 (r = 0.998\ 8)$,表明黄芪甲苷在 $0.08\sim 0.4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 呈良好线性关系。

2.4 黄芪甲苷含量测定^[5-6]

2.4.1 色谱条件 采用 HPLC 与 ELSD, Alltima C_{18} 色谱柱($4.6\text{ mm}\times 150\text{ mm}, 5\text{ }\mu\text{m}$),流动相乙腈-水(34:66),流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,漂移管温度 $105\text{ }^{\circ}\text{C}$,载气流速 $2.5\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

2.4.2 对照品溶液的制备 精密称取黄芪甲苷对照品 10 mg 置 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.4.3 供试品溶液的制备 精密量取超滤工序前后样品溶液 1 mL ,加 25% 甲醇溶解并稀释至 5 mL ,用 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,即得。

2.5 细菌内毒素的检测

2.5.1 标准曲线的绘制及可靠性试验^[7] 用细菌内毒素检查用水将细菌内毒素对照品溶解并稀释,配制成内毒素浓度分别为 $2.0, 0.5, 0.125, 0.031\ 25\text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列对照品溶液。各取 0.1 mL 分别加至预先加有鲎试剂溶液 0.1 mL 的反应管内,混合均匀,插入细菌内毒素测定仪进行检测($n = 3$),并同时作阴性对照 3 管,检测时间 1 h,得标准曲线 $\lg t =$

3.018 4 - 0.253 29 lgC ($r = 0.999 5$)。结果阴性对照管反应时间 > 标准曲线最低浓度的反应时间,实测内毒素浓度分别为 2.128 (RSD 1.66%), 0.515 (RSD 1.00%), 0.098 (RSD 8.17%), 0.037 (RSD 7.96%) $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$,说明标准曲线成立。

2.5.2 干扰试验^[8] 将样品液分别稀释至 50, 100, 200, 400 倍,依据《中国药典》2010 年版一部附录 X III D 细菌内毒素检查法测定,供试品最大有效稀释倍数 (MVD) = CL/λ_1 计算,式中 C 为供试品溶液浓度, L 为供试品的内毒素限值(本冻干粉针临床应用最大剂量 2 mL,使用时用 0.9% 氯化钠注射液或 5% 葡萄糖注射液稀释至 250 mL,其细菌内毒素应 $\leq 0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$;人均体重按 60 kg 计算,人体最大可接受的内毒素剂量 300 EU,依照公式 $L = K/M = (300 - 250 \times 0.5)/2 = 87.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, λ_1 为标准曲线的最低浓度 ($0.031 25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$),计算得供试品的 MVD = 2 800 倍。结果显示,50, 100, 200, 400 稀释倍数下添加内毒素的回收率依次为 79% (RSD 1.45%), 75% (RSD 5.19%), 68% (RSD 4.08%), 43% (RSD 3.00%),故选择 50 倍为最佳稀释倍数。

2.5.3 细菌内毒素定量测定 将各样品溶液用细菌内毒素检查用水稀释至干扰试验确定的倍数,同时分别将此倍数稀释液制成含内毒素对照品 $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液。分别取上述溶液 0.1 mL 加入预先加有鲎试剂 0.1 mL 的反应管内,涡旋混匀,插入细菌内毒素定量检测仪进行检测 ($n = 2$),计算平均回收率、细菌内毒素含量及去除率。

$$\text{去除率} = (1 - \text{超滤后内毒素含量} / \text{超滤前内毒素含量}) \times 100\%$$

2.6 超滤试验及膜材质的选择 取超滤前药液适量,平均分成 4 份,每份 1 L。根据药液体系特点,选用膜材质分别为聚砜 (PS)、聚醚砜 (PES)、聚丙烯 (PP) 及混纺超滤膜,截留相对分子质量均为 100 kDa 的 4 种中空纤维超滤膜。药液质量浓度均为 $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,温度 $20 \text{ }^\circ\text{C}$,操作压力 0.05 MPa。超滤前药液经超滤器分离,初滤液返回储液槽,待分离药液平衡后,收集滤过液。随超滤的进行,原料液浓度逐渐升高,待原料液无法通过蠕动泵时,超滤结束,收集透过液和截留液,并记录其体积。测定超滤前药液、超滤透过液中细菌内毒素含量与有效成分黄芪总皂苷、黄芪甲苷、羟基红花黄色素 A 含量。计算各成分透过率,见表 1~2。

$$\text{有效成分透过率} = (C_1 \times V_1) / (C_0 \times V_0) \times 100\%$$

其中 C_0 为超滤前药液质量浓度; C_1 为透过液中有效成分质量浓度; V_0 为超滤前药液体积; V_1 为透过液体积。

表 1 不同膜材质超滤后芪红脉通中有效成分透过率的比较 %

| 超滤膜 | 羟基红花黄色素 A | 黄芪总皂苷 | 黄芪甲苷 |
|-----|-----------|-------|-------|
| PP | 91.47 | 91.44 | 99.29 |
| PS | 71.79 | 67.24 | 38.37 |
| PES | 93.50 | 95.36 | 90.91 |
| 混纺 | 77.70 | 73.66 | 70.09 |

表 2 超滤前后注射用芪红脉通中细菌内毒素检测

| 超滤膜 | 回收率 / % | 变异系数 / % | 细菌内毒素浓度 / $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ | 去除率 / % |
|-----|---------|----------|--|---------|
| 超滤前 | 98 | 0.65 | 3.88 | |
| PP | 92 | 1.12 | < 0.031 25 | 100 |
| PS | 93 | 0.45 | < 0.031 25 | 100 |
| PES | 86 | 2.05 | 1.01 | 74 |
| 混纺 | 92 | 1.11 | < 0.031 25 | 100 |

结果表明,不同材质的超滤膜对有效成分的影响具有显著差异。PES 与 PP 材质的超滤膜超滤后有效成分的透过率较高;PS 与混纺材质超滤膜的有效成分的转移率较低。4 种材质超滤膜的细菌内毒素含量均 < 细菌内毒素限值 ($87.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$),表明超滤后细菌内毒素检查合格,但就去除效果而言,PES 材质的超滤膜细菌内毒素去除率较其余 3 种材质低。PS 与混纺材质超滤膜的细菌内毒素去除效果好,但有效成分透过率较低 (< 80%);PES 材质的超滤膜有效成分透过率最高,但其细菌内毒素的去除效果较差;PP 材质去除细菌内毒素效果好,且有效成分转移率较高,适宜于本品的精制。

3 讨论

本试验选取 4 种不同材质超滤膜进行超滤,结果表明,相同截留相对分子质量不同材质的超滤膜在去除细菌内毒素与有效成分透过方面存在差异。此外,采用膜孔径为 10 万的超滤膜超滤均能有效去除热原,除了超滤膜本身可去除热原外,与超滤前药液的预处理过程采用活性炭吸附和微孔滤膜有关,同时验证了活性炭吸附与膜分离技术联用的工艺设计,可使热原的去除更加完全。

目前,超滤技术的应用研究多偏重于超滤膜孔径的选择与操作条件的优化,而对膜材质的筛选具有盲目性。由于不同材质制成的超滤膜性能不同,

对乙酰氨基酚-海藻酸钠-碳纳米管凝胶微球的制备及体外释药性能考察

万洪善*, 袁芹, 赵威洋

(连云港职业技术学院, 江苏 连云港 222006)

[摘要] 目的:制备对乙酰氨基酚-海藻酸钠-碳纳米管(MWCNT)凝胶微球,并考察其体外释药性能。方法:以对乙酰氨基酚(PCM)为模型药物,1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺(EDC)为相偶联剂,通过海藻酸钠(SAL)对碳纳米管(CNTs)进行修饰和改性,制备碳纳米管-海藻酸钠凝胶微球。借助 FTIR 分析、扫描电子显微镜表征修饰后 MWCNTs 的表面形貌,探讨 PCM-SAL-MWCNT 凝胶微球在人工肠液(SIF)中释放机制。结果:修饰后的 MWCNT 凝胶微球载药量及在介质中释放量随凝胶微球中 MWCNT 含量的增加而减少,在模拟肠液中释放时间长且药物释放完全。结论:MWCNT 可作为药物缓释载体材料。

[关键词] 对乙酰氨基酚; 海藻酸钠; 多壁碳纳米管; 凝胶微球; 缓释

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0004-04

[doi] 10.11653/syfy2013110004

Preparation and *in vitro* Release Properties Investigation of Acetaminophen-Sodium Alginate-Carbon Nanotube Gels Microsphere

WAN Hong-shan*, YUAN Qin, ZHAO Wei-yang

(Lianyungang Technical College, Lianyungang 222006, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare acetaminophen-sodium alginate-carbon nanotubes gels microsphere, and investigate its *in vitro* release properties. **Method:** With acetaminophen as a model drug, 1-ethyl-3-(3-

[收稿日期] 20121227(007)

[基金项目] 连云港市 2011 年科技攻关项目(CG1111);连云港市 2012 年科技攻关项目(CN1211)

[通讯作者] * 万洪善, 硕士, 副教授, 从事生物制药教学与研究, Tel:13851288799, E-mail:wanhs9799@126.com

使得膜材质与待分离体系间存在相对适宜性。因此,在超滤技术的应用过程中,膜材质的选择应引起重视。

[参考文献]

- [1] 李存玉,郑云枫,李红阳,等. 细菌内毒素定量法研究活性炭与超滤法热原去除工艺[J]. 医药导报, 2010, 29(2):142.
- [2] 熊海伟,彭国平,过科家,等. 超滤工艺对丹参注射液中有有效成分的影响研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(12):34.
- [3] 孙永成,郭传宝,王伟,等. 大孔树脂使用次数对羟基红花黄色素 A 吸附率的影响[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2011, 13(4):697.
- [4] 王培培,许杜娟,夏泉. 黄芪皂苷的提取及含量测定

[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(4):27.

- [5] 张金红,周晶,吴志丽,等. HPLC-ELSD 法测定黄芪及金芪降糖片中黄芪甲苷的含量[J]. 天津医科大学学报, 2010, 16(1):26.
- [6] 郭宝林,张兰涛,刘京晶,等. 蒙古黄芪不同种质黄芪甲苷含量比较[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(24):3292.
- [7] 李森,徐玉玲,宋娟,等. 热毒宁注射液生产过程中关键工序对细菌内毒素去除效果研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6):663.
- [8] 王莉,张红宇,赵祎左,等. 卡尼汀注射液细菌内毒素检查法研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10):50.

[责任编辑 仝燕]