

注射用芪红脉通微滤液的超滤工艺适用性研究

祝倩倩¹, 萧伟^{2*}, 王振中², 孙永成², 杨绪芳², 李力龙²

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210000

2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

摘要: **目的** 以注射用芪红脉通微滤后药液为研究对象, 考察4种不同材质的中空纤维超滤膜对注射用芪红脉通药液体系的适用性。**方法** 分别选取截留相对分子质量为100 000的聚砜、聚醚砜、聚丙烯、混纺复合4种材质的超滤膜进行超滤, 测定不同膜材质超滤过程的膜通量, 指标成分黄芪总皂苷、黄芪甲苷、羟基红花黄色素A (hydroxy safflower yellow A, HSYA) 透过率, 固含物减少率, 蛋白质减少率, 有关物质及热原检查, 筛选适宜本产品的超滤膜。**结果** 相同截留相对分子质量的4种不同材质超滤膜对同一药液体系的适用性存在差异: 聚丙烯、聚醚砜和混纺复合材质的膜纯水通量恢复率均较高, 而聚砜材质的膜通量和膜纯水通量恢复率较低; 聚丙烯与聚醚砜材质的指标成分透过率较高, 聚砜与混纺复合材质的固含物与蛋白质去除率较高; 对于本产品, 截留相对分子质量为100 000超滤膜可有效去除热原。**结论** 聚丙烯-100000超滤膜既能有效去除固含物与高分子物质, 又能保留有效成分, 适用于注射用芪红脉通的精制。

关键词: 芪红脉通注射剂; 超滤; 膜材质; 黄芪甲苷; 羟基红花黄色素A; 中空纤维超滤膜

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)09-1117-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.09.010

Adaptability research on ultrafiltration process of microfiltrated Qihong Maitong Injection

ZHU Qian-qian¹, XIAO Wei², WANG Zhen-zhong², SUN Yong-cheng², YANG Xu-fang², LI Li-long²

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210000, China

2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective To study the application of four kinds of hollow fiber ultrafiltration membranes by taking Qihong Maitong Injection (QMI) microfiltrated liquid as the research object. **Methods** Polysulfone, polyether sulfone, polypropylene, and blended composite membranes with the entrapment relative molecular mass of 100 000 for ultrafiltration were selected to determine the best appropriate ultrafiltration membrane material. The membrane flux of ultrafiltration was determined by taking the content of active ingredients (*Astragalus* total saponin, astragaloside IV, and hydroxy safflower yellow A), solid reduction rate, protein reduction rate, related substances, and pyrogen inspection of different membrane materials as the evaluation indexes. **Results** The suitability of four different kinds of ultrafiltration membrane materials with the same entrapment relative molecular mass was different. The pure water flux recovery rates of polypropylene, polyether sulfone, and blended composite materials are higher than that of polysulfone material. The component permeation rates of polypropylene and polyether sulfone materials were higher, while the solid and protein reduction rates of polysulfone and blend compound materials were higher. For QMI, the ultrafiltration membrane with entrapment relative molecular mass of 100 000 could effectively remove the pyrogen. **Conclusion** The polypropylene-100000 ultrafiltration membrane could not only effectively remove the solid and high polymer material, but also keep the active ingredients. It is suitable for the purification of QMI.

Key words: Qihong Maitong Injection; ultrafiltration; membrane material; astragaloside IV; hydroxy safflower yellow A; hollow fiber ultrafiltration membrane

收稿日期: 2012-11-30

作者简介: 祝倩倩 (1985—), 女, 河北石家庄人, 南京中医药大学2010级研究生, 研究方向为中药新型制剂的研究与开发。

Tel: 15189025771 E-mail: nzyzqq@gmail.com

*通信作者 萧伟, 研究员级高级工程师, 博士, 研究方向为中药新剂型的研究与开发。E-mail: wzhh-nj@tom.com

网络出版时间: 2013-02-22 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130222.1620.003.html>

近20年来,中药注射液作为中药新制剂,在中医临床治疗危急重症中发挥出了良好的疗效。随着中药制剂与现代检测技术的发展,中药注射剂成品质量有了逐步提高,但由于中药成分复杂,且受中药品种、产地、制备工艺和分析技术不够完善等因素影响,仍存在产品稳定性差、热原去除效果不理想等问题。超滤技术在中药注射剂制剂工艺中的研究与应用,在很大程度上解决了上述问题,大大提高了中药注射剂的质量和安全性。

超滤技术是利用膜的筛分原理,选择性去除药液中的大分子物质,保留小分子有效成分,达到除杂、除热原、提高药液澄明度等目的^[1]。超滤膜的种类繁多,在使用中,超滤膜的孔径大小和型式往往可根据药液体系特点而定,而超滤膜材质的选择有一定盲目性^[2]。相同截留相对分子质量的不同材质及其性能对待分离物质及膜污染程度均有较高的要求。

注射用芪红脉通为冻干粉针剂,由黄芪、红花等味药组成,为中药六类新方,临床上用于治疗冠心病、心绞痛。本实验采用相同截留相对分子质量与型式的4种不同材质的超滤膜,对注射用芪红脉通(Qihong Maitong Injection, QMI)的适用性进行系统考察,筛选出适宜于本产品的超滤膜。

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); Millipore 蠕动泵; Alltech ELSD-2000 蒸发光散射检测器; UV-2550 PC 紫外可见分光光度计(日本岛津公司); Mettler Toledo AB204-S 精密电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); 中空纤维超滤膜组件(膜材质分别为聚丙烯-100000、聚砜-100000、聚醚砜-100000、混纺-100000,北京旭邦膜设备有限责任公司)。

黄芪中间体(批号 110501)、红花中间体(批号 110501)江苏康缘药业股份有限公司,对照品黄芪甲苷(批号 110781-200613)、羟基红花黄色素 A(HSYA,批号 111637-200905)购于中国药品生物制品检定所;牛血清白蛋白(中国计量科学研究院,批号 100151);考马斯亮蓝 G250(国药集团化学试剂有限公司);乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯;水为注射用水。

2 方法与结果

2.1 指标成分的测定

2.1.1 黄芪总皂苷的测定^[3]

(1)对照品溶液的制备:取黄芪甲苷对照品 10.0

mg,置 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

(2)供试品溶液的制备:精密量取各超滤工序前后样品溶液 0.5 mL,置 50 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度。吸取该溶液 10 mL,以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。

(3)线性关系考察:精密量取黄芪甲苷对照品溶液 0、0.15、0.30、0.45、0.60、0.75 mL,依次分别加入 50%甲醇 0.75、0.60、0.45、0.30、0.15、0 mL,再分别加入 8%香草醛-无水乙醇溶液 0.75 mL,置冰水浴中,加体积分数 72%硫酸溶液 7.5 mL,摇匀,放入 62 °C 水浴中,保温 20 min,置冷水浴中立即冷却,在 540 nm 波长处测定吸光度(A)值,同时以随行试剂作空白。以对照品的质量浓度为横坐标(X),A 值为纵坐标(Y)进行线性回归,得回归方程 $Y=2.785\ 93 X-0.009\ 26$, $r=0.999\ 9$,结果表明黄芪甲苷在 0.08~0.40 mg/mL 呈良好的线性关系。

(4)样品测定:精密量取供试品溶液 0.75 mL,照“线性关系考察”项下的方法,自“再加入 8%香草醛无水乙醇溶液 0.75 mL”起,依法操作,测定 A 值。

2.1.2 黄芪甲苷的测定^[4]

(1)色谱条件与系统适应性试验:采用 HPLC 与蒸发光散射监测器(ELSD),色谱柱为 Alltima C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-水(34:66);体积流量 1.0 mL/min;漂移管温度 105 °C;载气体积流量 2.5 L/min。

(2)对照品溶液的制备:同“2.1.1 (1)”。

(3)供试品溶液的制备:精密量取各除杂工序前后样品溶液 1 mL,加 25%甲醇溶解并稀释至 5 mL,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

(4)线性关系考察:精密称取黄芪甲苷对照品 10.0 mg,加入甲醇使溶解并定容于 25 mL 量瓶中,摇匀即得。用 0.45 μm 微孔滤膜滤过后,按上述色谱条件分别进样,进样量依次为 10、20、30、40、50 μL,每个质量浓度重复 3 次,测定峰面积。以黄芪甲苷质量浓度对数平均值与峰面积对数平均值进行线性回归,得回归方程 $Y=0.646\ 5 X-3.701\ 2$, $r=0.999\ 9$,表明黄芪甲苷在 4.0~20.0 μg 对数值与峰面积对数值呈良好线性相关。

(5) 样品测定: 分别精密吸黄芪甲苷对照品溶液 10、15 μL , 供试品溶液 10 μL , 注入液相色谱仪测定, 用外标两点法对数方程计算, 即得。

2.1.3 HSYA 的测定^[5]

(1) 色谱条件与系统适应性试验: 色谱柱为 Phenomenex ODS 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液 (13:87); 检测波长为 400 nm, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 体积流量 1.0 mL/min。理论塔板数按 HSYA 峰计不低于 1 000。

(2) 对照品溶液的制备: 精密称取 60 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥 3 h 的 HSYA 对照品适量, 加水溶解并制成含 HSYA 0.2 mg/mL 的溶液, 即得。

(3) 供试品溶液的制备: 精密量取各超滤工序前后样品溶液 0.5 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

(4) 线性关系考察: 取 HSYA 对照品适量, 精密称定, 加水制成 0.204 mg/mL 的溶液。按上述色谱条件分别进样 5、10、15、20、25 μL , 测定峰面积, 以峰面积为纵坐标 (Y), HSYA 质量浓度为横坐标 (X), 进行线性回归, 得回归方程 $Y=514\ 109.325 X-206\ 547.7$, $r=0.999\ 1$; 线性范围为 1.02~5.10 μg 。

(5) 样品测定: 分别精密吸取 HSYA 对照品和供试品溶液各 10 μL , 注入 HPLC 色谱仪, 测定峰面积, 按外标法计算, 即得。

2.2 固含物的测定

按《中国药典》2010 年版附录 XA 规定的浸出物测定方法进行测定, 称定质量并计算。

2.3 有关物质检查

按《中国药典》2010 年版附录 IXS 规定的注射剂有关物质检查法进行测定。

2.4 蛋白质的测定^[6-7]

选用考马斯亮蓝法测定蛋白质的量^[7-8]。配制质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 牛血清白蛋白溶液作为对照。分别精密移取 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 对照液至试管中, 加蒸馏水稀释至 1 mL 后摇匀。加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250, 混匀 (轻摇匀, 防止产生泡沫), 静置 2 min, 于波长 595 nm 处测定样品的 A 值, 以蛋白质质量浓度为横坐标 (X), A 值为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 得线性回归方程 $Y=0.852\ 784 X+0.076\ 67$, $r=0.997\ 93$, 表明牛血清白蛋白在 10~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与 A 值呈良好的线性关系。

样品的测定: 精密移取待测样品 0.1 mL, 加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 溶液, 混匀, 静置 2 min 后

测其 A 值, 计算蛋白质的量。

2.5 热原检查

按《中国药典》2010 年版附录 XID 规定的热原检查法检查。

2.6 超滤实验

2.6.1 超滤液的预处理 按照处方配比, 称取黄芪、红花中间体适量, 加注射用水使其完全溶解, 静置至室温后冷藏 24 h, 滤过, 随后药液 10 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 用 0.3% 针用活性炭在 40 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌吸附 30 min, 过 0.22 μm 微孔滤膜后, 即得。

2.6.2 超滤实验及膜材质的选择 取注射用芪红脉通微滤液适量, 平均分成 4 份, 每份 1 000 mL。依据药液体系特点, 选用膜材质分别为聚砜 (PS)、聚醚砜 (PES)、聚丙烯 (PP) 及混纺复合超滤膜, 截留相对分子质量均为 100 000 的 4 种中空纤维超滤膜。药液质量浓度均为 0.1 g/L, 温度 20 $^{\circ}\text{C}$, 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。随着超滤的进行, 原料液质量浓度逐渐升高, 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 HSYA、黄芪总皂苷、黄芪甲苷、固含物、蛋白质的量, 并进行热原、有关物质检查。

2.6.3 超滤过程膜通量的测定 超滤前, 用蒸馏水清洗膜至 pH 值为中性, 测定膜纯水通量; 超滤过程中分别测定超滤开始、超滤液体积为原液总体积 1/2 时及超滤结束前的膜通量, 计算超滤过程平均膜通量。超滤结束后, 先用蒸馏水循环洗去残存料液, 再用 0.1 mol/L NaOH 循环 1 h 后, 浸泡 2 h, 再用 0.1 mol/L NaOH 循环 1 h^[8], 最后用蒸馏水清洗膜至中性, 测定膜纯水通量恢复率。结果显示, 超滤过程中, PES 的膜通量最大, PS 的膜通量最小, 且 PS 的膜通量在物料超滤过程中降低最为明显; PP、PES、混纺复合 3 种膜材质的膜纯水通量恢复率均优于 PS, 表明 PS 抗污染能力相对较差, 结果见表 1。

膜通量 = 滤过体积 / 时间

膜纯水通量恢复率 = 清洗后膜纯水通量 / 超滤前膜纯水通量

2.6.4 不同膜材质对指标成分的影响 收集 4 种膜材质超滤后的透过液与截留液, 分别测定指标成分 HSYA、黄芪总皂苷、黄芪甲苷的透过率。结果表明, PES 与 PP 超滤膜超滤后指标成分的透过率较

高, PS 与混纺复合材质超滤膜的指标成分的透过率较低, 结果见表 2。

$$\text{指标成分透过率} = (C_1 V_1) / (C_0 V_0)$$

C_0 为超滤前药液质量浓度, C_1 为透过液中指标成分质量浓度, V_0 为超滤前药液体积, V_1 为透过液体积

2.6.5 不同材质超滤膜对固含物、蛋白质的影响

4 种膜材质超滤前后进行固含物测定、蛋白质量测定及有关物质检查。结果表明, 4 种膜材质超滤后,

药液颜色变浅, 澄明度提高, 且固含物与蛋白质均得到有效去除; PS 与混纺复合材质的固含物与蛋白质去除率较高, PP 与 PES 的固含物与蛋白质去除率较低, 结果见表 3。

$$\text{固含物减少率} = (\text{超滤前药液固含物质量} - \text{超滤后药液固含物质量}) / \text{超滤前药液固含物质量}$$

$$\text{蛋白质减少率} = (\text{超滤前药液蛋白质质量} - \text{超滤后药液蛋白质质量}) / \text{超滤前药液蛋白质质量}$$

表 1 4 种膜材质膜通量的变化情况

Table 1 Changes of membrane flux in four kinds of membrane materials

超滤膜规格	超滤前膜纯水通量 / (mL·min ⁻¹)	超滤过程平均膜通量 / (mL·min ⁻¹)	清洗后膜纯水通量 / (mL·min ⁻¹)	膜纯水通量恢复率 / %
PP-100000	252	162.0	246.5	97.8
PS-100000	41	5.1	38.0	92.7
PES-100000	870	432.0	836.0	96.1
混纺-100000	472	219.0	462.0	97.9

表 2 不同膜材质超滤后指标成分的比较

Table 2 Comparison on index components in different membrane materials after ultrafiltration

超滤膜规格	透过率 / %		
	HSYA	黄芪总皂苷	黄芪甲苷
PP-100000	91.47	91.44	99.29
PS-100000	71.79	67.24	38.37
PES-100000	93.50	95.36	90.91
混纺-100000	77.70	73.66	70.09

2.6.6 热原检查 依照《中国药典》2010 年版附录 XID 规定的家兔法进行热原检查。结果表明, 4 种膜材质超滤后, 药液的升温总和分别为 PP-100000 0.1 °C、PS-100000 0.3 °C、PES-100000 0.1 °C、混纺-100000 0.3 °C, 均小于 0.6 °C (合格判定标准), 即热原检查合格。

3 讨论

由于不同膜材质的表面性质不同, 使得不同材质超滤膜的膜通量存在差异, 对于生产而言, 在最

表 3 不同材质超滤膜对固含物、蛋白质的影响

Table 3 Effects of different ultrafiltration membrane materials on solids and protein

超滤膜规格	固含物减少率 / %	蛋白质减少率 / %	有关物质检查	药液性状
PP-100000	17.09	13.56	合格	澄明度提高, 颜色略浅
PS-100000	32.50	69.07	合格	澄明度提高, 颜色明显变浅
PES-100000	14.34	11.20	合格	澄明度提高, 颜色略浅
混纺-100000	29.42	34.35	合格	澄明度提高, 颜色略浅

大限度保留有效成分的情况下, 应选择膜通量适当较大的膜材质, 以便缩短超滤时间, 提高生产效率。本研究中 PS 的超滤膜膜通量最小, 分析原因, 该材质制成的中空纤维超滤膜为外压式, 且超滤膜管道直径很细 (<1 mm), 在外压条件下物料透过膜表面的难度增大, 膜通量小, 使超滤时间变长。此外, PS 的膜纯水通量回复率较其他 3 种材质膜低, 相应膜污染程度较高, 膜的使用寿命大大降低。另有文献报道, PS 含有大量疏水性链节, 带有较多静

电荷, 致使膜透水速度低, 抗污染能力差^[9]。

由表 1、2 得出, 4 种不同材质的超滤膜处理同一种物质, 其对指标成分、高分子杂质的影响有显著差异。PS 与混纺复合超滤膜对高分子杂质的去除率最高, 但指标成分的透过率较低 (低于 80%), 指标性成分损失较大, 适于处理截留相对分子质量较小的药液体系; PP 与 PES 的指标成分透过率较高 (均在 90%以上), 适宜于本药液体系的精制, 但 PP 对固含物、蛋白质的去除率均高于 PES, 因此, 综

合评价 PP 对本品种的适用性优于 PES。

本研究中热原检查结果表明, 选用截留相对分子质量为 100 000 的超滤膜超滤可有效去除热原, 其原因为除超滤膜本身对热原的去除, 还与超滤前药液的预处理密切相关。本研究在超滤前预处理过程中结合活性炭吸附和微滤技术, 在保留制剂成分转移率的前提下, 能达到有效去除热原的目的, 进而提高注射剂的安全性。

参考文献

- [1] 沈洁, 韩志峰, 郭立玮, 等. 超滤膜富集干姜挥发油的工艺优化研究 [J]. 中草药, 2012, 43(8): 1526-1530.
- [2] 王姣, 姜忠义, 吴洪, 等. 中药有效成分和有效部位分离用膜 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(3): 165-169.
- [3] 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): 27-30.
- [4] 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): 26-29.
- [5] 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): 697-699.
- [6] 董洁, 郭立玮, 文红梅, 等. 中药水提液中蛋白质含量测定方法研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2009, 22(6): 40-43.
- [7] 王孝平, 邢树礼. 考马斯亮蓝法测定蛋白含量的研究 [J]. 天津化工, 2009, 23(3): 40-41.
- [8] 王永香, 刘涛, 王振中, 等. 活血通络注射液超滤工艺的膜污染及清洗研究 [J]. 中草药, 2011, 42(5): 913-915.
- [9] 王建华, 方俊. 膜分离材料及其在中药研究中的应用 [J]. 材料报道, 2008, 22(5): 35-37.