

基于超滤技术的消癌平注射液工艺改进

陈伟伟¹,李存玉¹,黄萍²,时浩¹,彭国平^{1*}

(1. 南京中医药大学,南京 210023; 2. 南京圣和药业有限公司,南京 210018)

〔摘要〕 目的:采用超滤技术优化消癌平注射液的生产工艺。方法:采用 HPLC、比色法、动态浊度法和光阻法分别检测消癌平注射液超滤前后绿原酸、总酚酸、细菌内毒素的含量变化及澄明度的合格率;比较原生产工艺和超滤膜联用技术对消癌平注射液中指标成分的影响、细菌内毒素的去除效果及澄明度的改善程度。结果:原生产工艺、30 kDa 和 5 kDa 超滤膜联用、30 kDa 和 10 kDa 超滤膜联用成品中绿原酸回收率分别为 51.6%、52.6%、55.3%,总酚酸回收率分别为 75.3%、58.2%、64.6%,细菌内毒素去除率分别为 84.2%、98.4%、98.2%,成品澄明度合格率分别为 80.0%、95.6%、93.3%。结论:与原工艺相比,采用截留相对分子质量 30 kDa 和 5 kDa 的超滤膜进行二级超滤时,指标性成分无明显损失,但可最大程度提高成品澄明度合格率,并能有效去除药液中细菌内毒素,保证注射剂的安全性及生产效率,适用于消癌平注射液的生产。

〔关键词〕 超滤工艺;消癌平注射液;工艺改进;澄明度;细菌内毒素;回收率

〔中图分类号〕 R283.6 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2014)05-0045-03

〔doi〕 10.11653/syfy2014050045

Improvement of Production Process for Xiaoaiping Injection
Based on Ultrafiltration Technology

CHEN Wei-wei¹, LI Cun-yu¹, HUANG Ping², SHI Hao¹, PENG Guo-ping^{1*}

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;
2. Nanjing Sanhome Pharmaceutical Co. Ltd, Nanjing 210018, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To improve production process of Xiaoaiping injection by ultrafiltration technology. **Method:** Chlorogenic acid, total phenolic acids, content changes of bacterial endotoxin and passing rate of clarity were detected by HPLC, colorimetry, kenitic-turbidimetry and light blockage method before and after ultrafiltratin of Xiaoaiping injection; And compare effect of index ingredients, removal effect of bacterial endotoxin and improvement degree of clarity of Xiaoaiping injection between the original production process and ultrafiltration membrane technology. **Result:** In the original process, 30 kDa-5 kDa and 30 kDa-10 kDa membranes combined technology, recoveries of chlorogenic acid were 51.6%, 52.6% and 55.3%, recoveries of total phenolic acids were 75.3%, 58.2% and 64.6%, removal rate of bacterial endotoxin were 84.2%, 98.4% and 98.2%, qualified rate of clarity were 80.0%, 95.6% and 93.3%, respectively. **Conclusion:** Compared with the original process, 30 kDa-10 kDa membranes combined technology could eliminate bacterial endotoxin effectively, most of the content of index components were reserved and qualified rate of clarity was improved obviously, which was suitable for production of Xiaoaiping injection.

〔Key words〕 ultrafiltration process; Xiaoaiping injection; process improvement; clarity; bacterial endotoxin; recovery

〔收稿日期〕 20130716(002)

〔基金项目〕 江苏省高校自然科学基金项目(12KJB360009)

〔第一作者〕 陈伟伟,硕士,从事中药化学研究,Tel:025-86798186,E-mail:chenvvbaby@163.com

〔通讯作者〕 *彭国平,博士,研究员,从事中药化学研究,Tel:025-86798186,E-mail:guopingpeng@sohu.com

消癌平注射液是南京圣和药业有限公司自主研发的产品,是以通关藤为原料,经过提取,精制,加入吐温-80 助溶而成的纯中药注射剂^[1],具有清热解毒、化痰软坚的功效。临床常用于食道癌、胃癌、肺癌、肝癌放疗和化疗的辅助治疗^[2],目前年销售量已超过 100 多万支,但常会出现澄明度部分不合格的问题,此外,在生产过程中还会偶发性地出现热原超标及成分损失明显等现象,在一定程度上增加了本品使用的安全隐患,大大降低了企业的生产效益。

超滤技术是一种以膜内外压力差为驱动力,通过膜孔筛分原理对药液体系进行目的性分离的方法^[3],目前已在中药制剂中被广泛应用,尤其是中药注射剂^[4]。本实验基于不变更原工艺且符合目前中药注射剂再评价的原则^[5],采用不同截留相对分子质量的超滤膜联用技术^[6](二级超滤),以指标性成分、细菌内毒素含量及成品澄明度合格率为考察指标,筛选消癌平注射液的二级超滤工艺,以提升该质量的质量和临床用药安全性,在保障患者用药安全的同时给制药企业带来可观的经济效益。

1 材料

XX814V230 型蠕动泵(美国 Millipore 公司),1100 系列高效液相色谱仪(G1311A 型泵,HT-230A 型柱温箱,美国安捷伦公司),Spectrum 754 型紫外-可见分光光度计(上海现科分光仪器有限公司),BET-72M 型细菌内毒素测定仪、FZQ-2 型涡旋混合器、YB-2 型澄明度检测仪(天津市天大天发科技有限公司),AQ-1.5II 型安瓿检漏灭菌器(连云港千樱医疗设备有限公司),AGF8/1-20 型安瓿灌装封口机(上海旭发制药机械有限公司)。

卷式超滤膜(聚醚砜,截留相对分子质量 5,10,30 kDa,南京拓鈺医药科技有限公司),超滤膜(截留相对分子质量 90 kDa)、消癌平浸膏(批号 201301231,201303072,201305152,201307031)、聚山梨酯-80(吐温-80)均购自南京圣和药业有限公司,绿原酸对照品(批号 110753-200212)、细菌内毒素工作对照品(批号 150601-201176,规格 100 EU·Amp⁻¹)均购自中国食品药品检定研究院,动态浊度法鲎试剂(TAL,规格 0.6 mL·Amp⁻¹,灵敏度 0.03 EU·Amp⁻¹)、细菌内毒素检查用水(规格 5 mL·Amp⁻¹)均购自湛江博康海洋生物有限公司,乙腈、磷酸为色谱纯,水为重蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 不同生产工艺样品的制备

2.1.1 原生产工艺 称取消癌平浸膏适量,置于 90 kDa 超滤膜中,超滤,超滤液加活性炭除热原,滤去活性炭,加入吐温-80 使其质量分数为 0.3%,微孔滤膜滤过,滤液灭菌,GMP 生产车间灌封得成品。

2.1.2 30 kDa 和 5 kDa 超滤联用工艺 取消癌平浸膏适量,置于 30 kDa 超滤膜中,超滤得一次超滤液;一次超滤液置于 5 kDa 超滤膜中,超滤得二次超滤液,二次超滤液加入吐温-80 使其质量分数为 0.3%,微孔滤膜滤过,灭菌,GMP 生产车间灌封得成品。

2.1.3 30 kDa 和 10 kDa 超滤联用工艺 取消癌平浸膏适量,置于 30 kDa 超滤膜中,超滤得一次超滤液;一次超滤液置于 10 kDa 超滤膜中,超滤得二次超滤液,二次超滤液加入吐温-80 使其质量分数为 0.3%,微孔滤膜滤过,灭菌,GMP 生产车间灌封得成品。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取绿原酸对照品适量,置于棕色量瓶中,加 50% 甲醇制成 40 mg·L⁻¹ 的溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密量取消癌平浸膏和成品各 20 mL,分别置于 50 mL 棕色量瓶中,加 50% 甲醇定容,即得。

2.3 绿原酸的含量测定

2.3.1 色谱条件^[7] Thermo scientific C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),柱温 30 ℃,检测波长 327 nm,流速 1 mL·min⁻¹,进样量 10 μL,流动相乙腈-0.4% 磷酸(9:91)。

2.3.2 回收率测定 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液适量,按 2.3.1 项下色谱条件测定,采用外标一点法计算原工艺、30 kDa 和 5 kDa 联用、30 kDa 和 10 kDa 联用样品中绿原酸的回收率分别为 51.6%,52.6%,55.3%,表明与原工艺比较,2 种超滤工艺对绿原酸无明显损失。

$$T_{\text{绿原酸}} = A_{\text{成品}} / A_{\text{浸膏}} \times 100\%$$

式中 $T_{\text{绿原酸}}$ 为绿原酸的回收率, $A_{\text{成品}}$ 为成品中绿原酸峰面积, $A_{\text{浸膏}}$ 为消癌平浸膏中绿原酸峰面积。

2.4 总酚酸的含量测定^[8] 精密吸取供试品溶液、对照品溶液各 2 mL,分别置于 25 mL 棕色量瓶中,加无水乙醇至 5 mL,各精密加入 0.3% 十二烷基磺酸钠溶液 2 mL 和 0.5% 铁氰化钾-1% 三氯化铁(1:1)混合液 2 mL,摇匀,暗处放置 5 min,加入 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液定容至 25 mL,摇匀,暗处放置 20 min,以无水乙醇为空白对照,分别于 764 nm 处测定

吸光度(A),计算原工艺、30 kDa 和 5 kDa 联用、30 kDa 和 10 kDa 联用样品中总酚酸的回收率($T_{\text{总酚酸}}$)依次为 75.3%,58.2%,64.6%,表明与原工艺比较,总酚酸回收率降低,且 30 kDa 和 5 kDa 联用较 30 kDa 和 10 kDa 联用对总酚酸的去除率更高,分析可能是超滤对药液中高分子酚酸类成分存在截留,且超滤膜的孔径越小,截留越明显。

$$T_{\text{总酚酸}} = C_{\text{成品}} / C_{\text{浸膏}} \times 100\%$$

式中 $C_{\text{成品}}$ 为成品中总酚酸质量浓度, $C_{\text{浸膏}}$ 为消癌平浸膏中总酚酸质量浓度。

2.5 细菌内毒素的检查

2.5.1 标准曲线的制作 用细菌内毒素检查用水将细菌内毒素工作对照品进行稀释,使其最终质量浓度分别为 2,0.5,0.125,0.031 25 EU·mL⁻¹,各精密量取 0.1 mL,分别加至预先盛有鲎试剂 0.1 mL 的反应管内,混合均匀,照 2010 年版《中国药典》方法检查内毒素^[9],其中每个质量浓度重复 3 管,同时作阴性对照 2 管,试验数据按最小二乘法进行统计分析,以反应时间(T)为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标,得标准曲线 $\log T = 3.024\ 16 - 0.396\ 16 \log C$ ($r = -0.999\ 3$),反应时间在 110.9 ~ 414.5 s,而阴性对照管反应时间大于标准曲线最低质量浓度的反应时间,故标准曲线成立。

2.5.2 干扰试验及内毒素定量分析 分别将各供试品溶液用细菌内毒素检查用水稀释一定倍数,分别将各稀释液制成含内毒素对照品 0.5 EU·mL⁻¹ 的溶液。精密吸取上述溶液各 0.1 mL,加至预先盛有鲎试剂 0.1 mL 的反应管中,混合均匀,照 2010 年版《中国药典》方法检查内毒素^[9],每个质量浓度重复 2 管,计算平均回收率,取平均回收率在 50% ~ 200% 且更接近于 100% 时的稀释倍数干扰最小,并以此稀释倍数下测得的内毒素值作为样品中内毒素含量,计算原工艺、30 kDa 和 5 kDa 联用、30 kDa 和 10 kDa 联用样品中内毒素去除率(Q)分别为 84.2%,98.4%,98.2%。结果表明原工艺生产的消癌平注射液虽未超过 2010 年版《中国药典》规定的内毒素限值(3.5 EU·mL⁻¹),但去除率较低且成品中内毒素含量(2.94 EU·mL⁻¹)已接近限值,存在超标风险;与原工艺比较,2 种超滤工艺均能较好地去除内毒素,且能控制在较安全范围内。

$$Q = (C_{\text{浸膏}} - C_{\text{成品}}) / C_{\text{浸膏}} \times 100\%$$

式中 $C_{\text{成品}}$ 为成品中内毒素质量浓度, $C_{\text{浸膏}}$ 为消癌平浸膏中内毒素质量浓度。

2.6 澄明度合格率检查^[9] 将 3 种不同工艺制备

的消癌平注射液成品照光度法检查其不溶性微粒,以未检出白点记为 0 级,检出 1 个白点为 1 级,检出 2 个白点为 2 级,检出多个白点为 3 级,检出大量小点为 4 级,出现轻微乳光为 5 级,出现乳光为 6 级,出现浑浊为 7 级,产生烟雾为 8 级,产生颗粒为 9 级,以 0 级成品作为合格品,其余作为不合格品,计算原工艺、30 kDa 和 5 kDa 联用、30 kDa 和 10 kDa 联用成品的合格率分别为 80.0%,95.6%,93.3%,表明与原工艺比较,2 种超滤工艺均可明显改善成品的澄明度。

3 讨论

通过对 3 种工艺的比较,发现采用截留相对分子质量 30 kDa 和 5 kDa 的超滤膜进行二级超滤时,绿原酸的影响无明显差异,虽然对总酚酸存在一定损失,但却能最大程度地提高成品合格率,并可有效地去除细菌内毒素。超滤工艺解决了原工艺中澄明度合格率不高且内毒素含量不可控的问题,与活性炭去除热原相比,超滤不仅消除了竞争吸附和吸附饱和等问题,还在很大程度上保障了注射剂的安全性。

[参考文献]

- [1] 刘长余. 通关藤及其制剂的临床应用[J]. 海峡药学, 2006,18(5):156.
- [2] 成冠蓝,孔令义,张仓. 通关藤化学成分和药理作用研究进展[J]. 药学与临床研究,2009,17(2):135.
- [3] 李宏伟. 超滤设备及技术在中药粉针生产中的应用[J]. 科技咨询导报,2007(20):75.
- [4] 王学松. 膜分离技术及其应用[M]. 北京:科学出版社,1994:83.
- [5] 彭国平,郑云枫,李红阳,等. 中药注射剂再评价时制剂工艺与质量标准研究的重点[C]. 杭州:全国中药注射剂安全性及产业发展交流研讨会,2009.
- [6] 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.
- [7] 于文静,王焕群. HPLC 法测定消癌平口服液中绿原酸的含量[J]. 中国药品标准,2006,7(3):50.
- [8] 刘峰群,曹红,靳守东,等. 比色法测定消癌平注射液中总酚酸的含量[J]. 华西药学杂志,2003,18(3):220.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:附录 IX R,附录 XII E.

[责任编辑 仝燕]