

膜分离技术改善吐温 80 澄明度

龚柔佳¹, 刘奕洲¹, 刘莉成¹, 马 赞¹, 李存玉^{1,2*}, 彭国平^{1,2}
(1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023; 2. 南京中医药大学, 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023)

摘要: **目的** 采用膜分离技术改善吐温 80 澄明度, 并探索影响澄明度的原因。**方法** 选择 10、50、100 kDa 截留分子量的超滤膜分离吐温 80 溶液, 以吐温 80 透过率、超滤和灭菌前后粒径分布及澄明度为指标, 进行相关性分析。**结果** 吐温 80 在 10、50、100 kDa 超滤膜中的透过率在 24.4% ~ 71.6% 之间, 与截留分子量呈正相关。10、50 kDa 超滤膜处理后, 澄明度均高于 95%。超滤后, 吐温 80 粒径分布范围明显减小, 而且可以去除粒径大于 1 μm 的微粒, 低粒径分布的胶束在 100 nm 以下, 高粒径分布的胶束在 100 ~ 1 000 nm 范围内。截留相对分子质量 300、800、1 000 Da 的纳滤膜对吐温 80 的截留率均大于 90%, 但 1 000 Da 纳滤膜损失相对较明显。**结论** 粒径在 1 μm 以上的高分子胶束及不溶性微粒是影响吐温 80 澄明度的主要因素。50 kDa 超滤膜和 800 Da 纳滤膜联合使用时, 不仅在保障澄明度的同时提高生产效率, 而且纳滤浓缩可以满足制剂生产中对吐温 80 的浓度需求。

关键词: 吐温 80; 澄明度; 膜分离技术; 相关性分析

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2017)11-2293-04
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.11.014

Improving Tween 80 clarity by membrane separation technology

GONG Rou-jia¹, LIU Yi-zhou¹, LIU Li-cheng¹, MA Yun¹, LI Cun-yu^{1,2*}, PENG Guo-ping^{1,2}
(1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Jiangsu Provincial Collaborative Innovation Center for Chinese Medicinal Resource Industrialization, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

KEY WORDS: Tween 80; clarity; membrane separation technology; correlation analysis

吐温 80 作为增溶剂、稳定剂, 具有改善难溶性药物溶解度、提升制剂稳定性的特点, 在中药注射剂(如鱼腥草注射液、参麦注射液等)中应用广泛^[1-2], 但以其为辅料的注射剂在制备过程中存在高温灭菌后澄明度降低的问题^[3], 影响了注射剂质量, 并给制药企业带来经济损失。吐温 80 是以山梨醇为原料, 经油酸酯化后与环氧乙烷缩聚制备而成, 分子式 C₂₄H₄₄O₆ [(C₂H₄O)_n], 它是由一定分子量分布范围内的聚山梨醇酯组成, 分子量越大, 临界胶束浓度越低, 因此其水溶液经高温灭菌处理时出现“起昙”现象, 冷却后澄清^[4-5], 推测已形成的高分子缔合态胶束难以完全重新分散到原溶液中, 从而影响注射剂澄明度。

为了改善吐温 80 灭菌后的澄明度, 并探索其内在原因, 本实验采用超滤分离技术以去除高分子缔合物及不溶性微粒^[6], 依托激光粒径散射技术, 分析超滤^[7]、灭菌前后吐温 80 溶液的粒径分布变化, 并结合澄明度变化分析原因。同时, 为了满足注射剂生产中对其浓度的需求, 采用纳滤技术考察常温浓缩参数^[8], 从而为含该辅料的中药注射剂生产提供数据。

1 材料

1.1 仪器 XX8200230 蠕动泵(美国 Millipore 公司); Nano-ZS3600 动态光散射仪(英国马尔文公司); Agilent 1200 高效液相色谱仪, 配置 Alltech ELSD 2000 检测器(美国安捷伦公司); YB-2 澄明

收稿日期: 2017-01-04
基金项目: 国家自然科学基金(81603307, 81503258); 江苏省自然科学基金青年基金(BK20151005); 江苏省高校自然科学基金(17KJB360010); 南京中医药大学 2016 年大学生创新创业计划省级重点项目(2016)
作者简介: 龚柔佳(1996—), 女, 研究方向为中药制药。Tel: (025) 86798186, E-mail: 381390433@qq.com
* 通信作者: 李存玉(1985—), 男, 博士, 讲师, 研究方向为中药制药。Tel: (025) 86798186, E-mail: licunyuok@163.com

度检测仪（天津天大天发科技有限公司）；Libror AEL-40SM 电子天平（十万分之一，日本岛津公司）；KH-250B 超声波清洗器（昆山禾创超声仪器有限公司）。

1.2 材料 吐温 80（批号 018K00941，分析纯，美国 Sigma-Aldrich 公司）；聚醚砜超滤膜（截留分子量 10、50、100 kDa）；复合聚酰胺纳滤膜（截留分子量 300、800 Da）、聚醚砜纳滤膜（截留分子量 1 000 Da）（南京拓鈺医药科技有限公司）；TSK-GEL G2000 SW_{XL} 色谱柱（7.8 mm × 300 mm，5 μm，日本东曹株式会社）。乙腈为色谱纯；其他试剂均为分析纯；水为纯化水。

2 方法

2.1 吐温 80 溶液配制 精密称取吐温 80 适量，超纯水超声分散溶解，得到 100.24 mg/mL 水溶液，超纯水逐步稀释至 50.012、10.002、5.001 mg/mL。

2.2 超滤

2.2.1 吐温浓度与超滤分离行为的相关性 在充分排除膜组件中残留水溶液的前提下，取上述 4 种质量浓度的吐温 80 溶液，超声 15 min 后，置于超滤分离系统中，采用截留相对分子质量 100 kDa 的超滤膜处理，在充分循环以排除超滤膜与吐温 80 吸附的前提下超滤，操作压力 ≤ 0.2 MPa，待水溶液体积无法继续超滤分离时，将过滤液超声混匀，取样，按式（1）计算透过率，平行 3 次，取平均值。

$$T = \frac{C_r V_f}{C_o V_o} \times 100\% \quad (1)$$

其中， T 为吐温 80 透过率， C_r 为超滤液中吐温 80 浓度， V_f 为超滤液体积， C_o 为原液中吐温 80 浓度， V_o 为原液体积。

2.2.2 澄明度改善 为了排除实验环境对溶液澄明度的影响，本实验委托南京圣和药业注射剂生产车间开展超滤及后续的灌装、灭菌等实验环节。吐温 80 作为药用辅料，在中药注射液中的用量一般低于 5%，本实验选择 50.012 mg/mL 吐温 80 溶液，分别采用截留相对分子质量 10、50、100 kDa 的超滤膜处理，在充分排除膜组件中残留水溶液的前提下，各取 4 L 超声 15 min，再置于超滤分离系统中，操作压力 ≤ 0.2 MPa，待水溶液体积无法继续超滤分离时，将超滤液超声混匀，取样，根据式（1）计算透过率，平行 3 次，取平均值。

2.3 澄明度检测 取 50.012 mg/mL 吐温 80 原液、

3 种孔径制备得到的吐温 80 超滤液，采用注射液洗烘灌封联动生产线进行分装灌封，各分装 200 支后热压灭菌，操作灭菌参数为 121 ℃、20 min，采用澄明度检测仪人工灯检评价超滤对吐温 80 澄明度的影响，观察可见异物，并以合格支数与总支数对比，计算合格率。

2.4 粒径检测 取吐温 80 溶液、超滤及灭菌后的吐温 80 超滤液，置于激光粒径检测仪中，检测温度 25 ℃，折射率 1.33，检测溶液中粒径分布特征，并分析超滤膜孔径与粒径分布的相关性。

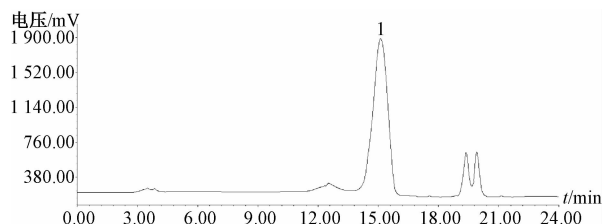
2.5 纳滤浓缩 由于吐温 80 溶液经超滤处理后的浓度难以满足中药注射剂要求，故采用纳滤分离技术进行浓缩，这不仅可以控制浓缩液达到目标浓度，同时也可去除溶液中的小分子杂质。选择截留相对分子质量 300、800、1 000 Da 的纳滤膜进行浓缩富集，操作温度 22 ~ 25 ℃，操作压力 1.5 MPa，将纳滤膜组件清洗至 pH 值中性后进行纳滤浓缩，待 10.002 mg/mL 吐温 80 溶液浓缩至 50 mg/mL 左右时停止浓缩，取样，根据式（2）计算截留率，平行 3 次，取平均值。

$$R = \frac{C_r V_r}{C_f V_f} \times 100\% \quad (2)$$

其中， R 为吐温 80 截留率， C_r 为浓缩液中吐温 80 浓度， V_r 为浓缩液体积， C_f 为纳滤液中吐温 80 浓度， V_f 为纳滤液体积。

2.6 含有量测定

2.6.1 色谱条件^[9-10] TSK-GEL G2000 SW_{XL} 色谱柱（7.8 mm × 300 mm，5 μm）；流动相乙腈-5 mmol/L 醋酸铵（pH = 4.0）（90 : 10）；柱温 30 ℃；体积流量 0.6 mL/min；漂移管温度 110 ℃；氮气体积流量 2.3 L/min；进样量 10 μL。理论塔板数按吐温 80 峰计算，应不低于 1 000，色谱图见图 1。



1. 吐温 80

1. Tween 80

图 1 吐温 80 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of Tween 80

2.6.2 线性关系考察 精密吸取 50.012 mg/mL 吐温 80 溶液 1、2、5、10、20 μL 进样检测,以峰面积积分值的对数为纵坐标 (Y),对照品进样量的对数为横坐标(X)进行回归,得回归方程 $Y = 14.04X - 7.41 (r = 0.999\ 0)$,在 50.012 ~ 1 000.24 μg 范围内线性关系良好。

3 结果

3.1 吐温 80 浓度与超滤透过率的相关性 表 1 显示,在 100 kDa 超滤膜中,各浓度吐温 80 的透过率均大于 50%,并且随着浓度降低而升高,表明浓度降低时引起其缔合态胶束分子量下降,从而有利于通过超滤膜。

表 1 吐温 80 超滤透过率

Tab. 1 Ultrafiltration transmittances of Tween 80	
吐温 80/($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	透过率/%
100.024	54.2
50.012	72.5
10.002	80.1
5.001	86.2

3.2 超滤对澄清度的影响 表 2 显示,吐温 80 溶液溶解分散、直接灌装灭菌后的澄清度为 81.5%,澄清度不合格的样品中存在大量白点,部分存在丝状不溶物;采用 3 种孔径超滤膜处理后,随着膜孔径减小,其透过率明显下降,但超滤液澄清度合格率明显升高,表明超滤可以去除影响澄清度的不溶物及大分子物质,但吐温 80 损失明显,而且超滤后其浓度降低,导致难以满足含高浓度吐温 80 制剂的生产需求。因此,在保障澄清度的前提下,选择生产效率较高的 50 kDa 超滤膜进行超滤,并与纳滤技术联合应用以筛选吐温 80 的浓缩参数。

表 2 超滤膜孔径与澄清度的相关性

Tab. 2 Correlation between ultrafiltration membrane pore size and clarity			
样品	滤液/($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	透过率/%	澄清度合格率/%
吐温 80 原液	—	—	81.5
100 kDa 超滤液	36.8	71.6	89.5
50 kDa 超滤液	21.1	42.2	95.0
10 kDa 超滤液	8.7	24.4	96.5

3.3 超滤对粒径分布的影响 图 2~4 显示,采用不同孔径超滤膜处理后的超滤液粒径分布相似,故仅选择 100 kDa 超滤液。对比超滤前后粒径变化时发现,超滤后吐温 80 溶液的粒径分布范围明显减小,而且可以去除粒径大于 1 μm 的微粒,同时也说明吐温 80 在溶液中可能至少以 2 种粒径的胶束状态存在,低粒径分布的胶束在 100 nm 以下,而

高粒径在 100 ~ 1 000 nm 范围内。对比图 3 和图 4 可知,灭菌后吐温 80 溶液的粒径变大,同时在高温灭菌时出现“起昙”现象,随着温度降低逐步澄清,此时溶液中的胶束存在状态发生改变,以高粒径分布为主。

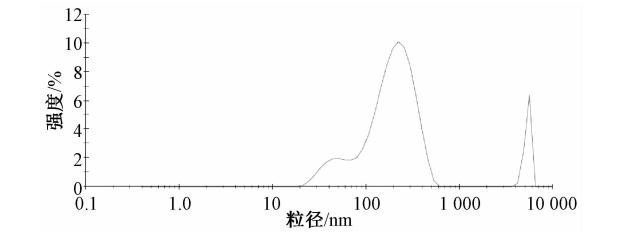


图 2 吐温 80 溶液粒径分布

Fig. 2 Particle size distribution of Tween 80 solution

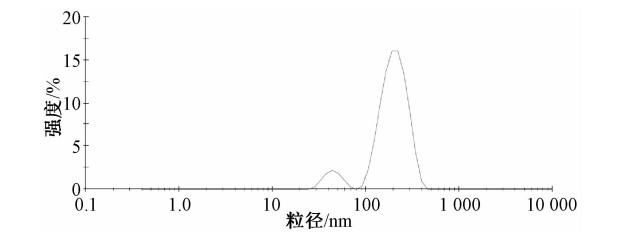


图 3 吐温 80 超滤液粒径分布 (100 kDa 超滤膜)
Fig. 3 Particle size distribution of Tween 80 ultrafiltration solution (100 kDa ultrafiltration membrane)

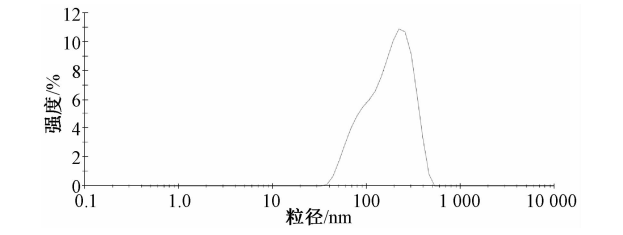


图 4 吐温 80 超滤液灭菌后粒径分布
Fig. 4 Particle size distribution of Tween 80 ultrafiltration solution after sterilization

3.4 纳滤浓缩可行性 表 3 显示,截留相对分子质量 300、800、1 000 Da 的纳滤膜对吐温 80 的截留率均大于 90%,但 1 000 Da 纳滤膜的损失相对明显,故选择 800 Da 纳滤膜与超滤技术联用,在去除影响澄清度的不溶物及大分子物质同时,可满足中药注射剂对吐温 80 的浓度要求。

表 3 纳滤膜截留率

Tab. 3 Rejection coefficients of nanofiltration membranes		
截留相对分子质量/Da	截留率/%	膜通量/($\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$)
300	98.7	18.2
800	97.2	72.5
1 000	90.2	117.3

4 讨论

实验结果显示,吐温 80 浓度与其超滤透过率呈负相关关系,浓度越高,溶液中分子间缔合形成的胶束粒径越大,从而难以透过超滤膜;在同等浓度下,10、50、100 kDa 超滤膜分离得到的超滤液则表现出相似的粒径分布特征,推测吐温 80 溶液中同时存在低、高分子缔合的胶束,而且缔合程度呈现出多样性和动态平衡性,在超滤过程中随着高分子向低分子缔合态胶束的转变,吐温 80 以单分子、低分子缔合胶束形态逐步透过超滤膜。随着截留液中吐温 80 浓度升高,大多以高分子缔合态形式存在,因此随着膜截留相对分子质量降低,透过率急剧下降。

吐温 80 作为药用辅料,广泛应用于中药注射剂中,以改善难溶性成分溶解度,提高制剂稳定性,但由于其在化工合成工艺中的限制,导致缩合程度不均一,以及油酸、环氧乙烷、难溶物残留,从而影响其用药安全性及制剂澄明度^[11]。该辅料引起注射剂灭菌后澄明度下降的原因主要与粒径分布在 1 μm 以上的物质有关,而超滤后虽然超滤液粒径分布相似,但与 50、100 kDa 超滤膜处理后相比仍存在一定差距,表明其中的大分子物质也与澄明度有一定相关性。超滤与纳滤联用时,不仅可以去除吐温中残留的热原、不溶物微粒、致敏性大分子^[12-14],而且还能去除小分子有机残留物^[15],从而提升制剂澄明度和安全性。

参考文献:

[1] 谭志高,巢志茂,隋宇,等. Tween-80 对鱼腥草注射液及鱼腥草挥发油的影响[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(2): 175-179.
[2] 胥勤,余建军,熊晓明,等. 不同增溶剂的参麦注射液稳定性考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(14): 30-33.

[3] 王琼琚,柳港生,吴锦忠. 影响中药注射剂澄明度的因素及解决方法[J]. 中华中医药学刊, 2006, 24(2): 360-361.
[4] Roldan-Cruz C, Vernon-Carter E J, Alvarez-Ramirez J. Assessing the stability of Tween 80-based O/W emulsions with cyclic voltammetry and electrical impedance spectroscopy[J]. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, 2016, 511: 145-152.
[5] 张美玉. 注射用辅料聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(14): 1910-1915.
[6] Rabeie H, Shahabadi S M S, Mokhtare A, et al. Enhancement in permeation and antifouling properties of PVC ultrafiltration membranes with addition of hydrophilic surfactant additives: Tween-20 and Tween-80[J]. *J Environ Chem Eng*, 2016, 4(4): 4050-4061.
[7] Hui X, Ru Y P, Rui Z, et al. Study of colloidal particle Brownian aggregation by low-coherence fiber optic dynamic light scattering[J]. *J Colloid Interface Sci*, 2012, 376(1): 322-326.
[8] 丁礼琴,刘力,徐德生. 纳滤在制药及食品中的应用进展[J]. 中成药, 2008, 30(8): 1199-1202.
[9] 尹利辉,范可青,朱俐,等. 凝胶色谱-蒸发光散射检测法检测中药注射剂中吐温 80 的含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(9): 1686-1689.
[10] Pan J, Yu J, Du Z, et al. Rapid characterization of commercial polysorbate 80 by ultra-high performance supercritical fluid chromatography combined with quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1465: 190-196.
[11] 程欧,高鹏,涂家生,等. 吐温 80 质量与致敏性关系的研究[J]. 中国药科大学学报, 2010, 41(3): 244-247.
[12] 支兴蕾,李存玉,陈颖,等. 超滤法去除生脉注射液细菌内毒素的应用分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(23): 21-24.
[13] 谢志军,魏鸿雁,贾晓光,等. 切向流超滤系统纯化雪莲注射液的工艺优化研究[J]. 中成药, 2013, 35(1): 183-184.
[14] 董丽静,李滢,吕新勇,等. 超滤工艺对注射用芪红脉通药效和被动皮肤过敏反应的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(12): 1-5.
[15] 顾瑾,李伟,孙余凭,等. 钱塘江水中有机污染物的检测与纳滤脱除研究[J]. 膜科学与技术, 2014, 34(4): 77-81.