

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.07.026

注射用重组人干扰素 $\alpha-1b$ 溶解后活性稳定性及雾化粒径研究*

陶婉君,李根[△],郭文玫

(电子科技大学医学院附属妇女儿童中心医院·四川省成都市妇女儿童中心医院,四川 成都 610091)

摘要:目的 探讨注射用重组人干扰素 $\alpha-1b$ (rhIFN $\alpha-1b$)溶解后的活性稳定性,并考察不同雾化器雾化对微粒粒径的影响。方法 rhIFN $\alpha-1b$ 分别以氯化钠注射液和灭菌注射用水为溶剂,考察4℃和25℃温度条件下的生物活性变化;用Winner311XP激光粒度仪检测药液用不同雾化器雾化后微粒的粒径分布。结果 rhIFN $\alpha-1b$ 以灭菌注射用水为溶剂,4℃存放1,6,12,24 h后的生物学活性相当于0 h活性的96.76%~100.46%,在25℃存放1,6,12,24 h后的生物学活性相当于0 h活性的91.24%~103.69%。rhIFN $\alpha-1b$ 以氯化钠注射液为溶剂,4℃存放1,6,12,24 h后的生物学活性相当于0 h活性的96.73%~103.74%,在25℃存放1,6,12,24 h后的生物学活性相当于0 h活性的95.35%~105.58%。雾化rhIFN $\alpha-1b$ 后,药液微粒可达到肺泡组织。结论 rhIFN $\alpha-1b$ 溶解后,在4℃及25℃温度条件下24 h内稳定,雾化后的粒径范围符合要求。

关键词:重组人干扰素 $\alpha-1b$;雾化给药;微粒粒径;生物学活性;稳定性

中图分类号:R917;R979.5

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)07-0093-03

Stability and Atomized Particle Size of Recombinant Human Interferon Alpha 1b for Injection After Dissolution

TAO Wanjun, LI Gen, GUO Wenmei

(Women and Children's Hospital Affiliated to Medical College of University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu Women and Children Central Hospital, Chengdu, Sichuan, China 610091)

Abstract: Objective To study the activity stability of recombinant human interferon alpha 1b(rhIFN $\alpha-1b$) for injection after dissolution, and to investigate the influence of different atomizers on the particle size. **Methods** Sodium chloride injection and water for sterilization injection were used as solvent respectively. The biological activity of rhIFN $\alpha-1b$ in different periods after being dissolved at 4℃ and 25℃ was investigated. Winner 311XP laser particle size analyzer was used to detect the particle size distribution of aerosolized particles. **Results** Using water for sterile injection as solvent, rhIFN $\alpha-1b$ at 4℃ for 1, 6, 12, 24 h had biological activities equivalent to 96.76~100.46% at 0 h; rhIFN $\alpha-1b$ at 25℃ for 1, 6, 12, 24 h had biological activities equivalent to 91.24%~103.69% at 0 h. Using Sodium chloride injection as solvent, rhIFN $\alpha-1b$ at 4℃ for 1, 6, 12, 24 h had biological activities equivalent to 96.73~103.74% at 0 h; rhIFN $\alpha-1b$ at 25℃ for 1, 6, 12, 24 h had biological activities equivalent to 95.35%~105.58% at 0 h. After aerosolization, the rhIFN $\alpha-1b$ could reach the alveoli. **Conclusion** After dissolution, rhIFN $\alpha-1b$ at 4℃ and 25℃ has stable properties within 24 h; the range of particle size after atomization meets the requirements.

Key words: recombinant human interferon alpha-1b; atomization administration; particle size; biological activity; stability

干扰素具有广谱抗病毒和免疫调节作用,临床常用于治疗病毒性疾病^[1-2]。雾化吸入重组人干扰素 $\alpha-1b$ (rhIFN $\alpha-1b$)已被国家标准处方集^[3]和《儿童雾化中心规范化管理指南》^[4]《重组人干扰素 $\alpha-1b$ 在儿科的临床应用专家共识》^[5]推荐使用,其对儿童病毒感染的治疗有重要作用^[6-7]。rhIFN $\alpha-1b$ 药品说明书上的适应证为用于治疗病毒性疾病和某些恶性肿瘤。目前关于rhIFN $\alpha-1b$ 超药品说明书雾化的研究多为针对某病毒性疾病的疗效、用药剂量。为保证疗效,需规范超药品说明书用药治疗过程,增加用药安全性。本研究中对注射用rhIFN $\alpha-1b$ 雾化的粒径和溶解后的活性稳定性进行了考察,为规范使用rhIFN $\alpha-1b$ 雾化吸入疗法提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Winner311XP型激光粒度仪(济南微纳颗粒仪器股份有限公司);ZJ24型CO₂培养箱(美国NBS公司);XPS-1B型倒置显微镜(重庆光电仪器有限公司);MD SpectraMax M3型酶标仪(美国分子仪器公司);S型冷凝管;pHfe20-K型酸度计(瑞士Mettler Toledo公司);HYC-360型2~8℃冰箱(海尔集团);SW-CJ-1F型净化工作台(苏州净化设备有限公司);ML203型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度为万分之一);NEC25S型空气压缩泵雾化器(欧姆龙健康医疗<中国>有限公司);M102型网式雾化器(江苏鱼跃医疗设备股份有限公司)。

*基金项目:四川省成都药学会赞助药学科研基金项目[201703]。

第一作者:陶婉君,女,布依族,硕士研究生,主管药师,研究方向为医院药学,(电子信箱)329971162@qq.com。

[△]通信作者:李根,男,回族,大学本科,主任药师,研究方向为临床药学,(电子信箱)627045226@qq.com。

1.2 试药

注射用 rhIFN α -1b[深圳科兴生物工程有限公司, 批号为 201802010, 规格为每支 20 μg , (20 μg 相当于 20 万 IU)]; 人羊膜成纤维细胞(WISH, 上海细胞研究所); 水疱性口炎病毒(VSV)株(中国食品药品检定研究院); 胎牛血清(Immuno Probe), 1640 培养基(gibco); 消化液、染色液、脱色液均为自配; 灭菌用注射用水(国药集团容生制药有限公司, 批号为 1711516); 氯化钠注射液(中国大冢制药有限公司, 批号为 7G97D2)。

2 方法与结果

2.1 注射用 rhIFN α -1b 溶解后活性稳定性

无菌条件下操作。取 10 支样品, 分别用 1 mL 灭菌注射用水和氯化钠注射液溶解, 混匀, 分装至小离心管, 作为供试品溶液, 分别在 4 $^{\circ}\text{C}$ 及 25 $^{\circ}\text{C}$ 温度条件下存放 0, 1, 6, 12, 24 h。取以上不同条件存放供试品溶液各 1 支, 用测定培养液稀释成 105 IU/mL 的溶液。在 96 孔细胞培养板中, 每个稀释度各 2 孔。

照 2015 年版《中国药典(三部)》干扰素活性测定法测定。Wish/VSV 微量病毒抑制法的具体操作步骤: 在 96 孔培养板中, 每孔加入 3.5×10^5 /mL Wish 细胞 100 μL , 置含 5% CO_2 的 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱培养 5 h。待其生长成单层细胞后, 弃上清液, 于培养板内 1 次加入系列稀释液(稀释度为 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 共 8 个稀释度)的检测, 每孔 100 μL , 每个稀释度各 2 孔。同时, 设置 8 个稀释度的 rhIFN α -1b 标准品作为对照, 将含有 rhIFN α -1b 检测样品和标准品的培养板置含 5% CO_2 的 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中孵育 20 h。弃上清液后, 于 rhIFN α -1b 检测样品和标准品培养板孔内各分别加入 100 CID₅OVS 病毒株, 再培养 24 h。待标准品溶液的 50% 病变点在 1 IU/mL 时。弃去细胞培养板中的上清液, 每孔加入染色液 50 μL , 室温放置 30 min 后, 用流水小心冲去染色液, 并吸干残留水分, 每孔加入脱色液 100 μL , 室温放置 3 ~ 5 min, 混匀, 用酶标仪以 630 nm 为参比波长, 在 570 nm 波长处测定吸光度, 记录测定结果。

以灭菌注射用水为溶剂的供试品溶液, 经 4 $^{\circ}\text{C}$ 温度条件下存放 1, 6, 12, 24 h 后的生物学活性相当于 0 h 活性的 96.76% ~ 100.46%, 生物活性未明显下降, 相对稳定; 供试品溶液经 25 $^{\circ}\text{C}$ 温度条件下存放 1, 6, 12, 24 h 后的生物学活性相当于 0 h 活性的 91.24% ~ 103.69%, 生物活性有波动, 但仍在合格范围内。详见表 1。

2.2 不同雾化器雾化注射用 rhIFN α -1b 的粒径分布

分别选用欧姆龙 NE-C25S 型压缩式雾化器和鱼跃 M102 型网式雾化器。用 5 mL 注射用水充分溶解注射用 rhIFN α -1b 后, 转移至雾化器雾化壶内, 雾化 10 ~ 15 min。使用激光粒度仪检测, 并记录药液雾化后

表 1 rhIFN α -1b 用不同溶剂溶解后的活性测定结果
($\times 10^5$ IU/mL, 平均值/2 孔)

温度	灭菌注射用水					氯化钠注射液				
	0 h	1 h	6 h	12 h	24 h	0 h	1 h	6 h	12 h	24 h
4 $^{\circ}\text{C}$	2.16	2.15	2.17	2.10	2.09	2.14	2.17	2.21	2.07	2.22
25 $^{\circ}\text{C}$	2.17	2.19	2.25	2.20	1.98	2.15	2.13	2.05	2.20	2.27

微粒的粒径分布情况。

压缩式雾化器雾化微粒粒径分布: 注射用 rhIFN α -1b 药液雾化后微粒粒径呈正态分布, 详见表 2。药液全部雾化后粒径小于 12 μm , 超过 80% 的微粒粒径分布于 1 ~ 5 μm 。试验表明, rhIFN α -1b 雾化后, 药液微粒可到达肺泡组织, 又不易随气流呼出, 可作用于肺部组织。

表 2 压缩式雾化器雾化粒径分布

项目	分析结果(自由分布)			自定义项目分析结果(体积分布)	
XV10 = 1.593 μm	XV50 = 2.955 μm	XV90 = 5.632 μm	$X^{[4.3]} = 3.329 \mu\text{m}$	$V_{50} = 3.045 \mu\text{m}$	$V_{82} = 5.137 \mu\text{m}$
XN10 = 0.884 μm	XN50 = 1.237 μm	XN90 = 2.167 μm	$X^{[1.0]} = 1.273 \mu\text{m}$	< 1 μm : 0.372%	< 5 μm : 83.541%
Mass Con = 0 g/m ³	N / V = 0.418	Number Con = 169 382/cm ³		< 12 μm : 100.00%	
拟和误差: 0.011	光学浓度: 12.9	体积浓度: 0.001017%		< 83 μm : 100.00%	

网式雾化器雾化微粒粒径分布: 注射用 rhIFN α -1b 药液雾化后微粒粒径呈正态分布, 详见表 3。药液全部雾化后粒径小于 12 μm , 超过 70% 的微粒粒径分布于 1 ~ 5 μm 区间。试验表明, rhIFN α -1b 雾化后, 药液微粒可到达肺泡组织, 又不易随气流呼出, 可作用于肺部组织。

表 3 网式雾化器雾化粒径分布表

项目	分析结果(自由分布)			自定义项目分析结果(体积分布)	
XV10 = 1.891 μm	XV50 = 3.759 μm	XV90 = 6.227 μm	$X^{[4.3]} = 3.964 \mu\text{m}$	V50 = 3.726 μm	V82 = 6.141 μm
XN10 = 1.098 μm	XN50 = 1.699 μm	XN90 = 2.756 μm	$X^{[1.0]} = 1.689 \mu\text{m}$	< 1 μm : 0.188%	< 5 μm : 74.593%
Mass Con = 0 g/m³	N / V = 0.452	Number Con = 145192 / cm³		< 12 μm : 100.00%	
拟和误差: 0.013	光学浓度: 18.2	体积浓度: 0.001325%		< 83 μm : 100.00%	

3 讨论

儿童雾化吸入治疗可使药物直接作用于气道黏膜, 具有靶向性强、疗效高、安全性好、操作简便、儿童顺应性高等优点, 并可经支气管、细支气管到达肺部, 较多地集中在肺部组织, 较肌肉注射给药作用更持久^[8]。临床使用中, 注射用 rhIFN α -1b 常单用或联合用药, 超说明书雾化用于治疗毛细支气管炎、病毒性肺炎、慢性支气管炎、手足口病、疱疹性咽峡炎等疾病^[9]。注射用 rhIFN α -1b 雾化治疗疾病过程中, 影响有效性和安全性的因素很多, 如不同的雾化吸入装置产生的气溶胶颗粒大小不一, 不同大小的气溶胶颗粒雾化吸入时到达儿童气道的部位不同, 药物溶解后的稳定性等^[10-11]。

注射用 rhIFN α -1b 药品说明书中的溶剂为灭菌注射用水, 临床雾化常选用灭菌注射用水或氯化钠注射

液作为溶剂。本研究结果显示,选择灭菌注射用水或氯化钠注射液作为溶剂,注射用 rhIFN α -1b 溶解后的活性变化均在合格范围内,提示注射用 rhIFN α -1b 在 4℃ 或 25℃ 保存 24 h 内稳定。

雾化吸入临床应用广泛,但吸入专用制剂品种少,临床使用西药注射液、中药注射液、中草药汤剂等进行雾化^[12-13]。但这些药物雾化后能否形成 0.5~10 μm 微粒(雾化颗粒直径对药物沉积位置有直接影响,有效雾化颗粒直径应在 0.5~10 μm ,其中粒径为 5~10 μm 的微粒主要沉积于口咽部,粒径为 3~5 μm 的微粒主要沉积于肺部,粒径小于 3 μm 的微粒 50%~60% 沉积于肺泡),以及其稳定性、安全性、有效性尚待进一步研究。临床常用雾化器主要有射流雾化器(压缩式雾化器)、超声雾化器及振动筛孔雾化器(网式雾化器)3 种^[14]。超声雾化器的剧烈震荡可使雾化器中的液体加温,可能会影响某些药物中所含蛋白质或肽类化合物的结构和稳定性^[15]。振动筛孔雾化器是通过压电陶瓷片的高频振动,使药液穿过细小的筛孔而产生药雾的装置,减少超声振动液体产热对药物的影响,筛孔的直径可决定产生药雾颗粒的大小^[16]。以压缩泵或氧气驱动的雾化器是目前临床最常用的雾化吸入器具,其原理是高速运动的压缩气体通过狭小开口后突然减压,在局部产生负压将药液吸出,并通过高速运动的持续气流形成药雾微粒,其中大药雾微粒通过挡板回落至贮药池,小药雾微粒则随气流输出,药雾微粒的大小与气流的压力和流速有关,增加气流速度可使雾化输出量增加,减小药雾微粒,缩短雾化时间^[17]。本研究结果显示,注射用 rhIFN α -1b 药液用 2 种雾化器雾化后微粒粒径均呈正态分布,但用压缩式雾化器雾化效果更好,药液全部雾化后粒径小于 12 μm ,超过 80% 的微粒粒径分布于 1~5 μm ,该区间雾化微粒既可到达肺泡组织,又不易随气流呼出,绝大部分药液可作用于肺泡,但不同厂家、不同型号的雾化器的雾化效果可能不同。

临床通常将注射用 rhIFN α -1b 与常见儿童雾化药物配伍,如与吸入用布地奈德混悬液、吸入用异丙托溴铵溶液、吸入用硫酸沙丁胺醇溶液、硫酸特布他林雾化液、注射用盐酸氨溴索等配伍。目前未见配伍后及雾化后注射用 rhIFN α -1b 生物活性和结构稳定性变化的相关报道,后续研究需进一步对注射用 rhIFN α -1b 配伍后的混合溶液进行外观、pH、雾化前后生物活性检测,以及雾化后 rhIFN α -1b 结构变化检测,为临床合理用药提供参考。

雾化吸入 rhIFN α -1b 尽管被《儿童雾化中心规范化管理指南》《重组人干扰素 α -1b 在儿科的临床应用专家共识》等推荐使用,但不可忽视在我国属超药品说

明书用药,会面临一定风险和法律问题,故医院需强化超药品说明书用药管理,做好备案;超药品说明书用药需谨慎,并做好患者的知情同意;药师应及时与医师沟通,做好处方点评,合理监控超药品说明书用药。

参考文献:

- [1] LI JH, LIU K, LIU Y, et al. Exosomes mediate the cell-to-cell transmission of IFN- α induced antiviral activity[J]. Nat Immunol, 2013, 14(8): 793.
- [2] YANG X, DAY SL, JACKSON R J, et al. Role of novel type I interferon epsilon in viral infection and mucosal immunity[J]. Mucosal Immunol, 2012, 5(6): 610-622.
- [3] JACKSON DJ. Inhaled interferon: a novel treatment for virus-induced asthma[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2014, 190(2): 123-124.
- [4] 尚云晓, 黄英, 刘恩梅, 等. 雾化吸入重组人干扰素 α -1b 治疗小儿急性毛细支气管炎多中心研究[J]. 中华实用临床儿科杂志, 2014, 29(11): 840-844.
- [5] RATKOD, TIMH, SEBASTIAN LJ, et al. The effect of inhaled IFN- α on worsening of asthma symptoms caused by viral infections: a randomized trial[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2014, 190(2): 145-154.
- [6] 《中国国家处方集》编委会. 中国国家处方集: 化学药品与生物制品卷(儿童版)[M]. 北京: 人民军医出版社, 2013: 415.
- [7] 申昆玲, 洪建国, 于广军, 等. 儿童雾化中心规范化管理指南[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 22.
- [8] 刘鉴峰, 刘金剑, 褚丽萍, 等. 雾化吸入干扰素 α -1b 在兔体内的分布及代谢途径[J]. 医药导报, 2013, 32(1): 1-5.
- [9] 申昆玲, 张国成, 尚云晓, 等. 重组人干扰素 α -1b 在儿科的临床应用专家共识[J]. 中国实用儿科杂志, 2015, 30(16): 1214-1218.
- [10] 申昆玲, 张国成. 重视儿童雾化吸入治疗的规范和临床应用研究[J]. 中国实用儿科杂志, 2014, 11(29): 837-839.
- [11] 杨玉兰, 王岚, 由丽华, 等. 小儿雾化吸入效果的影响因素分析[J]. 实用护理杂志, 2003, 19(17): 31.
- [12] 吴焕英. 雾化吸入复方丹参注射液治疗脑梗死患者的临床疗效观察[J]. 当代医学, 2015, 21(35): 126-127.
- [13] 张婷, 吴军华. 中药雾化吸入治疗冠心病心绞痛及对心脏标志物影响的临床应用研究[J]. 中国医药指南, 2015, 13(2): 214.
- [14] 吴明慧, 刘强, 滕晓茗. 雾化吸入治疗的研究进展[J]. 中国临床新医学, 2018, 11(11): 1167-1171.
- [15] 赵德育. 不同雾化吸入装置特点及使用要点[J]. 中国实用儿科杂志, 2016, 31(12): 895-898.
- [16] 中华医学会临床药学分会《雾化吸入疗法合理用药专家共识》编写组. 雾化吸入疗法合理用药专家共识[J]. 医药导报, 2019, 38(2): 135-146.
- [17] 申昆玲, 邓力, 李云珠, 等. 糖皮质激素雾化吸入疗法在儿科应用的专家共识[J]. 临床儿科杂志, 2014, 36(2): 95-107.

(收稿日期: 2019-06-13; 修回日期: 2019-10-12)