

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.01.012

注射用糜蛋白酶溶解后稳定性及雾化粒径考察*

王 玮,包建安[△],刘睿娟,沈国荣,王 永,朱建国,缪丽燕

(苏州大学附属第一医院药学部,江苏 苏州 215006)

摘要:目的 建立测定注射用糜蛋白酶溶解后含量的反相高效液相色谱(RP-HPLC)法,并考察注射用糜蛋白酶雾化吸入溶液(简称雾化溶液)的稳定性和雾化粒径分布。方法 色谱柱为 Grace 214TP C₄柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为 0.1% 三氟乙酸水溶液-0.09% 三氟乙酸乙腈(梯度洗脱),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 214 nm,柱温为 30℃,进样量为 10 μL;采用 RP-HPLC 法测定雾化溶液 0,0.5,1.0,2.0,4.0,6.0 h 时的含量,并考察稳定性;采用 Spraytec STP2000 型激光粒度仪测定雾化溶液的粒径。结果 糜蛋白酶质量浓度在 0.20~2.00 mg/mL 范围内与峰面积线性关系良好,精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均不超过 2.0%(n=5),平均回收率为(100.81±2.47)%,RSD 为 2.45%(n=9);注射用糜蛋白酶分别用灭菌注射用水和 0.9% 氯化钠注射液配制后,在 4℃下 6 h 内均呈澄清状态,2 h 内含量均较稳定,2,4,6 h 内的平均降解率分别为(9.05±4.59)%和(13.51±3.99)%(14.25±4.89)%和(15.45±3.19)%(15.18±3.86)%和(14.08±4.84)%,均显著高于 0.5 h 时(P<0.05),且用灭菌注射用水配制雾化溶液的 pH 接近中性;用 0.9% 氯化钠注射液配制的雾化溶液,累积分布达 50% 时的粒径为(3.59±0.14)μm,显著低于用灭菌注射用水配制的粒径(P<0.05)。结论 注射用糜蛋白酶雾化溶液的稳定性在接近中性条件下 2 h 内较稳定,在 0.9% 氯化钠注射液及灭菌注射用水中雾化效果均可达到预期,且均到达肺部。

关键词:注射用糜蛋白酶;反相高效液相色谱法;含量;稳定性;雾化;粒径

中图分类号:R917

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)01-0045-04

Stability and Atomized Particle Size of Chymotrypsin for Injection After Dissolution

WANG Wei,BAO Jian'an,LIU Ruijuan,SHEN Guorong,WANG Yong,ZHU Jianguo,MIU Liyan

(Department of Pharmacy,The First Affiliated Hospital of Soochow University,Suzhou,Jiangsu,China 215006)

Abstract: Objective To establish an reversed phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC) for the content determination of Chymotrypsin for Injection after dissolution, and to investigate the stability and the distribution of particle size of Chymotrypsin for Injection aerosol inhalation solution (hereinafter referred to as aerosol inhalation solution) after atomization.

Methods The chromatographic column was Grace 214TP C₄ column (250 mm×4.6 mm,5 μm), the mobile phase was 0.1% acetic acid solution-0.09% trifluoroacetic acid acetonitrile (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 214 nm, the column temperature was 30℃, and the injection volume was 10 μL. The content of aerosol inhalation

*基金项目:国家科技重大专项课题[2017ZX09304021]。

第一作者:王玮,女,博士,主管药师,研究方向为医院药学,(电子信箱)24265149@qq.com。

[△]通信作者:包建安,男,硕士,主任药师,研究方向为医院药学,(电子信箱)clsx5430@126.com。

- 湖北中医药大学,2020.
- [2] 林凡友,孙永喜,罗晓倩,等. 盐酸地芬尼多片的制备工艺:CN201911023152.2[P]. 2019-10-25.
- [3] 吴 芬,郭真君,曾 媛,等. 盐酸地芬尼多的研究进展[J]. 中国药师,2019,22(7):1323-1328.
- [4] 朱兰琼. 盐酸地芬尼多渗透泵制剂的研究[D]. 广州:南方医科大学,2017.
- [5] 陈存香. 法莫替丁渗透泵制剂的研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2007.
- [6] 颜 琨,梅兴国. 渗透泵给药系统设计原理、关键技术与发展动态[J]. 国际药学研究杂志,2010,37(2):92-97.
- [7] 张 婧,樊光辉,刘 辉,等. 微孔型渗透泵控释制剂的研究进展[J]. 中国医院药学杂志,2013,33(16):1351-1354.
- [8] 姚明杰,赵 锋,马银玲,等. Box-Behnken 法优化快速溶解性微针的制备工艺[J]. 中国药学杂志,2019,54(20):1677-1684.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:121-124.
- [10] 郭真君,曾 媛,张 芸,等. 星点设计-效应面法优化盐酸苯环壬酯控释片的处方[J]. 中国医院药学杂志,2018,38(24):2512-2517.
- [11] 陈 飞,王 超,高 昊. 推拉式渗透泵药物传递系统处方设计关键要素研究[J]. 中国药学杂志,2019,54(10):783-789.
- [12] 艾佳佳,邓 平,胡鹏翼,等. Box-Behnken 设计-效应面法优化胶皮处方及胶皮的性能研究[J]. 中国新药杂志,2020,29(2):192-198.
- [13] 张秋艳,韩 帅. 药品稳定性在药品质量控制中的应用探析[J]. 大家健康:学术版,2015,9(17):283.
- [14] 王军楠,恒旭红,崔 鹏. 稳定性研究在药品质量控制中的应用[J]. 辽宁化工,2014,43(6):708-710.
- [15] 文佳卉. 304 不锈钢管线腐蚀开裂原因分析[J]. 中国设备工程,2019(15):158-159.
- [16] 王 标. 304 不锈钢在 3.5% NaCl 溶液中点蚀行为研究[D]. 南昌:南昌航空大学,2019.

(收稿日期:2021-04-30;修回日期:2021-08-20)

solution at 0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 and 6.0 h was determined by the RP-HPLC method. The particle size of the aerosol inhalation solution was determined by Spraytec STP2000 laser particle sizer. **Results** The linear range of chymotrypsin was 0.20–2.00 mg/mL. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were not more than 2.0% ($n=5$). The average recovery of chymotrypsin was $(100.81 \pm 2.47)\%$ with an RSD of 2.45% ($n=9$). After Chymotrypsin for Injection was prepared with Water for Sterilization Injection and 0.9% Sodium Chloride Injection respectively, all the aerosol inhalation solution was clear within 6 h at 4 °C, the content was stable within 2 h, the average degradation rates of the aerosol inhalation solution prepared with two different solvents within 2, 4 and 6 h were $(9.05 \pm 4.59)\%$ and $(13.51 \pm 3.99)\%$, $(14.25 \pm 4.89)\%$ and $(15.45 \pm 3.19)\%$, $(15.18 \pm 3.86)\%$ and $(14.08 \pm 4.84)\%$ respectively, which were significantly higher than those within 0.5 h ($P < 0.05$), and the pH of the aerosol inhalation solution prepared with Water for Sterilization Injection was close to neutral solution. The DV(50) of Chymotrypsin for Injection dissolved and atomized with 0.9% Sodium Chloride Injection was $(3.59 \pm 0.14) \mu\text{m}$, which was significantly lower than that dissolved and atomized with Sterilized Water For Injection ($P < 0.05$). **Conclusion** The content of Chymotrypsin for Injection aerosol inhalation solution is more stable in neutral condition within 2 h, and can be well atomized in 0.9% Sodium Chloride Injection and Water for Sterilization Injection to reach the lung.

Key words: Chymotrypsin for Injection; RP-HPLC; content; stability; atomization; particle size

雾化吸入疗法已成为治疗呼吸系统疾病重要的辅助手段之一。国内常使用注射用药物进行雾化吸入,与目前雾化吸入治疗相关指南的推荐意见不一致^[1-2]。不建议使用注射用制剂进行雾化治疗的主要原因:1)无法保证注射液雾化后颗粒的均匀度,粒径难以控制在0.5~10.0 μm间,无法最大限度地沉积于气道和肺部;2)部分注射液为强酸或强碱溶液,雾化后产生的刺激性气体会导致气道痉挛引起呼吸困难,如注射用盐酸氨溴索不能与pH>6.3的0.9%氯化钠注射液配伍使用^[3];3)尚不明确注射液中辅料的安全性,部分药物中的防腐剂等辅料雾化后有诱发哮喘的风险。因此,测定临床常用注射用药品制成雾化制剂后的pH、含量及雾化粒径,可为临床安全使用雾化疗法提供有效参考。本研究中建立了测定注射用糜蛋白酶溶解后含量的反相高效液相色谱(RP-HPLC)法,并考察了注射用糜蛋白酶雾化吸入溶液(简称雾化溶液)的稳定性和雾化粒径分布。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Aglient1260型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);Spraytec STP2000型激光粒度仪(英国马尔文仪器有限公司);FE20型实验室pH计,XS105DU型分析天平(精度为千分之一),均购自瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司;DFM 2000型流量计(英国Copley Scientific公司)。

1.2 试药

注射用糜蛋白酶(上海上药第一生化药业有限公司,批号为1707037,规格为每支4 000 IU);0.9%氯化钠注射液(中国大冢制药有限公司,批号为9J83B2);灭菌注射用水(国药集团容生制药有限公司,批号为1905517);糜蛋白酶对照品(批号为C2160000,

纯度≥1 000 U/mg),三氟乙酸(批号为B1927051),均购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;乙腈(色谱纯,德国默克公司);无水乙醇(分析纯,广东光华化学厂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验

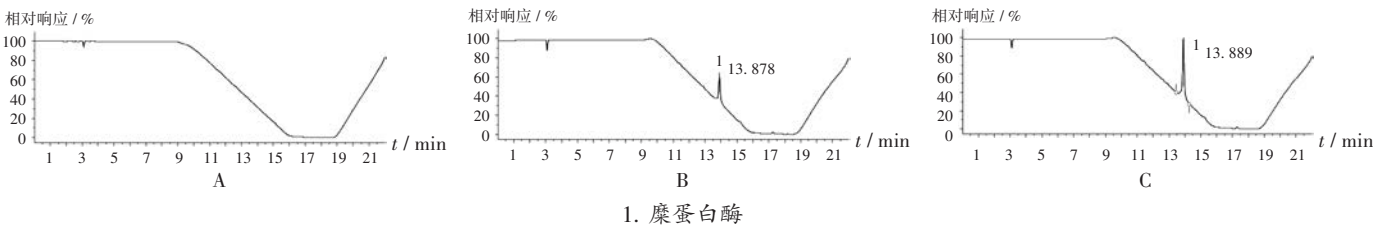
色谱柱:Grace 214TP C₄柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:0.1%三氟乙酸水溶液(A)-0.09%三氟乙酸乙腈(B),梯度洗脱程序见表1;流速:1.00 mL/min;检测波长:214 nm;柱温:30 °C;进样量:10 μL。精密量取空白对照溶液(0.9%氯化钠注射液)、对照品溶液、供试品溶液各10 μL,进样测定,结果在此色谱条件下,糜蛋白酶峰形对称,阳性对照无干扰。色谱图见图1。

表1 流动相梯度洗脱程序(%)

Tab. 1 Gradient elution program of the mobile phase(%)		
时间	流动相 A	流动相 B
0~8 min	95	5
8~15 min	35	65
15~22 min	95	5

2.1.2 溶液制备

取糜蛋白酶对照品100 mg,精密称定,置10 mL容量瓶中,用0.10%三氟乙酸水溶液溶解并定容,摇匀,即得质量浓度为10.0 mg/mL的对照品溶液。取样品10 mg,精密称定,置10 mL容量瓶中,用0.10%三氟乙酸水溶液溶解并定容,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,即得质量浓度为1.0 mg/mL的供试品溶液,于4 °C保存。取样品10 mg,精密称定,分别用0.9%氯化钠注射液及灭菌注射用水稀释成质量浓度为2.0 mg/mL的雾化溶液,于4 °C下避光保存。



A. 空白对照溶液 B. 对照品溶液 C. 供试品溶液

图1 系统适用性试验高效液相色谱图

1. Chymotrypsin

A. Blank reference solution B. Reference solution C. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms of the system suitability test

2.1.3 方法学考察

线性关系考察:精密量取对照品溶液适量,加水稀释成糜蛋白酶质量浓度分别为0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,2.0 mg/mL的系列对照品溶液,分别精密量取对照品溶液200 μ L,各加入0.10%三氟乙酸水溶液300 μ L,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以糜蛋白酶质量浓度(X , mg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 0.77X - 29.78$ ($R^2 = 0.9998$, $n = 6$)。结果表明,糜蛋白酶质量浓度在0.20~2.00 mg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密量取同一对照品溶液适量,加水稀释成糜蛋白酶质量浓度分别为0.2,0.6,1.0 mg/mL的待测溶液。按2.1.1项下色谱条件于1 d内连续进样5次,日内精密度的 RSD 为0.17% ($n = 5$);取待测溶液连续进样测定3 d,每天3次,日间精密度的 RSD 为0.70% ($n = 9$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:精密量取供试品溶液适量,加水稀释制备待测溶液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果供试品溶液中糜蛋白酶的平均含量为0.61 mg/mL, RSD 为2.00% ($n = 5$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取供试品溶液适量,置4 $^{\circ}$ C恒温自动进样器中,分别于放置0,1,2,4,6 h时进样分析,按外标法以峰面积计算样品含量。结果样品中糜蛋白酶的平均含量为98.59%, RSD 为1.14% ($n = 5$),表明待测样品在4 $^{\circ}$ C下放置6 h稳定。

回收试验:取质量浓度分别为0.2,0.6,1.0 mg/mL的对照品溶液适量,各3份,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,按外标法计算回收率。结果平均回收率为 $(100.81 \pm 2.47)\%$, RSD 为2.45% ($n = 9$)。

2.2 稳定性考察

取样品10 mg,精密称定,共2份,置10 mL容量瓶中,分别用0.9%氯化钠注射液与灭菌注射用水溶解并定容,摇匀,于4 $^{\circ}$ C下避光保存。按2.1.1项下色谱条件进样测定,按外标法以峰面积计算,分别考察0,0.5,

1.0,2.0,4.0,6.0 h时样品的性状、pH、含量、降解率,重复4次,测试雾化溶液的稳定性。结果样品用灭菌注射用水和0.9%氯化钠注射液稀释后,6 h内均呈澄清状态,且2 h内含量较稳定,pH、含量、降解率测定结果见表2。

表2 不同溶剂配制下雾化溶液的pH、含量、降解率测定结果
($n = 4$)

Tab. 2 Determination results of pH,content and degradation rate of aerosol inhalation solution prepared with different solvents ($n = 4$)						
时间 (h)	pH		含量($\bar{X} \pm s$, mg/mL)		降解率($\bar{X} \pm s$, %)	
	A	B	A	B	A	B
0	4.76	4.30	1.06 ± 0.06	0.93 ± 0.06		
0.5	5.37	5.00	1.05 ± 0.06	0.90 ± 0.05	1.46 ± 1.32	2.71 ± 2.12
1.0	5.65	5.37	1.03 ± 0.07	0.89 ± 0.05	2.79 ± 2.18	3.84 ± 1.60
2.0	5.87	5.62	0.97 ± 0.10	0.81 ± 0.08	$9.05 \pm 4.59^{\#}$	$13.51 \pm 3.99^{\#}$
4.0	6.02	5.50	$0.90 \pm 0.10^{\#}$	$0.79 \pm 0.09^{\#}$	$14.25 \pm 4.89^{\#}$	$15.45 \pm 3.19^{\#}$
6.0	6.02	5.38	$0.90 \pm 0.09^{\#}$	$0.80 \pm 0.02^{\#}$	$15.18 \pm 3.86^{\#}$	$14.08 \pm 4.84^{\#}$

注:A为灭菌注射用水,B为0.9%氯化钠注射液。与0 h时比较, $^{\#}P < 0.05$;与0.5 h时比较, $^{\#}P < 0.05$ 。

Note: A is Water for Sterilization Injection, and B is 0.9% Sodium Chloride Injection. Compared with those at 0 h, $^{\#}P < 0.05$; compared with those at 0.5 h, $^{\#}P < 0.05$ 。

2.3 雾化溶液粒径测定

空气流量计的参数设置:空气流速为15 L/min ($\pm 5\%$),相对湿度为40%~60%,介质折光率为1,颗粒折光率为1.33。将5 mL雾化溶液(质量浓度为2 mg/mL)分别装入不同的喷雾器中,与人工喉相连,测试雾化粒径大小,15 min后观察到雾化溶液无残留,停止采样,每组重复4次,得到累积分布分别为10%,50%,90%时对应的粒径,即 $Dv(10)$, $Dv(50)$, $Dv(90)$ 。结果见表3。以径距(span)代表样品粒径分布宽度, $span = [Dv(90) - Dv(10)] / Dv(50)$ 。一般 $span < 1$,小颗粒较少。本研究中,2种雾化方法span均有较大的跨度,但灭菌注射用水配制的雾化溶液span的跨度显著小于0.9%氯化钠注射液雾化溶液

($P < 0.05$)。

表3 不同溶剂配制下雾化溶液粒径考察结果($\bar{X} \pm s, \mu\text{m}$)
Tab.3 The particle sizes of aerosol inhalation solution prepared with different solvents ($\bar{X} \pm s, \mu\text{m}$)

粒径	灭菌注射用水	0.9%氯化钠注射液
$D_v(10)$	1.07 ± 1.38	0.26 ± 0.01
$D_v(50)$	5.12 ± 0.26	$3.59 \pm 0.14^*$
$D_v(90)$	9.22 ± 0.35	9.03 ± 0.13
span	1.60 ± 0.30	$2.44 \pm 0.06^*$

注:与灭菌注射用水比较,* $P < 0.05$ 。

Note: Compared with those prepared with Water for Sterilization Injection,* $P < 0.05$.

3 讨论

2015年版《中国药典(二部)》中注射用糜蛋白酶质量标准仅有效价测定项,无纯度检查项,难以确切控制药物的含量,可能存在用药安全风险^[4-5]。预试验中,采用效价测定法测定注射用糜蛋白酶的含量,但浓度测定误差较大。虽然HPLC法测定糜蛋白酶含量时,色谱图中样品峰基线稳定,且与杂质峰分离效果好,但用时较长,不适合大样本分析^[6]。本研究中通过调节梯度洗脱的时间及流动相比比例,建立了快速测定注射用糜蛋白酶含量的RP-HPLC法,测定时间缩短为22 min。

此外,目前研究多集中在糜蛋白酶药理学性质及临床用药,尚未见药物配制稳定性及雾化后体内分布的报道^[7-9]。稳定性考察发现,注射用糜蛋白酶在0.10%三氟乙酸流动相中,4℃下6 h内可保持稳定。对于痰多、黏稠的患者,雾化吸入糜蛋白酶溶液可降低痰液黏弹性,加速患者康复^[10]。由表2可知,用灭菌注射用水制备的雾化溶液放置6 h, pH为6.02,接近中性,刺激性较小,2 h内平均降解率低于10%,较0.9%氯化钠注射液雾化溶液稳定。雾化吸入疗法主要是应用雾化吸入装置使药液形成粒径为0.01~10.00 μm 的气溶胶微粒,患者吸入后能较好地沉积于气道和肺部。雾化过程中,影响药物沉积的主要因素包括微粒性质、呼吸道几何结构、呼吸模式、微粒粒径大小及分布,上述因素决定了雾化药物在呼吸系统中的沉积部位和沉积量,影响药物疗效^[11]。有效雾化颗粒直径一般为0.5~10 μm ,其中 $5 \leq \text{粒径} \leq 10 \mu\text{m}$ 主要沉积于口腔与咽喉部位, $3 \leq \text{粒径} < 5 \mu\text{m}$ 主要沉积于肺部,粒径 $< 3 \mu\text{m}$ 有50%~60%沉积于肺泡^[12]。临床中不推荐注射用糜蛋白酶用于雾化治疗^[1,13],但该药用于雾化可有效防止痰栓形成,加速患者康复。由表3结果可知,注射用糜蛋白酶在0.9%氯化钠注射液及灭菌注射用水中雾化效果均可达到预期,且均可到达肺部,发挥溶解痰栓的作

用。此外,《欧洲药典9.0版》指出15 L/min的流速是最接近正常人体的呼吸流速,则本研究中采用15 L/min^[14]。但也有研究指出肺炎患者的吸气能力比正常人差,应在低于正常人呼吸流速的情况下测定雾化粒径^[15-17],后期将进一步加以研究。

参考文献

- [1] 杜光,赵杰,卜书红,等. 雾化吸入疗法合理用药专家共识(2019年版)[J]. 医药导报,2019,38(2):135-146.
- [2] 陶婉君,李根,郭文玖. 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[J]. 中国药业,2020,29(7):93-95.
- [3] 李玲,黄荣富,晏晨阳. 不同pH条件下盐酸氨溴索与0.9%氯化钠注射液配伍禁忌研究[J]. 中国药业,2016,25(24):22-24.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:1591.
- [5] 阎薇,陈国龙,罗巍. 基层医疗机构呼吸系统疾病雾化吸入治疗用药现状调查[J]. 中国药业,2019,28(19):95-98.
- [6] 史卓维,史芳亮,陈钢. 注射用糜蛋白酶的比活与纯度研究[J]. 首都医药,2012,19(6):50-52.
- [7] 张伟,孟金燕. 50%葡萄糖、糜蛋白酶外用促进感染性伤口愈合的疗效分析[J]. 临床医药文献电子杂志,2018,5(75):44-45.
- [8] 马佐鹏,庞怀霞,马祯,等. 鼻朗加糜蛋白酶治疗感染性鼻炎患儿的临床效果研究[J]. 中华医院感染学杂志,2017,27(24):5695-5698.
- [9] 孙淑萍,李胜利,徐文科,等. 用于创面的糜蛋白酶乳膏的制备[J]. 通化师范学院学报,2017,38(2):46-49.
- [10] 徐文,董频,谷庆隆,等. 雾化吸入在咽喉科疾病药物治疗中应用专家共识[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科,2019,26(5):231-238.
- [11] 陈诗韵,王伟,赵新慧. 雾化吸入剂体外粒径分析的研究进展[J]. 北方药学,2017,14(10):142-143.
- [12] SHETH P, STEIN SW, MYRDAL PB. The influence of initial atomized droplet size on residual particle size from pressurized metered dose inhalers [J]. Int J Pharm, 2013, 455(1/2): 57-65.
- [13] 中华医学会呼吸病学分会. 雾化吸入疗法在呼吸疾病中的应用专家共识[J]. 中华医学杂志,2016,96(34):2696-2708.
- [14] European Pharmacopoeia Commission. EP 9.0 [M]. Strasbourg:European Directorate Health Care,2013:323.
- [15] 詹舒瑶,宋星汉,张睿,等. 流速对激光衍射法测试2种市售雾化吸入剂粒径大小及分布结果的影响[J]. 广东药科大学学报,2017,33(3):290-293.
- [16] 侯丽艳,贾如江,王景梅. 机械通气患者呼气流速受限危险因素分析及其对患者预后的影响[J]. 临床荟萃,2020,35(7):624-627.
- [17] 王雪,陈韩亚,杨飞飞,等. 重组人干扰素 $\alpha 1b$ 注射液的雾化可吸入性研究[J]. 国际药学研究杂志,2019,46(6):456-460.

(收稿日期:2021-04-23;修回日期:2021-07-28)