吸入制剂用原料药中无定型含量的定量方法研究进展

齐创宇
（上海新黄河制药有限公司，上海 201612）

摘要：吸入制剂尤其是吸入粉雾剂的快速发展，凸显了对微粉化原料药中无定型含量的定量需求。文章简述了目前广泛使用的 7 种定量方法（PXRD 法、DSC 法、动态蒸汽吸附法、微量热法、溶解量热法、IR 法和拉曼光谱法），及其限度和相应的检测仪器，并基于吸入制剂用原料药的常见无定型含量限度要求，列举了一些研究实例，分析了不同方法的优缺点，以期为相关研究提供参考。

关键词：吸入制剂；微粉化原料药；无定型含量；定量分析；结晶度
中图分类号：R917　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2024)04-0488-06
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.04.006

Research Progress on Quantification Methods of Amorphous Content of Bulk Drugs for Inhaled Preparation

QI Chuangyu
(*Shanghai Xin Huanghe Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai 201612*)

ABSTRACT: The rapid development of inhaled products, especially dry powder for inhalation, highlights the quantitative demands for the amorphous content of micronized bulk drugs. This review briefly describes seven widely used quantitative methods, named PXRD, DSC, dynamic vapor adsorption, microcalorimetry, solution calorimetry, IR and Raman spectroscopy methods, as well as their limitations and corresponding detection instruments. And based on the common limit requirements of amorphous content for inhaled bulk drugs, some examples are provided. The advantages and disadvantages of different methods are analyzed to provide some references for related researches.

Key Words: inhaled preparation; micronized bulk drug; amorphous content; quantification analysis; crystallinity

随着精准医疗的发展，对于支气管哮喘、COPD、慢性支气管炎、肺气肿等，吸入制剂以其可以避免肝脏首过效应、提高肺部血药浓度、减少系统性不良反应等优势，日益受到人们的青睐，已成为治疗呼吸系统疾病的主要手段之一。此外，吸入制剂也为治疗全身性疾病提供了一种非侵入性的给药途径[1]。

2020 年版 ChP 中对吸入制剂的定义为，原料药溶解或分散于适宜的介质中，以气溶胶或蒸汽形式递送至肺部，发挥局部或全身作用的液体或固体制剂，包括吸入气雾剂、吸入粉雾剂、吸入喷雾剂、吸入液体制剂和可转变成蒸汽的制剂。其中，吸入粉雾剂的原料药仍以固体形式存在于制剂中。

吸入制剂所用原料药的粒径一般都小于 5 μm。一般而言，原料药合成工艺中的最后步骤，即传统的结晶工序无法达到上述粒径要求。因此需要通过气流粉碎、机械研磨等合适的途径减小原料药粒径。这些方法本质上都是将外部能量输入并作用于原料药，破坏颗粒的晶格，产生无序区域；随着作用时间的延长，部分晶型原料药就会转变成无定型。无定型是亚稳状态[2]，虽具有更高的溶解度和更快的

收稿日期：2023-05-24
作者简介：齐创宇（1975—），男，博士，高级工程师，从事原料药的开发与固体化学研究。
E-mail：siocsh@163.com

溶出速率等特点[3]，但会在潮湿、高温等条件下重新结晶，导致制剂的形态、性质发生改变，降低药物稳定性。因此对于吸入粉雾剂而言，需要对其所用原料药中的无定型含量进行定量，建立原料药的无定型含量限度，以确保药物的安全性、有效性和质量可控性，维护临床用药安全性和人民群众的生命健康。美国 FDA 在 2007 年制定了药物的晶型、水合物和无定型的指导原则[4]。

固体化学物质可以划分为晶态和非晶态物质这 2 大类，即晶型和无定型。目前，2020 年版 ChP 中的药品晶型研究及晶型质量控制指导原则章节已收载了 4 种常用的晶型定量分析方法，即单晶 X 射线衍射（single-crystal X-ray diffraction，SXRD）法、PXRD 法、DSC 法、IR 法。而原料药中无定型含量的常见定量方法则主要有如下 7 种[5—6]，分别是 PXRD 法、DSC 法、动态蒸汽吸附（dynamic vapor adsorption，DVS）法、微量热（microcalorimetry，μCal）法、溶解量热（solution calorimetry，SolCal）法、IR 法和拉曼光谱（Raman spectroscopy）法。依据检测时具体选取的研究对象（无定型或晶型），直接测定无定型含量的方法称为直接法，先测定晶型含量而间接获得无定型含量的称为间接法。

本文简要综述了上述 7 种无定型含量定量方法的研究进展，并基于实例分析各种方法的优缺点。

1 PXRD 法

PXRD 法早先应用于不同晶型的定性与定量分析。ALEXANDER 等[7]最早在 1948 年便提出了使用 PXRD 法进行不同晶型定量分析的理论，主要分为单峰法（single peak method）和全谱法（whole pattern method）2 种[8]。PXRD 法是一种间接测定无定型含量的方法，对于单一晶型化合物而言，在测得未知样品中的晶型含量后，就可以得出无定型含量，其检测限一般为 10%，但不同原料药也会存在一些例外情况。

单峰法：需要将无定型（或杂晶）对照品和（优势）晶型对照品混合，配成一系列百分含量的混合物样品；通过检测不同百分含量样品的晶型特征衍射峰的强度，拟合得到标准曲线，从而确定未知样品中的晶型含量。单峰法操作简单，但对标准品的纯度要求高，而且要注意排除择优取向的干扰。SUN 等[9]使用单峰法，在原料药利奈唑胺Ⅳ型优势晶型中进行Ⅱ型杂晶的定量检测，检测限达到 0.4%。如式①可显示特征衍射峰强度与相应晶型百分含量之间的线性比例关系[10]。

$$I_J=\frac{KX_J}{\rho_J\mu^*_m} \qquad ①$$

式中：I_J 为组分 J 的衍射峰强度；K 为常数 /(m^{-1})；X_J 为组分 J 的质量分数；ρ_J 为组分 J 的密度 /(kg·m^{-3})；μ^*_m 为基质的质量吸收系数 /(m^2·kg^{-1})。

全谱法：依靠建立 PXRD 全谱图和目标晶型含量之间的线性关系，从而确定未知样品中晶型的含量。全谱法包括内标法（internal standard method）、外标法（external standard method）、校准线性模型（linear calibration model，LCM）法、部分或无已知晶型结构（partial or no known crystal structure，PONKCS）法、结晶度法（degree of crystallinity method）、全结构法（full structure method）。与单峰法相比，全谱法不需要标准样品，且弱化了样品粒径大小以及择优取向对最终定量检测结果的影响，但全谱法整体较为复杂，不太适合应用推广。仍以文献[9]为例，SUN 等还使用了全结构法，建立了原料药利奈唑胺Ⅳ型优势晶型中Ⅱ型杂晶的定量检测模型，检测限达到 0.2%。

在上述 6 种全谱法中，结晶度法的应用较广泛[11]。结晶度的定义为样品中晶体含量的百分比，故亦可进一步推算出无定型含量。例如，确认了富马酸福莫特罗原料药的结晶度为 95%，可得出无定型含量为 5%。结晶度及无定型含量的计算公式如式②。

$$\text{无定型含量}=100-\frac{X-X_a}{X_c-X_a}\times 100\% \qquad ②$$

式中：X 为样品测量时的曲线下面积，X_a 和 X_c 分别为无定型和晶型的曲线下面积。

2 DSC 法

DSC 法[12]是记录物质某些物理性质随温度变化而变化的函数关系的检测技术，主要是在精确控制温度升降的情况下，测定样品与参比品在单位时间内吸收或释放能量的差值随温度变化的关系。在

DSC 的检测过程中，无定型会首先经过玻璃态，然后转变成晶型，最后在更高的温度下熔融。基于晶型熔融时或无定型向晶型转变时各自发生的热效应，相应的热量变化与晶型含量或无定型含量之间存在线性关系，因此不同型号的检测设备，可能分别适用于晶型或无定型的定量分析。

杨世颖等[13]使用传统型 DSC，实现了尼群地平Ⅳ型优势晶型中Ⅰ型杂晶的定量检测，检测限已达到 10%；杨敏等[14]则建立了固体分散体中依折麦布晶型的定量方法，检测限为 0.16%。对于单一晶型化合物而言，在测得晶型纯品的熔融焓或熔融峰面积后，根据标准曲线即可确定未知样品中的晶型含量，由此可进一步得到无定型含量。作为一种间接方法，DSC 法受限于仪器性能，并且传统型 DSC 一般也不太适合定量分析无定型含量在 10% 以下的样品，但不同原料药也都会存在例外的情况。

温度调节型 DSC（modulated temperature differential scanning calorimetry，MTDSC）的检测灵敏度更高，对无定型的玻璃态转变温度（T_g）比较敏感，可根据无定型纯品在 T_g 时的热容量跳动值建立标准曲线，用于无定型含量的直接定量分析，检测限可达到 1%左右。ABDUL-JABBAR 等[15]测定了硫酸沙丁胺醇的无定型含量，检测限达到 0.13%。MTDSC 的无定型含量计算公式如式③、④所示[11]。

$$C_p = K(C_p) \cdot \frac{\mathrm{Amp_{MHF}}}{\mathrm{Amp_{MHR}}} \qquad ③$$

$$K(C_p) = \frac{C_p, \mathrm{theoretical}}{C_p, \mathrm{measured}} \qquad ④$$

式中，$K(C_p)$ 为热容常数，$\mathrm{Amp_{MHF}}$ 和 $\mathrm{Amp_{MHR}}$ 分别为调制的热流与热率的振幅。

需要指出的是，虽然 DSC 法检测时的样品消耗量小，操作过程也简单，但属于有损分析，并且只适用于热稳定的化合物。

3　DVS 法

水作为无定型物质的增塑剂，可降低无定型的 T_g，从而导致无定型转晶。因此，无定型具有比晶型更易吸水及吸水后会转晶的特性，且水分吸收量（即吸收水分的质量百分数）与无定型含量呈正比。这是 DVS 法测定无定型含量的基本原理，故 DVS 法可直接定量分析无定型含量。根据仪器工作方式的不同，DVS 法又可分为 3 种检测方法，即水吸收法、平衡水分吸收法和剩余质量法。以水吸收法为例，基本操作步骤及相应的吸湿平衡图如图 1 所示[16]。图 1 中，左侧纵坐标是吸湿或解吸的质量变化，右侧纵坐标是相对湿度，横坐标是时间。单个样品的检测流程主要分为 6 个步骤：步骤①为干燥；步骤②为在特定湿度下样品达到吸湿平衡，记录此时的质量增量（吸收和吸附）；步骤③为干燥；步骤④为在更高湿度下结晶；步骤⑤为干燥；步骤⑥为在特定湿度下样品达到吸湿平衡，记录此时的质量增量（吸附）。其中，步骤②的质量增量减去步骤④的质量增量，即为样品中无定型所对应的吸水量。将无定型对照品和晶型对照品配成系列百分含量的混合物样品，如上操作后记录无定型所对应的吸水量，得出标准曲线，即可根据该标准曲线获知未知样品中的无定型含量。DVS 法的检测限主要取决于蒸汽吸附仪中天平的灵敏度，其一般 <1%，甚至可达到 0.5%左右。

BAGWAN 等[17]使用 DVS 法定量测定了硫酸特布他林原料药中的无定型含量，检测限为 0.41%。笔者用该法测定布地奈德原料药中的无定型含量，检测限为 0.4%。

4　μCal 法

μCal 法与 DVS 法的基本原理相同，即无定型比晶型更易吸水、吸水后会转晶且吸水量与无定型含量呈正比的特性也适用于以 μCal 法测定样品中的无定型含量[18—19]。μCal 法的吸湿和解吸的操作过程与上述 DVS 法类似，但此法中，仪器检测到的不是待测样品质量的变化，而是溶剂诱导无定型再结晶所释放的热量。该方法的成功与否取决于能否找到合适的结晶条件。这可能是非常具有挑战性的。再结晶过程既不应太快（会导致与最初的爆析现象叠加），也不应太慢（会阻碍对再结晶终点的检测）。

业内常用等温微量热仪进行检测，根据仪器的不同操作方式也可分为 3 种检测方法，即安瓿量热法、等温滴定量热法和等温气体灌注量热法。等温微量热仪可检出纳瓦级的热量变化，检测限一般小

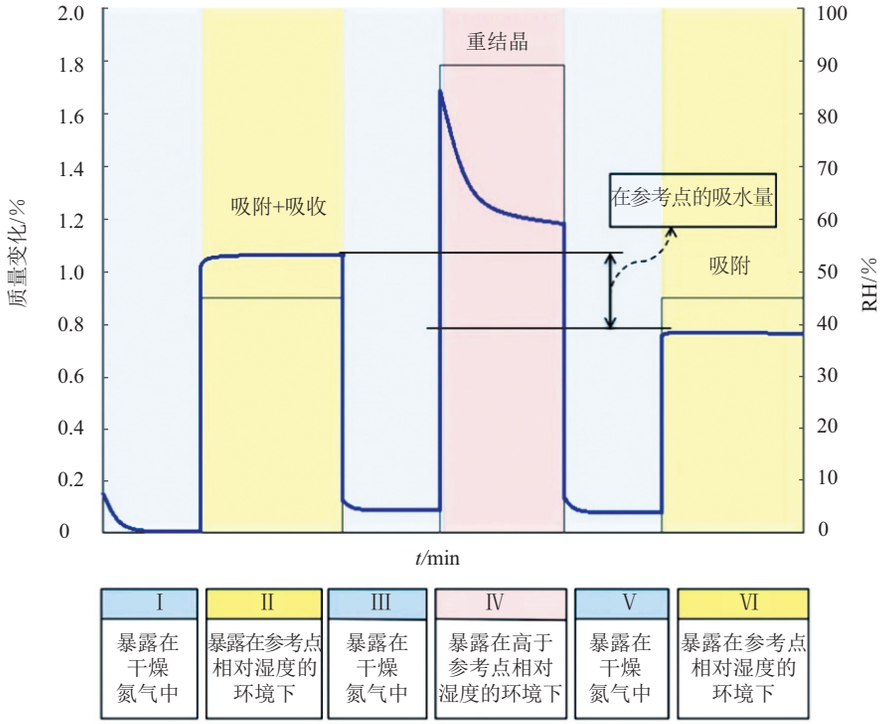


图 1 DVS 法的水吸收法吸湿平衡图 [16]

Fig.1 DVS Profile for Water Uptake Method[16]

于 1%。ALAM 等 [20] 使用等温微量热仪，定量测定了目标样品中的无定型含量，检测限达到 0.3%。

需要补充的是，等温微量热仪与常见 DSC 仪的检测不同，它研究的是随时间变化的相变和化学过程，而不仅仅是温度驱动的相变。因此，等温微量热仪在药物研发中有更多应用。在安装不同的检测模块后，等温微量热仪还能用于稳定性指示分析，如相容性评估以及反应动力学和热力学性质的测定等 [21]。

5 SolCal 法

无定型和晶型之间的焓差也可以通过 SolCal 法检测 [22]。SolCal 法并不需要将晶型转变成无定型或无定型转变成晶型，而是将 2 种固态形式转化为溶液，作为一个共同的参考态。因此，SolCal 法也适用于不能结晶的样品，并且能测量样品中全部无定型的含量，而不仅仅是样品表面可接近的部分。该方法的原理是根据起始物质的不同形态，溶解时会释放出不同数量的，可以通过溶液的温度变化而被检出的潜热（吸热或放热）。SolCal 法的灵敏度在一定程度上取决于所选择的溶剂。因此需要找到一种适合快速溶解的溶剂，并且也受到样品粒径的影响；检测限一般在 1% 左右。KATAINEN 等 [23] 使用 SolCal 计，在甲醇中定量测定了乳糖的无定型含量，检测限和定量限分别为 1.3% 和 4.4%，同时也使用了后面将要阐述的 Raman 光谱法进行无定型含量的直接测定，结果显示 2 种方法的计算结果吻合。

6 IR 法

IR 法是通过在 400 ～ 4 000 cm^{-1} 波数范围内记录物质的吸收光谱，从而实现对待测样品的鉴别或含量测定等目的的方法。IR 法定量分析的依据为待测样品对红外辐射的吸收度与其质量百分浓度的关系符合朗伯 - 比尔定律。晶型和无定型在 IR 中均有吸收峰。利用不同待测样品分子在一定波数范围内 IR 吸收峰的位置、强度、峰形等几何拓扑差异，可实现对晶型或无定型等不同物质状态的定性鉴别与定量研究 [24]。常见的传统透射光谱，如溴化钾压片法，制样时对样品进行的研磨或挤压，有可能会改变待测样品的微观状态，造成转晶，故推荐采

用衰减全反射（attenuated total reflection，ATR）IR，样品无需预处理，减少了固态形式的转变，可实现原位、实时、无损测量[25]。

WARNECKE 等[26]应用近红外光谱法，对无定型一水 α- 乳糖中的晶型进行了定量检测，再由此间接得出无定型含量，检测限为 0.43%。

7 拉曼光谱法

与 IR 相似，拉曼光谱也是一种分子振动光谱，反映了待测样品分子结构中各官能团的振动信息。因 IR 来自分子偶极矩的变化，是吸收光谱；拉曼光谱则源自分子极化率的变化，是散射光谱。因此多数时候 IR 和拉曼光谱能相互补充，也就是 IR 强、拉曼光谱弱，IR 弱、拉曼光谱强，表现在光谱图上就是 IR 谱图是凹的，拉曼光谱是凸的[27]。

无定型在 PXRD 图谱中显示为弥散峰，但在拉曼光谱图中晶型和无定型都可以出现吸收峰，且拉曼光谱图中的谱带强度与待测样品浓度的关系亦符合朗伯 - 比尔定律，通过光谱校正就可得到浓度的分布，为定量分析奠定了理论基础，可进行无定型含量的直接和间接定量分析。

对于具体的待测样品而言，有些无定型在拉曼光谱图中的峰强度弱于晶型的峰强度，且峰也更宽、更钝[28]。因此对于单一晶型而言，建议先对晶型进行定量分析，从而间接获得无定型含量。拉曼光谱的优点在于检测时无需进行样品制备或预处理，属于无损的原位检测，并且对水分不敏感，适用于水溶液样品的检测，故还能用于反应或结晶工序的在线过程分析，达到近实时监测的目的。

WABUYELE 等[29]运用拉曼光谱法，实现了对完整药片中原料药的无定型含量定量分析，检测限可达到 4.5%。EDINGER 等[30]使用拉曼光谱法，检测经微波诱导处理后的 PVP 片中的塞来昔布（celecoxib）原料药，可检出高达 90%的无定型。

8 总结与展望

综上所述，随着人民健康意识的提高和药物制剂技术的不断发展，吸入制剂已受到前所未有的关注，研发、生产和质量部门将会越来越重视微粉化原料药中的无定型含量。除本文中提到的 7 种检测方法外，还有固体核磁（solid state nuclear magnetic resonance，ss-NMR）[31]等方法，也能用于无定型含量的直接或间接定量检测。每种无定形含量的定量检测方法都有其优缺点，最终选择哪种定量方法，将主要取决于具体研究的原料药的理化性质和需要达到的检测限或定量限[32]。从检测设备的普及程度出发，常采用 PXRD 法、DSC 法、DVS 法和 IR 法来检测原料药中的无定型含量，考虑到吸入制剂的自身特点和对微粉化原料药中无定型含量的相关限度要求，DVS 法的适用性更胜一筹。

参考文献：

[1] SHETTY N, CIPOLLA D, PARK H, *et al*. Physical stability of dry powder inhaler formulations [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2020, **17**(1): 77-96.

[2] 陈颖翀 , 周伟成 , 雷方方 , 等. 基于药物晶型结构改善中药活性成分理化特性与功效的研究进展与思考 [J]. 药学学报 , 2021, **56**(8): 2059-2069.

[3] WANG B, LIU F, XIANG J, *et al*. A critical review of spray-dried amorphous pharmaceuticals: synthesis, analysis and application [J]. *Int J Pharm*, 2021, **594**: 120165.

[4] FDA. Guidance for Industry. ANDAs: pharmaceutical solid polymorphism. Chemistry, manufacturing and controls information [S]. July 2007.

[5] RAGER T. Quantitation of amorphous content [J]. *Solvias Prospects*, 2012, **2**: 13-17.

[6] MAHESWARAM M P, MANTHENI D, PERERA I, *et al*. Characterization of crystalline and amorphous content in pharmaceutical solids by dielectric thermal analysis [J]. *J Therm Anal Calorim*, 2013, **111**: 1987-1997.

[7] ALEXANDER L, KLUG H P. Basic aspects of X-ray absorption in quantitative diffraction analysis of powder mixtures [J]. *Anal Chem*, 1948, **20**: 886-889.

[8] MADSEN I C, SCARLETT N V Y, KERN A. Description and survey of methodologies for the determination of amorphous content via X-ray powder diffraction [J]. *Z Kristallogr*, 2011, **226**: 944-955.

[9] SUN M, HU X, ZHOU X, *et al*. Determination of minor

quantities of linezolid polymorphs in a drug substance and tablet formulation by powder X-ray diffraction technique [J]. *Powder Diffr*, 2017, **32**(2): 78-85.

[10] ROBERTS S N C, WILLIAMS A C, GRIMSEY I M, *et al*. Quantitative analysis of mannitol polymorphs: X-ray powder diffractometry-exploring preferred orientation effects [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2002, **28**(6): 1149-1159.

[11] SHAH B, KAKUMANU V K, BANSAL A K. Analytical techniques for quantification of amorphous/crystalline phases in pharmaceutical solids [J]. *J Pharm Sci*, 2006, **95**(8): 1641-1665.

[12] 陈咏萱, 周东山, 胡文兵. 示差扫描量热法进展及其在高分子表征中的应用 [J]. 高分子学报, 2021, **52**(4): 423-444.

[13] 杨世颖, 张 丽, 杜冠华, 等. 差示扫描量热法对尼群地平晶型的定量分析研究 [J]. 中国新药杂志, 2015, **24**(12): 1423-1426.

[14] 杨 敏, 徐 亮. 采用差示扫描量热法定量分析固体分散体中的依折麦布晶型 [J]. 中国医药工业杂志, 2023, **54**(3): 424-428.

[15] ABDUL-JABBAR S, WONG D W, MARTIN G P, *et al*. Repurposing melt degradation for the evaluation of mixed amorphous-crystalline blends [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2021, **22**(105): 1-6.

[16] SHEOKAND S, MODI S R, BANSAL A K. Dynamic vapor sorption as a tool for characterization and quantification of amorphous content in predominantly crystalline materials [J]. *J Pharm Sci*, 2014, **103**: 3364-3376.

[17] BAGWAN N U S, SHEOKAND S, KAUR A, *et al*. Role of surface molecular environment and amorphous content in moisture sorption behavior of milled terbutaline sulphate [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2021, **161**: 105782.

[18] O′NEILL M A A, GAISFORD S. Application and use of isothermal calorimetry in pharmaceutical development [J]. *Int J Pharm*, 2011, **417**: 83-93.

[19] GAISFORD S. Isothermal microcalorimetry for quantifying amorphous content in processed pharmaceuticals [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, **64**: 431-439.

[20] ALAM S, OMAR M, GAISFORD S. Use of heat of adsorption to quantify amorphous content in milled pharmaceutical powders [J]. *Int J Pharm*, 2014, **459**: 19-22.

[21] 范一灵, 王伟霞, 闻宏亮, 等. 等温微量热技术快速评价头孢曲松钠的体外抑菌效果 [J]. 药物分析杂志, 2019, **39**(4): 722-729.

[22] MAJUMDER M, RAJABNEZHAD S, NOKHODCHI A, *et al*. Chemico-calorimetric analysis of amorphous granules manufactured via continuous granulation process [J]. *Drug Deliv and Transl Res*, 2018, **8**: 1658-1669.

[23] KATAINEN E, NIEMELÄ P, HARJUNEN P, *et al*. Evaluation of the amorphous content of lactose by solution calorimetry and Raman spectroscopy [J]. *Talanta*, 2005, **68**: 1-5.

[24] HUDSON R L, MULLIKIN E F. Infrared band strengths for amorphous and crystalline methyl propionate, a candidate interstellar molecule [J]. *Spectrochim Acta Part A*, 2019, **207**: 216-221.

[25] 林 翔, 李 娟, 彭熙琳, 等. 透射与衰减全反射: 红外光谱测试的实际案例及讨论 [J]. 实验科学与技术, 2022, **20**(4): 76-81.

[26] WARNECKE S, WU J X, RINNAN A, *et al*. Quantifying crystalline α-lactose monohydrate in amorphous lactose using terahertz time domain spectroscopy and near infrared spectroscopy [J]. *Vib Spectrosc*, 2019, **102**: 39-46.

[27] 周 健, 杨世颖, 靳桂民, 等. 拉曼光谱技术在药物晶型研究中应用进展 [J]. 医药导报, 2019, **38**(2): 197-202.

[28] 周 健, 杨世颖, 张 丽, 等. 拉曼光谱法鉴别分析 3 种甾体类避孕药晶型 [J]. 医药导报, 2020, **39**(11): 1501-1505.

[29] WABUYELE B W, SOTTHIVIRAT S, ZHOU G X, *et al*. Dispersive raman spectroscopy for quantifying amorphous drug content in intact tablets [J]. *J Pharm Sci*, 2017, **106**: 579-588.

[30] EDINGER M, KNOPP M M, KERDONCUFF H, *et al*. Quantification of microwave-induced amorphization of celecoxib in PVP tablets using transmission Raman spectroscopy [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2018, **117**: 62-67.

[31] 陈 婷, 李 琦, 刘琪文, 等. 固态核磁共振技术在晶型药物研究中的应用 [J]. 医药导报, 2022, **41**(5): 655-663.

[32] DOUMENG M, MAKHLOUF L, BERTHET F, *et al*. A comparative study of the crystallinity of polyetheretherketone by using density, DSC, XRD, and Raman spectroscopy techniques [J]. *Polymer Testing*, 2021, **93**: 1-10.