采用确定性筛选设计优化催产素粉末的处方及制备工艺参数

董子豪，高 洁，唐艺菲，张 琪，吴闻哲*
（中国医药工业研究总院药物制剂国家工程研究中心，上海 201203）

摘要：采用 JMP 软件（版本 13.0 Pro）的确定性筛选设计（DSD）模块对吸入用催产素粉末的喷雾干燥处方工艺进行了初步筛选。分别设定了 6 个处方或工艺参数（磷酸盐比例、亮氨酸比例、料液 pH、进口温度、进料流速、压缩空气流量），进行 13 次试验，评价指标为微细粒子分数、产率、玻璃化转变温度、水分含量、几何中位径、催产素含量。结果表明，磷酸盐比例和亮氨酸比例显著影响微细粒子分数，亮氨酸比例显著影响产率，磷酸盐比例和进料流速显著影响水分含量。最后，以微细粒子分数、催产素含量为关键评价指标，通过联合建模获得了优化处方工艺参数。优化处方工艺的验证试验结果显示，所得喷雾干燥粉末的微细粒子分数 89.14%、水分含量 0.67%、催产素含量 94.63%、几何中位径 1.36 μm、产率 68.50%，基本符合催产素干粉吸入剂要求。因此，在多肽类药物干粉吸入剂研发早期，确定性筛选设计可快速衡量各处方或工艺参数对粉末性质的影响。

关键词：催产素；确定性筛选设计；喷雾干燥；玻璃化转变温度；吸入；多肽类药物
中图分类号：R944.9 **文献标志码：**A **文章编号：**1001-8255(2022)08-1167-06
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.08.011

Definitive Screening Design for Optimizing Formulation and Process Parameters of Oxytocin Powder

DONG Zihao, GAO Jie, TANG Yifei, ZHANG Qi, WU Wenzhe*
(*National Pharmaceutical Engineering Research Center, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203*)

ABSTRACT: A definitive screening design (DSD, software JMP 13.0 Pro) was undertaken to preliminarily screen the formulation and process parameters of spray-dried powders of oxytocin for inhalation. Six formulation and process parameters, namely phosphate radio, leucine radio, pH of feed solution, inlet temperature, feed solution flow rate and airflow rate, were set as the influence factors, then 13 batches of oxytocin powder were prepared and characterized in terms of fine particle fraction, yield, glass transition temperature, moisture content, geometric median diameter, oxytocin content. The results showed that fine particle fraction was mainly influenced by phosphate radio and leucine radio, whereas yield was found to be primarily affected by leucine radio, and moisture content was mainly influenced by phosphate radio and feed solution flow rate. Finally, the optimal formulation and process parameters of spray-dried powders of oxytocin was obtained with fine particle fraction and oxytocin content as key indicators through joint modeling. The results of verification test showed that the optimized powders were basically in line with the requirements of oxytocin dry powder for inhalation, with fine particle fraction of 89.14%, moisture content of 0.67%, oxytocin content of 94.63%, geometric median diameter of 1.36 μm and yield of 68.50%. In conclusion, DSD can quickly screen and quantify the influence of the formulation or process parameters on powder properties in the early development of peptide dry powder inhalation.

Key Words: oxytocin; definitive screening design; spray drying; glass transition temperature; inhalation; peptide drug

将多肽类药物制备成干粉进行肺部吸入给药，较常规注射给药具有诸多优势，是近年来倍受制药界关注的给药方式。相较于注射液，多肽吸入干粉大大提高了药物的稳定性，运输贮存无需冷链；干

收稿日期：2022-01-07
作者简介：董子豪(1996—)，男，硕士研究生，专业方向：肺部吸入给药。
通信作者：吴闻哲(1973—)，女，研究员，硕士生导师，从事经鼻及吸入给药研究。
E-mail：wuwenzhe@sina. com

粉吸入剂可自主给药，其无创给药的特点大幅增加了患者顺应性；由于肺泡表面积大、血流丰富，多肽类药物可通过吸入途径快速入血发挥全身治疗作用，因肺黏膜代谢酶活性较低，吸入给药后生物利用度高[1—3]。

喷雾干燥是制备多肽药物吸入干粉的常用技术手段之一，将溶解有药物与辅料的水溶液经压缩空气的雾化和瞬时高温干燥，辅料分子来不及规则排列，易与多肽药物形成无定形颗粒，空气动力学粒径可达到 1 ～ 5 μm，适合递送到肺部[4]。通过喷雾干燥制备多肽药物干粉吸入剂通常有 3 种体系：①处方中有高比例的甘露醇和磷酸盐[5]；②处方中有高比例的海藻糖[4]；③处方中有高比例的多肽药物[2]。在体系①中，甘露醇自身玻璃化转变温度（glass transition temperature，T_g）较低（11 ℃），导致贮存稳定性差、易发生结晶，需要与磷酸盐共喷雾干燥才能提高其 T_g 值。但盐的引入增加了粉末中的水分含量，而水作为一种增塑剂又会降低粉末的 T_g 值[6]，可能引起无定形辅料转晶，失去对多肽药物的保护作用，同时会影响颗粒其他方面的性质，所以在吸入干粉的研究过程中，往往需要将处方和工艺变量协同进行考察。

催产素（oxytocin，**1**）是一种环状九肽，临床上以静脉滴注和肌内注射方式给药用于引产。吸入给药也可快速进入体循环发挥药效，并且无创，更易被患者接受。本研究以 **1** 为模型药物，应用确定性筛选设计（definitive screening design，DSD）考察喷雾干燥处方和工艺变量对关键质量参数（critical quality attributes，CQAs）的影响，探究喷雾干燥过程中颗粒形成的机制。

1　仪器与试药

LC-20AT 型高效液相色谱仪（日本 Shimadzu 公司）；XS205 型电子分析天平（瑞士 Mettler-Toledo 公司）；B-191 型喷雾干燥机（瑞士步琦仪器有限公司）；Q-2000 型差示扫描量热仪和 Q-500 型热重分析（TGA）仪（美国 TA 仪器公司）；HELOS/BF-RODOS 型激光粒度测定仪（德国 Sympatec 公司）；PB-10 型 pH 计（德国 Sartorius 公司）；新一代药用撞击器（next generation impactor，NGI，英国 Copley 公司）；胶囊型干粉吸入剂装置 Aerolizer®（上海华瑞气雾剂有限公司）。

1（苏州天吉生物制药有限公司，含量 98.51%，批号 20211001）；甘露醇（法国 Roquette 公司）；无水磷酸二氢钠（国药集团化学试剂有限公司）；亮氨酸［生工生物工程（上海）股份有限公司］；羟丙甲纤维素（HPMC）3 号胶囊（苏州胶囊有限公司）。

2　方法与结果

2.1　喷雾干燥粉末的制备

称取甘露醇、磷酸二氢钠、亮氨酸、**1**（其中 **1** 比例 =2%，磷酸二氢钠和亮氨酸比例见表 1，甘露醇比例 =100% － 磷酸二氢钠比例 － 亮氨酸比例 － **1** 比例），用纯水溶解并调至确定的 pH 值，料液固含量为 1%。照表 1 中的工艺参数进行喷雾干燥，其中循环空气流量设定为 100%且不纳入本试验的考察项目。粉末使用高效旋风分离器收集并计算产率，最后置干燥器中保存。喷雾干燥过程中环境湿度控制在相对湿度（RH）（35±5）%、温度（23±2）℃。

2.2　喷雾干燥粉末性质的测定

2.2.1　含量

色谱条件：色谱柱 Welch Xtimate C_{18} 柱（4.6 mm×125 mm，5 μm）；流动相　22%乙腈水溶液（含无水磷酸二氢钠 15.6 g/L）；检测波长 220 nm；流速 1 ml/min；柱温 40 ℃；进样量　20 μl。总分析时间为 5 min，用外标法测定。**1** 质量浓度 c 在 0.5 ～ 20 μg/ml 与峰面积 A 线性关系良好，回归方程为 A=12 058c+337.37，R^2=0.999 9。低、中、高质量浓度（0.8、1、1.2 μg/ml）溶液的平均回收率为 98.75 %、99.26 %、98.80 %；日内 RSD（n=6）为 1.55%。方法学验证结果表明本法的线性、精密度和回收率均符合相关要求。

2.2.2　几何中位径

采用激光粒度测定仪进行几何中位径的测定。称取适量粉末于进样口，先进行空白校正，再进行粒径测定。选用 R2 镜头（粒径测定范围 0.25 ～ 150 μm），分散压力为 300 kPa。

2.2.3　玻璃化转变温度（T_g）

采用差示扫描量热法（DSC）测定 T_g。精密称取各处方粉末 4 ～ 5 mg 于 DSC 检测用铝质坩埚中，在升温速率 10 ℃ /min、升温范围 －10 ～ 200 ℃条

件下进行测定，记录 DSC 结果谱图，数据分析采用 TRIOS 软件（版本 5.0.0）。

2.2.4 水分含量

采用 TGA 仪进行粉末水分含量测定。称取各处方粉末 5 ～ 8 mg 于去皮的铂金装样盘中，在升温速率 10 ℃ /min、升温范围 30 ～ 150 ℃条件下进行测定。记录 TGA 结果谱图，数据分析同上采用 TRIOS 软件。

2.2.5 微细粒子分数（fine particle fraction，FPF）

采用 NGI 对样品进行空气动力学性质测定。吸入装置为 Aerolizer®、测试时间为 4 s、测试流速为 60 L/min。精密称取样品粉末约 20 mg，手工填充于 HPMC 3 号胶囊中。取 2 颗胶囊进行测定，照“**2.2.1**”项下方法测定药物含量。用 CITDAS 软件（版本 3.1）计算 FPF。

2.3 实验设计

共选用 3 个处方变量和 3 个工艺变量（表 1）用于考察，每个变量设置低中高 3 个水平，以产率（Y_1）、残余水分含量（Y_2）、d(0.5)（Y_3）、T_g（Y_4）、**1** 含量（Y_5）、FPF（Y_6）为响应，利用 JMP 软件（版本 13.0 Pro）的 DSD 模块进行实验设计，共计 13 次试验（表 2）。采用方差分析（ANOVA）确定模型和效应的显著性（P）及效应的大小，即统一尺度估计值（JMP 软件中为了方便比较具有不同单位的效应大小，会对效应进行标准化处理，处理后的效应大小称为统一尺度估计值，以下简称“估计值”）。

表 1 DSD 的因素和水平

Tab.1 Factors and Levels of the DSD Experiment

变量	低（－1）	中（0）	高（+1）
进口温度（X_1）/℃	170	195	220
进料流速（X_2）/%	2	5	8
压缩空气流量（X_3）/L·h^{-1}	500	650	800
磷酸二氢钠比例（X_4）/%	0	17.5	35
亮氨酸比例（X_5）/%	10	20	30
料液 pH（X_6）	4.5	6.75	9

2.4 结果分析

试验结果如表 2 所示。对所有的响应进行回归建模，效应筛选中显著性水平设定为 0.1。模型拟合优度见表 3，效应筛选结果见图 1。结果表明，除 T_g 外所有模型的拟合效果良好。以下主要以“**1** 含量”“几何中位径”“T_g”“水分含量”“FPF”为例说明模型项拟合情况及各个处方工艺参数对模型的影响。

2.4.1 **1** 含量

由表 2 可见，所有处方的药物含量在 72.64% 到 102.51% 范围内；模型的 R^2 为 0.969、R^2_{adj} 为 0.926、P 为 0.001 7（表 3），说明该模型拟合良好且显著。磷酸二氢钠比例（X_4）、料液 pH（X_6）、进口温度（X_1）的估计值分别为 －3.85、－3.82、－3.14（正值越大代表变量响应越大，负值绝对值越大代表变量响应越小），同时 X_1 与 X_5、X_4 有显著的二阶交互作用，

表 2 DSD 试验设计及结果

Tab.2 Design and Results of the DSD Experiment

编号	模型项						响应					
	X_1/℃	X_2/%	X_3/L·h^{-1}	X_4/%	X_5/%	X_6	Y_1/%	Y_2/%	Y_3/μm	Y_4/℃[1)]	Y_5/%	Y_6/%
1	170	8	650	35	10	4.5	31.68	1.18	3.88	22.87	84.13	15.44
2	195	2	500	0	10	4.5	44.73	0.31	1.95	11	102.51	65.33
3	220	5	500	35	30	4.5	37.10	0.36	2.00	18.32	82.14	68.57
4	220	2	800	35	10	6.75	17.60	1.53	2.17	25.42	86.99	20.09
5	170	8	500	0	30	6.75	57.79	0.48	1.96	11	98.13	73.95
6	220	8	800	0	20	4.5	52.52	0.46	1.45	11	87.7	85.87
7	170	5	800	0	10	9	43.43	0.44	1.35	11	92.92	84.07
8	220	2	650	0	30	9	53.86	0.85	1.43	11	72.64	86.80
9	195	5	650	17.5	20	6.75	65.83	1.17	1.99	20.03	89.85	73.24
10	170	2	800	17.5	30	4.5	52.52	2.51	1.67	19.28	95.24	80.14
11	170	2	500	35	20	9	67.35	2.08	2.28	24.78	76.31	24.24
12	220	8	500	17.5	10	9	34.37	2.26	3.55	31.15	85.83	46.26
13	195	8	800	35	30	9	44.98	0.55	1.67	29.73	85.83	83.27

注：[1)] 处方 2、5、6、7、8 没有检测到 T_g 值，拟合时采用 11 ℃替代

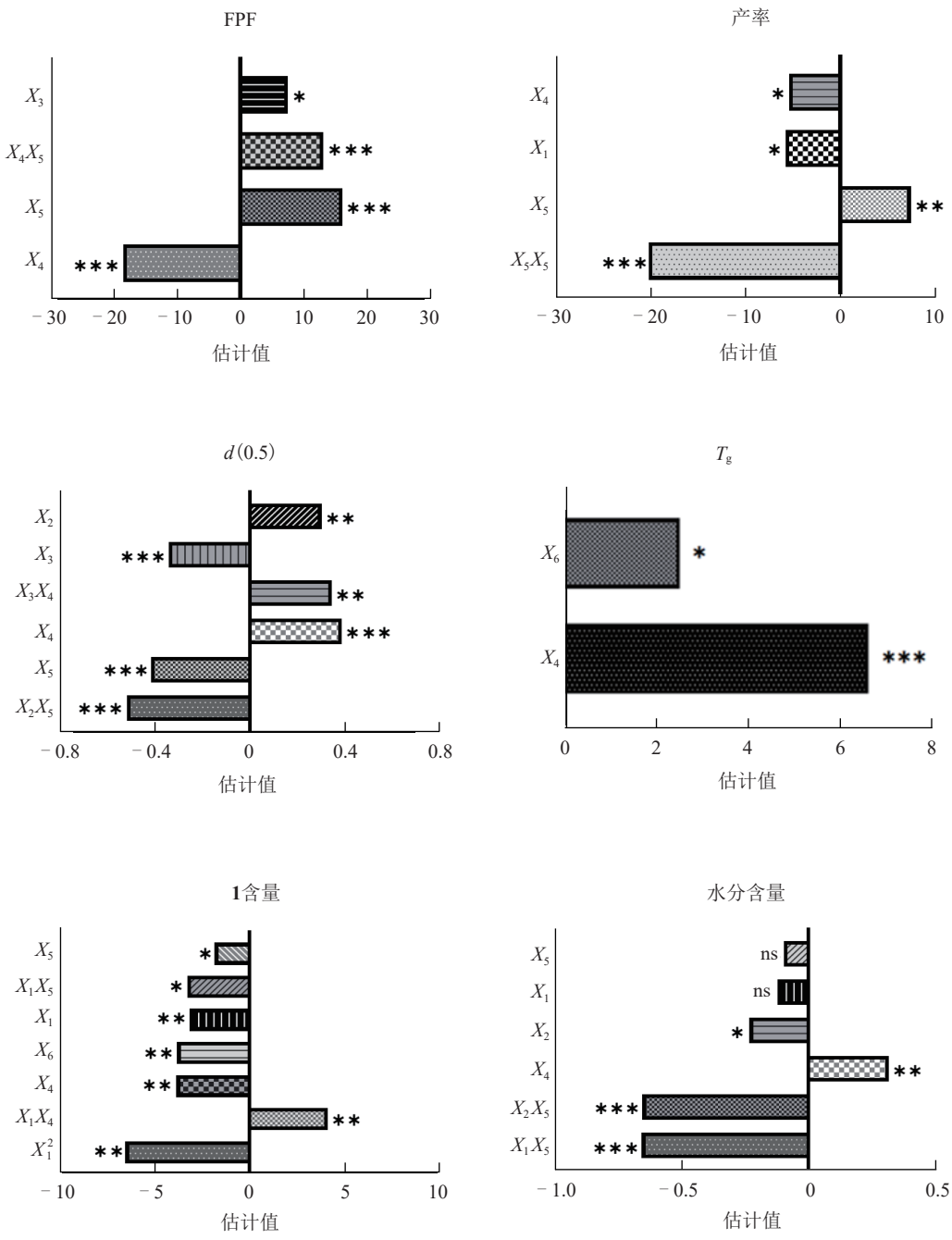


图 1　不同拟合模型中影响因素的统一尺度估计值（*P<0.1，**P<0.01，***P<0.001，ns：P>0.1）

Fig.1　Scaled Estimates of Influence Factors in Different Fitting Models

（* Represents P<0.1, ** Represents P<0.01, *** Represents P<0.001, ns Represents P>0.1）

表 3　不同 **CQAs** 的模型拟合结果

Tab.3　Model Fitting Results of Different CQAs

项目	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5	Y_6
R^2	0.887	0.961	0.973	0.743	0.969	0.949
R^2_{adj}	0.831	0.922	0.946	0.691	0.926	0.924
P	0.004 3	0.001 3	0.000 2	0.001 1	0.001 7	0.001

此外 X_1 的二阶平方项也影响显著。**1** 为多肽，在高 pH 值和高温下易降解，该模型提示 X_6 和 X_1 与 **1** 含量为负相关，即提高料液 pH 和进口温度都会造成 **1** 含量下降。同时，模型还提示磷酸二氢钠比例（X_4）这一处方参数也是导致 **1** 含量下降的显著因素，但

对于磷酸盐的作用还需进行进一步研究。

2.4.2 几何中位径

结果显示，大部分处方颗粒的 $d(0.5)$ 位于 1.35～2.28 μm。而处方 1 和处方 12 颗粒的 $d(0.5)$ 分别为 3.88 和 3.55 μm，且制备时发现在旋风分离器和收集瓶外壁上均有少部分颗粒粘连，这可能与处方中高比例的磷酸盐有关：磷酸盐和水的亲和力比较强，而瞬时加热无法使含盐颗粒完全干燥。这一点也在建立的拟合模型中得到了验证（图 1）。此外，增大进料流速（X_2）会提高 $d(0.5)$，推测是因为进料流速提高后，单位流量的压缩空气需要雾化更多体积的料液，即单位料液所受到的雾化能量更少，所以被雾化的液体体积偏大，最后干燥形成的颗粒也偏大。

2.4.3 玻璃化转变温度（T_g）

该参数拟合模型的 R^2 为 0.743、R^2_{adj} 为 0.691、P 为 0.001 1（表 3），说明模型虽然显著但是只能解释 74%的数据变异，这可能与处方 2、5、6、7、8 没有检测到 T_g 值而采用 11 ℃替代进行拟合有关。该模型给出了 2 个显著影响因素 X_4 和 X_6，估计值分别为 6.11、2.52，即提高这 2 项参数均可提升 T_g 值。WENG 等研究证明冷冻干燥过程中 HPO_4^{2-} 的引入可提高海藻糖的 T_g 值，而 $H_2PO_4^-$ 的引入会降低海藻糖的 T_g 值，这是因为前者的氢键作用要强于后者，包含前者的体系可形成刚性更强的无定形结构[7]。OHTAKE 等研究中也以海藻糖和蔗糖为基质证明了这一现象[8]。由于处方中含有一定的水分，而水作为一种增塑剂会大大降低无定形基质的分子链段迁移性从而降低 T_g 值。FOCAROLI 等测定了喷雾干燥的含海藻糖处方的水分含量和 T_g 值，线性回归后观察到，每增加 1%的水分含量，T_g 值约下降 5 ℃[4]。本研究将处方 12 颗粒进一步减压干燥处理后，水分含量从 2.26%降至 0.91%，T_g 值从 31.15 ℃提高至 50.02 ℃，与文献报道基本相符。

2.4.4 水分含量

结果（表 2）显示，不含盐的处方中水分含量均小于 1%，而含盐的处方随着工艺的变化其水分含量介于 0.36%～2.51%。该拟合模型也指出 X_4 是影响水分含量最显著的因素，如**“2.4.3”**项下所述，粉末可通过进一步减压干燥处理降低水分含量。

2.4.5 微细粒子分数（FPF）

该拟合模型的 R^2 为 0.949、R^2_{adj} 为 0.924（表 3），说明可解释大部分的变异；同时 R^2 和 R^2_{adj} 相差不大，说明该模型没有因为项目过多而发生过拟合（lack of fit）；P 为 0.001 说明模型显著。X_4、亮氨酸比例（X_5）、压缩空气流量（X_3）”的估计值分别为 －18.44、16.15、7.51，均较显著。

X_4 是对 FPF 影响较大的变量，磷酸盐比例高达 35%时出现 FPF 小于 30%且产率也偏低的情况（如处方 1、4），推测在喷雾干燥过程中由于高比例的盐离子和水的相互作用力强，液滴无法及时干燥形成小颗粒，从而黏附在旋风分离器上造成产率损失。此外，从 $d(0.5)$ 偏大的结果可推测，颗粒由于水分含量较高而易粘连，进而造成 FPF 较低。因此，降低磷酸盐含量可提高 FPF。X_5 增加可显著提升 FPF，与之前文献中的结论一致[9]，即亮氨酸作为一种疏水性氨基酸易于干燥，并且形成的疏水性外壳在喷干时内外压差的作用下可赋予颗粒空心球结构或褶皱结构，这有利于药物的肺部递送。X_3 对 FPF 的贡献在于压缩空气流量越大，被喷嘴雾化形成的液滴及形成的颗粒也就越小，相近密度下可关联性地降低 FPF。所以 X_3 是影响 FPF 的显著变量。

除了上述单一因素影响，X_4 和 X_5 的交互作用也影响显著（P<0.001），其估计值为 13.12，说明疏水性辅料亮氨酸和亲水性辅料磷酸盐之间存在着明显的交互作用。

2.5 喷雾干燥粉末性质的综合优化与工艺验证

本项通过 JMP 软件的拟合组功能，选择 **1** 含量、FPF、T_g 值为核心优化指标［响应重要性（权重）均设为 1］，对多个响应进行联合优化，结果得到了 2 种优化处方（核心优化指标分别为：① **1** 含量和 FPF；② **1** 含量、FPF 和 T_g 值），工艺参数见表 4。

照优化结果（表 4）进行验证试验，预测值及其 95%置信区间和实际值见表 5。结果表明，FPF 的预测值和实际值最接近，且实际值位于预测值 95%置信区间内，说明该模型较可靠。同时优化处方①的 FPF 要高于 DSD 试验中的任何一个处方，**1** 含量也满足要求，但未检出该处方的 T_g 值，提示

粉体可能为结晶态或半结晶态，需要后续继续考察贮存稳定性。优化处方②具有较高的 T_g 值，经减压干燥处理后，水分含量由 3.93%降到了 0.75%，T_g 值由 19.72 ℃提高到了 46.76 ℃，但药物含量为 89.05%，不适合开发。综上所述，优化处方暂定为处方①。

3 讨论

本研究通过 DSD 研究了 **1** 喷雾干燥处方工艺，仅用了 13 次试验就完成了喷雾干燥工序中 6 个变量的影响分析，大部分变量的模型拟合良好，可提高筛选效率，快速获得优选处方。DSD 具有表征的二阶交互作用之间无混杂、试验次数少的优点，可用于喷雾干燥粉末制备的早期筛选。但基于 DSD 的实验设计中不能出现数据的删失，否则将大幅降低模型预测的准确性。

表 4　优化的处方工艺参数

Tab.4　Optimized Formulation and Process Parameters

优化处方	甘露醇/%	磷酸二氢钠(X_4)/%	亮氨酸(X_5)/%	pH(X_6)	**1** 比例/%	进口温度(X_1)/℃	进料流速(X_2)/%	压缩空气(X_3)/L·h^{-1}
①	68	0	30	4.5	2	174	5	800
②	33	35	30	9	2	191	5	800

表 5　验证试验结果

Tab.5　Verification Test Results

项目	水分含量/%	T_g/℃	产率/%	d(0.5)/μm	FPF/%(n=2)	**1** 含量/%(n=2)
处方①预测值[1)]	1.33[0.98, 1.68]	16.03[12.20, 19.86]	59.42[51.34, 67.52]	0.61[0.29, 0.94]	91.08[79.20, 102.96]	104.63[99.30, 109.97]
处方①实际值	0.67	未检出	68.50	1.36	89.14±2.35	94.63±0.28
处方②预测值[1)]	1.43[1.15, 1.72]	27.29[23.46, 31.12]	44.81[37.50, 52.11]	2.07[1.75, 2.40]	80.44[68.56, 92.33]	85.26[79.68, 90.85]
处方②实际值	3.93/0.75[2)]	19.72/46.76[2)]	58.89	1.51	83.48±3.24	89.05±0.25

注：[1)] 方括号内数值为预测值的 95%置信区间；[2)] 表示喷干粉未经 50 ℃减压干燥处理 3 h 后的测定值

参考文献：

[1] FABIO K, CURLEY K, GUARNERI J, *et al*. Heat-stable dry powder oxytocin formulations for delivery by oral inhalation [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2015, **16**(6): 1299-1306.

[2] WHITE S, BENNETT D B, CHEU S, *et al*. EXUBERA: pharmaceutical development of a novel product for pulmonary delivery of insulin [J]. *Diabetes Technol Ther*, 2005, **7**(6): 896-906.

[3] HOU A, LI L, HUANG Y, *et al*. Fragmented particles containing octreotide acetate prepared by spray drying technique for dry powder inhalation [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2018, **8**(3): 693-701.

[4] FOCAROLI S, MAH P T, HASTEDT J E, *et al*. A design of experiment (DoE) approach to optimise spray drying process conditions for the production of trehalose/leucine formulations with application in pulmonary delivery [J]. *Int J Pharm*, 2019, **562**: 228-240.

[5] SOU T, FORBES R T, GRAY J, *et al*. Designing a multi-component spray-dried formulation platform for pulmonary delivery of biopharmaceuticals: the use of polyol, disaccharide, polysaccharide and synthetic polymer to modify solid-state properties for glassy stabilisation [J]. *Powder Technol*, 2016, **287**: 248-255.

[6] OHTAKE S, KITA Y, ARAKAWA T. Interactions of formulation excipients with proteins in solution and in the dried state [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, **63**(13): 1053-1073.

[7] WENG L, ELLIOTT G D. Distinctly different glass transition behaviors of trehalose mixed with Na_2HPO_4 or NaH_2PO_4: evidence for its molecular origin [J]. *Pharm Res*, 2015, **32**(7): 2217-2228.

[8] OHTAKE S, SCHEBOR C, PALECEK S P, *et al*. Effect of pH, counter ion, and phosphate concentration on the glass transition temperature of freeze-dried sugar-phosphate mixtures [J]. *Pharm Res*, 2004, **21**(9): 1615-1621.

[9] VEHRING R. Pharmaceutical particle engineering via spray drying [J]. *Pharm Res*, 2008, **25**(5): 999-1022.