注射用盐酸万古霉素冻干工艺对冻干物外观形态及晶型的影响

徐慧娟[1]，杜加秋[1]，钟　梁[2]，张晓燕[1]，陶成浩[2]
（1. 瀚晖制药有限公司，浙江杭州 310016；2. 浙江海正药业股份有限公司，浙江杭州 311404）

摘要：市售注射用盐酸万古霉素冻干品的饼块易分层，或产生结晶。本研究设置了不同退火温度（－5 和 －10 ℃）、不同降温速率（6 和 0.5 ℃/min）的对比试验，结果显示增加退火步骤和加快预冻的降温速率均能明显改善冻干产品饼块的外观形态。但在较高的退火温度下，冻干样品的最下层产生了部分晶体，其主要特征峰位置（9.76、17.36、18.80、20.49、21.18、24.76 和 25.28 °）与甘露醇特征峰的位置相对应，这可能是由于在较高的退火温度下，处于下层位置的无定形态甘露醇发生了晶型的构建，形成了甘露醇晶体，因此不宜选用过高的退火温度。

关键词：盐酸万古霉素；注射剂；冻干工艺；外观；晶体
中图分类号：R944.9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2022)08-1196-05
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.08.016

Effect of Freeze-dried Process of Vancomycin Hydrochloride for Injection on Appearance and Crystal Form of Freeze-dried Cakes

XU Huijuan[1], DU Jiaqiu[1], ZHONG Liang[2], ZHANG Xiaoyan[1], TAO Chenghao[2]
(*1. Hanhui Pharmaceuticals Co., Ltd., Hangzhou 310016; 2. Zhejiang Hisun Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 311404*)

ABSTRACT: The freeze-dried cakes of commercially available vancomycin hydrochloride for injection are easy to stratify and crystallize. Different annealing temperatures (－5 and －10 ℃) groups and different prefreezing rates (6 and 0.5 ℃/min) groups were set and compared in this study. It was confirmed that both adding an annealing step and speeding the prefreezing rate could obviously improve the cake appearance of the freeze-dried products. However, at a higher annealing temperature, some crystalline substances were found in the bottom layer of the sample. And the positions of characteristic peaks (9.76, 17.36, 18.80, 20.49, 21.18, 24.76 and 25.28 °) for these crystals were corresponding to the positions of characteristic peaks of mannitol. The possible reason for this phenomenon was the transformation of amorphous mannitol in the bottom layer to crystalline state at a higher annealing temperature. Therefore, it was not advisable to choose a higher annealing temperature.

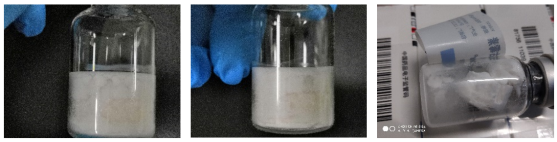
Key Words: vancomycin hydrochloride; injection; freeze-dried process; appearance; crystal

盐酸万古霉素（vancomycin hydrochloride，**1**）为首个上市的糖肽类抗菌药，对革兰阳性菌有效。其作用机制为结合敏感细菌细胞壁前体肽聚末端的丙氨酰丙氨酸，阻断肽聚糖合成，导致细胞壁缺损而杀灭细菌；可通过改变细菌细胞膜渗透性，选择性地抑制 RNA 合成。**1** 由美国礼来（Eli Lilly）公司原研，于 1958 年获得美国 FDA 许可上市。上市剂型为注射用 **1**，规格为 0.5 g (50 万单位)[1]。万古霉素是目前治疗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*，MRSA）感染的一线用药。

根据国家药品监督管理局发布的《化学药品注射剂仿制药质量和疗效一致性评价技术要求》[2]，启动了注射用 **1** 一致性评价工作。从《中华人民共

收稿日期：2021-09-06
作者简介：徐慧娟(1978—)，女，副高级工程师，从事微丸包衣技术和抗菌素类注射剂冻干曲线的研究。
E-mail：7850172@qq.com

和国药典》2020 年版收载的注射用 **1** 质量标准可看出，注射用 **1** 为冻干制剂，且含有赋形剂，性状为“白色或类白色粉末或疏松块状物”。通过调研市场上不同生产企业的注射用 **1** 产品可见，多家企业的市售产品外观形态存在不同程度的结晶和分层现象，而参比制剂的外观却未见明显分层和结晶现象（见图 1）。



企业A　　企业B　　参比制剂

图 1　不同市售产品的外观

Fig.1　Appearances of Different Commercially Available Products

产品分层是由于在冻干过程中处方中的某一成分随着水分升华往上迁移引起的，若该迁移成分分布不均还会影响产品的稳定性；若处方中存在有色成分，则会导致冻干饼块颜色不均匀，外观检测不合格。结晶的存在还提示产品并非以无定形状态存在，晶型不同也会导致产品稳定性和复溶情况与原研药品存在差异。

冻干产品的外观和晶型主要受到冻干曲线设计的影响，冻干工艺可分 3 个阶段：预冻（冷冻）阶段、升华干燥阶段和解析干燥阶段。在预冻阶段，由于样品在冻干机中的位置不同、样品中微粒组成和数量不同，这些因素会使得样品在不同的成核温度下产生不同的冰晶形态和大小分布，导致升华干燥的速率不均匀，继而导致同一批制品的形态存在差异，最终呈现出不同的外观和晶型。

仿制药一致性评价要求仿制药处方与原研制剂相同，产品质量与原研制剂相当。辅料用量、预冻干工艺等多种因素均可影响冻干产物的外观形态和晶型。本研究设计产品处方与原研药品一致，并在处方不变的情况下，通过考察预冻干工艺参数对冻干产物形态和晶型的影响来确定最佳预冻干参数，从而获得外观和晶型与原研制剂一致的产品。

1　仪器与试药

XP205 型电子天平（德国梅特勒 - 托利多公司）；CAP6202S 型电子天平（德国赛多利斯公司）；LYO-0.5 型真空冷冻干燥机（上海东富龙科技股份有限公司）；SmartLab SE 型 X 射线衍射仪（日本 Rigaku 公司）。

1 原料药［雅赛利（台州）制药有限公司，效价 1 142 u/mg，批号 C242624］；甘露醇（广西南宁化学制药有限责任公司，批号 F657D）；注射用水（自制）。

10 ml 中硼硅玻璃管制注射剂瓶［肖特玻璃科技（苏州）有限公司］；氯化丁基胶塞（江苏华兰药用新材料股份有限公司，型号 20-A4-1）。

2　方法与结果

2.1　溶液的配制

注射用 **1** 的规格为 0.5 g，其中甘露醇约为 120 mg，因此配制 **1** 和甘露醇质量浓度分别为 100 和 24 mg/ml 的溶液，全部溶解后以 1 mol/L 盐酸调至 pH 2.5 ～ 4.5，药液经过滤后以每瓶 5 ml 灌装于中硼硅玻璃管制注射剂瓶中，于冷冻干燥机中冻干得成品。

2.2　冻干试验

常规预冻对照（DZ）组：冻干进箱，维持隔板温度 20 ℃，设置 1 h 内降温至 －40 ℃（降温速率 1 ℃ /min），维持 2 h。然后开启冷阱，抽真空，待冷阱温度低于 －55 ℃、干燥室压力低于 50 Pa 之后，开始加热隔板至 0 ℃并维持 20 h，进入二次干燥阶段，设置板层温度为 40 ℃，真空度为 5 Pa，直至干燥结束。

退火温度研究 1（T1）组：冻干进箱，维持隔板温度 20 ℃，设置 1 h 内降温至 －40 ℃，维持 1 h；1 h 内升温至 －5 ℃，维持 2 h；30 min 内降温至 －40 ℃，维持 2 h。其余操作同 DZ 组，直至干燥结束。

退火温度研究 2（T2）组：冻干进箱，维持隔板温度 20 ℃，设置 1 h 内降温至 －40 ℃，维持 1 h；1 h 内升温至 －10 ℃，维持 2 h；30 min 内降温至 －40 ℃，维持 2 h。其余操作同 DZ 组，直至干燥结束。

降温速率研究 1（J1）组：冻干进箱，维持隔板温度 20 ℃，设置 10 min 内降温至 －40 ℃（降温速率 6 ℃ /min），维持 2 h。其余操作同 DZ 组，直至

干燥结束。

降温速率研究 2（J2）组：冻干进箱，维持隔板温度 20 ℃，设置 2 h 内降温至 －40 ℃（降温速率 0.5 ℃ /min），维持 2 h。其余操作同 DZ 组，直至干燥结束。

2.3 冻干形态对比研究

照“**2.2**”项下不同预冻工艺操作，所得产品的外观形态见图 2。

2.3.1 退火温度研究组

退火是指以一定的升温速率把样品从预冻的终温加热到高于玻璃化转变温度但低于其共熔点的某一特定温度，并保持一段时间，然后以一定的降温速率把样品冷却到预冻终温的过程。由于在冻结过程中，冻结的产品内部仍会存在部分不可冻结水。因此退火过程的相行为主要为——在退火过程中，由于退火的温度高于药液的玻璃化转变温度，会促进重结晶的形成，使原冻结过程中的不可冻结水冻结。

在 SEARLES 等研究中提到，退火能够改变冰晶形态和大小分布 [3]。退火过程中的相行为和重结晶可以减小由于成核温度差异造成的冰晶尺寸差异。周新丽等认为，当退火温度高于玻璃化转变温度时，系统内的冰晶将同时发生 2 个受化学势驱动的过程：融化和重结晶 [4]。重结晶是指在加热时由于小冰晶的分子向大冰晶迁移，而使固相系统中晶体大小的分布渐渐发生变化的过程。在该过程中，小于临界尺寸的冰晶变小直至消失，大于临界尺寸的冰晶逐渐长大。融化和重结晶的共同作用将使冰晶的形态和大小分布更为均一。

对比 DZ、T1、T2 组产品的外观形态（图 2A ～ 2C）可见，在预冻过程中加入退火步骤能够有效改善产品的外观形态。

2.3.2 降温速率研究组

同样在预冻阶段，DZ、J1 和 J2 组的降温速率为 1、6 和 0.5 ℃ /min，对比 DZ、J1、J2 组产品的外观形态（图 2A、2D 和 2E）可见，预冻阶段的降温速率越快，成品的外观形态越好。这是由于预冻阶段的降温速率越快，溶液的过冷度和过饱和度愈大，成核的温度越低，形成的临界结晶的粒度则愈小，成核速度越快，越容易形成颗粒较多、尺寸较小的细冰晶，预冻后产品各部位之间的冰晶分布也就越均匀，因而冰晶升华后，冻干成品的整体形态更加均一美观，粒度分布也更均匀。

预冻产品主要由两部分构成，溶质和溶剂，本品中溶剂为水，溶质为甘露醇和万古霉素等。预冻时被冻结的物质从本质上说是水，水结成了冰，而溶质存在于冰的间隙之中，两者相互交错。预冻时冰晶形态若均一，则在冰（晶）升华之后，留下的骨架孔径也较均一，宏观表现为产品的外观形态更为均一，不会出现分层的情况。

综上所述，在预冻工艺中加入退火步骤及提高预冻阶段的降温速率，都能够有效改善产品的外观形态。

2.4 冻干产品晶型研究对比

X 射线衍射（XRD）分析的仪器参数如下。Cu 靶；扫描初始角度 3 °；扫描终止角度 60 °；扫描条件 连续扫描；扫描速度 20 °/min；扫描步宽 0.01 °；管压 40 kW；管流 40 mA。



A　　B　　C　　D　　E

A：DZ 组（分层），B：T1 组（不分层），C：T2 组（不分层），D：J1 组（不分层），E：J2 组（分层）

图 2　不同预冻工艺所得产品的外观形态

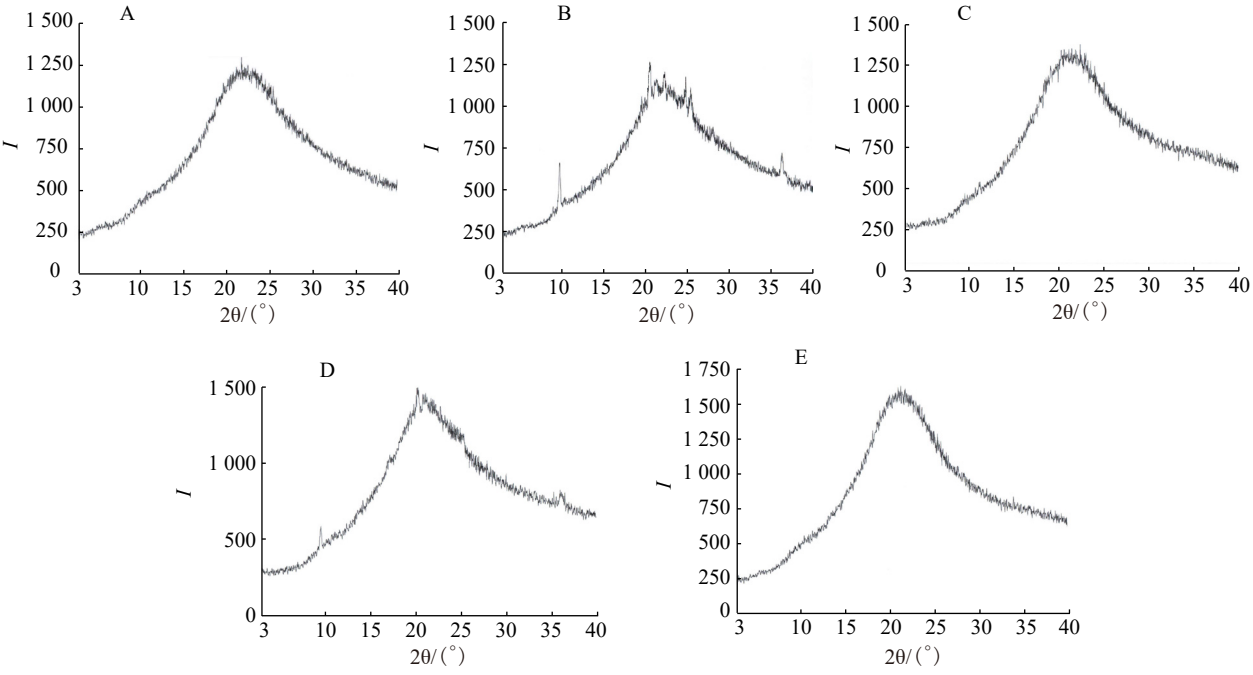
Fig.2　Appearances of the Products Frozen by Different Pre-freezing Processes

对上述制得的样品进行晶型检测，结果见图 3。

由图 3 可见，T1 组冻干品中存在部分晶型，DZ、T2、J1、J2 组冻干品均为无定形。对 T1 组的冻干品进一步分析：将冻干饼块从上至下平均分为 3 份，分别从每份中取样进行 XRD 检测，结果见图 4。

由图 4 可见，晶型形成于冻干饼块的下层位置。考虑到本品辅料中含有的甘露醇是一种应用十分广泛的天然六元糖醇，目前已经确定其存在 3 种晶型：beta、delta 和 alpha[4]。在 THAKRAL 等的研究中提到，含甘露醇的溶液在使用退火工艺进行冻干时可能会产生晶体[5]。因此对比饼块下层和甘露醇的 XRD 图谱，以进行确认。

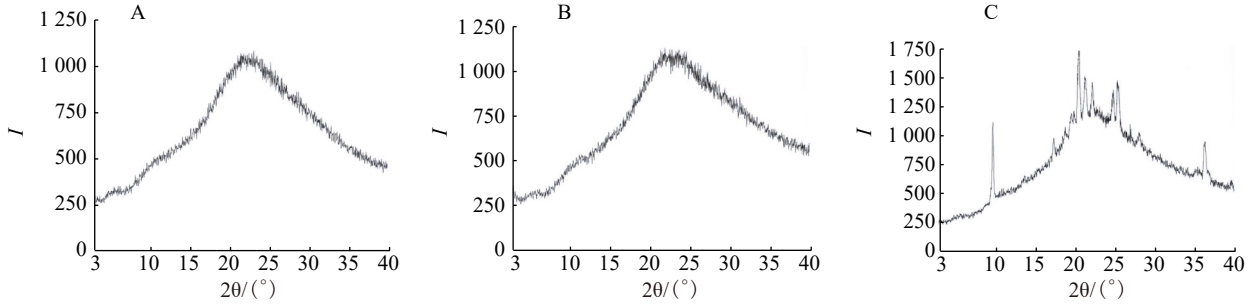
由图 4C 和图 5 对比可见，T1 组冻干品的主要特征峰位置（9.76、17.36、18.80、20.49、21.18、



A：DZ 组，B：T1 组，C：T2 组，D：J1 组，E：J2 组

图 3 冻干产品 XRD 图谱

Fig.3 XRD Patterns of Lyophilized Products



A：饼块上层，B：饼块中层，C：饼块下层

图 4 T1 组冻干品不同分层的 XRD 图谱

Fig.4 XRD Patterns of Different Layers of the Lyophilized Cake of T1 Group

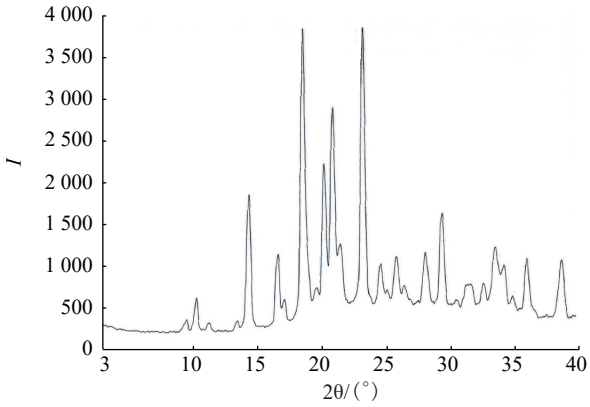


图 5　甘露醇 XRD 图谱

Fig.5　XRD Pattern of Mannitol

24.76 和 25.28 °）能够与甘露醇特征峰位置（9.52、17.08、18.58、20.24、21.48、24.50 和 25.02 °）相对应，因此判断经 T1 组工艺制备的冻干品中出现的结晶物质为甘露醇。晶体形成的原因可能为产品的底部与板层距离最近，温度相对最高，产品的底部在退火过程中处于类似熔融状态，在 －5 ℃的退火温度下，原冻干饼块下层位置处的无定形态甘露醇发生了晶型的构建，形成了甘露醇晶体。T2 组中 －10 ℃以下的退火工艺未产生晶体物质，仍为无定形态。

3　结论

针对注射用 **1** 的冷冻干燥工艺，本研究探讨了预冻降温速率及退火方式对产品的最终形态及晶型的影响。试验表明，增加退火步骤和加快预冻的降温速率均对产品的外观形态有明显的改善作用。但是退火方式会对注射用 **1** 产品中甘露醇的晶型产生一定的影响，在期望改善产品形态的前提下，产品冻干过程中退火的温度不宜设置过高。

目前的产品研究表明，结晶度的增加并不会影响产品的复溶及理化性质的稳定性，但是结晶的存在往往预示着产品并非以无定形状态存在，而不同晶型产品的稳定性一般来说是有差异的。产品分层一般是由于在预冻过程中，与板层接触部分的药液首先冻结，冰晶逐渐向上生长，导致溶质向上部或中部迁移，产生分层，可能影响冻干效率及产品稳定性。如处方中存在有色成分，溶质迁移会导致冻干饼块颜色不均匀、外观检测不合格。从医生与患者的角度来看，结晶分层的存在提示产品中可能存在不同晶型而并非均一稳定的产品，进而对产品的有效性产生怀疑，因此有必要对冻干工艺进行研究。从本试验结果来看，为改善产品的冻干形态，可考虑快速降温方式与冻干退火方式联用。

参考文献：

[1]　王　晨, 王立新, 张斗胜, 等. 国产注射用盐酸万古霉素的质量评价[J]. 中国抗生素杂志, 2018, **43**(3): 262-268.

[2]　国家药品监督管理局药品审评中心. 国家药监局药审中心关于发布《化学药品注射剂仿制药质量和疗效一致性评价技术要求》等3个文件的通告(2020年第2号)[EB/OL]. (2020-05-14)[2021-09-03]. https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/d9c6f118b773f54e8feba3519bf78a11.

[3]　SEARLES J A, CARPENTER J F, RANDOLPH T W. The ice nucleation temperature determines the primary drying rate of lyophilization for samples frozen on a temperature-controlled shelf [J]. *J Pharm Sci*, 2001, **90**(7): 860-871.

[4]　周新丽, 翁　宇, 陈光明. 药品冷冻干燥过程的退火机理分析[J]. 化学工程, 2005, **33**(6): 4-7.

[5]　THAKRAL S, KORANNE S, SURYANARAYANAN R. Intra-vial heterogeneity in physical form of mannitol in colyophilized binary systems [J]. *Pharm Res*, 2018, **35**(11): 214.