湿法介质研磨技术制备注射用纳米混悬剂及其质量评价研究进展

曾素梅[1,2]，蔡文坚[2]，曾少群[2]，姚美村[1*]，岳　峰[2*]
（1. 中山大学药学院（深圳），广东深圳 518000；2. 广东嘉博制药有限公司，广东清远 511517）

摘要：湿法介质研磨技术已被证实是一种可行的提高难溶性药物生物利用度的手段，操作简单、能避免使用有机溶剂、产品的载药量高，尤其适合制备注射用纳米混悬剂。本研究综述了湿法介质研磨技术制备注射用纳米混悬剂的研究进展，介绍了适用的药物活性成分、稳定剂、分散剂、冻干保护剂，并对其工艺参数和产品的关键质量评价指标进行了分析，期望为湿法介质研磨技术制备注射用纳米混悬剂的研究与开发提供依据，助力安全、有效、质量可控的注射用纳米混悬剂更快地从实验研究转化为临床应用。

关键词：湿法介质研磨；注射剂；纳米混悬剂；质量评价
中图分类号：R944.9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255（2022）09-1251-11
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.09.003

Research Progress on Preparation and Evaluation of Injectable Nanosuspensions by Wet Media Milling Technology

ZENG Sumei[1,2], CAI Wenjian[2], ZENG Shaoqun[2], YAO Meicun[1*], YUE Feng[2*]
（*1. School of Pharmaceutical Science (Shenzhen), Sun Yat-sen University, Shenzhen 518000;*
2. Guangdong Jiabo Pharmaceutical Co., Ltd., Qingyuan 511517）

ABSTRACT: Wet media milling technology, with the advantages of simple operation, avoiding the use of organic solvents, and high drug loading, has been proven to be a preparation technology for bioavailability enhancement of poorly water-soluble drugs, especially for injectable nanosuspensions. This review summarizes the research progress of injectable nanosuspension prepared by wet media milling technology and introduces the active pharmaceutical ingredients, stabilizers, dispersants, and cryoprotectants. The process parameters and critical quality attributes are also analyzed to provide a basis for the research and development of injectable nanosuspensions prepared by wet media milling technology, so as to promote the transition of safe, effective, quality-controllable injectable nanosuspensions from experimental research to clinical applications at a faster speed.

Key Words: wet media milling; injection; nanosuspension; evaluation

药物纳米混悬剂是只以少量表面活性剂和聚合物为稳定剂，将固体药物分散于液相中形成的粒径10～1 000 nm的胶体分散体系。其本质是通过增加难溶性药物的表面积，提高药物的饱和溶解度及溶出速度，从而达到提高生物利用度的目的。与其他解决药物低溶解度和低生物利用度问题的纳米制剂（如纳米粒、脂质乳剂、脂质体）技术相比，纳米混悬剂制备工艺简单，具有一定的独特性和潜在优势。纳米混悬剂的显著优点是给药途径广泛，如口服、注射、肺部、经皮、眼部给药等；此外，纳米混悬剂载药量高（几乎达到100%），这意味着给药体积更小、所含的赋形剂更少，从而降低了赋

收稿日期：2021-12-22
基金项目：广东扬帆计划引进创新创业团队项目（2017YT05S029）、清远市创新创业科研团队专项（2016002）、清远市重大科技创新项目（2019DZX003）
作者简介：曾素梅（1986—），女，博士，从事新型注射给药系统研究。
通信作者：姚美村（1972—），男，教授，从事药物分析新技术和新方法的研究与开发。
E-mail：yaomeicun@gmail.com
岳　峰（1985—），男，硕士，从事药品工艺及药品质量研究。
E-mail：yuefeng@jiabopharm.com

形剂带来的安全性风险，尤其适用于小体积给药的注射剂[1—2]。

制备纳米混悬剂的方式分为自下而上（bottom-up）和自上而下（top-down）法。前者是将药物分子组装成纳米粒，主要包括沉淀法、超临界流体法、喷雾干燥法和电喷法等；优点是能耗低、设备费用低，缺点是应用范围窄、粒径均一性差、需使用有机溶剂等[3]。后者通过破坏药物颗粒的整体性，使大颗粒变成小颗粒，主要包括湿法介质研磨技术和高压均质法；特点是工艺流程简单，制备的纳米混悬剂重现性好，易于产业化，目前应用广泛。表1列出了目前已上市或处于临床试验阶段的纳米混悬剂，可见top-down技术是纳米混悬剂商业化生产的主要手段。

在上市或在研的纳米混悬剂中，口服剂型居多，且主要应用湿法介质研磨技术制备；而无菌的注射用纳米混悬剂主要应用高压均质技术，原因可能是高压均质法可实现无菌生产，且均质过程可破碎细菌而避免微生物污染[4]。但高压均质法不适合硬度较大的药物，需要提前对大颗粒进行微细化处理，且一般只能得到微米级的粒子[5]。湿法介质研磨技术可克服以上缺点，并能避免使用有机溶剂；此外，近年来研磨设备得到了快速发展，已可实现无菌制剂的大批量生产，这将促进介质研磨技术在制备注

表1　已上市及处于临床试验的纳米混悬剂产品

Tab.1　Nanosuspension Products Marketed or in Clinical Trials

商品名	药物活性成分（API）	生产商	制备技术	剂型	给药途径	适应证	状态[1)]
Giris-PEG®	灰黄霉素（griseofulvin）	Bausch	共沉淀	片剂	口服	抗真菌	上市/1982
Cesamet®	大麻隆（nabilone）	Bausch	共沉淀	胶囊	口服	止吐	上市/1985
Verelan® PM	盐酸维拉帕米（verapamil HCl）	Schwarz Pharma	湿法介质研磨	胶囊	口服	高血压	上市/1998
Rapamune®	西罗莫司（sirolimus）	Wyeth Pharma LLC	湿法介质研磨	片剂	口服	免疫抑制	上市/2000
Focalin® XR	盐酸右哌甲酯（dexmethylphenidate HCl）	Novartis	湿法介质研磨	片剂	口服	注意缺陷与多动障碍	上市/2001
Avinza®	硫酸吗啡（morphine sulfate）	King Pharma LLC	湿法介质研磨	胶囊	口服	精神兴奋	上市/2002
Ritalin® LA	盐酸哌甲酯（methylphenidate HCl）	Novartis	湿法介质研磨	胶囊	口服	肌肉松弛	上市/2002
Zanaflex™	盐酸替扎尼定（tizanidine HCl）	Covis Pharma	湿法介质研磨	胶囊	口服	肌肉松弛	上市/2002
Herbesser®	盐酸地尔硫䓬（diltiazem HCl）	Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation	湿法介质研磨	片剂	口服	高血压	上市（日本）/2002
Emend®	阿瑞匹坦（aprepitant）	Merck	湿法介质研磨	胶囊	口服	止吐	上市/2003
Tricor®	非诺贝特（fenofibrate）	AbbVie Inc.	湿法介质研磨	片剂	口服	高胆固醇血症	上市/2004
Megace ES®	醋酸甲地孕酮（megestrol acetate）	Par Pharmaceutical	湿法介质研磨	混悬液	口服	厌食症	上市/2005
Triglide®	非诺贝特（fenofibrate）	First Horizon Pharma	高压均质	片剂	口服	高胆固醇血症	上市/2005
Azopt®	布林佐胺（brinzolamide）	Alcon	湿法介质研磨	混悬液	眼部给药	高眼压症	上市/1998
Abraxane®	紫杉醇（paclitaxel）	Abraxis BioScience Inc.	Nab[2)]	冻干粉	静脉注射	转移性乳腺癌	上市/2005
Invega Sustenna®/Invega Trinza®	棕榈酸帕利哌酮（palperidone palmitate）	Janssen Pharma	高压均质	混悬液	肌内注射	精神分裂症	上市/2009
Ryanodex®	丹曲林钠盐（dantrolene sodium）	Eagle Pharmaceuticals	高压均质	静脉注射	静脉注射	恶性高热	上市/2014
Aristada®	月桂酰阿立哌唑（aripiprazole lauroxil）	Alkermes Inc.	高压均质	混悬液	肌内注射	精神分裂症	上市/2015
Aristada Initio™	月桂酰阿立哌唑（aripiprazole lauroxil）	Alkermes Inc.	湿法介质研磨	混悬液	肌内注射	精神分裂症	上市/2018
Anjeso®	美洛昔康（meloxicam）	Baudax Bio	湿法介质研磨	混悬液	静脉注射	中至重度疼痛	上市/2020
Cabenuva	卡博特韦/利匹韦林（cabotegravir/rilpivirine）	ViiV Healthcare	高压均质	混悬液	肌内注射	艾滋病	上市/2021
Fyarro	西罗莫司（sirolimus）	Aadi Bioscience Inc.	Nab	冻干粉	静脉注射	晚期恶性血管周上皮样细胞肿瘤	上市/2021
Panzem NCD	2-甲氧基-β-雌二醇（2-methoxy-β-estradiol）	EntreMed Inc.	湿法介质研磨	胶囊	口服	恶性肿瘤	临床Ⅱ期（截至2022-03）
BPM31510	辅酶Q10（ubidecarenone）	Berg Pharma	–	混悬液	静脉注射	胰腺癌、恶性胶质瘤	临床Ⅱ期（截至2022-03）

注：[1)] 除括号中特殊说明外，均为FDA批准上市；[2)]Nab技术是将API与白蛋白共价键结合，再通过超高压混合形成稳定的白蛋白纳米粒产品。

射剂领域的应用。本研究总结了湿法介质研磨技术制备注射用纳米混悬剂的研究进展，并对其工艺参数和质量评价指标进行了分析，期望为湿法介质研磨技术在注射用纳米混悬剂研发中的应用提供文献支持。

1 湿法介质研磨技术

湿法介质研磨技术，也称纳米晶体技术，于1992年由LIVERSIDGE等开发[6]。该法是将API、分散剂、研磨介质和稳定剂混合后置密闭研磨室中，在控温条件下快速转动，使API颗粒之间及其与研磨介质、器壁之间发生碰撞，通过碰撞产生的高能量和高剪切力将颗粒从微米级破碎至纳米级[7]。其中，颗粒的破碎分为2个阶段，初始是基于较大粒子中裂纹和晶体缺陷等易断裂特征的快速碎裂阶段；研磨后期破碎速度变慢，随着粒径的逐渐减小，颗粒的剪切应力增大，此时的断裂机制主要是磨损，即药物颗粒在摩擦运动中通过机械作用而变形、断裂，通过化学作用改变性状，并通过热作用改变形状。

在介质研磨机中，物料被置于具备控温系统的研磨室中，能量通过一体式的棒销式分散器（见图1分散器A），或装在分散轴上的盘片（见图1分散器B）或涡轮加速器（见图1分散器C），传输给研磨介质以达到分散和研磨物料的效果。介质研磨机可进行批量、再循环、连续模式操作，批量模式主要用于实验室研究阶段。图1显示了介质研磨机的再循环模式，进料罐中的物料被泵入研磨室进行研磨，然后经过分离器再次回到进料罐，实现物料的循环研磨。连续操作模式则是在再循环模式中加入一个接收罐，使达到研磨目标的纳米混悬剂经分离器汇入接收罐中。在连续模式下实现产品的连续生产是介质研磨技术的一个显著优势。

湿法介质研磨技术能实现高药物浓度、无有机溶剂和连续制备的操作，被认为是更普遍、更有前景的大规模生产难溶性药物纳米混悬剂的方法[8]。表2列举了近10年湿法介质研磨技术应用于注射用纳米混悬剂的研究报道[9—24]，其常见的给药方式有静脉注射、肌内注射、关节腔内注射。基于纳米混悬剂的静脉注射制剂主要以提高药物溶解度、改善生物利用度为目的，而肌内或关节腔内注射的纳米混悬剂以增加在系统中循环的药物浓度、确保药物缓慢平稳释放为目的。

2 工艺参数

湿法介质研磨技术操作简单、易于规模化生产，但也耗时、耗能。制剂工艺开发的一般步骤是理解基本工艺、进行工艺建模、筛选和优化工艺参数。通过筛选合适工艺参数，不但可提高研磨效率以减少生产成本，还能减小产品的批间差异性。湿法介质研磨技术中可调节的主要参数有研磨珠、线速度、物料固含量、研磨时间等，这些参数从不同角度影响着研磨效率和产品质量。

2.1 研磨珠

通常选用耐磨的聚合物或陶瓷为研磨介质，以减少因磨损而污染终产物的情况，引发与药品质量相关的问题。研磨珠的材质有玻璃、氧化锆、聚苯乙烯、聚氨酯、聚碳酸酯等，其中钇稳定的氧化锆研磨珠和高度交联的聚苯乙烯树脂研磨珠因在研磨中磨损率低、无金属污染、形成的残留物在终产物中含量低而被广泛用于制剂领域[25—26]。

研磨珠的直径范围为0.03～1.5 mm，尺寸选择取决于研磨物的初始粒径和目标粒径。建议初始时选用与目标粒径相差1 000倍的研磨珠，如目标粒径为200 nm时选择0.2 mm的研磨珠，再根据所得产物的实际粒径进行调整。一般来说，所选的研磨珠直径越小，所得产物的粒径越小，这是因为越小的研磨珠与药物颗粒碰撞的平均频率越高，有利于药物颗粒的破碎。LI等应用湿法介质研磨技术制备灰黄霉素纳米混悬剂，采用直径为0.8、0.4、0.2、0.1、0.05 mm的氧化锆研磨珠制备得到的产物粒径分别为169、137、120、97、95 nm，且研磨珠的直径越小，珠子磨损率越低[27]。然而，当小尺寸研磨珠与初始粒径较大的研磨物共研磨时，会因颗粒间的最大接触压力降低而导致初始阶段的破碎速度变慢，此时可用大尺寸珠子预研磨再换小尺寸珠子继续研磨，或将一定比例（通常是1∶1）的大、小尺寸研磨珠混合后共研磨[15]。

研磨珠的填充率（即装载量，是装载研磨珠的

表 2　近 10 年报道的湿法介质研磨技术制备的注射纳米混悬剂

Tab.2　Reported Injectable Nanosuspensions Produced by Wet Media Milling Technology for the Last Ten Years

API	辅料组成	粒径/nm	载药量/%	给药途径	文献
毛萼乙素(eriocalyxin B)	卵磷脂，泊洛沙姆188，生理盐水	98.2	66.7	静脉注射	[9]
姜黄素二癸酸酯(curcumin didecanoate)	泊洛沙姆188，花生油	300～700	95.2	肌内注射	[10]
1,1'-methylenebis-4-[(hydroxyimino)methyl]-pyridinium dimethanesulfonate（MMB4 DMS，一种抗神经性毒剂药物）	棉籽油	200～500	>99	肌内注射	[11]
BA99和AC88(模型化合物)	聚乙烯吡咯烷酮(PVP)K30，琥珀酸二(2-乙基己基)酯磺酸钠(AOT)，甘露醇	约200	87.5	腹腔注射	[12]
棕榈酸帕利哌酮(paliperidone palmitate)	Tween-20，水	1 041±6和505±9	–	肌内注射	[13]
紫杉醇(paclitaxel)	氢化蓖麻油，磷酸盐缓冲液	400	95	静脉注射	[14]
氯硝柳胺(niclosamide)	Tween-80，水	235	83.3	静脉注射	[15]
西洛他唑(cilostazol)		554	79.1		
螺内酯(spironolactone)	泊洛沙姆338，水	484	99.6	静脉注射	[16]
普罗布考(probucol)		377	75.4		
SNX-2112(抗肿瘤药)	泊洛沙姆188，水	203	50	静脉注射	[17]
BI XX(水难溶性模型化合物)	精氨酸，甘露醇，水	<1	30.8	静脉注射	[18]
穿心莲内酯(andrographolide)	泊洛沙姆188，脱氧胆酸钠或牛磺熊去氧胆酸钠，甘露醇	300	约22	静脉注射	[19]
化合物P	二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(DSPE)-聚乙二醇(PEG)2000或泊洛沙姆407，PVP K30/AOT，甘露醇或海藻糖	150～160	56.5	静脉注射	[20]
kartogenin（人类间充质干细胞分化成软骨细胞的诱导剂）	维生素E聚乙二醇琥珀酸酯(TPGS)，水	320	55.6	关节腔内注射	[21]
多拉韦林(doravirine)	TPGS或泊洛沙姆188或泊洛沙姆338，氯化钠或蔗糖，水或缓冲液	150～170[使用泊洛沙姆188时为546]	28.6～81.6	注射剂	[22]
雷公藤红素(celastrol)	泊洛沙姆188，水	215.7±0.7	87.6±1.0	静脉注射、口服	[23]
川芎嗪双羟萘酸盐(ligustrazine pamoate)	羟丙甲纤维素(HPMC)、PVP K30，水	585±5	85.7	注射剂	[24]

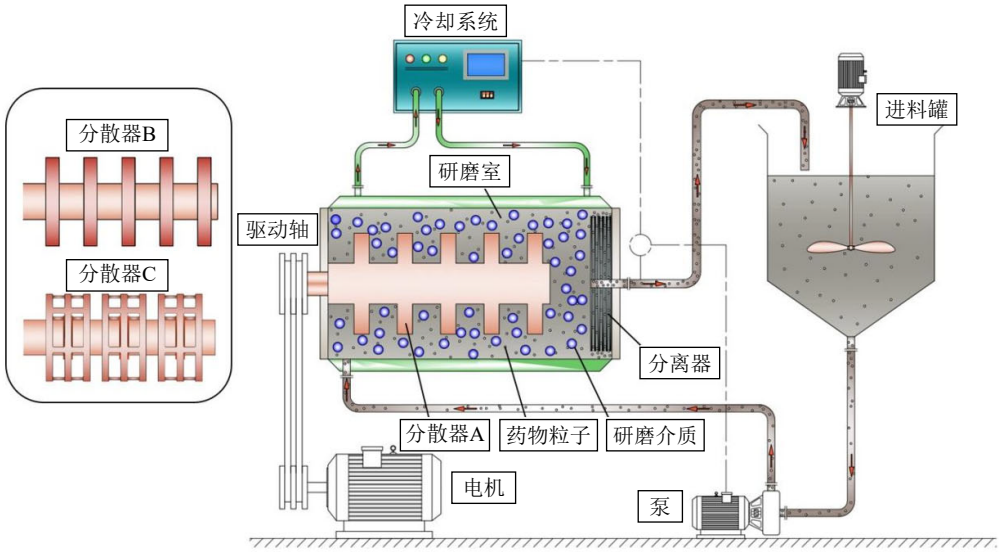


图 1　湿法介质研磨机基本原理示意图

Fig.1　Schematic Diagram of the Basic Principle of Wet Media Milling Equipment

截面积与研磨室内截面积的比值）越大，研磨腔体内发生碰撞的频率越高，即研磨效率越高。据报道，研磨珠填充率最大可至 100％ [28]，而实际生产中，研磨珠填充率的选择往往依赖于研磨体系的结构，如制造商推荐 0.6 L 研磨腔体在使用盘片式分散器时的填充率为 75％～ 85％，使用涡轮式分散器时则为 50％～ 65％；棒销式研磨机的研磨珠填充率则可达 90％以上。

2.2 线速度或搅拌速度

线速度或搅拌速度增加，则碰撞频率和剪切力强度增大，颗粒获得的能量增大，必然导致整体破碎率的增加。TANAKA 等研究表明，线速度为 8 m/s 时普罗布考颗粒只有部分被磨碎，而未磨碎颗粒的比例会随着搅拌速度的增加而显著降低，当线速度提高至 12 m/s 时，所有的药物颗粒都被研磨到约 139 nm[29]。然而，高线速度或搅拌速度也会增加机器的运行压力，导致研磨物料温度升高，且不一定能得到理想的研磨效果。GUO 等用行星式研磨机制备穿心莲内酯混悬剂 [19]，药物与泊洛沙姆 188 在 250、300、350 r/min 条件下研磨获得粒径为 (528.1±5.3)、(396.4±5.7)、(302.8±6.5) nm 的纳米粒子，显示粒径随速度的增加而显著减小，但当速度提高到 400 r/min 时，粒径的减小却不显著（P<0.05）。这是因为当线速度达到一定值时，研磨珠会附着在研磨腔壁上，与物料一起随着气缸做圆周运动，产生的碰撞力和剪切力不足以破碎药物颗粒。此外，过高的线速度或搅拌速度会使得研磨物形成大量气泡，从而使药物粒子从分散介质中过早分离，最终导致粒径缩减失败。

2.3 研磨物的固含量

在实际生产中，每个批次间均须对设备进行清洁及验证，所以在研磨生产纳米混悬剂时往往会追求尽可能高的固含量以减少清洗设备的次数，达到提高生产效率的目的。研究表明，研磨物的固含量从 5％增至 30％时，与研磨珠碰撞的药物颗粒数量增加，导致珠子施加在每个颗粒上的压力降低，这使得研磨强度因子（系研磨珠体积浓度、药物体积浓度、研磨珠均方速度的函数）下降，但研磨至目标粒径的时间差异不大，原因可能是研磨物中高浓度的药物颗粒之间的相互碰撞概率相应增加 [30]。因此，在湿法介质研磨工艺过程的初期，可将较高含量的 API 和必要的稳定剂共研磨至目标粒径后再稀释到所需的药物浓度，不仅可提高生产效率，还能降低能耗。

2.4 研磨时间

充足的研磨时间可使药物颗粒得到充分碰撞，并使稳定剂充分吸附在药物粒子上。卓虹伊等在以湿法介质研磨技术制备川芎嗪双羟萘酸盐注射用纳米混悬剂的研究中观察到，研磨 1.0 h 时粒子的平均粒径为 (721±40) nm、多分散性指数（PDI）为 0.413，研磨 2.5 h 时减至 (611±18) nm 和 0.277[24]。当药物颗粒的粒径随着研磨时间的增加而减小至极限值或达到动态平衡后应停止研磨，因为过度研磨不仅会浪费能量、磨损研磨珠，还可能导致药物晶态发生变化，不利于纳米混悬剂的稳定 [31]。刘柳毅等将灯盏花素原料药、Tween-80 与氧化锆珠分别共研磨 0.5、0.75、1.0、1.5 h 制备纳米混悬剂，结果显示研磨 1.5 和 1.0 h 时所得纳米混悬剂的粒径基本一致，综合考虑能耗和效率后确定研磨时间为 1.0 h，加速稳定性考察结果显示该纳米混悬剂能稳定 3 个月 [32]。

原料药质地、批次量大小、研磨温度、进料速度等也是影响工艺的重要参数。事实上，上述工艺参数相互之间也存在制约关系，如研磨腔体积有限，研磨珠填充率越高，批次量就越小；研磨线速度较大时，研磨物的固含量就要相应下调以满足机器运行的压力要求；批次量越大、原料药质地越硬，研磨至目标粒径的时间就越长；提高研磨温度可缩短研磨进程，但不利于维持温敏性药物的稳定性等。在制剂工艺开发中，综合考虑以上参数的影响是很有必要的，应用实验设计（DOE）或许是一种有效的手段，但目前的 DOE 更多侧重于制剂的处方开发，在工艺开发中应用较少。

3 处方组成

药物颗粒经研磨变成小颗粒后，表面积急剧增加，导致体系的吉布斯自由能显著增加，因此纳米

混悬剂属于热力学不稳定体系。为获得最大程度的稳定性，药物粒子往往会通过聚集结块来降低表面张力、减少体系总能量。用湿法介质研磨技术制备具有理想粒径并能稳定贮存的纳米混悬剂不仅需要优化工艺参数，还需要筛选合适的处方。

3.1 稳定剂

选择合适的稳定剂并对其浓度进行优化是制备纳米混悬剂的关键。通常在研磨初期就要加入稳定剂与 API 共研磨，以使稳定剂吸附在药物粒子表面起到润湿和降低界面张力的作用，并形成屏障以阻止粒子聚结。纳米混悬剂的稳定性是体系中药物粒子间的静电力、空间阻力、熵力和范德华力相互作用的结果[33]，具有足够稳定性的先决条件是使合适浓度的稳定剂吸附在药物粒子上。稳定剂浓度过低时不足以完全覆盖药物粒子表面以提供足够的稳定作用，使粒子因相互吸引而聚结[34]；而过量的稳定剂会在溶液中形成胶束而增溶部分药物，进而促进陈化（又称奥斯特瓦尔德熟化）现象，即小粒子溶解、大粒子生长[35]。通常认为 API 与稳定剂的合适比例为 1 ∶ (0.05 ～ 0.5)[36]。

注射用纳米混悬剂中的稳定剂一般有表面活性剂和高分子聚合物 2 类。表面活性剂具有降低界面张力并润湿药物粒子的作用，可增强制剂的分散性。由表 2 可见，用于注射用纳米混悬剂的表面活性剂有离子型表面活性剂 AOT 以及非离子型表面活性剂泊洛沙姆、聚山梨酯、TPGS、卵磷脂、山梨糖醇酐单月桂酸酯等。高分子聚合物降低界面张力和润湿的性能略弱，主要吸附通过在药物粒子表面，利用其延伸至分散介质中长链的空间位阻来避免粒子的聚结。常用作注射用纳米混悬剂稳定剂的高分子聚合物有 PVP、HPMC、PEG 等。

不同的稳定剂对药物粒子的稳定作用不同，制得的纳米混悬剂粒径也不同。稳定剂对药物粒子的亲和力与研磨产物的粒径密切相关，结构不同的稳定剂如羟丙纤维素（HPC）、PVP K30、共聚维酮（VA64）、聚乙烯醇（PVA）对甲芬那酸的亲和力依次降低；当与药物颗粒共研磨时，稳定剂的亲和力越大，则吸附在药物粒子表面的量越多，所得纳米粒子的粒径就越小（上述稳定剂共研磨后粒径分别为 172、217、334 和 447 nm）[34]。应用复合稳定剂是获得具有理想粒径和稳定性产物的一种常用策略，如上市产品月桂酰阿立哌唑注射用纳米混悬剂处方中应用了复合稳定剂山梨糖醇酐单月桂酸酯和 Tween-20（8 ∶ 3）。卓虹伊等将川芎嗪双羟萘酸盐分别与 HPMC、PVP K30、泊洛沙姆 188 和 Tween-80 共研磨，所得制品粒径分别为 779、830、975、1 230 nm，而将川芎嗪双羟萘酸盐与复合稳定剂（HPMC ∶ PVP K30=1 ∶ 4）共研磨获得产物的粒径为 721 nm[24]。

稳定剂的种类可影响药物粒子在体内的行为。将以 DSPE-PEG2000 作稳定剂的化合物 P 纳米混悬剂通过尾静脉注入小鼠体内，半衰期为 9 min；以 DSPE-PEG2000、PVP K30、AOT（15 ∶ 20 ∶ 1）作复合稳定剂制备的纳米混悬剂在小鼠体内的半衰期为 3 min；单用泊洛沙姆 407（P407）制备得到的纳米混悬剂和联用复合稳定剂（P407 ∶ PVP K30 ∶ AOT=15 ∶ 20 ∶ 1）的纳米混悬剂的半衰期均为 9 min。有意思的是，溶液型药物仅在肝细胞中积累，但纳米混悬剂分布在肝窦内皮细胞和库普弗细胞（曾称枯否细胞）中，且 DSPE-PEG2000/PVP K30/AOT 的化合物 P 纳米混悬剂在肝脏中的积累多于 P407/PVP K30/AOT 的化合物 P 纳米混悬剂，这与 PEG 化的药物粒子具有的“隐形”功能有关[37]，即 PEG 在纳米粒子表面形成的构象云产生的空间位阻阻碍了血液中蛋白质的吸附和细胞的黏附，从而防止纳米粒子被网状内皮系统识别和摄取，延长了药物粒子在血循环滞留时间。

3.2 分散剂

药学上可接受一些危险性较低的水溶性溶剂如乙醇、异丙醇和部分非水溶性溶剂如乙酸乙酯、碳酸丙烯酯、苯甲醇、三乙酸甘油酯等作为难溶性药物的溶剂，但即使是接受度较高的乙醇也被报道会引起血液毒性[38]。湿法介质研磨技术中使用水或油作为分散剂研磨得到终产品，或用水作为分散剂研磨后再加工成冻干粉，临床使用时重新分散于生理盐水、葡萄糖溶液或油中，因此避免使用任何有

机溶剂是其制备注射剂的显著优势。水是最常用的分散剂，目前上市的月桂酰阿立哌唑注射用纳米混悬剂和美洛昔康纳米混悬剂均是以水为分散剂进行研磨制备的。而通常以油为分散剂的目的是使制剂具有缓释控释作用，WEI 等将姜黄素二癸酸酯与泊洛沙姆 188 于水中共研磨，所得研磨产物冷冻干燥，临用前重悬于可注射的花生油中，制成的肌内注射用油性姜黄素二癸酸酯纳米混悬剂在大鼠体内可缓慢释放药物 15 d[10]。此外，以油作为易水解 API 的分散剂时可获得更稳定的制剂，如 MMB4 DMS 是一种高温下易水解的抗神经性毒剂药物，将其分散于棉籽油中研磨制备的纳米混悬剂在 80 ℃条件下能稳定贮存 2 年以上 [11]。

3.3 冻干保护剂

纳米混悬剂是热力学不稳定体系，当所用稳定剂不足以在货架期内维持注射剂的稳定性或药物易发生水解、化学降解时，冷冻干燥是有效改善制剂长期稳定性的一种重要手段。另外，将纳米混悬剂冻干也更便于贮存和运输。然而，冻干过程中的预冻和干燥阶段不利于维持纳米混悬剂结构和功能的稳定，加入冻干保护剂将有助于降低这种不利影响，防止药物粒子结块、提高再分散性。常用的冻干保护剂是二糖类，如蔗糖 [20]、海藻糖 [20]、甘露醇 [19]。

此外，制备注射用纳米混悬剂时会根据 API 的性质和给药途径差异而添加其他附加剂，如作助表面活性剂的脱氧胆酸钠、牛磺熊去氧胆酸钠；作渗透压调节剂的氯化钠、葡萄糖；作 pH 调节剂的氢氧化钠、磷酸氢二钠、盐酸；缓冲剂等。2020 年上市的静脉注射用美洛昔康纳米混悬剂处方中的脱氧胆酸钠不但起到了润湿难溶性的美洛昔康颗粒的作用，还使药物粒子带上负电荷，提供离子屏障而发挥稳定制剂的功能。

4 质量评价

质量可控是药物研发和评价的基本原则之一。国家药品监督管理局药品审评中心于 2021 年 8 月发布了《纳米药物质量控制研究技术指导原则（试行）》，适用范畴为药物纳米粒和载体类纳米药物，要求根据纳米药物的结构、组成、功能等设置具有针对性的、科学合理的评价指标 [39]。纳米混悬剂属于药物纳米粒，与普通注射剂不同，注射用纳米混悬剂处方中各组分并非简单地接触、混合，而是在一定机械力作用下形成的纳米粒子混悬液，生产中须进行质量控制的指标较多。

4.1 外观

湿法介质研磨技术制备的纳米混悬剂是一种热力学不稳定的胶体分散系统，药物粒子因热力学效应而倾向于聚集或发生陈化以降低吉布斯自由能；当纳米混悬剂中药物粒子的重力大于分散体系的浮力时便发生沉降；当粒子间相互作用力不平衡时将导致胶体体系发生絮凝。因此，合格的注射用纳米混悬剂的外观应是均一的，无团聚、沉降、分层现象，且无絮状物出现。

4.2 粒径大小和分布

纳米混悬剂的粒径大小和分布对其质量和药效作用具有重要影响，是重要的质量控制指标。粒径大小与药物的体内释放行为、药动学特性、生物分布和清除途径等密切相关，如 Beagle 犬分别单次肌内注射 1 041 和 505 nm 的棕榈酸帕利哌酮纳米混悬剂，前者的 AUC 和 c_{max} 是后者的 2 和 1.8 倍 [13]。纳米混悬剂在贮存过程中粒径不应显著增加。

粒径大小和分布常用动态光散射法或激光衍射法测定。前法测定结果为流体动力学粒径，后法则可检测和量化研磨过程中形成的药物微粒。如棕榈酸帕利哌酮混悬剂（Invega Sustenna®）的质量标准中要求用 Malvern Mastersizer 2000 型激光粒度仪检测粒径，应为 $d(0.1)$ 0.3 ～ 0.6 μm、$d(0.5)$ 0.9 ～ 1.4 μm、$d(0.9)$ 2.0 ～ 4.4 μm。其他显微成像技术如扫描电镜、透射电镜、原子力显微镜等可更直观地获得粒径大小信息，将结果图导入图像处理软件（如 Image J 软件）就可统计药物粒子的平均粒径及分布。

4.3 ζ 电位

ζ 电位是胶体与分散介质间的电位差，是纳米混悬剂物理稳定性的重要指标，可影响药物粒子与细胞的相互作用和生物分布等性质。ζ 电位是流体动力剪切面上的电位，可通过粒子在外加电场下的

迁移率来测定，方法有相位分析光散射法、电泳光散射法、可调电阻脉冲感应技术等。纳米混悬剂的ζ电位与处方组成、粒径大小、分散介质等有关。对于以静电稳定为主的纳米混悬剂，ζ电位绝对值至少为 30 mV；若是静电和空间位阻相结合的情况，最低的ζ电位绝对值为 20 mV[40]。

4.4 pH 值和渗透压

注射用纳米混悬剂的 pH 值和渗透压不仅涉及对患者给药部位的刺激性、静脉损伤、溶血等不良反应，还影响制剂的物理稳定性和药物粒子在体内的控释性能。在检测 pH 值时，应在给定条件下待纳米混悬剂达到平衡后检测，以避免出现“pH 漂移”和电极表面吸附悬浮粒子的现象。一般，pH 值要求为 3.5 ～ 9.0，渗透压则约为 300 mOsmol/kg，均越接近生理值，不良反应越小[41]。上市制剂中，静脉注射制剂美洛昔康纳米混悬剂的 pH 值为 6.8 ～ 7.8，肌内注射制剂棕榈酸帕利哌酮混悬剂的 pH 为 6.5 ～ 7.5。

4.5 晶型和粒子形貌

在研磨过程中，药物可能会变为无定形或其他晶型，从而影响注射用纳米混悬剂的稳定性和药物的体内释放、降解行为。对药物晶型和形态的研究有助于理解药物的纳米化过程。药物晶型可用粉末 X 射线衍射（PXRD）技术分析，结合差示扫描量热（DSC）法来确定。粒子的形貌（可通过透射电镜和扫描电镜获得）也可表征药物粒子晶型[42]。注射用紫杉醇（白蛋白结合型）仿制药技术指导原则建议选择 X 射线衍射和偏振光显微镜法证明产品粒子中的紫杉醇为无定形态[43]，因为相对于结晶型紫杉醇，无定形紫杉醇的溶解度更大、溶出速率更高。值得注意的是，对于液状的注射用纳米混悬剂，制备用于晶型分析的样品很重要，因为制剂中的辅料影响表征结果的可能性较大。通常会选择自然条件下干燥的样品进行分析。

4.6 体外释放

体外释放的研究目的是反映处方工艺参数的改变对制剂质量的影响，并与制剂的体内释放行为建立相关性[44]，是评价纳米混悬剂生物药剂学性质的首选方法，常用研究方法有桨法、透析法、反透析法、流通池法等，一般应绘制完整的药物释放曲线（直至释放达到平台期或释放 80％以上）。在选择研究方法时应充分考虑方法的适用性，上市产品月桂酰阿立哌唑注射用纳米混悬剂选用桨法对药物的释放行为进行研究，所得释药曲线与产品的粒度分布之间具有较好的线性关系。近期有研究表明，相比于桨法、透析法和反透析法，流通池法更适用于评价纳米混悬剂的处方、工艺参数、粒度分布和黏度对释放行为的影响[45]。

4.7 其他项目

此外，再分散性是注射用纳米混悬剂冻干粉必须评价的指标，重悬时的粒径大小及分布与冻干前相比不应发生显著变化，稳定性应达到制剂使用的要求。饱和溶解度可预测药物的体内行为。纳米混悬剂可提高药物的饱和溶解度，若制剂设计为缓释剂型则应研究饱和溶解度。鲎试剂法是测定内毒素的常用方法，使用该法测定注射用纳米混悬剂的内毒素时应注意制剂对浊度测定的干扰，若为有色制剂则应注意其对荧光测定的干扰。总之，应该根据 API 的性质、制剂的注射途径（肌内、静脉、关节腔等）、设计目的（速释、缓释）等，对影响注射用纳米混悬剂质量的指标进行评价。

5 总结

由于高通量筛选和组合化学技术的发展，越来越多的新化学实体得以进入研发管线。然而，其中超过 90％属于生物药剂学分类系统（BSC）Ⅱ类（70％）或Ⅳ类（20％）药物，这些药物由于水溶性差而表现出较低的生物利用度。对于热不稳定、水和非水溶剂均不溶的新化学实体，湿法介质研磨技术可作为提高其生物利用度的首选方法。事实上，通过处方筛选和工艺参数优化，湿法介质研磨技术可应用于几乎所有药物。可是，在上市的注射用纳米混悬剂中使用湿法介质研磨工艺的并不多，这是由于早年研磨技术的缺点如研磨介质和器壁的磨损会污染终产品、研磨时间长、研磨介质与研磨产物分离困难、研磨产物粒度分布较宽等原因所致。

近几年来，制造工艺取得了长足的进步，研

磨机无论是材质还是结构都有了飞跃性提升，已可实现批处理和再循环模式生产，在批处理模式下，0.5 ～ 1.0 h 就能得到分布均匀且平均粒径小于 200 nm 的、杂质限量合格的无菌纳米混悬剂；且通过处方和工艺优化，可得到批间差异较小的产品。近年上市的产品有治疗精神分裂症的肌内注射用月桂酰阿立哌唑缓释混悬剂和治疗中至重度疼痛的静脉注射用美洛昔康纳米混悬剂。具有缓释作用的纳米混悬剂因在慢性疾病治疗方面的积极作用已成为当下研究热点。湿法介质研磨技术所得产品具备不良反应小、对注射部位刺激性小的优势，可能将在长效纳米混悬剂方面有更广泛的应用。其次，产品载药量高、与溶液型制剂相似的体内药动学行为等特点也将使其成为制备难溶性药物静脉注射剂的优选手段。此外，表面功能化的纳米晶体能提高对各种器官的靶向性，将是未来研究的发展方向。

目前，湿法介质研磨技术制备注射用纳米混悬剂面临的挑战是可供选择的药用辅料不多。一些已在国外上市制剂中使用的辅料目前在国内仍需要再进行评估。随着近年几个注射用纳米混悬剂产品的上市，人们对其关键质量属性的理解和认识逐步深入，但相关质量研究和控制还需要不断完善。本研究对湿法介质研磨技术制备纳米混悬剂的工艺参数和处方进行了列举和分析，并对关键质量评价指标进行评述，期望能使安全、有效、质量可控的注射用纳米混悬剂更快地从实验研究转化为临床应用产品。

参考文献：

[1] 王若楠, 袁鹏辉, 杨德智, 等. 纳米晶药物的应用及展望[J]. 医药导报, 2020, **39**(8): 1100-1106.

[2] MA Z W, ZHANG H J, WANG Y J, *et al*. Development and evaluation of intramuscularly administered nano/microcrystal suspension[J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2019, **16**(4): 347-361.

[3] 岳鹏飞, 刘 阳, 谢 锦. 药物纳米晶体制备技术 30 年发展回顾与展望[J]. 药学学报, 2018, **53**(4): 529-537.

[4] 顾 艳, 何 军, 卞 玮, 等. 注射纳米混悬剂制备及表征的研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2016, **47**(4): 471-477.

[5] RAGHAVA SRIVALLI K M, MISHRA B. Drug nanocrystals: a way toward scale-up[J]. *Saudi Pharm J*, 2016, **24**(4): 386-404.

[6] LIVERSIDGE G G, CUNDY K C, BISHOP J F, *et al*. Surface modified drug nanoparticles: US, 19910647105[P]. 1992-01-13.

[7] JACOB S, NAIR A B, SHAH J. Emerging role of nanosuspensions in drug delivery systems[J]. *Biomater Res*, 2020, **24**: 3.

[8] LI M, AZAD M, DAVÉ R, *et al*. Nanomilling of drugs for bioavailability enhancement: a holistic formulation-process perspective[J]. *Pharmaceutics*, 2016, **8**(2): 17-52.

[9] 王 健, 侯惠民, 夏怡然, 等. 毛萼乙素纳米混悬剂. I. 制备及在小鼠体内的药动学[J]. 中国医药工业杂志, 2012, **43**(2): 100-103.

[10] WEI X L, HAN Y R, QUAN L H, *et al*. Oily nanosuspension for long-acting intramuscular delivery of curcumin didecanoate prodrug: preparation, characterization and *in vivo* evaluation[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2013, **49**(2): 286-293.

[11] DIXON H, CLARK A P, CABELL L A, *et al*. MMB4 DMS nanoparticle suspension formulation with enhanced stability for the treatment of nerve agent intoxication[J]. *Int J Toxicol*, 2013, **32**(4 Suppl): 18S-29S.

[12] SIGFRIDSSON K, LUNDQVIST A, STRIMFORS M. Evaluation of exposure properties after injection of nanosuspensions and microsuspenions into the intraperitoneal space in rats[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2013, **39**(11): 1832-1839.

[13] LENG D L, CHEN H M, LI G J, *et al*. Development and comparison of intramuscularly long-acting paliperidone palmitate nanosuspensions with different particle size[J]. *Int J Pharm*, 2014, **472**(1/2): 380-385.

[14] CHIANG P C, GOULD S, NANNINI M, *et al*. Nanosuspension delivery of paclitaxel to xenograft mice can alter drug disposition and anti-tumor activity[J]. *Nanoscale Res Lett*, 2014, **9**(1): 156.

[15] YE Y H, ZHANG X W, ZHANG T P, *et al*. Design and evaluation of injectable niclosamide nanocrystals prepared by wet media milling technique[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2015, **41**(9): 1416-1424.

[16] FUJIMURA H, KOMASAKA T, TOMARI T, *et al*. Nanosuspension formulations of poorly water-soluble compounds for intravenous administration in exploratory

toxicity studies: *in vitro* and *in vivo* evaluation［J］. *J Appl Toxicol*, 2016, **36**(10): 1259-1267.

［17］ DONG D, WANG X, WANG H L, *et al*. Elucidating the *in vivo* fate of nanocrystals using a physiologically based pharmacokinetic model: a case study with the anticancer agent SNX-2112［J］. *Int J nanomed*, 2015, **10**: 2521-2535.

［18］ FRANK K J, BOECK G. Development of a nanosuspension for iv administration: from miniscale screening to a freeze dried formulation［J］. *Eur J Pharm Sci*, 2016, **87**: 112-117.

［19］ GUO L G, KANG L, LIU X R, *et al*. A novel nanosuspension of andrographolide: preparation, characterization and passive liver target evaluation in rats［J］. *Eur J Pharm Sci*, 2017, **104**: 13-22.

［20］ SIGFRIDSSON K, SKANTZE U, SKANTZE P, *et al*. Nanocrystal formulations of a poorly soluble drug. 1. *In vitro* characterization of stability, stabilizer adsorption and uptake in liver cells［J］. *Int J Pharmaceut*, 2017, **518**(1/2): 29-40.

［21］ MAUDENS P, SEEMAYER C A, THAUVIN C, *et al*. Nanocrystal-polymer particles: extended delivery carriers for osteoarthritis treatment［J］. *Small*, 2018, **14**(8): 1703108-1703117.

［22］ RUDD N D, HELMY R, DORMER P G, *et al*. Probing *in vitro* release kinetics of long-acting injectable nanosuspensions via flow-NMR spectroscopy［J］. *Mol Pharm*, 2020, **17**(2): 530-540.

［23］ 黄甜甜, 沈一平, 路丽康, 等. 高载药量雷公藤红素纳米混悬剂的制备及体外评价[J]. 中草药, 2020, **51**(8): 2125-2133.

［24］ 卓虹伊, 陈　梁, 王春蕊, 等. 川芎嗪双羟萘酸盐缓释纳米混悬剂的制备及体外释放研究[J]. 中草药, 2020, **51**(3): 616-624.

［25］ JUHNKE M, MÄRTIN D, JOHN E. Generation of wear during the production of drug nanosuspensions by wet media milling［J］. *Eur J Pharm Biopharm*, 2012, **81**(1): 214-222.

［26］ PATRAVALE V B, DATE A A, KULKARNI R M. Nanosuspensions: a promising drug delivery strategy［J］. *J Pharm Pharmacol*, 2004, **56**(7): 827-840.

［27］ LI M, YARAGUDI N, AFOLABI A, *et al*. Sub-100 nm drug particle suspensions prepared via wet milling with low bead contamination through novel process intensification［J］. *Chem Eng Sci*, 2015, **130**: 207-220.

［28］ LEHOCKÝ R, PPĚČEK D, ŠTĚPÁNEK F. Scale-up from batch to flow-through wet milling process for injectable depot formulation［J］. *Eur J Pharm Sci*, 2016, **95**: 122-129.

［29］ TANAKA Y, INKYO M, YUMOTO R, *et al*. Nanoparticulation of probucol, a poorly water-soluble drug, using a novel wet-milling process to improve *in vitro* dissolution and *in vivo* oral absorption［J］. *Drug Dev Ind Pharm*, 2012, **38**(8): 1015-1023.

［30］ AFOLABI A, AKINLABI O, BILGILI E. Impact of process parameters on the breakage kinetics of poorly water-soluble drugs during wet stirred media milling: a microhydrodynamic view［J］. *Eur J Pharm Sci*, 2014, **51**: 75-86.

［31］ KNIEKE C, AZAD M A, DAVÉ R N, *et al*. A study of the physical stability of wet media-milled fenofibrate suspensions using dynamic equilibrium curves［J］. *Chem Eng Res Des*, 2013, **91**(7): 1245-1258.

［32］ 刘柳毅, 温璐平, 许男徽, 等. 灯盏花素纳米晶的制备及质量评价[J]. 中国药房, 2020, **31**(15): 1861-1867.

［33］ WU L B, ZHANG J, WATANABE W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles［J］. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, **63**(6): 456-469.

［34］ ITO A, KONNERTH C, SCHMIDT J, *et al*. Effect of polymer species and concentration on the production of mefenamic acid nanoparticles by media milling［J］. *Eur J Pharm Biopharm*, 2016, **98**: 98-107.

［35］ VERMA S, KUMAR S, GOKHALE R, *et al*. Physical stability of nanosuspensions: investigation of the role of stabilizers on Ostwald ripening［J］. *Inter J Pharmaceut*, 2011, **406**(1/2): 145-152.

［36］ AHIRE E, THAKKAR S, DARSHANWAD M, *et al*. Parenteral nanosuspensions: a brief review from solubility enhancement to more novel and specific applications［J］. *Acta Pharm Sin B*, 2018, **8**(5): 733-755.

［37］ SIGFRIDSSON K, SKANTZE P, SKANTZE U, *et al*. Nanocrystal formulations of a poorly soluble drug. 2. Evaluation of nanocrystal liver uptake and distribution after intravenous administration to mice［J］. *Int J Pharmaceut*, 2017, **524**(1/2): 248-256.

［38］ TEN TIJE A J, VERWEIJ J, LOOS W J, *et al*. Pharmacological effects of formulation vehicles: implications for cancer chemotherapy［J］. *Clin Pharmacokinet*, 2003,

42(7): 665-685.

[39] 国家药品监督管理局. 纳米药物质量控制研究技术指导原则(试行)[EB/OL]. [2021-12-21]. https://www. nmpa. gov. cn/xxgk/fgwj/gzwj/gzwjyp/ 20220601110541120. html.

[40] PATEL D, ZODE S S, BANSAL A K. Formulation aspects of intravenous nanosuspensions [J]. *Int J Pharmaceut*, 2020, **586**: 119555.

[41] 靳 倩, 龚 伟, 苏志德, 等. 注射用制剂关键理化属性的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2019, **28**(9): 1075-1080.

[42] SHETE G, PURI V, KUMAR L, *et al*. Solid state characterization of commercial crystalline and amorphous atorvastatin calcium samples [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2010, **11**(2): 598-609.

[43] 国家药品监督管理局. 注射用紫杉醇（白蛋白结合型）仿制药研究技术指导原则(试行)[EB/OL]. [2021-12-21]. https://www. nmpa. gov. cn/xxgk/fgwj/xzhgfxwj/index. html.

[44] 丁静雯, 王君吉, 何 军. 影响注射用长效纳米晶混悬型注射液体内外释药因素的概述[J]. 中国医药工业杂志, 2020, **51**(12): 1517-1528.

[45] FORREST W P, REUTER K G, SHAH V, *et al*. USP apparatus 4: a valuable *in vitro* tool to enable formulation development of long-acting parenteral (LAP) nanosuspension formulations of poorly water-soluble compounds [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2018, **19**(1): 413-424.