DOE 法优化肺表面活性物质混悬剂的工艺参数

许俊博，赵海英，陆文超，寇同欣，刘　宁
（华润双鹤药业股份有限公司，北京 100120）

摘要：为了制备符合质量标准的合成肺表面活性物质混悬剂，该研究采用实验设计（DOE）方法对工艺参数进行优化。以产品关键质量属性中的粒度和表面活性作为主要考察指标，运用响应面法优化配制温度、搅拌转速、分散时间等工艺参数。最终确定的优化工艺参数为：分散温度 40 ～ 42 ℃、搅拌转速 500 ～ 600 r/min、搅拌时间 3 ～ 5 min。照优化工艺参数制备的样品均符合质量要求，表明该优化工艺稳定、可靠，为合成肺表面活性物质制剂的生产提供了技术支持。

关键词：合成肺表面活性物质；混悬剂；工艺优化；呼吸窘迫综合征
中图分类号：R974；R944.1^{+}6　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2025)03-0360-05
引用：许俊博，赵海英，陆文超，等．DOE 法优化肺表面活性物质混悬剂的工艺参数［J］．中国医药工业杂志，2025, 56(3)：0360-0364．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.03.010

Optimization of Process Parameters for Pulmonary Surfactant Suspension by the DOE Method

XU Junbo, ZHAO Haiying, LU Wenchao, KOU Tongxin, LIU Ning
(*China Resources Double-Crane Pharmaceutical Co., Ltd., Beijing 100120*)

ABSTRACT: In order to prepare a synthetic pulmonary surfactant suspension that meets quality standards, this study employed Design of Experiment(DOE) to optimize process parameters. The particle size and surface activity, which are key quality attributes of the product, were used as the main evaluation indicators. The response surface methodology was adopted to optimize process parameters such as dispersion temperature, stirring speed, and dispersion time. The optimized process parameters were determined as follows: dissolution temperature of 40–42 ℃, stirring speed of 500–600 r/min, and stirring time of 3–5 min. The samples prepared with the optimized process all met the quality requirements. It indicated that the optimized process were stable and reliable, providing a technical support for the production of synthetic pulmonary surfactant preparations.

Key Words: synthetic pulmonary surfactant; suspension; process optimization; respiratory distress syndrome

呼吸窘迫综合征（respiratory distress syndrome，RDS）是早产儿常见的呼吸功能异常类疾病，起因主要是新生儿肺部无法产生足够的表面活性物质（surfactants）。这些表面活性物质多为磷脂蛋白复合物，通常覆盖在健康肺泡内衬上，对维持正常呼吸和肺泡稳定至关重要。如果肺部缺乏足够的表面活性物质，会导致呼吸困难[1]。目前多通过补充肺表面活性物质替代物进行治疗。常用的肺表面活性物质根据来源可分为动物源性和化学合成两类。Beractant（暂译为贝拉康坦，牛肺提取物，商品名为 Survanta）、猪肺磷脂注射液（poractant alfainjection，商品名 Curosurf）是常见的动物源性肺表面活性物质药品，具有良好的生物相容性和药效，但临床应用受限于产量以及传播动物相关性疾病的潜在风险。芦西纳坦［lucinactant，也称西那普肽（sinapultide）或 KL4］是由美国 Discovery Laboratories 公司（后

收稿日期：2024-12-26
作者简介：许俊博（1974—），女，硕士，高级工程师，从事药物研发工作。
E-mail：xujunbo623@163.com

转给 Windtree Therapeutics 公司）开发的全合成肺表面活性物质，给药后可降低肺泡气 - 液界面处的表面张力，防止呼气末肺泡萎陷，补偿表面活性物质的缺乏，恢复患病婴儿肺的表面活性，从而维持婴儿的正常呼吸 [2]。芦西纳坦的气管内滴入混悬液于 2012 年 3 月 6 日获美国 FDA 批准上市，商品名为 Surfaxin，主要用于高危早产婴儿 RDS 的预防 [3—4]。芦西纳坦的药效远优于目前临床应用的合成肺表面活性物质 Exosurf（磷脂组合物），可与 beractant 和 poractant 媲美 [5—6]。2017 年，美国 Windtree Therapeutics 公司与李氏大药厂签署了亚洲市场芦西纳坦的共同开发和商业化协议，并继续进行不同剂型的临床试验。Surfaxin 的处方包含有 4 个活性成分，分别是二棕榈酰磷脂酰胆碱（1,2-dihexadecanoyl-rac-glycero-3-phosphocholine，DPPC）、1- 棕榈酰基 -2- 油酰基磷脂酰甘油钠盐（1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphorylglycerol sodium，POPG-Na）、棕榈酸（palmitic acid，PA）和芦西纳坦 [7—8]。因处方中的磷脂、PA、多肽均不溶于水，制备过程需要搅拌、分散，并提高配制温度。然而，表面活性物质降低肺泡气 - 液界面表面张力的活性易受高温、机械力的影响而失活，因此制备时需兼顾混悬液的质量要求和高表面活性的特点。本研究参照 Surfaxin 处方，开发含有磷脂和模拟天然肺表面活性物质性能的多肽（即全合成肺表面活性物质）的混悬剂，并采用实验设计（design of experiment，DOE）优化处方及工艺参数，为合成肺表面活性物质混悬剂的制备提供帮助。

1 仪器与试药

Beckman Coulter Multisizer 3 型粒度测定仪（美国 Beckman Coulter 公司）；DC-BY-01 型闭泡式表面张力仪（北京北分科环仪器成套有限公司制作，双鹤专利产品 [9]）；MSA224S-1CE-DU 型电子分析天平（德国赛多利斯科学仪器公司）；TM S470-K 型 pH 计［梅特勒 - 托利多国际贸易（上海）有限公司］；T25 型分散机（德国 IKA 集团）；UltiMate 3000-Corona Veo 快速分离电雾式检测器（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）。

芦西纳坦（浙江湃肽生物股份有限公司，批号 P201211）；POPG-Na（批号 X0711）、DPPC（批号 C0641）均购于瑞士禾大医药健康；PA（日本 TCI 公司，批号 E708DQH）；氨丁三醇［西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司，批号 BCCD0211］；氯化钠注射液（华润双鹤药业股份有限公司，批号 A20021X006）；乙酸（国药集团化学试剂有限公司，批号 20210917）；透析袋（美国 Spectrum Laboratories 公司，截留分子量 2 000 ～ 8 000）；无水乙醇（分析纯）购于太仓新太酒精有限公司。

2 方法和结果

2.1 合成肺表面活性物质混悬剂的制备

取 POPG-Na 7.5 g，DPPC 22.5 g、PA 4.05 g 和芦西纳坦 0.86 g，加入 95% 乙醇约 300 mL，在 37 ℃以上搅拌至澄清；使用透析袋，在氨丁三醇 - 氯化钠缓冲液（将氨丁三醇 2.42 g 加至氯化钠注射液 1 L 中，用乙酸调至 pH 7.2）中透析 48 h 以上（期间更换透析液 4 ～ 6 次），回收透析袋内样品，用乙酸调至 pH 7.2，用氨丁三醇 - 氯化钠缓冲液定容至 1 L，搅拌、混匀，即得合成肺表面活性物质混悬液。

2.2 粒度测定方法

将氨丁三醇 2.42 g 加至氯化钠注射液 1 L 中，用乙酸调至 pH 7.2

2.3 表面张力测定方法

取混悬液样品，以注射用水稀释至 5 mg/mL，用表面张力仪测量常压及加压后气泡的高度（*H*/mm）和直径（*D*/mm），按下述式①计算最低表面张力［*R*/（mN·m^{-1}）］。

$$R = \Delta\rho \times g \times [H/G]^2 \quad ①$$

式中：$G = C_1 + C_2 \times (H/D)^1 + C_3 \times (H/D)^2 + C_4 \times (H/D)^3 + C_5 \times (H/D)^4$，$C_1$ ～ C_5 为常数，C_1=1.865 190，C_2=2.807 066，C_3=－9.430 927，C_4=8.669 726，C_5=－3.660 622；$\Delta\rho$=0.998 2 g/cm^3，即气泡内外物质的密度差；g=9.8 m/s^2，即重力加速度。

2.4 经典 DOE 试验设计与结果

首先采取经典 DOE 模型，对合成肺表面活性物质混悬剂的制备工艺进行优化。以分散温度、分散时间、搅拌转速为工艺参数，粒度和表面张力为指标，进行 3 因素、2 水平外加 2 个中心点的全因子设计优化试验。参考芦西纳坦的溶解温度和预试验结果，

设置的工艺参数水平如表 1 所示，具体试验设计及试验结果如表 2 所示。此试验设计共需进行 10 次试验，分辨度达到Ⅴ，可以很好地区分主效应和交互作用。

表 1　DOE 因素与水平表

Tab.1　DOE Design Factor and Level

因子名称	低水平	高水平	中心点
分散温度 /℃	40	48	44
分散时间 /min	1	5	3
搅拌转速 /(r·min^{-1})	200	600	400

对经典试验设计的 d(0.9) 和表面张力结果，以项的逐步选择法 (α=0.15) 分别进行方差分析，结果如表 3 所示。以 d(0.9) 为指标时，所得拟合方程 P<0.05，R^2=0.975 2，R_{adj}^2=0.944 3，R_{pre}^2=0.824 3，S=0.373 510，显示模型拟合度良好，但存在弯曲 ($P_{弯曲}$<0.05)。但以表面张力为指标时，所得拟合方程 P=0.115，R^2=0.721 3，R_{adj}^2=0.498 4，R_{pre}^2=0，S=0.879 808，说明模型拟合度一般，不存在弯曲 ($P_{弯曲}$>0.05)。

表 3　方差分析结果

Tab.3　Variance Analysis Results

来源	粒度		表面张力	
	F 值	P 值	F 值	P 值
模型	31.50	0.003	3.24	0.115
线性	35.17	0.002	3.40	0.110
分散温度	86.95	0.001	9.72	0.026
搅拌转速	18.18	0.013	0.00	0.994
分散时间	0.39	0.568	0.48	0.520
双因子交互作用	15.25	0.017	2.74	0.159
温度 × 转速	15.25	0.017	2.74	0.159
弯曲	36.75	0.004	0.18	0.693
失拟	57.80	0.096	42.54	0.112

2.5　效应面设计与结果

根据“**2.4**”项下结果，DOE 设计模型有效但存在弯曲，因此需在原试验基础上增加轴点，改为响应面设计，并按照新的试验设计进行补充试验 (项的逐步选择法 α=0.15)，具体试验设计及结果如表 4 所示。

对新模型的试验数据进行方差分析，结果如表 5 所示。以 d(0.9) 为指标时，所得拟合方程 P<0.05，R^2=0.726 2，R_{adj}^2=0.589 4，R_{pre}^2=0.486 0，S=0.922 115。以表面张力为指标时，所得拟合方程 P<0.05，R^2=0.833 9，R_{adj}^2=0.688 5，R_{pre}^2=0，S=0.680 277。可见，新模型对 2 个指标均有效，且不存在失拟性。

根据方差分析结果，使用 Minitab 17 软件对上述数据进行分析。以表面张力、粒径 d(0.9) 最低为目标，拟合得到优化工艺参数为分散温度 40 ℃，搅拌转速 600 r/min，分散时间 5 min。此工艺条件下，表面张力预测值为 3.562 mN/m[95％置信区间 (2.267，4.856)]，d(0.9) 预测值为 9.069 μm[95％置信区间 (7.664，10.474)]，符合产品质量标准的要求 [d(0.9)<10 μm，表面张力 <6 mN/m]。

2.6　工艺参数的验证

按照优化工艺参数制备 3 批样品，并进行检测，结果如表 6 所示，表面张力为 3.88 mN/m、d(0.9) 为 8.92 μm，检测结果均在 95％的置信区间内，表明以优化工艺制备的合成肺表面活性物质混悬剂符

表 2　经典 DOE 试验设计与结果

Tab.2　Experiment Design and Results of Classic DOE

标准序	运行序	中心点	区组	分散温度 /℃	搅拌转速 /(r·min^{-1})	分散时间 /min	d(0.9)/μm	表面张力 /(mN·m^{-1})
7	1	1	1	40	600	5	10.17	4.01
6	2	1	1	48	200	5	8.64	7.02
8	3	1	1	48	600	5	8.23	5.79
4	4	1	1	48	600	1	8.39	7.40
3	5	1	1	40	600	1	9.32	3.60
5	6	1	1	40	200	5	11.65	4.83
10	7	0	1	44	400	3	11.42	5.64
2	8	1	1	48	200	1	8.18	4.46
1	9	1	1	40	200	1	12.15	4.47
9	10	0	1	44	400	3	11.34	5.40

表 4 效应面试验设计与结果

Tab.4 Experimental Design of Effect Surface

标准序	运行序	中心点	区组	分散温度 /℃	搅拌转速 /(r·min^{-1})	分散时间 /min	d(0.9)/μm	表面张力 /(mN·m^{-1})
7	1	1	1	40	600	5	10.17	4.01
6	2	1	1	48	200	5	8.64	7.02
8	3	1	1	48	600	5	8.23	5.79
4	4	1	1	48	600	1	8.39	7.40
3	5	1	1	40	600	1	9.32	3.60
5	6	1	1	40	200	5	11.65	4.83
10	7	0	1	44	400	3	11.42	5.64
2	8	1	1	48	200	1	8.18	4.46
1	9	1	1	40	200	1	12.15	4.47
9	10	0	1	44	400	3	11.34	5.40
15	11	−1	2	44	400	1	9.08	5.92
12	12	−1	2	48	400	3	10.11	5.79
14	13	−1	2	44	600	3	8.38	7.60
18	14	0	2	44	400	3	8.00	6.16
11	15	−1	2	40	400	3	9.71	7.99
16	16	−1	2	44	400	5	11.07	5.60
13	18	−1	2	44	200	3	8.76	7.31

表 5 新模型的方差分析结果

Tab.5 Variance Analysis Results of New Models

来源	粒度		表面张力	
	F 值	P 值	F 值	P 值
模型	5.31	0.012	5.74	0.013
区组	5.43	0.042	—	—
线性	7.38	0.011	7.01	0.013
分散温度	11.95	0.006	20.58	0.002
搅拌转速	2.81	0.125	0.02	0.889
分散时间	—	—	0.42	0.533
平方	8.26	0.017	8.53	0.01
温度 × 转速	—	—	17.04	0.003
转速 × 转速	8.26	0.017	7.31	0.027
双因子交互作用	2.5	0.145	3.85	0.067
温度 × 转速	2.5	—	3.12	0.115
转速 × 搅拌时间	—	—	4.58	0.065
失拟	295.13	0.045	18.22	0.179

表 6 验证试验结果

Tab.6 Verification Test Results

试验编号	最低表面张力 /(mN·m^{-1})	d(0.9)/μm
1	3.56	8.52
2	4.21	9.01
3	3.89	9.23
均值	3.88	8.92

合质量要求。

2.8 样品检测

取上述 3 批验证样品，按 ChP 2020 年版检测 pH 值，按照质量标准[10—11]规定检测主成分含量，并对磷脂成分的分解产物以及乙醇溶剂残留等进行了分析。结果如表 7 所示，3 批验证批各指标均符合标

表 7 验证批样品检测结果

Tab.7 Test Results of Verification Lots

考察项目		限度要求	验证批 1	验证批 2	验证批 3
性状		白色至类白色不透明凝胶状	符合规定	符合规定	符合规定
pH 值		7.0 ～ 8.0	7.45	7.42	7.40
有关物质含量 /%	LPC	不得过 1.0	0.41	0.45	0.40
	LPG	不得过 2.0	0.65	0.64	0.58
	总杂质	不得过 5.0	1.80	1.85	1.77
乙醇残留 /%		不得过 0.5	未检出	未检出	未检出
最低表面张力 /(mN·m^{-1})		<10	3.56	4.21	3.88
含量 /%	DPPC	90 ～ 110	100.1	99.8	101.0
	POPG-Na		99.5	98.9	100.1
	芦西纳坦		101.0	100.5	102.8
	PA		99.8	99.6	98.8

准要求。其中，检测的磷脂分解产物包括 DPPC 水解后生成溶血磷脂酰胆碱（lysophosphatidylcholine，LPC）、游离脂肪酸（PA），以及 POPG 水解后生成溶血磷脂酰甘油（lysophosphatidylcholine，LPG）、游离脂肪酸（PA 和油酸）。在所采用的检测条件下游离脂肪酸与活性成分 PA 同时出锋，本品制备工艺过程中 PA、LPC、LPG 含量均未见显著变化，说明工艺过程中磷脂并未发生降解。检测结果表明本次 DOE 优化所得的工艺参数合理，制备样品符合质量标准要求。

3　讨论

本课题组前期通过研究芦西纳坦处方，确定了合成肺表面活性物质混悬剂的处方组成。由于 4 个成分几乎不溶于水，混合后不易成为均一物质，因此关键工序是 4 个主成分的混合。经预试验确定，采用 95% 乙醇为溶剂，在一定条件下混合均匀，然后通过透析等工艺去除乙醇，最终可得到粒度均一的混悬液。

本研究在该制备工艺基础上进一步优化影响产品关键质量属性的主要工艺参数。产品的表面张力是影响产品药效的关键指标，该值越低说明样品活性越高，但其对温度和机械搅拌变化较为敏感；粒径及粒度分布［尤其是 $d(0.9)$］是混悬液的关键质量属性，根据 ChP 2020 年版四部注射剂通则项下要求，$d(0.9)$ 应小于 15 μm。因此选取表面张力、粒度［$d(0.9)$］为指标，且均从望小特性出发，对工艺参数进行优化。由于 3 个因素相互关联，单因素筛选试验无法获得更优的结果，因此采用 DOE 法设计了三因素二水平的全因子试验。试验结果显示，所得模型存在弯曲，故进一步采取效应面法进行优化。通过对 DOE 试验数据进行拟合、预测，得优化工艺参数为分散温度 40 ℃，搅拌转速 600 r/min，分散时间 5 min。以该优化工艺制备的合成肺表面活性物质的表面张力为 3.88 mN/m、$d(0.9)$ 为 8.92 μm，且其性状、pH 值、主成分含量、分解产物以及乙醇溶剂残留均符合产品质量要求，可为后续放大生产提供依据。

参考文献：

［1］ 夏训明．美国 FDA 批准 Surfaxin（lucinactant）用于治疗早产儿呼吸窘迫综合征［J］．广东药学院学报，2012, **28**(2)：155．

［2］ 宋　帅，赵冬梅．芦西纳坦［J］．中国药物化学杂志，2012, **22**(4)：268．

［3］ 艾　敏．治疗呼吸窘迫综合征的新药—lucinactant［J］．药学进展，2005, **29**(10)：481．

［4］ 李氏大药厂．独家许可及合作协议，在亚洲共同开发 KL4 表面活性剂技术平台并实现其商业化［EB/OL］．［2024-09-01］．https://www．leespharm．com/wp-content/uploads/2019/05/LeesPharma_Licensing_Agreement_PR20170615_REV．pdf．

［5］ DONN S M，SINHA S K．Aerosolized lucinactant: a potential alternative to intratracheal surfactant replacement therapy［J］．*Expert Opini Pharmacother*, 2008, **9**(3)：475-478．

［6］ GHODRAT M．Lung surfactants［J］．*Am J Health Syst Pharm*, 2006, **63**(16)：1504-1521．

［7］ SORBERA L A，LEESON P A．Lucinactant: agent for respiratory distress syndrome agent for meconium aspiration syndrome lung surfactant［J］．*Drugs Future*, 2004, **29**(6)：570-573．

［8］ BRASHER M, RAFFAY T M, CUNNINGHAM M D，Aerosolized surfactant for preterm infants with respiratory distress syndrome［J］．*Children*（Basel）, 2021, **8**(6)：493．

［9］ 寇同欣，董声焕，杨　澈，等．表面张力测定仪：中国，207540936U［P］．2018-06-26．

［10］ 董声焕，杜立中，于顺廷，等．肺表面活性物质基础与临床［M］．北京：人民军医出版社，2012: 112-119．

［11］ FDA．Surfaxin［EB/OL］．［2025-01-20］．https://www．accessdata．fda．gov/drugsatfda_docs/nda/2012/021746Orig1s000ChemRedt．pdf．