卡巴他赛纳米脂质体冻干工艺的考察

柳宇红[1]，姜 宇[2*]，郝贵周[2]，刘善奎[1]
（1. 济南大学生物科学与技术学院，山东济南 250022；2. 山东新时代药业有限公司科研部，山东临沂 273400）

摘要：为了提高贮存稳定性、降低乙醇残留量，将卡巴他赛纳米脂质体制备成冻干注射剂，并对冻干工艺进行了研究与优化。以冻干产品的外观、主药含量、包封率、水分含量、乙醇残留量、贮存稳定性为评价指标，考察了冻干保护剂（蔗糖）用量、料液装量、预冻速度、干燥温度对产品质量的影响。结果表明，蔗糖与磷脂的质量比为 5.0 时较佳；脂质体中卡巴他赛的质量浓度为 2 mg/mL；装量为每瓶 20 mg；西林瓶选用 20 或 30 mL 2 个规格。优化冻干工艺参数为：预冻温度 －40 ℃，隔板降温时间 90 min，－40 ℃时保温 5 h；一次干燥温度 －15 ℃，一次干燥时间 14 h；二次干燥温度 28 ℃，二次干燥时间 28 h；冻干全程总耗时 48.83 h；干燥过程采用阶段式升温方式。优化冻干工艺的冻干周期大幅缩短，所得冻干制剂贮存稳定性良好。

关键词：卡巴他赛；纳米脂质体；冷冻干燥；稳定性
中图分类号：R944.9 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2023)08-1233-08
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.08.013

Investigation on the Lyophilization Technology of Cabazitaxel Nanoliposomes

LIU Yuhong[1], JIANG Yu[2*], HAO Guizhou[2], LIU Shankui[1]
(*1. School of Biological Science and Technology, University of Jinan, Jinan 250022;*
2. Scientific Research Dept. of Shandong New Time Pharmaceutical Co., Ltd., Linyi 273400)

ABSTRACT: In order to improve storage stability and reduce residual ethanol, cabazitaxel nanoliposomes were prepared into lyophilized injection, and the lyophilization process was investigated and optimized. Taking the appearance, main drug content, encapsulation efficiency, moisture content, residual ethanol and the storage stability of lyophilized powder as evaluation indicators, the effects of dosage of lyophilized protective agent (sucrose), the filling volume of feed liquid, pre-freezing speed and drying temperature on the quality of the lyophilized injection were investigated. The results showed that the optimum mass ratio of sucrose to phospholipid was 5.0; the mass concentration of cabazitaxel in the nanoliposomes was 2 mg/mL; specification was 20 mg per bottle; xilin bottle specification was 20 or 30 mL. The optimal lyophilization process parameters were as follows: the pre-freezing temperature was －40 ℃, the shelf cooling time was 90 min, then holding at －40 ℃ for 5 h; the primary drying was conducted at －15 ℃ for 14 h; the secondary drying was conducted at 28 ℃ for 28 h; the total lyophilization time was 48.83 h; a stepwise heating mode was adopted in the whole drying process. The lyophilization cycle of optimal process was greatly shortened, and the obtained lyophilized injection had good storage stability.

Key Words: cabazitaxel; nanoliposome; lyophilization; stability

卡巴他赛（cabazitaxel，**1**）属于紫杉烷类抗肿瘤药，是多西他赛结构中 7- 和 10- 位羟基被甲醚化的产物[1—2]，对多西他赛耐药肿瘤具有良好的治疗效果，可以延长多西他赛治疗后进展为转移性去势抵抗性前列腺癌（mCRPC）患者的总体生存期

收稿日期：2022-08-09
基金项目：山东省重大科技创新工程项目(2019JZZY011116)
作者简介：柳宇红(1995—)，女，硕士研究生，专业方向：纳米脂质体。
通信作者：姜 宇(1990—)，男，博士，工程师，从事纳米脂质体的研究。
E-mail：jiangyusoder@163.com

（overall survival，OS），有效缓解晚期发生骨转移的前列腺癌患者的疼痛[3—4]。然而，市售**1**注射剂（Jevtana®）临床应用时操作烦琐，而且处方中使用了Tween-80和无水乙醇作为共溶剂，也缺乏肿瘤靶向性，可能会引发严重不良反应。

纳米脂质体是平均粒径约100 nm的脂质体，具有磷脂双分子层结构，生物相容性良好，作为药物载体既能够提高药物溶解性，又具有被动靶向性，可降低毒性、改善疗效。药物根据溶解性的不同，可被负载于脂质体的不同部位：脂溶性药物镶嵌在磷脂双分子层中，水溶性药物则被包载在脂质体的内部空腔中[5]。

本课题组前期采用创新的混合腔技术已成功制得了高载药量、高包封率、稳定性良好的**1**纳米脂质体混悬液成品，并解决了**1**纳米脂质体难以线性放大生产的技术瓶颈。然而，制得的脂质体混悬液中乙醇残留量较高，无法达到静脉注射级要求，且处方中所用的大豆磷脂结构中含有2条不饱和脂肪酸链，易发生氧化、水解，使其毒性增加。此外，脂质体在水溶液中的稳定性较差，易出现聚集、融合、药物析晶等现象，不利于长期贮存。冷冻干燥技术[6—7]可有效除去残留乙醇，也可有效抑制磷脂的氧化、水解，同时保护脂质体结构，显著提高稳定性，更利于产品的运输和长期贮存。因此，本研究将**1**纳米脂质体混悬液制成冻干注射剂，并对冻干工艺进行考察与优化。

1　仪器与试药

BT300-01型、BT600-01型蠕动泵（保定齐力恒流泵有限公司）；AE-100型脂质体滤膜挤出器（加拿大ATS公司）；0.08和0.2 μm的聚碳酸酯膜（美国Whatman公司）；SCIENTZ-30F型原位冻干机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；Lyobeta 3PS型中试型冻干机［阿自倍尔泰事达机电设备（上海）有限公司］；LGJ-S20型压盖型冷冻干燥机（北京四环起航科技有限公司）；7、15、20和30 mL的中硼硅玻璃管制注射剂瓶（山东力诺特种玻璃股份有限公司）；W1T单叉20-A-S型注射用冷冻干燥无菌粉末用覆聚四氟乙烯/乙烯共聚物膜氯化丁基橡胶塞（江苏华兰药用新材料股份有限公司）；UltiMate 3000型高效液相色谱仪（美国Thermo Fisher公司）；Zetasizer Nano ZS型纳米粒径与ζ电位分析仪（英国Malvern公司）；DSC 200 F3型差示扫描量热分析仪（德国Netzsch公司）；7890A型气相色谱仪（美国安捷伦科技有限公司）；V30s型卡尔费休水分测定仪（瑞士Mettler Toledo公司）；0.22 μm尼龙66微孔滤膜针头过滤器（天津市科亿隆试验设备有限公司）；0.22 μm微孔滤膜离心过滤管（美国Milipore公司）；Labonce-250LTPS型药品强光稳定性试验箱（北京兰贝石恒温技术有限公司）；KBF720型恒温恒湿箱（德国Binder公司）。

1丙酮络合物（CTX，北京福瑞康泽医药科技有限公司，含量99.87%，批号180202）；大豆磷脂（SPC，德国Lipoid公司，含量99.8%，批号579010-119099-08）；胆固醇（Chol，日本精化株式会社，含量99.5%，批号B80859）；聚乙二醇1000维生素E琥珀酸酯（TPGS，注射级，法国PMC Isochem公司，批号1901010012）；维生素E琥珀酸酯（VES，江苏玺鑫维生素有限公司，批号1907100011）；蔗糖（德国Merck公司，含量99.9%）；Tween-80（德国Sigma-Aldrich公司，药用级，批号20180202）；灭菌注射用水（山东齐都药业有限公司）；乙醇（药用级，安徽安特食品股份有限公司）；乙腈、甲醇均为色谱纯，其他试剂为分析纯，水为纯化水。

2　方法与结果

2.1　**1**纳米脂质体冻干注射剂的制备

2.1.1　**1**纳米脂质体混悬液

精密量取处方量的原辅料，使SPC与CTX、SPC与Chol、SPC与TPGS、SPC与VES的质量比分别为16.524、23.948、7.800、50.000，均溶于无水乙醇中得油相。精密量取适量蔗糖溶于水中作为水相。通过蠕动泵将油相与水相（体积比1∶5）分别以100和500 mL/min的流速注入混合室内，使之充分混合，稀释1倍后得脂质体初乳，超滤除去乙醇，浓缩得**1**质量浓度为2 mg/mL的脂质体中间体。将其通过脂质体滤膜挤出器进行整粒、浓缩得**1**质量浓度为3 mg/mL的纳米脂质体混悬液。4 ℃冷藏保存，备用。

2.1.2　**1**纳米脂质体冻干注射剂

将自制的**1**纳米脂质体混悬液过0.22 μm滤膜，然后分装到15 mL西林瓶中，装量5 mL，半压塞，

冻干（冻干程序如表1所示，总耗时72.33 h）后轧盖，于4 ℃保存备用。结果表明，所得**1**纳米脂质体冻干注射剂为紧贴瓶壁的淡黄或白色圆柱形疏松块状物，表面平整、无塌陷，复溶后为淡蓝色均一液体。

2.2 **1**纳米脂质体混悬液共晶点与共熔点的测定

采用DSC法测量样品的共晶点与共熔点，取**1**纳米脂质体混悬液适量于DSC分析仪中，升温速率设为5 K/min，结果如图1所示，**1**纳米脂质体混悬液的共晶点和共熔点分别约为 －24和 －9 ℃。

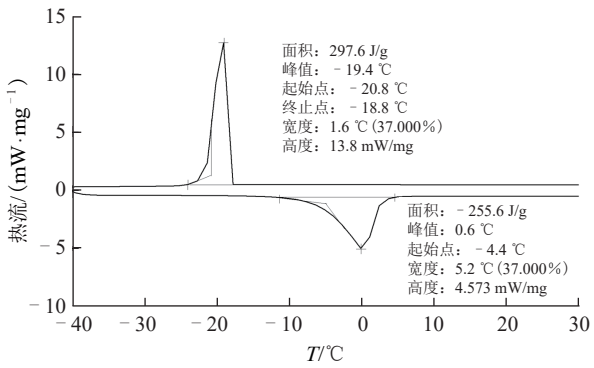


图1 1纳米脂质体混悬液的DSC曲线

Fig.1 DSC Curve of **1** Nanoliposome Suspension

2.3 评价指标的检测方法

2.3.1 粒径及粒度分布

参照《中华人民共和国药典》2020年版（ChP 2020）和盐酸多柔比星脂质体、两性霉素B脂质体等上市脂质体制剂的质量标准，本研究规定了**1**纳米脂质体的粒径范围（表2）。

表2 对1纳米脂质体粒径的规定

Tab.2 Specification of Particle Size for **1** Nanoliposomes

阶段	限定粒径范围/nm	多分散性指数(PDI)限度
冻干前	80～100	≤0.15
冻干品复溶后	90～110	≤0.20

采用动态光散射（DLS）技术测定**1**纳米脂质体的粒径及其分布。取冻干注射剂1瓶，用灭菌注射用水复溶为**1**纳米脂质体混悬液，精密量取该混悬液90 μL于7 mL西林瓶中，加入水相3 mL，稀释得待测样品。测试条件：激光器He/Ne（λ=632.8 nm）；温度25 ℃；折射角173°；折射指数1.343；黏度1.184 mPa·s。

2.3.2 含量和包封率

1纳米脂质体冻干注射剂中的**1**含量采用HPLC法进行测定，包封率采用离心-微孔滤膜过滤法[8]测定。

HPLC色谱条件：色谱柱 Ultimate® XB-C_{18}柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 乙腈和水（体积比80 ∶ 20），等度洗脱；柱温（30±5）℃；检测波长230 nm；流速1 mL/min；进样量20 μL。

2.3.3 水分和乙醇残留量

水分含量参考ChP 2020四部通则0832，采用卡尔费休法测量。乙醇残留量参考ChP 2020四部通则0861，采用GC法测量。

GC色谱条件：色谱柱 毛细管柱（30 m×0.32 mm×1.0 μm，固定液为100% PEG 20 M或极性相近的溶剂）；升温程序（起始温度为60 ℃，维持5 min，以20 ℃/min的速率升温至200 ℃，维持2 min）；进样口温度200 ℃；检测器温度250 ℃；检测器 氢火焰离子化检测器；顶空平衡温度80 ℃；平衡时间30 min；载气 氮气；柱流速1.5 mL/min；分流比20 ∶ 1；进样量 2 mL。

2.4 冻干保护剂的选择及其用量

冻干过程中会产生冰晶而破坏脂质体结构[9—10]。通常，为了保护脂质体的结构，会加入冻干保护剂，如海藻糖、蔗糖、乳糖、甘露醇等[11—12]。前期研究表明，甘露醇作为冻干保护剂时保护效果较差、

表1 初始冻干程序

Tab.1 Initial Lyophilization Procedure

阶段	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
温度/℃	－40	－40	－30	－20	－15	－15	－10	0	10	20	20	25
升温时间/min	20	0	60	60	60	0	60	60	60	60	0	60
恒温时间/min	300	20	60	60	60	1 260	60	60	60	60	840	1 000
真空度/Pa	—	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13

粒子易聚集；乳糖作为冻干保护剂时的保护效果与蔗糖相近，但部分患者的乳糖耐受性较差；海藻糖属于注射级辅料，作为冻干保护剂时保护效果也较好，但价格较高。综上所述，本研究选用蔗糖为冻干保护剂，以冻干产品的外观、水分、复溶再分散时间（$t_{再分散}$，指冻干产品完全溶解所用时间）为评价指标，考察蔗糖与磷脂的质量比对冻干产品质量的影响。结果如表 3 所示。

表 3　冻干保护剂用量对冻干纳米脂质体质量的影响

Tab.3　Effect of Lyophilized Protective Agent Dosage on the Quality of Lyophilized Nanoliposomes

$m_{糖}/m_{脂}$	复溶前外观	$t_{再分散}$/s	水分/%
2.5	疏松、白色块状物，表面塌陷，呈花篮状或冒泡	20	未考察
5.0	紧贴瓶壁的白色圆柱形疏松块状物，表面平整	20	0.9
7.5	紧贴瓶壁的白色圆柱形疏松块状物，表面平整	20	2.5

可见，当 $m_{糖}/m_{脂}$=5.0 或 7.5 时，冻干产品表面平整、无塌陷，但 $m_{糖}/m_{脂}$=7.5 时，产品中水分含量较高，约为 $m_{糖}/m_{脂}$=5.0 时产品的 3 倍，因此，选择 $m_{糖}/m_{脂}$=5.0 进行后续研究。

2.5　料液装量优化

采用析因设计法，以冻干产品的外观、**1** 含量（**1** 含量规格分别为 10、15、20、30 mg）、水分含量、$t_{再分散}$，以及产品复溶后在室温和 4 ℃放置 24 h 的稳定性（粒径、PDI、pH 值）为评价指标，考察料液中 **1** 质量浓度（*A*）、料液与西林瓶的体积比（*B*）、西林瓶规格（*C*）对冻干产品质量的影响。析因设计法的因素和水平如表 4 所示，试验设计方案及试验结果如表 5 所示，稳定性试验结果如表 6 所示。

表 4　析因设计的因素和水平

Tab.4　Factors and Levels for Factorial Design

水平	*A*/(mg·mL^{-1})	*B*	*C*/mL
1	2	1∶2	15
2	3	1∶3	20
3	—	1∶4	30

试验结果显示，各处方制得的 **1** 纳米脂质体冻干注射剂的外观均为紧贴瓶壁的白色圆柱形疏松块状物，表面平整、无塌陷，且水分含量相近，在室温和 4 ℃条件下放置 24 h 的稳定性良好。当 *A*= 3 mg/mL 时，冻干产品中 **1** 含量约 90%，而当 *A*= 2 mg/mL 时，冻干产品中 **1** 含量为 98%～ 100%，说明当料液中 **1** 质量浓度较大时，冻干产品中 **1** 含量较低。而西林瓶中料液装量增加、液面高度增加会延长升华干燥时间，因此，最终确定使用 20 或 30 mL 规格的西林瓶，**1** 规格为每瓶 20 mg，料液与瓶的体积比分别为 1 ∶ 2、1 ∶ 3。

2.6　冻干工艺优化

冷冻干燥过程包括预冻和干燥[6—7]。为了降低能耗、提高效率，本研究从预冻阶段降温速度、一次干燥温度、二次干燥温度 3 个方面对冻干工艺进行研究与优化，以缩短冻干周期。

2.6.1　预冻阶段

预冻阶段中料液的冻结程度或状态会直接影响后续干燥过程的效率和产品质量[13—14]。依据 **1** 纳

表 5　试验方案及部分评价指标结果

Tab.5　Experimental Scheme and Results of Some Evaluation Indicators

处方编号	*A*/(mg·mL^{-1})	*B*	*C*/mL	**1** 含量规格/mg	**1** 含量(标示量%)/%	乙醇残留量/%	水分/%	$t_{再分散}$/s
1	2	1∶2	15	15	98.72	0.39	1.1	20
2	2	1∶2	20	20	98.36	0.36	0.9	20
3	2	1∶2	30	30	98.46	0.38	1.0	20
4	3	1∶2	20	30	89.62	0.40	1.0	20
5	2	1∶3	15	10	99.27	0.39	0.8	20
6	2	1∶3	30	20	99.67	0.44	0.9	20
7	3	1∶3	15	15	90.25	0.39	1.3	20
8	3	1∶3	30	30	90.84	0.38	0.8	20
9	2	1∶4	20	10	99.80	0.38	0.9	20
10	2	1∶4	30	15	99.24	0.33	1.2	20
11	3	1∶4	20	15	91.55	0.33	1.3	20

表 6 料液装量对冻干注射剂稳定性的影响

Tab.6 Effect of the Feed Liquid Filling Volume on Stability of the Lyophilized Injection

处方编号	取样时间/h	室温			4 ℃		
		粒径/nm	PDI	pH 值	粒径/nm	PDI	pH 值
1	0	93.88	0.123	7.45	94.54	0.108	7.35
	8	89.01	0.083	7.46	90.38	0.079	7.33
	24	97.62	0.142	7.20	91.39	0.075	7.41
2	0	88.39	0.077	7.39	89.98	0.051	7.43
	8	105.50	0.185	7.58	95.36	0.115	7.38
	24	88.55	0.062	7.38	92.90	0.090	7.37
3	0	93.57	0.075	7.44	97.94	0.033	7.34
	8	109.60	0.194	7.63	105.10	0.147	7.41
	24	93.38	0.068	7.36	100.30	0.076	7.43
4	0	107.10	0.163	7.32	97.55	0.139	7.36
	8	93.40	0.060	7.53	92.30	0.066	7.43
	24	102.30	0.124	7.32	92.91	0.074	7.41
5	0	86.36	0.091	7.15	86.07	0.077	7.17
	8	86.44	0.105	6.87	85.47	0.086	7.18
	24	86.98	0.100	7.12	86.32	0.102	7.15
6	0	92.17	0.112	7.15	93.99	0.133	6.93
	8	88.84	0.195	6.82	87.73	0.192	7.13
	24	93.55	0.123	7.12	93.27	0.102	7.20
7	0	87.38	0.073	7.45	88.68	0.088	7.43
	8	87.87	0.092	7.37	88.23	0.099	7.40
	24	87.91	0.065	7.43	86.67	0.069	7.38
8	0	88.85	0.090	7.51	87.67	0.068	7.48
	8	87.91	0.066	7.46	88.00	0.087	7.40
	24	87.69	0.057	7.47	88.25	0.054	7.40
9	0	104.80	0.155	7.49	88.39	0.097	7.40
	8	88.28	0.067	7.42	89.53	0.090	7.40
	24	88.75	0.087	7.14	94.64	0.137	7.40
10	0	89.93	0.067	7.28	91.95	0.086	7.39
	8	100.70	0.177	7.40	92.79	0.094	7.43
	24	89.48	0.074	7.12	94.05	0.098	7.46
11	0	88.26	0.073	7.33	89.09	0.058	7.34
	8	87.34	0.077	7.41	88.91	0.072	7.41
	24	87.32	0.070	7.43	88.63	0.066	7.43

米脂质体混悬液的共晶点，将预冻温度设为 －40 ℃。采用电阻法判断样品的冻结程度，考察隔板从室温降到 －40 ℃所用时间（t_1）对冻干脂质体产品质量的影响。

试验结果表明，当 t_1=20 min 时，冻干产品的颗粒较细腻；当 t_1=90 min 时，冻干产品的颗粒较粗糙；于 －40 ℃保持 3 h 时，电阻值较大，此时 **1** 纳米脂质体混悬液完全冻实，继续在 －40 ℃保持 2 h 后，进入升华干燥阶段。由于粒子细腻的冻干脂质体产品引湿性较强，不利于保存；并且降温速度过快易形成较多粒径较小的冰晶而损伤脂质体膜，而慢速降温则可形成较大的冰晶，可避免破坏脂质体膜[15—16]。此外，缩短隔板降温时间对冻干机的性能要求较高，且在干燥过程中需要更多的能量才能达到预期的干燥效果，因此设置 t_1=90 min。

综上所述，优化后预冻阶段工艺参数为：预冻温度 －40 ℃，t_1=90 min，隔板降温到 －40 ℃时，保温时间（t_2）=5 h。

2.6.2 一次干燥阶段

一次干燥又称升华干燥，主要目的是除去产品中的非结合水。该阶段的主要工艺参数是升华干燥温度和干燥时间（$t_{升}$，指从一次干燥开始到水线完全消失及之后继续保温 2 h 的总时长）[14]。依据 **1** 纳米脂质体混悬液的共熔点，分别选择 －15 和 －10 ℃作为升华干燥温度进行考察。设计一次干燥方案如表 7 所示，记录水线消失时间，并对制得的冻干产品的外观、$t_{再分散}$、水分含量等指标进行评价。结果显示，方案①所得冻干产品呈白色花篮状，表面塌陷严重，不符合 **1** 纳米脂质体冻干粉的外观要求，且复溶性差；而方案②所得 **1** 纳米脂质体冻干粉紧贴瓶壁，呈疏松的白色圆柱形块状物，表面平整，其水线消失时间为 12 h，$t_{再分散}$=20 s，水分含量为 1.0%，贮存稳定性良好，且包封率较高（表 8）。因此，本研究将升华干燥温度设为 －15 ℃，$t_{升}$设为 14 h。

2.6.3 二次干燥阶段

二次干燥又称解析干燥，主要目的是去除在一次干燥中无法去除的、未冻结的部分吸附水和结合水[13—14]，其干燥效果主要受干燥温度影响。由于实验室日常温度约为 24 ℃，为了避免出箱温度低于环境温度而使空气中的水分凝结在产品上导致产品吸湿，将二次干燥温度设置在 24 ℃以上。同时，结合辅料的热稳定性，考察了二次干燥温度分别为 25 和 28 ℃对冻干产品质量的影响。记录干燥终点，并对冻干产品的外观、$t_{再分散}$、水分含量及室温（放置 24 h）和 4 ℃（放置 48 h）下稳定性（粒径、PDI、pH 值）进行评价。升压测试中，二次干燥时间（$t_{解}$）为从二次干燥开始到干燥箱内压力很低且达稳定状态（即关掉抽气机和前箱的阀门后，压力上

升速度不超过 10 Pa/min）的时间。

结果如表 9 所示，二次干燥温度为 25 或 28 ℃时，所得冻干产品的外观均为紧贴瓶壁的白色圆柱形疏松块状物，表面平整、无塌陷，且 $t_{再分散}$均为 20 s，水分含量均低于 2%，其他各项评价指标均相近且表现良好。二次干燥温度为 25 和 28 ℃时，到达干燥终点所需时间分别为 61.50 和 48.83 h，$t_{解}$分别为 40.67 和 28.00 h。为了节约时间、减少能耗，本研究将解析干燥温度设为 28 ℃，解析干燥时间设为 28 h，冻干全程总耗时为 48.83 h。

2.6.4　优化冻干工艺

综上所述，优化冻干工艺为：蔗糖与磷脂的质量比为 5.0；脂质体中 **1** 质量浓度为 2 mg/mL，规格为每瓶 20 mg；西林瓶选用 20 或 30 mL 的规格，当西林瓶规格为 20 mL 时，料液与西林瓶体积比为 1 ∶ 2，当西林瓶规格为 30 mL 时，料液与西林

表 7　一次干燥的冻干参数设计

Tab.7　Design of Lyophilization Parameters for the Primary Drying

阶段	方案①			方案②			真空度/Pa
	温度/℃	升温时间/min	恒温时间/min	温度/℃	升温时间/min	恒温时间/min	
1	－40	90	300	－40	90	300	—
2	－40	0	20	－40	0	20	13
3	－30	60	60	－30	60	60	13
4	－20	60	60	－20	60	60	13
5	－10	60	1 260	－15	60	1 260	13
6	0	60	60	－10	60	60	13
7	10	60	60	0	60	60	13
8	20	60	960	10	60	60	13
9	25	60	1 000	20	60	960	13
10	—	—	—	25	60	1 000	13

表 8　方案②制备的冻干注射剂的贮存稳定性及包封率

Tab.8　Storage Stability and Encapsulation Efficiency of Lyophilized Injection Prepared by Scheme ②

取样时间/h	室温			4 ℃			包封率[1)]/%（n=5）
	粒径/nm	PDI	pH值	粒径/nm	PDI	pH值	
0	81.17	0.096	7.43	81.12	0.079	7.42	—
6	86.84	0.074	7.52	90.81	0.076	7.38	—
12	86.53	0.068	7.63	92.05	0.102	7.41	—
24	84.83	0.075	7.49	86.02	0.094	7.58	98.60（0.002）
48	—	—	—	81.17	0.096	7.42	98.55（0.001）

注：[1)] 括号内为 RSD 数据。

表 9　二次干燥温度对冻干纳米脂质体质量的影响

Tab.9　Effect of the Secondary Drying Temperature on Quality of the Lyophilized Nanoliposomes

二次干燥温度/℃	取样时间/h	室温			4 ℃			水分[1)]/%（n=5）	到达干燥终点所需时间[1)]/h（n=5）
		粒径/nm	PDI	pH值	粒径/nm	PDI	pH值		
25	0	76.36	0.091	6.87	72.17	0.112	6.82	1.3（0.37）	61.50（0.24）
	6	76.44	0.105	7.12	78.84	0.195	7.12		
	12	92.59	0.217	7.09	73.55	0.123	7.07		
	24	76.98	0.100	7.19	78.12	0.162	6.97		
	48				72.84	0.124	7.25		
28	0	99.05	0.086	7.21	99.98	0.078	7.18	1.0（0.17）	48.83（0.36）
	6	98.38	0.088	7.24	100.30	0.080	7.22		
	12	100.60	0.079	7.12	101.00	0.088	7.23		
	24	100.80	0.077	7.20	100.30	0.083	7.19		
	48				99.87	0.078	7.14		

注：[1)] 括号内为 RSD 数据。

瓶体积比为 1 ∶ 3；采用阶段式升温，冻干曲线如图 2 所示，预冻温度为 －40 ℃，隔板降温时间为 90 min，－40 ℃时保温 5 h；一次干燥温度为 －15 ℃，一次干燥时间为 14 h；二次干燥温度为 28 ℃，二次干燥时间为 28 h。

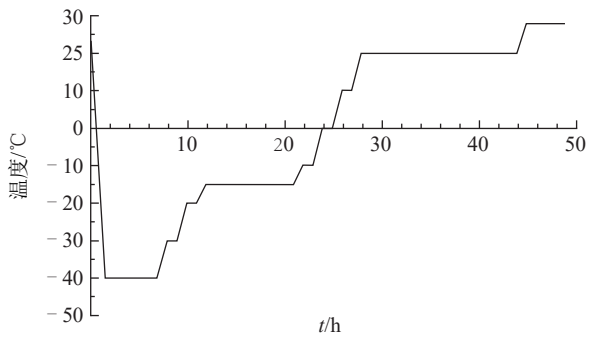


图 2 优化的冻干曲线

Fig.2 The Optimal Lyophilization Curve

2.7 冻干工艺的重现性及重复性

精密称取 100 倍处方量的原辅料，照“**2.1.1**”项下的方法，制备 3 批 **1** 纳米脂质体混悬液。将每批脂质体混悬液等分为 3 份，分别使用原位冻干机、中试型冻干机、压盖型冷冻干燥机按“**2.6.4**”项下工艺参数进行灌装、冻干，得到不同冻干机生产的 **1** 纳米脂质体冻干注射剂。

依据“**2.2**”项下的方法，分别考察所得冻干产品的外观、主药含量、包封率、水分含量、乙醇残留量、$t_{再分散}$和贮存稳定性（室温放置 24 h 及 4 ℃放置 48 h 的粒径、PDI 变化）。结果显示，3 种冻干机制得的 9 批冻干产品外观一致，均表现为紧贴瓶壁的白色圆柱形疏松块状物，表面平整、无塌陷；均可实现迅速复溶，$t_{再分散}$均为 20 s。使用不同厂家的冻干机对同一批次样品进行冻干或使用同一厂家的冻干机对不同批次样品进行冻干时，所得 **1** 脂质体冻干注射剂的各项评价指标均表现良好，批间差异较小（表 10），提示本研究建立的优化冻干工艺具有良好的重现性和重复性。

2.8 初步稳定性研究

取任意 2 批冻干产品，各 18 瓶，每批分成 3 份，每份 6 瓶，分别于高温［(40±2) ℃，相对湿度 (75±5) %］、强光照［(4 500±500) lx；辐照强度 90 μW/cm^2］和室温条件下保存。高温和强光照试验组分别于 0、5 和 10 d 取样，每次取样 2 瓶，模拟影响因素试验；室温试验组分别于 2、4、6 个月取样，每次取样 2 瓶，模拟加速试验。评价指标为复溶前性状、$t_{再分散}$、复溶后脂质体混悬液的澄明度、粒径、PDI、pH 值、包封率。试验结果如表 11 所示。

表 10 冻干产品的各项指标 [1)]

Tab.10 The Indexes of Lyophilized Products[1)]

批次	取样时间/h	室温		4 ℃		主药含量/%	包封率/%	水分含量/%	乙醇残留量/%
		粒径/nm	PDI	粒径/nm	PDI				
1	0	76.95/80.07/77.53	0.087/0.103/0.070	78.86/79.22/78.40	0.065/0.100/0.092	99.7/99.5/99.6	97.4/97.3/97.6	1.20/1.00/1.00	0.35/0.32/0.37
	6	73.23/79.30/78.28	0.065/0.045/0.061	80.15/80.65/83.70	0.048/0.098/0.071				
	12	79.57/79.62/77.14	0.104/0.056/0.068	77.17/79.27/78.40	0.051/0.066/0.083				
	24	74.77/78.51/79.32	0.073/0.044/0.082	77.69/81.82/82.30	0.061/0.089/0.067				
	48			74.52/76.54/75.70	0.059/0.057/0.048				
2	0	76.10/79.20/78.95	0.093/0.049/0.100	74.33/76.20/79.40	0.060/0.071/0.072	99.3/99.7/99.6	97.4/98.2/98.8	0.96/1.30/1.10	0.39/0.43/0.35
	6	77.17/77.50/77.92	0.078/0.059/0.067	78.67/77.37/80.40	0.087/0.064/0.070				
	12	72.17/77.87/75.43	0.091/0.044/0.066	77.93/77.90/73.50	0.056/0.069/0.061				
	24	78.84/76.74/83.47	0.105/0.054/0.051	85.59/78.47/74.20	0.065/0.078/0.082				
	48			77.28/77.34/79.10	0.081/0.077/0.102				
3	0	76.36/77.95/82.19	0.088/0.065/0.057	76.78/77.32/85.90	0.056/0.070/0.093	99.4/99.9/99.7	97.2/98.2/98.5	0.96/0.90/1.20	0.34/0.41/0.34
	6	76.44/78.81/82.28	0.079/0.090/0.070	77.31/75.05/77.10	0.076/0.054/0.078				
	12	75.50/77.17/82.32	0.058/0.056/0.052	77.95/82.00/75.20	0.072/0.061/0.071				
	24	76.13/78.02/77.69	0.078/0.073/0.062	77.35/74.83/72.50	0.073/0.045/0.065				
	48			76.99/76.53/72.50	0.076/0.048/0.057				

注：[1)]“/”分隔开的数据从左到右依次为原位冻干机、中试型冻干机、压盖型冷冻干燥机所得产品的测定结果。

表 11　影响因素试验及加速试验结果

Tab.11　Results of Influence Factor Test and Accelerated Test

试验条件	取样时间	批1				批2				$t_{再分散}$	澄清度
		粒径/nm	PDI	pH值	包封率/%	粒径/nm	PDI	pH值	包封率/%		
高温	0 d	78.17	0.092	7.15	99.70	76.98	0.100	7.15	96.69	8 s 注完，20 s 内完全复溶	无浑浊
		72.84	0.124	6.82	98.04	81.85	0.104	6.87	97.69		
	5 d	75.91	0.089	6.58	96.57	78.62	0.071	6.56	96.33		略浑浊
		74.89	0.113	6.44	99.84	80.74	0.109	6.60	97.78		
	10 d	77.38	0.116	6.72	92.03	114.80	0.243	6.77	99.13	9 s 注完，40 s 以上才可完全复溶	严重浑浊
		77.45	0.089	6.71	95.50	81.77	0.105	6.81	99.38		
强光照	0 d	78.17	0.162	7.15	99.70	76.98	0.100	7.15	96.69	8 s 注完，20 s 内完全复溶	无浑浊
		72.84	0.124	6.82	98.04	81.85	0.174	6.87	97.69		
	5 d	71.83	0.094	6.39	98.11	75.42	0.092	6.62	97.61		略浑浊
		72.61	0.103	6.49	98.72	76.89	0.071	6.55	97.91		
	10 d	98.39	0.259	6.78	98.2	105.20	0.238	6.76	94.96	9 s 注完，40 s 以上才可完全复溶	严重浑浊
		74.97	0.109	6.76	95.82	79.68	0.135	6.82	93.81		
室温	0个月	78.17	0.092	7.15	99.7	76.98	0.100	7.15	96.69	8 s 注完，20 s 内完全复溶	无浑浊
		72.84	0.124	6.82	98.04	81.85	0.104	6.87	97.69		
	2个月	79.19	0.093	7.13	98.70	78.16	0.098	7.23	96.96		
		77.55	0.087	7.21	98.84	78.88	0.077	7.21	98.69		
	4个月	77.29	0.078	7.23	98.70	78.26	0.073	7.17	98.19		
		77.66	0.074	7.14	98.70	79.09	0.088	7.23	98.91		
	6个月	79.24	0.080	7.21	97.84	78.91	0.072	7.20	97.19		
		78.46	0.099	7.23	97.70	78.63	0.096	7.15	98.11		

结果表明，在高温和光照条件下贮存 10 d 或室温条件下贮存 6 个月时，冻干产品的外观几乎没有变化，均表现为紧贴瓶壁的偏粉末样乳白色块状物，表面平整、无塌陷。高温或光照条件下放置 10 d 时，冻干产品的粒径、pH 值和包封率基本无明显变化，但是随着时间的延长，冻干产品的 $t_{再分散}$ 延长，复溶后脂质体混悬液澄明度明显降低，脂质体的其他评价指标变化较小；在室温放置 6 个月时，产品各项指标几乎没有变化。可见，制得的 **1** 纳米脂质体冻干注射剂贮存稳定性良好。

3　讨论

物料中原有水分含量、冷凝器能量和温度是影响冷冻干燥速度的主要因素。其中，物料中原有水分含量可通过所装料液的液面高度、质量浓度和物料性质来调控；冷凝器能量受冷冻干燥机性能影响。研究表明[9]，当冻干产品中水分含量大于 2%时，不利于产品的长期贮存；适当升高干燥温度可缩短冻干时间，既高效又可减少能耗。基于此，本研究对 **1** 纳米脂质体混悬液的冻干工艺进行优化，所得的优化冻干工艺有效缩短了冻干时间（由 72.33 h 缩短为 48.83 h），制得的冻干产品中水分含量及乙醇残留量均符合药典要求，并且该优化冻干工艺的适用批量可达每批 1 000 支。然而，该冻干工艺的最大批量仍需要进一步提升，需要继续试验以获取更全面的数据，供 **1** 纳米脂质体冻干注射剂的工业化生产参考。

参考文献：

[1] SUN B Y, STRAUBINGER R M, LOVELL J F. Current taxane formulations and emerging cabazitaxel delivery systems [J]. *Nano Res*, 2018, **11**(10): 5193-5218.

[2] AL-MANSOURI L, GURNEY H. Clinical concepts for cabazitaxel in the management of metastatic castration-resistant prostate cancer [J]. *Asia Pac J Clin Oncol*, 2019, **15**(6): 288-295.

[3] 刘振华. 前列腺癌治疗的最新进展: 肿瘤精准治疗时代下转移性去势抵抗性前列腺癌患者的管理[J]. 国际肿瘤学杂志, 2021, **48**(11): 702-704.

[4] NUHN P, DE BONO J S, FIZAZI K, *et al*. Update on systemic prostate cancer therapies: management of metastatic castration-resistant prostate cancer in the era of precision oncology [J]. *Eur Urol*, 2019, **75**(1): 88-89.

（下转第1264页）

[9] THOR S, VETTER T, MARCAL A, *et al*. EMA-FDA parallel scientific advice: optimizing development of medicines in the global age [J]. *Ther Innov Regul Sci*, 2023, **57**(4): 656-661.

[10] 国家药品监督管理局药品审评中心. 药品研发与技术审评沟通交流管理办法[EB/OL]. (2018-09-30)[2022-10-07]. https://www.cde.org.cn/main/policy/view/e18ffdbad3bc73381c359eb454790568.

[11] FDA. FDA product-specific guidances: lighting the development pathway for generic drugs [EB/OL]. (2021-05-05)[2022-10-07]. https://www.fda.gov/drugs/fda-product-specific-guidances-lighting-development-pathway-generic-drugs-05052021-05052021.

[12] FDA. Upcoming Product-specific guidances for generic drug product development [EB/OL]. (2022-08-17)[2022-10-07]. https://www.fda.gov/drugs/guidances-drugs/upcoming-product-specific-guidances-complex-generic-drug-product-development.

[13] 李　培. 国内药品注册沟通交流制度介绍与思考[J]. 中国药事, 2021, **35**(12): 1340-1346.

[14] FDA. CDER conversation: OGD global affairs program, one year progress report of generic drug cluster [EB/OL]. (2022-09-21)[2022-10-07]. https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/cder-conversation-ogd-global-affairs-program-one-year-progress-report-generic-drug-cluster.

[15] 国家药品监督管理局. 《药品注册管理办法》政策解读[EB/OL]. (2020-03-31)[2022-10-07]. https://www.nmpa.gov.cn/zhuanti/ypzhcglbf/ypzhcglbfzhcjd/20200331144901137.html.

[16] 国家药品监督管理局. 2017年度药品审评报告[EB/OL]. (2018-03-22)[2022-10-07]. https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/gzwj/gzwjyp/20180322103801253.html.

[17] PHILIP E C, J R. The world health organization prequalification programme—playing an essential role in assuring quality medical products [J]. *Int Health*, 2019, **11**(2): 79-80.

（上接第1240页）

[5] 张　丽. 卡巴他赛冻干脂质体的制备及药代动力学研究[D]. 江苏: 江苏大学硕士学位论文, 2017.

[6] 毕金峰, 冯舒涵, 金　鑫, 等. 真空冷冻干燥技术与产业的发展及趋势[J]. 核农学报, 2022, **36**(2): 414-421.

[7] 刘松雨, 黄勤挽, 吴纯洁, 等. 冷冻干燥技术在中药领域的研究进展[J]. 中草药, 2022, **53**(3): 930-936.

[8] 柳宇红, 姜　宇, 郝贵周, 等. 卡巴他赛脂质体包封率的测定[J]. 中国医药工业杂志, 2022, **53**(3): 373-377.

[9] 徐　缓, 尹朋朋, 于　涛, 等. 聚(2-乙基-2-噁唑啉)修饰超氧化物歧化酶模拟物脂质体冻干制剂的制备[J]. 中国药房, 2013, **24**(1): 57-60.

[10] 陆　倩, 国小利, 杨雅欣, 等. 木犀草素脂质体冻干工艺优化及其对LX-2细胞的影响[J]. 生物技术, 2022, **32**(5): 598-604.

[11] 耿锟锟, 熊　非, 朱家壁, 等. 用于药物制剂的冷冻干燥技术及相关影响因素[J]. 药学进展, 2011, **35**(3): 104-109.

[12] 吴颖杰, 耿梦缘, 汪　晶, 等. 不同冻干保护剂在外泌体储存中的研究[J]. 天津医科大学学报, 2022, **28**(4): 353-359.

[13] 姚　静, 张自强. 药物冻干制剂技术的设计及应用[M]. 第2版. 北京: 中国医药科技出版社, 2007.

[14] 王洪伟, 田　兵, 李　磊, 等. 注射用还原型谷胱甘肽冻干工艺的优化[J]. 中国医药工业杂志, 2021, **52**(1): 94-98.

[15] 邓礼荷, 韦敏燕, 汤晨懿, 等. 冻干工艺及保护剂对羟基喜树碱脂质体质量的影响[J]. 中国医药工业杂志, 2012, **43**(1): 30-34.

[16] LIU Y, ZHANG Z Y, HU L D. High efficient freeze-drying technology in food industry [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2022, **62**(12): 3370-3388.