

星点设计-效应面法优化托吡卡胺温敏型原位凝胶处方

李曼*,张恩娟*(第三军医大学,重庆 400038)

中图分类号 R944.1;R988.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)45-4273-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.45.18

摘要 目的:优化托吡卡胺眼用温敏型原位凝胶的制备工艺。方法:采用星点设计法考察温敏材料泊洛沙姆407和泊洛沙姆188质量分数对指标相变温度的影响,并以相变温度(T_1)和模拟泪液稀释后的相变温度(T_2)为指标对结果进行模型拟合;采用效应面法优化处方并进行验证,测定300 min内的体外累积释放度。结果:泊洛沙姆407和泊洛沙姆188质量分数分别为20%、5%,以 T_1 和 T_2 为指标进行多元线性回归的相关系数分别为0.918 7、0.889 9;效应面法优化处方的实测值与预测值偏差绝对值均<5%,300 min内的体外累积释放度为65%。结论:星点设计-效应面法所建立的模型实现了该眼用温敏型原位凝胶的处方优化,数学模型预测性良好。

关键词 托吡卡胺;温敏型原位凝胶;星点设计;效应面法

Optimization of Tropicamide Ophthalmic Thermosensitive in Situ Gel by Central Composite Design-response Surface Methodology

LI Man, ZHANG En-juan(Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the preparation technology of Tropicamide ophthalmic thermosensitive in situ gel. METHODS: Central composite design was used to observe the influence of the amount of P407 and P188 on the phase-transition temperature; the multi-linear regression model was fitted using phase-transition temperature (T_1) and phase-transition temperature of samples after diluted with simulated tears (T_2) as index. Optimized formulation was selected and validated by response surface methodology, and accumulative release rate *in vitro* was determined within 300 min. RESULTS: The amount of P407 and P188 were 20% and 5%; the correlation coefficient of multi-linear regression model were 0.918 7 and 0.889 9 using T_1 and T_2 as index, respectively. The absolute values of deviations between measured value and predicted value were all lower than 5%, and accumulative release rate *in vitro* was 65% within 300 min. CONCLUSIONS: The optimization of the ophthalmic thermosensitive in situ gel formulation can be achieved by central composite design-response surface methodology with good estimation.

KEY WORDS Tropicamide; Thermosensitive in situ gel; Central composite design; Response surface methodology

托吡卡胺(Tropicamide)为抗胆碱药,其睫状肌麻痹作用起效快速、瞳孔恢复时间短、副作用少^[1]。托吡卡胺滴眼液临床用于散瞳和调节麻痹,给药后一般只有5%的剂量被吸收进入眼内,其余剂量通过结膜和鼻泪管被吸收到全身血液循环^[2],因此其作用持续时间短、生物利用度低,且需频繁给药,容易造成患者顺应性差。温敏型原位凝胶^[3-4](Thermosensitive in situ gel, TG)在室温下为高黏液体状态,以液态形式给药后在生理温度下发生相变,形成非化学交联的半固体状态。TG与黏膜组织亲和力强,眼部滞留时间长,具有一定的缓控释能力^[5],且使用方便、患者顺应性好。为便于储存, TG在室温下的相变温度应>25℃,同时,调节温敏材料含量使所制备的TG相变温度接近于眼表温度(34℃)。本试验以常用温敏材料泊洛沙姆407(P407)和泊洛沙姆188(P188)为基质,单因素试验选取了重要的影响因素,采用星点设计-效应面法优选处方,制备了符合眼部应用要求的缓释托吡卡胺TG。

* 硕士研究生。研究方向:药剂学。电话:023-68774770。E-mail:liman89@163.com

主任药师,硕士研究生导师。研究方向:药剂学与药事管理学。电话:023-68774721。E-mail:enjuan@sohu.com

1 材料

1.1 仪器

电子天平、PB-10型pH计(德国赛多利斯公司);HWS24型水浴锅(上海一恒科技有限公司);精密温度计(常州市新华仪表厂,精度:0.01℃);Waters 600型高效液相色谱仪、Waters 2487型紫外检测器(美国Waters公司);THZ-82气浴恒温振荡器(江苏金坛市金城国胜实验仪器厂)。

1.2 药品与试剂

托吡卡胺原料药(湖北潜江制药股份有限公司,批号:20110702,纯度:>99.6%);托吡卡胺对照品(中国食品药品检定研究院,批号:101019-200801,纯度:99.7%);药用级P407(Pluronic F127,批号:WPDH630B)、药用级P188(Pluronic F68,批号:WPOG565B)均来自德国BASF公司;羟丙甲纤维素(HPMC K4M,平均黏度:3 785 mPa·s,批号:XT070224L1,药用级;HPMC E50,平均黏度:48 mPa·s,批号:PD307196,药用级;陶氏化学太平洋有限公司);辛烷磺酸钠、甲醇为色谱纯,氯化钾、氯化钠、碳酸氢钠、二水氯化钙、磷酸均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 托吡卡胺TG的制备

参考托吡卡胺滴眼液的临床应用规格^[6],制备托吡卡胺TG规格为0.25%(5 ml:12.5 mg)。

根据以下试验中制备TG中所需P407或(和)P188的量,称取P407和P188,均匀撒于超纯水(若含有渗透压调节剂和抑菌剂,则将温敏材料撒于已溶有0.9%氯化钠和0.03%尼泊金乙酯的超纯水)面上,置于4℃冰箱放置24 h,使其充分溶胀,得到澄清、分散均匀的溶液,即得空白TG。取空白TG 10 ml,加入托吡卡胺原料药粉末25 mg,搅拌至完全溶解,即得托吡卡胺TG。

2.2 模拟泪液的制备

称取氯化钠6.78 g、碳酸氢钠2.18 g、氯化钾1.38 g、二水氯化钙0.084 g至烧杯,加超纯水溶解并转移至1 000 ml量瓶中,以超纯水稀释至刻度,即得。

2.3 相变温度的测定

取1 ml制备好的TG,采用试管倒置法^[7]测定相变温度。每个样品连续测定5次,取平均值(T_1)。测定模拟泪液稀释后的TG的相变温度(T_2)时,将样品、模拟泪液按体积比40:7^[8]充分混合,再按上述方法测定 T_2 。

2.4 泊洛沙姆质量分数对TG相变温度的影响

2.4.1 P407质量分数对TG相变温度的影响。有研究表明当P407质量分数<15%时,溶液无成胶能力^[9]。因此,试验中选择的P407质量分数为16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%,分别制备托吡卡胺质量浓度为0.25%的溶胶,并按“2.3”项下方法测定相变温度,结果详见图1。

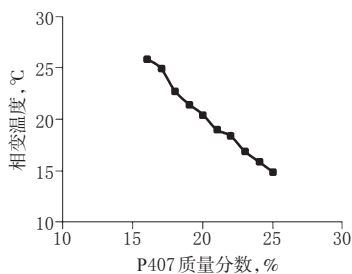


图1 P407不同质量分数对溶胶相变温度的影响

Fig 1 Influence of different P407 mass fraction on the phase-transition temperatures of sol

图1结果表明,溶胶加热后形成均匀TG,且具有可逆性;P407质量分数与相变温度之间具有浓度依赖性,相变温度随P407质量分数的升高而降低。但以上所制备TG的相变温度均过低,室温下除16%P407外其他均为半固体状态,不符合TG的眼部应用要求,因此需加入其他辅料以升高相变温度。从经济性考虑,“2.4.2”项下选择P407质量分数为17%、18%、19%进行试验更为合理。

2.4.2 P188质量分数对TG相变温度的影响。固定P407的质量分数分别为17%、18%、19%,每种P407质量分数的溶胶中分别加入质量分数为2%、4%、6%、8%、10%的P188,按“2.3”项下方法测定相变温度,结果详见图2。

图2结果表明,固定P407质量分数,相变温度随P188质量分数的升高而升高。P188的加入升高了TG的相变温度,因此为了得到适合于眼部应用的TG,应将P407与P188配伍使用作为温敏材料。结合本部分所取得的质量分数区间,采用星

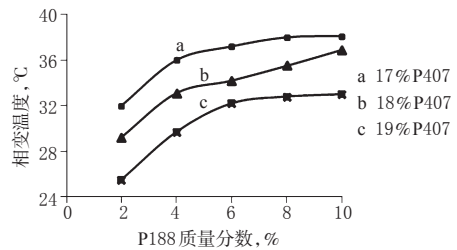


图2 P188不同质量分数对3种P407的溶胶相变温度的影响
Fig 2 Influence of different P188 mass fraction on the phase-transition temperatures of 3 kinds of P407 of sol

点设计-效应面法试验,以期获得较佳配比。

2.5 星点设计-效应面法

预试验分别制备了空白TG和托吡卡胺TG,结果主药的含量对TG相变温度没有影响。且由“2.4”项结果可见,P407质量分数与P188质量分数是影响TG相变温度的重要因素。因此以下采用星点设计-效应面法优化托吡卡胺TG的处方。

2.5.1 试验设计。设P407质量分数为 x ,P188质量分数为 y ,取值范围: x 为16%~24%, y 为0~10%。两个因素的水平代码值和实际操作值由星点设计原理^[10]确定。因素与水平见表1,试验方案见表2。

表1 星点设计因素与水平

Tab 1 Factors and levels of central composite design

因素	水平				
	-1.414	-1	0	1	1.414
P407(x), %	16	17.171	20	22.829	24
P188(y), %	0	1.464	5	8.536	10

表2 星点设计试验方案及效应值($n=5$)

Tab 2 Composite design and response ($n=5$)

编号	P407(x), %	P188(y), %	T_1 , °C	T_2 , °C
1	17.171	8.536	38.66±0.05	44.59±0.02
2	22.829	8.536	25.75±0.08	32.88±0.05
3	22.829	1.464	19.39±0.01	23.36±0.03
4	17.171	1.464	31.83±0.02	38.62±0.04
5	24	5	20.13±0.02	28.08±0.08
6	16	5	43.46±0.16	57.30±0.14
7	20	10	31.46±0.03	37.98±0.03
8	20	0	22.11±0.07	25.11±0.02
9~13	20	5	24.62±0.03	33.06±0.08

2.5.2 模型拟合。采用SPSS 13.0软件,以相变温度(T_1)、经模拟泪液稀释后的相变温度(T_2)为指标对两个因素进行多元线性回归。拟合模型如下,可见模型拟合效果良好。

$$T_1 = 74.270 - 2.578x + 0.934y (r = 0.9187, P < 0.01)$$

$$T_2 = 89.264 - 3.018x + 1.191y (r = 0.8899, P < 0.01)$$

2.5.3 效应面优化。根据“2.5.2”项拟合得到的数学模型,采用Matlab 2011b绘制 T_1 、 T_2 的二维等高线和三维效应面图,结果见图3;并通过叠加的等高线图得到优选处方范围,结果见图4。

图4中两条等高线之间的区域即为符合条件的温敏材料的质量分数范围,即等高线25、34分别从 T_1 、 T_2 等高线中选出,两线之间的范围即为符合温度要求的处方范围。从此范围中选择4个代表性处方19%P407-1%P188、20%P407-3%P188、

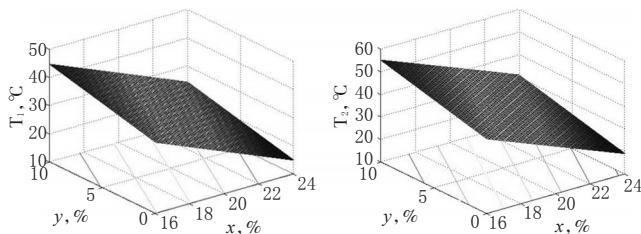


图3 托吡卡胺TG相变温度(T_1/T_2)对P407和P188的三维效应面和二维等高线图(x :P407, m/m ; y :P188, m/m)

Fig 3 Three-dimensional plot and two-dimensional contour plot of Tropicamide TG's phase-transition temperature versus the concentrations of P407 and P188 (x : P407, m/m ; y : P188, m/m)

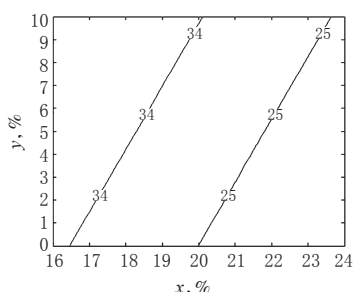


图4 二维等高线叠加图(x :P407, m/m ; y :P188, m/m)

Fig 4 Superimposed two-dimensional contour diagrams (x : P407, m/m ; y : P188, m/m)

21% P407-5.5% P188、22% P407-9% P188, 对应各质量分数制备托吡卡胺TG, 测定 T_1 、 T_2 并进行偏差分析。结果显示各处方预测值和实测值偏差绝对值均 $<5\%$, 表明预测效果良好, 结果见表3。

表3 处方预测值与实测值的验证($n=5$)

Tab 3 Validation of predicted value and measured value ($n=5$)

温度	项目	P407质量分数-P188质量分数			
		19%-1%	20%-3%	21%-5.5%	22%-9%
T_1	预测值, $^{\circ}\text{C}$	26.22	25.51	25.74	25.96
	实测值, $^{\circ}\text{C}$	26.21 ± 0.06	25.52 ± 0.19	25.78 ± 0.08	25.91 ± 0.10
	偏差, %	0.21 ± 0.21	-0.04 ± 0.74	-0.16 ± 0.30	0.21 ± 0.37
T_2	预测值, $^{\circ}\text{C}$	33.11	32.48	33.03	33.59
	实测值, $^{\circ}\text{C}$	33.10 ± 0.07	33.64 ± 0.11	33.06 ± 0.10	32.52 ± 0.06
	偏差, %	0.04 ± 0.21	-0.11 ± 0.36	-0.08 ± 0.30	0.22 ± 0.18

2.6 附加剂对相变温度的影响

根据2010年版《中国药典》有关眼用制剂的有关规定^[6], 眼用制剂应加入渗透压调节剂及抑菌剂; 本试验还加入了黏附性材料HPMC K4M和HPMC E50。由于主药用量少、温敏材料及黏附性材料分子质量大因而不足以引起渗透压的改变, 因此采用0.9%氯化钠作为渗透压调节剂, 0.03%尼泊金乙酯^[11]作为抑菌剂, HPMC K4M或HPMC E50作为增稠剂。经试验可知加入上述附加剂后相变温度降低3~6 $^{\circ}\text{C}$, 通过相变温度的改变对温敏材料质量分数进行调整, 调整后的TG相变温度符合眼用TG的要求。调整后的各处方的相变温度见表4(以下各处方均含有0.9%氯化钠、0.03%尼泊金乙酯)。

由表4可见, 通过对托吡卡胺TG处方所含各种辅料对相

表4 质量分数调整后的相变温度

Tab 4 Phase-transition temperature of the adjusted concentration

处方	P407质量分数-P188质量分数	相变温度(T_1 , $^{\circ}\text{C}$)	模拟泪液稀释后的相变温度(T_2 , $^{\circ}\text{C}$)
A	20%P407-4%P188	25.99 ± 0.02	34.01 ± 0.07
B	20%P407-5%P188-0.5%HPMC K4M	25.42 ± 0.13	33.45 ± 0.09
C	21%P407-8%P188-0.5%HPMC K4M	25.88 ± 0.03	33.83 ± 0.02
D	22%P407-10%P188	25.31 ± 0.07	32.49 ± 0.04
E	20%P407-5%P188-1%HPMC E50	26.02 ± 0.05	33.00 ± 0.04
F	21%P407-6%P188	26.04 ± 0.08	33.97 ± 0.04
G	21%P407-9%P188-1%HPMC E50	25.79 ± 0.04	33.36 ± 0.05

变温度影响的全面考察, 找到了适合于眼部应用的TG处方。2010年版《中国药典》规定^[6]眼用制剂pH应与泪液接近。通过测定可知以上处方的pH均在6.6~6.7范围内, 符合要求。再通过对经济性、处方黏度等的全面衡量, 认为处方B即0.25%托吡卡胺-20% P407-5% P188-0.5% HPMC K4M-0.9% 氯化钠-0.03% 尼泊金乙酯为最佳处方。

2.7 处方验证

根据“2.6”所得试验结果, 以最佳处方制备3批样品(批号: 20130610-1、20130610-2、20130610-3), 对其 T_1 、 T_2 两项指标进行考察, 结果分别为 $(25.45 \pm 0.03)^{\circ}\text{C}$ ($n=3$)、 $(33.46 \pm 0.02)^{\circ}\text{C}$ ($n=3$), 符合要求。

3 托吡卡胺TG体外释放度考察

3.1 色谱条件^[12]及方法学考察

色谱柱: Luna C_8 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.01 mol/L 辛烷磺酸钠溶液(磷酸调pH至3.0)-甲醇(45:55), 流速: 1 ml/min; 检测波长: 254 nm; 柱温: 33 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μl 。在此色谱条件下, 托吡卡胺的主峰保留时间为7 min; 辅料对托吡卡胺的含量测定无影响; 精密度、24 h稳定性试验的RSD分别为0.19% ($n=6$)、0.35% ($n=6$); 空白TG中加入托吡卡胺对照品适量, 制备得低、中、高水平的供试品溶液, 测定并计算得平均回收率分别为99.01%、98.94%、100.20%, RSD分别为0.98%、0.14%、0.12% ($n=6$)。

精密称取托吡卡胺对照品49.69 mg, 用流动相溶解并稀释至50 ml, 得到贮备液。用移液管分别移取0.1、0.4、0.6、0.8、1 ml于5 ml量瓶中, 流动相定容, 制备成质量浓度分别为19.90、79.60、119.40、159.20、199.00 $\mu\text{g/ml}$ 的对照品溶液, 按上述色谱条件测定。以峰面积(y)为纵坐标、质量浓度(c)为横坐标, 进行线性回归, 得回归方程为 $y=16.163c+52.731$ ($r=0.9998$)。表明托吡卡胺检测质量浓度在19.90~199.00 $\mu\text{g/ml}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

3.2 体外累积释放度测定^[13]

按最佳处方配比(0.25%托吡卡胺-20% P407-5% P188-0.5% HPMC K4M-0.9% 氯化钠-0.03% 尼泊金乙酯)制备托吡卡胺TG。取1.55 ml TG于试管中, 在 $(34 \pm 0.5)^{\circ}\text{C}$ 气浴恒温振荡器中放置10 min, 加入2.4 ml模拟泪液(34 $^{\circ}\text{C}$), 转速100 r/min, 20 min后将模拟泪液全部取出, 再将试管放入气浴恒温振荡器中, 平衡10 min, 补充34 $^{\circ}\text{C}$ 模拟泪液2.4 ml。如此反复操作至试验结束。将以上收集到的模拟泪液经0.45 μm 微孔

滤膜过滤后,用高效液相色谱法测定溶液中托吡卡胺的含量,并以时间(t)为横坐标、药物累积释放度(Q)为纵坐标进行线性回归,得方程为 $Q=0.0022t-0.0085$ ($r=0.9994$),呈现良好的线性关系,符合零级释放模型。且制剂在300 min内累积释放度为65%左右,后续仍可继续缓慢释放。

4 讨论

4.1 相变温度的测定

本文采用试管倒置法测定样品相变温度,相比搅拌子法操作方便,影响因素仅为水浴锅的升温速率。且预试验通过两种方法对同一样品进行相变温度测定发现,搅拌子对凝胶具有剪切变稀的作用,使得测量值大于实际的相变温度,因此试管倒置法测定相变温度更为科学,与后续试验中采用流变仪测定的相变温度基本一致。

4.2 辅料的选择

泊洛沙姆是一种安全性高、无过敏性且具有良好的生物相容性的药用辅料,是目前用于静脉乳中极少数的合成乳化剂之一。试验中可见氯化钠和尼泊金乙酯的加入降低了TG的相变温度,这可能是由于盐的加入增加了溶液中温敏材料的溶解度^[4];而HPMC的加入进一步降低了TG相变温度,可能是由于其分子质量较大,水化膨胀后占据体积分数增大,导致泊洛沙姆质量分数相对增加,且P407对相变温度的影响更为显著,因而致使TG相变温度降低。

从优选处方A~G的辅料配比可以得出,HPMC的加入降低了温敏材料的用量,增加了处方的黏度,得到的最佳处方不仅在相变温度上符合眼用要求,理化性质方面也更适合于眼用。由表4可知,使用HPMC的处方泊洛沙姆的质量分数相对减少,因此选用含有HPMC的处方作为最优处方,降低了成本相对高的泊洛沙姆的质量分数,成本更经济,且材料易得。

另外,对所得处方pH进行测定时发现,不加pH调节剂的情况下,各处方的pH都处于6~7之间,节省了辅料用量,经济性也高。

4.3 方法与剂型的优势

星点设计-效应面法是在析因设计的基础上,减少了试验次数、运用数学模型建立主要影响因素和考察指标之间的定量关系、验证模型的预测效果,并筛选出优化处方的试验设计方法。本文中所建立的模型精度高、预测性良好。所得托吡卡胺TG体外释放度研究显示其符合零级释放模型,用药后在眼表温度条件下即形成半固体TG状并缓慢释药,可以提高患者顺应性,具有使用方便、剂量准确、应用前景良好等特点。

参考文献

[1] 王静,费华,贾万程.托吡卡胺与阿托品凝胶在青少年近

视验光中应用效果比较[J].蚌埠医学院学报,2011,36(4):385.

- [2] Urtti A, Pipkin JD, Rork G, *et al.* Controlled drug delivery devices for experimental ocular studies with timolol 2. Ocular and systemic absorption in rabbits[J]. *Int J Pharm*, 1990, 61(3):241.
- [3] Joo MK, Park MH, Choi BG, *et al.* Reverse thermogelling biodegradable polymer aqueous solutions[J]. *J Mater Chem*, 2009, 19(33):5891.
- [4] 林友文,庄小慧,李光文,等.壳聚糖-羧甲基壳聚糖凝胶的温敏性及体外药物缓释试验[J].中国现代应用药学,2010,27(7):626.
- [5] 仇海镇,李娟.原位凝胶的研究进展及其在药剂学中的应用[J].医学信息,2010,23(4):1524.
- [6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:264、附录9.
- [7] Takeuchi M, Kageyama S, Suzuki H, *et al.* Rheological properties of reversible thermo-setting in situ gelling solutions with the methylcellulose-polyethylene glycol/citric acid ternary system[J]. *Colloid Polym Sci*, 2003, 281(12):1178.
- [8] Wei G, Xu H, Ding PT, *et al.* Thermosetting gels with modulated gelation temperature for ophthalmic use: the rheological and gamma scintigraphic studies[J]. *J Control Release*, 2002, 83(1):65.
- [9] Pital SS, Paradkar AR, Mahadik KR, *et al.* Pluronic gels for nasal delivery of vitamin B12. Part I: Preformulation study[J]. *Int J Pharm*, 2004, 270(1/2):37.
- [10] 吴伟,崔光华.星点设计-效应面优化法及其在药学中的应用[J].国外医学药学分册,2000,27(5):292.
- [11] 刘卫平.马来酸噻吗洛尔眼用即型凝胶的研究[D].石家庄:河北医科大学,2008:18.
- [12] 郁子萱,杨必勇.高效液相色谱法测定托吡卡胺滴眼液含量[J].中国药业,2010,19(13):36.
- [13] 高斐,王东凯,罗立,等.左氧氟沙星热敏型眼用凝胶的研制及体外释放研究[J].中国药房,2005,16(14):1057.
- [14] Mata JP, Majhi PR, Guo C, *et al.* Concentration, temperature and salt-induced micellization of a triblock copolymer Pluronic L64 in aqueous media[J]. *J Colloid Interface Sci*, 2005, 292(2):548.

(收稿日期:2013-06-07 修回日期:2013-07-17)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊,欢迎投稿、订阅