

# 星点设计-效应面法优化贝美前列素眼用温度敏感原位凝胶的处方工艺

孙敬蒙, 曲晓宇, 张四喜\* (吉林大学第一医院药学部, 长春 130021)

**摘要:**目的 使用星点设计-效应面法探讨贝美前列素眼用温度敏感原位凝胶的处方组成, 并考察其体外释放度。方法 以泊洛沙姆 407 和 188 为凝胶基质, 用星点设计-效应面法筛选出最佳处方得到合适的胶凝温度, 高效液相色谱法测定贝美前列素眼用凝胶的含量, 并以无膜溶出模型考察其体外释放度。结果 处方以 1%吐温 80, 0.03%贝美前列素(w/v)、21%泊洛沙姆 407(w/v)和 2%泊洛沙姆 188(w/v)组成能达到最适胶凝温度。体外释放度的考察结果显示药物的释放与时间呈线性关系。结论 本实验制备的贝美前列素眼用温度敏感原位凝胶具有理想的胶凝温度, 能够使药物更加持久地附在给药部位, 具有给药方便等优点, 是一种值得开发并推广使用的眼用制剂。

**关键词:** 贝美前列素; 温度敏感; 星点设计-效应面法; 原位凝胶

中图分类号: R944 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2021)23-2966-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.23.009

引用本文: 孙敬蒙, 曲晓宇, 张四喜. 星点设计-效应面法优化贝美前列素眼用温度敏感原位凝胶的处方工艺[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(23): 2966-2970.

## Formulation Optimization of the Thermosensitive *in Situ* Gel System Containing Bimatoprost for Ocular Use by Central Composite Design-Response Surface Methodology

SUN Jingmeng, QU Xiaoyu, ZHANG Sixi\* (Department of Pharmacy, The First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To explore the formulation composition of bimatoprost ophthalmic thermosensitive *in situ* gel by using the central composite design-response surface method and investigate its *in vitro* release. **METHODS** Poloxamer 407 and 188 were used as the gel matrix. The central composite design-response surface method was used to screen out the best prescription to obtain the appropriate gelation temperature. HPLC method was established to determine the content of bimatoprost and the release *in vitro* was investigated using a membrane-free dissolution model. **RESULTS** In the formulation, 1% tween 80 was used as the solubilizer, and the composition of 0.03% bimatoprost(w/v), 21% poloxamer 407(w/v) and 2% poloxamer 188(w/w) could reach the optimum gelation temperature. The results of *in vitro* release test indicated that the release of the formulation showed a linear relationship with time. **CONCLUSION** The *in situ* thermosensitive gel of pemirolast potassium prepared in this paper has good temperature sensitivity, which can prolong the residence time of the drug in the eye and is easy to administer. It is expected to be developed into a new ophthalmic dosing formulation.

**KEYWORDS:** bimatoprost; thermosensitive; the central composite design-response surface methodology; *in situ* gel

贝美前列素是第二代前列素类抗青光眼药物, 在国外已成为一线抗青光眼制剂<sup>[1]</sup>, 主要适用于发病率较高的原发性开角型青光眼及高眼压症。多项研究表明, 贝美前列素在前列腺素类药物中较其他药物有更好的降眼压效果, 并且耐受性、依从性较好, 全身不良反应少<sup>[2]</sup>。

泊洛沙姆(poloxamer)是由聚氧乙烯和聚氧丙烯组成的 ABA 型嵌段共聚物<sup>[3]</sup>, 在温度敏感凝胶的研究中使用最为广泛。泊洛沙姆具有良好的生物相容性和可逆的反向胶凝性质<sup>[4]</sup>, 对黏膜的刺激较小, 更适用于眼用制剂<sup>[5]</sup>。泊洛沙姆原位凝胶的眼用局部给药优于滴眼剂给药, 具有减少给药

次数, 延长药物在眼内滞留的时间等优点, 因此泊洛沙姆在提高药物的生物利用度、生物相容性等方面都是良好的基质材料<sup>[6]</sup>。

目前临床贝美前列素药物制剂主要以滴眼液为主, 尚无眼用温度敏感原位凝胶制剂, 亦未见相关文献报道。本实验采用非离子表面活性剂泊洛沙姆 188(poloxamer 188, P188)和泊洛沙姆 407(poloxamer 407, P407)作为温敏原位凝胶的缓释材料, 使用星点设计-效应面法探讨贝美前列素眼用温度敏感原位凝胶的处方组成, 并考察其体外释放度。将贝美前列素研制成眼用智能化温敏凝胶不仅开发了一种新的给药途径, 同时温敏凝胶能

基金项目: 吉林省教育厅科学研究规划项目(JJKH20201123KJ); 吉林大学第一医院科技成果转化基金项目(JDYZZH-1902014)

作者简介: 孙敬蒙, 女, 博士, 药师 Tel: (0431)88782481 E-mail: 769590401@qq.com \*通信作者: 张四喜, 男, 博士, 副主任药师 Tel: (0431)88782481 E-mail: sixi@jlu.edu.cn

够使药物达到更加持久的释放目的<sup>[7]</sup>,避免了滴眼剂停留时间短而未达到治疗有效剂量,造成治疗效果不佳的缺点<sup>[8]</sup>;并且,与凝胶剂相比,该剂型具有较好的流动性,能够达到给药方便、药物分布均匀的优点<sup>[9]</sup>。因此本剂型可以提高患者用药的依从性,在经济学评价上,温敏凝胶的制备也较简单,设备与材料成本均较低,因此在降低药物成本方面也具有一定的优势。

## 1 仪器与试剂

AX224ZH 型电子天平(奥豪斯仪器有限公司); Shimadzu 16A 高效液相色谱仪(日本岛津公司), 色谱柱为 WondaSil C<sub>18</sub> 键合硅胶柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm); IKEA 恒温磁力搅拌器(德国 IKEA 公司); TS-200B 型恒温振荡器(常州诺基仪器有限公司); Shimadzu UV-160A 紫外分光光度计(日本岛津公司)。

贝美前列素(上海京河医药科技有限公司, 含量为 99%, 批号: 155206-00-1); 吐温 80(天津市大茂化学试剂厂, 批号: 9005-65-6); P188(批号: WPHC625E)、P407(批号: WPAH516D)均购自德国 BASF 公司; 氯化钠(批号: 20190107)、碳酸氢钠(批号: 20080108)、氯化钾(批号: 20160126)均购自北京化工厂; 氯化钙(上海百研生物科技有限公司, 批号: WXSC0624V); 甲醇(色谱纯, 美国 TEDIA 公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 温敏凝胶的制备

精密称取贝美前列素粉末适量与 1%吐温 80 超声溶解,加双蒸水,制得 0.03%贝美前列素溶液,加入 P407 与 P188,混匀,4 °C溶胀 24 h,即得贝美前列素眼用温敏型原位凝胶。

### 2.2 人工泪液的配制

根据泪液的组成<sup>[10]</sup>,精密称取 6.78 g 氯化钠、1.38 g 氯化钾、2.18 g 碳酸氢钠和 0.084 g 氯化钙,加入适量双蒸水中,全部溶解后转移至 1 000 mL 量瓶中,并用双蒸水定容,摇匀,即得。

### 2.3 胶凝温度的测定方法

取冷藏的贝美前列素温敏凝胶溶液置于玻璃试管中,将其浸没于水面以下,以 0.5 °C·min<sup>-1</sup> 的升温速率缓慢升温,每 10 s 稍微倾斜试管,直到试管中的凝胶不再流动时,此温度即为该凝胶的  $T_{gel}$ 。

### 2.4 人工泪液稀释后相变温度的测定

当溶液型眼用制剂进入结膜囊内,会被泪液稀释,每滴溶液型眼用制剂的体积约为 50 μL,结

膜囊内泪液的体积约为 7 μL<sup>[11]</sup>,所以将贝美前列素温敏型凝胶与人工泪液按体积比为 50 : 7 的比例混合。考察混合前后的相变温度,确定贝美前列素温敏型原位凝胶进入眼内的相变过程。

## 2.5 星点设计-效应面法优化凝胶处方

**2.5.1 实验设计** 根据预实验,对胶凝温度有显著影响的 2 个因素为考察对象,即 P407 的浓度( $X_1$ , %, w/v)和 P188 的浓度( $X_2$ , %, w/v),各因素的极值范围是  $X_1$  为 18~26,  $X_2$  为 0~8,以模拟泪液稀释前后的相变温度  $T_1$ 、 $T_2$  为考察指标,星点设计-效应面因素水平见表 1,结果见表 2。

表 1 星点设计因素水平表

Tab. 1 Factors and levels of central composite design

因素	水平				
	-1.414	-1	0	1	1.414
$X_1$	18	19.171 5	22	24.828 5	26
$X_2$	0	1.171 5	4	6.828 5	8

表 2 星点设计试验方案及效应值( $n=5$ )

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

序号	P407/%	P188/%	泪液稀释前 相变温度 $T_1$ /°C	泪液稀释后 相变温度 $T_2$ /°C
1	22.00	4.00	31.86±0.312	38.55±0.257
2	24.83	6.83	32.16±0.127	37.54±0.366
3	22.00	4.00	31.15±0.375	37.12±0.311
4	22.00	4.00	31.58±0.294	37.26±0.247
5	19.17	6.83	42.27±0.378	61.27±0.414
6	22.00	0.00	24.10±0.261	30.03±0.349
7	19.17	1.17	30.23±0.132	40.82±0.271
8	22.00	4.00	32.16±0.243	37.61±0.385
9	26.00	4.00	23.73±0.322	33.13±0.421
10	18.00	4.00	37.43±0.561	54.80±0.398
11	22.00	8.00	40.80±0.344	52.47±0.326
12	22.00	4.00	31.37±0.327	39.75±0.227
13	24.83	1.17	22.60±0.178	27.63±0.472

**2.5.2 统计分析** 根据表 1 实验安排,将星点设计试验结果以  $T_1$ 、 $T_2$  为指标,采用 Design-Expert 8.0 进行效应面二次模型的方差分析,根据模型的复相关系数  $r$ ,结合  $P$  值检验结果,可知  $T_1$  和  $T_2$  模型均具有较高的可信度,拟合方程如下:  $T_1=31.62-4.64X_1+5.65X_2-0.62X_1X_2-0.4X_1^2+0.49X_2^2$ ,  $P<0.000 1$ ,  $r^2=0.996 1$ ;  $T_2=38.06-8.45X_1+7.76X_2-2.64 X_1X_2+2.76X_1^2+1.40X_2^2$ ,  $P<0.000 1$ ,  $r^2=0.990 2$ 。

由拟合方程的拟合优度  $r^2$  及置信度  $P$  可知方程  $T_1$  和  $T_2$  的拟合效果良好,具有统计学意义,P407 和 P188 对泪液稀释前后的相变温度均有显著影响。

通过 Design-Expert 8.0 软件拟合的等高线图及三维效应面图见图 1~2。

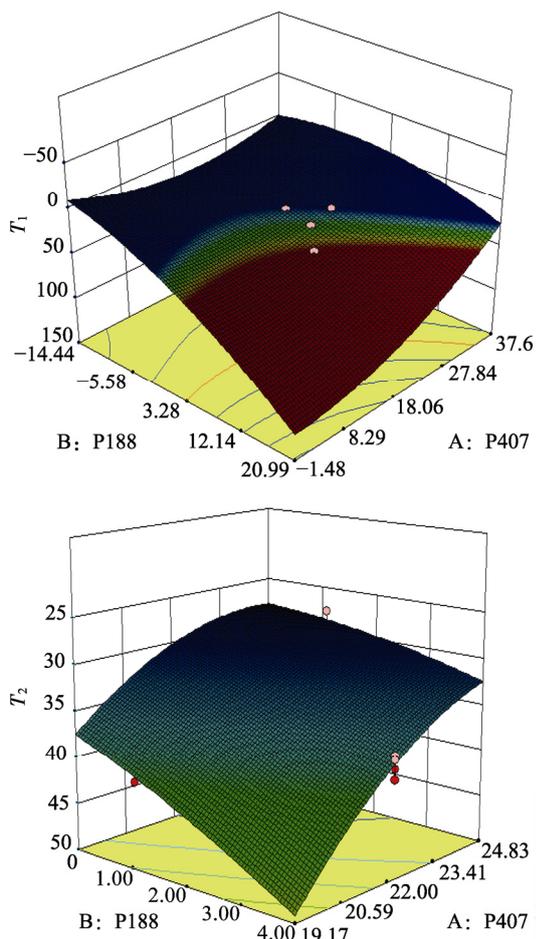


图1 胶凝温度  $T_1$  和  $T_2$  的效应面图

Fig. 1 Effect surface diagram of gelation temperature  $T_1$  and  $T_2$

**2.5.3 实验验证** 结合各因素的取值范围, 经 Design-Expert 8.0 软件优化后, 根据处方制备贝美前列素眼用温度敏感原位凝胶, 分别测定模拟泪液稀释前后的相变温度, 对其预测值和实测值进行偏差分析。结果显示, 处方 3 的偏差绝对值最小, 预测效果最好, 且  $T_1$ 、 $T_2$  的实测值满足眼部用药要求即  $25\text{ }^\circ\text{C} \leq T_1 \leq 30\text{ }^\circ\text{C}$  和  $30\text{ }^\circ\text{C} \leq T_2 \leq 35\text{ }^\circ\text{C}$ , 所以选择处方 3, 即 21% P407、2% P188 为优化处方。最优处方在加入模拟泪液稀释前后, 胶凝温度实测值与预测值偏差均 < 5%, 表明拟合方程预

表 3 验证处方的预测值实测值及偏差 ( $n=5$ )

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

处方编号	P188/%	P407/%	$T_1/^\circ\text{C}$			$T_2/^\circ\text{C}$		
			预测	实测	偏差/%	预测	实测	偏差/%
1	1	21	27.87	28.14±0.31	3.25±0.54	34.78	35.81±0.58	2.33±1.24
2	1	22	26.57	26.65±0.17	1.72±1.86	32.46	33.45±0.46	1.78±1.42
3	2	21	29.30	30.87±0.26	1.04±0.33	34.20	35.52±0.22	1.06±0.99
4	2	22	27.87	28.46±0.31	1.45±1.18	33.85	34.83±0.35	1.34±0.72
5	3	23	28.61	29.53±0.28	1.72±1.65	34.18	36.14±0.34	2.57±2.77

测性较好。见表 3。

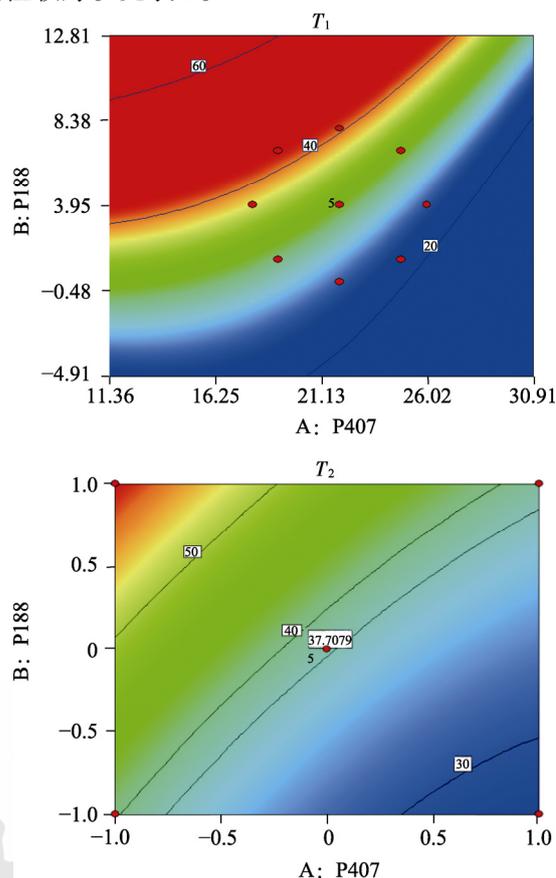


图 2 胶凝温度  $T_1$  和  $T_2$  的等高线图

Fig. 2 Two-dimensional plot of bimatoprost's phase-transition temperature versus the concentrations of P407 and P188

## 2.6 含量测定方法的建立

**2.6.1 色谱条件的确定** WondaSil  $C_{18}$ -WR 色谱柱 (4.6 mm×150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相为 0.1% 磷酸-甲醇 (30 : 70); 流速为 20  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 检测波长为 261 nm; 柱温为 35  $^\circ\text{C}$ ; 进样量为 20  $\mu\text{L}$ 。

**2.6.2 线性关系** 精密称取干燥至恒重的贝美前列素对照品适量, 加甲醇溶解并稀释制成 0.06  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  溶液, 分别精密量取 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 mL 置于 5 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度,

摇匀。按“2.6.1”项下色谱条件，依次注入液相色谱仪测定，记录峰面积，以对照品色谱峰面积( $Y$ )为纵坐标，对照品浓度( $X$ )为横坐标，绘制标准曲线，得回归方程  $Y=450X-213.2(r=0.9996)$ 。结果表明，贝美前列素在  $1.2\sim 36\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  内线性关系良好。

**2.6.3 含药量测定** 精密称取贝美前列素对照品适量，加甲醇稀释并定容，摇匀，制成浓度为  $0.3\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的对照品溶液。另取贝美前列素温敏凝胶溶液适量，加甲醇稀释并定容，摇匀，制成浓度为  $0.3\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的供试品溶液。分别取对照品溶液和供试品溶液各  $20\ \mu\text{L}$ ，注入高效液相色谱仪，记录峰面积，根据外标法计算供试品溶液中贝美前列素的含量。结果测得贝美前列素温敏凝胶供试品中贝美前列素的含量为标示量的  $98.76\%$ 。色谱图见图 3。

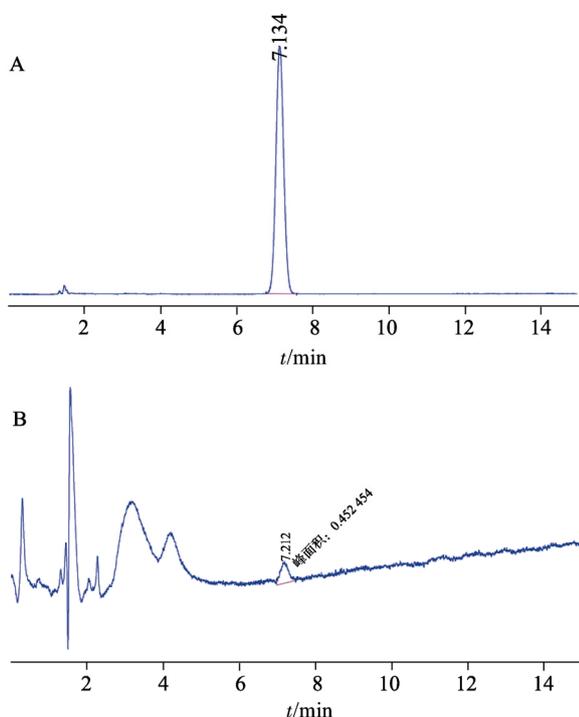


图 3 贝美前列素对照品(A)和供试品(B)高效液相色谱图  
Fig. 3 HPLC chromatograms of bimatoprost sample(B) and control solution(A)

**2.6.4 加样回收率试验** 精密称取贝美前列素对照品，分别制备低(80%)、中(100%)、高(120%)3种浓度的凝胶样品，按“2.6.3”项下操作，计算平均回收率为  $98.98\%$ 。

**2.6.5 精密度试验** 分别取“2.6.3”项下方法制备的样品，于日内重复进样 5 次，测定其日内精密度。5 d 内每日进样 5 次，测定其日间精密度，均符合精密度要求，见表 4。

表 4 贝美前列素含量测定的精密度( $n=5$ )

Tab. 4 Precision of determination of bimatoprost content ( $n=5$ ) %

含量	日内精密度		日间精密度	
	实测值	RSD	实测值	RSD
80	78.91±0.47	0.59	78.61±0.83	0.79
100	97.47±1.24	1.39	97.97±0.92	1.12
120	117.69±1.06	1.20	118.36±1.32	0.82

## 2.7 体外释放度考察

无膜溶出模型采用模拟泪液在震荡条件下对凝胶表面产生类似眨眼的动作，水溶性凝胶的溶蚀与药物释放同步进行，符合眼用温度敏感原位凝胶在人体眼内的真实过程。参考文献[12]， $4\ ^\circ\text{C}$  时，将凝胶约  $1.0\ \text{g}$  置于预先已称重的  $1.5\ \text{mL}$  西林瓶中，将其置于  $37\ ^\circ\text{C}$  的振荡器中预热  $10\ \text{min}$ ，待溶液完全形成凝胶状态后，加入事先预热的人工泪液  $0.5\ \text{mL}$  作为释放介质，在  $200\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  的转速下恒温震荡  $20\ \text{min}$ ，立即倒出全部释放介质，将容器内外表面吸干，迅速称量并记录，再重新放入振荡器中平衡  $10\ \text{min}$ ，补充人工泪液  $0.5\ \text{mL}$  并继续震荡  $20\ \text{min}$ 。如此反复操作。倒出的释放介质置于  $10\ \text{mL}$  量瓶中，用甲醇稀释并定容，取  $20\ \mu\text{L}$  采用 HPLC 测定其含量。凝胶与离心管总重与液体倒出后离心管重间的差值为 2 个时间点间的溶蚀量，分别用凝胶累计溶蚀量( $X$ )和药物累计释放量( $Y$ )对时间进行线性回归分析，结果呈现良好关系，符合零级动力学特征。以药物的累计释放量对凝胶累计溶蚀量进行线性回归，回归方程为  $Y=0.9265X+6.8112(R^2=0.9964)$ ，见图 4。药物的释放与凝胶的溶蚀以相同的速率进行，得出决定释放的主要因素是凝胶的溶蚀。

## 3 讨论

国内应用于青光眼的贝美前列素制剂主要为滴眼液，当药物进入眼内时容易泄露不能达到有效的治疗剂量，同时药物覆盖用药部位时间短，需要多次给药，引起诸多不便。目前尚无眼用温度敏感原位凝胶制剂，亦未见相关文献报道。本研究研制了贝美前列素眼用温度敏感凝胶，为该药物新剂型与新技术的开发提供了部分试验依据，具有一定的实用价值。温度敏感原位凝胶是一类在常温下为溶液状态给药后在用药部位能发生相转变由液态形成半固体凝胶的制剂<sup>[13]</sup>。温度敏感型原位凝胶对用药部位刺激性小，并且制备工艺简单，更有利于药物释放，能够提高生物利

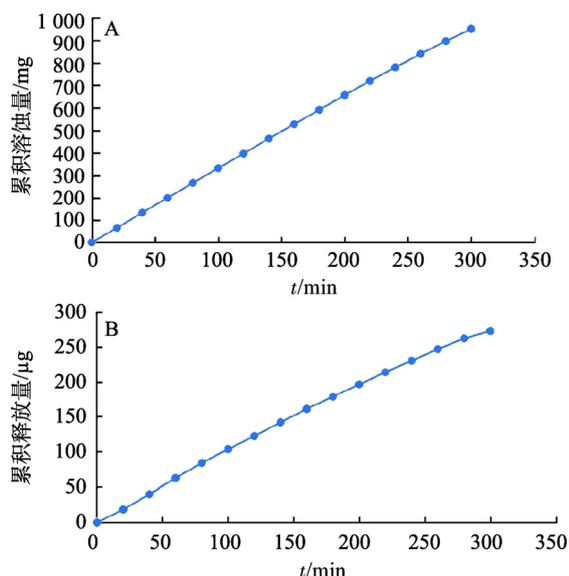


图4 贝美前列素眼用温度敏感凝剂的释放度考察结果 A-凝剂的崩解曲线; B-药物的累积释放曲线。

Fig. 4 Results of release property investigations for bimatoprost situ si thermosensitive gel for ophthalmic use A-crosion profile of gel; B-accumulate release profile of drug.

用度,减少患者用药次数,降低不良反应,是一种具有发展潜力的药物传递系统<sup>[14]</sup>。本实验选取安全可靠的P407和P188作为温敏型凝胶基质<sup>[15]</sup>。是目前研究最成熟的温度敏感原位凝胶的高分子材料,同时混合型凝胶基质具有原位凝胶及生物黏附性的双重优势。

均匀设计和正交设计常用于药物处方筛选,但是这2种方法具有精确度差,模型预测能力有限的缺点<sup>[16]</sup>。遂采用集统计学和数学于一体的星点设计-效应面优化法进行试验优化。此方法精确度高,首先通过单因素考察确定范围后,再采用星点设计效应面法优化精确的处方基质配比参数,非常适合于优选细化的制剂参数。在试验前参考大量的文献以及预实验,确定泊洛沙姆407的浓度范围为18%~24%,P188的浓度范围为0%~8%;通过验证试验表明实测值和预测值间的误差百分比<5%,说明在因素优化过程中使用此拟合的数学模型是可行的。在选择最优处方时,需要对各处方分别进行考察,选择相变温度适宜的组别是重要的考察手段之一;本试验在选择最优处方时,需要分别对各处方进行考察,分析数据得出各处方的相变温度和偏差的差距均<5%,模型预测准确性高,最优处方中P188与P407的用量较少且凝胶性状稳定,相变温度满足要求,因此选择21%P407、2%P188为优化处方。

## REFERENCES

- [1] KREESHAN F C, MADAN V. Idiopathic guttate hypomelanosis treated with 308-nm excimer light and topical bimatoprost[J]. J Cutan Aesthetic Surg, 2021, 14(1): 115-117.
- [2] CAI Z, CAO M, LIU K, et al. Analysis of the responsiveness of latanoprost, travoprost, bimatoprost, and tafluprost in the treatment of OAG/OHT patients[J]. J Ophthalmol, 2021(2021): 5586719.
- [3] WANG Z Z, LU H Y, NI X J, et al. Formulation optimization of Blonanserin-poloxamer thermo-sensitive gel via central composite design and determination[J]. Pharm Today(今日药), 2021, 31(1): 18-22.
- [4] BORGES R, KAI K C, LIMA C A, et al. Bioactive glass/poloxamer 407 hydrogel composite as a drug delivery system: The interplay between glass dissolution and drug release kinetics[J]. Colloids Surfaces B: Biointerfaces, 2021(206): 111934.
- [5] ZHOU J, TANG L, ZHAO W G, et al. Preparation and *in vitro* drug release of ocular thermosensitive gel of atropine sulfate[J]. China Pharm(中国药师), 2017, 20(2): 365-367.
- [6] DENG X L, QIN D M, CHEN W. Optimization of the formulation of fluticasone propionate thermosensitive *in-situ* gel nasal drops by central composite design-response surface methodology and investigation of *in vitro* release retention[J]. J Shihezi Univ(Nat Sci)(石河子大学学报: 自然科学版), 2017, 35(1): 119-123.
- [7] ZHAG L J, WU Y Y, WU J J, et al. Study on *in vitro* release and bioadhesion of breviscapine temperature-sensitive nasal *in situ* gel[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药), 2020, 37(23): 2863-2867.
- [8] SUN T, XU W N, LI Q H. Research progress of *in-situ* gel for ocular drug delivery[J]. J of Pharm Resea(药学研究), 2018, 37(7): 420-422.
- [9] WU H X, LIN M, SHI D M, et al. Preparation and *in vitro* release of levofloxacin hydrochloride ocular nanoparticles thermo-sensitive *in situ* gels[J]. J Fujian Med Univ(福建医科大学学报), 2018, 52(3): 158-163.
- [10] LU Y, CHEN G Y, ZHAO B Q, et al. Optimization of composition of thermosensitive *in situ* forming eye gel matrix containing muan by central composite design-response surface methodology[J]. Herald Med(医药导报), 2018, 37(12): 1488-1493.
- [11] ZHAO Y N, HAO X J. Preparation and *in vitro* release of chloramphenicol *in situ* pH-sensitive gel[J]. North Pharm J(西北药学杂志), 2018, 33(6): 793-796.
- [12] WANG T, WANG Y X, SUN J Y, et al. Study on *in vitro* release and nasal mucosal toxicity of ditong biyan spray gel[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药), 2020, 37(18), 2215-2222.
- [13] SHI L, LIU X F, WANG H, et al. Preparation and *in vitro* release of diclofenac sodium thermosensitive gel[J]. J Jiangnan Univ Nat Sci Edit(江汉大学学报: 自然科学版), 2018, 46(6): 538-542.
- [14] KE J, ZHAO Z W, LI S S, et al. Research on preparation and *in vitro* release of pH sensitive gel for eye cornea of salvianolic acid B[J]. J Kunming Med Univ(昆明医科大学学报), 2018, 39(3): 23-30.
- [15] YUAN P, CHEN Y, LIU L N. Preparation and *in vitro* release of octoxynol-9 thermosensitive *in situ* gel[J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2017, 37(14): 1352-1356.
- [16] KARAVASILI C, FATOUROS D G. Smart materials: *in situ* gel-forming systems for nasal delivery[J]. Drug Discov Today, 2016, 21(1): 157-166.

收稿日期: 2021-01-15  
(本文责编: 沈倩)