外用制剂中的流变学应用

流变学测定方法设计与方法学验证的考察重点

李祥梅[1]，邵　奇[2]，王　力[3]，罗华菲[1]*

（1. 中国医药工业研究总院医药先进制造国家工程研究中心，上海 201203；2. 上海上药信谊药厂有限公司，上海 201206；3. 上海医药集团股份有限公司，上海 200020）

摘要：流变学方法在表征半固体制剂的微观结构方面潜力巨大，然而该方法的标准化程序未完全建立。该研究旨在对流变学方法进行开发和验证，以期为建立标准化的流变学方法提供参考。以糠酸氟替卡松鼻用喷雾剂作为模型，评估了流动扫描、流动斜坡、振荡振幅和振荡频率模式下测样方法的设定参数，对于选定的关键流变学参数（屈服值、无穷大剪切黏度、触变环面积、临界应力、储能模量、损耗模量和损耗角正切）的影响。方法学考察（重复性、精密性、特异性和稳健性）结果表明，多项测得参数的 RSD 值超出 15%。因此，流变参数等效标准范围的确定，还需要进一步研究。

关键词：流变学；半固体制剂；微观结构；方法设计；系统验证；悬浮液

中图分类号：R944.9；O37　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2025)03-0274-11

引用：李祥梅，邵　奇，王　力，等．流变学测定方法设计与方法学验证的考察重点［J］．中国医药工业杂志，2025, 56(3)：274-284．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.03.001

Main Points of Rheological Measurement Method Design and Methodological Verification

LI Xiangmei[1], SHAO Qi[2], WANG Li[3], LUO Huafei[1]*

(*1. National Advanced Medical Engineering Research Center, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203; 2. SPH Sine Pharmaceutical Laboratories Co., Ltd., Shanghai 201206; 3. Shanghai Pharmaceuticals Holding Co., Ltd., Shanghai 200020*)

ABSTRACT: Rheological methods exhibit significant potential in characterizing the microstructure of semisolid preparations. However, there is a lack of fully established standardized procedures for this technique. The objective of this study was to develop and validate rheological methods, aiming to provide a reference for establishing standardized protocols. Taking fluticasone furoate nasal spray as a model, this study assessed the impacts of the set parameters for the measurement methods in flow sweep, flow ramp, oscillation amplitude, and oscillation frequency modes on the selected key rheological parameters (yield value, infinite shear viscosity, thixotropic loop area, critical stress, storage modulus, loss modulus, and loss tangent). The results of methodological investigations (repeatability, precision, specificity, and robustness) showed that the RSD values of many measured parameters exceeded 15%. Hence, the determination of equivalent standard ranges for parameters such as rheological microstructure required further studies.

Key Words: rheology; semisolid preparation; microstructure; method design; system validation; suspension

微观结构由多种因素决定，如分散颗粒的大小和形状、多晶型、乳剂内相的液滴大小、相间界面张力、原料药在各相的分配系数以及原料药流变性能等[1]。流变仪可用于测定材料的剪切稀化、恢复性、

收稿日期：2024-01-25

作者简介：李祥梅（1998—），女，博士研究生，专业方向：药物新剂型。

通信作者：罗华菲（1977—），女，研究员，博士生导师，从事经皮/黏膜药物递送与新型黏附技术的研究。

E-mail：luohuafei01@sinopharm.com

力学特性[2—3]、固有特性[4]等性能，从而研究组分变化对结构和力学性能、黏度特性和稳定性的影响[5—10]。例如LI等[11]研究了纤维素纳米颗粒（cellulose nanoparticles，CNPs）的结构形态与流变学关系。

EMA提出的《局部应用、局部作用透皮产品的质量和等效性指南》[12]中表明，当仿制制剂中原料药和辅料的质量（Q1）、用量（Q2）及物理性能和微观结构（Q3）与参比制剂一致，假设数据呈正态分布，仿制制剂与参比制剂测得参数的平均值之差的90%置信区间（confidence interval，CI）不超过10%，则可认为是等效的。同时，EMA对描述给定配方的流变行为时应提供的流变学参数提出了具体要求，其中包括：①剪切应力（或黏度）与剪切速率的完整流动曲线；②屈服应力和蠕变试验；③线性黏弹性响应［储能模量（storage modulus，G'）和损耗模量（loss modulus，G''）与频率/应力的关系］。此外，应提供流变图，根据剪切和时间效应（如假塑性、膨胀、触变）对产品的流变学行为进行分类，并使用适当的指标进行表征。例如：流变图上特定剪切速率下的黏度（如剪切速率为100 s^{-1}时的黏度，η_{100}）、塑性流变屈服应力值、触变环相对面积（thixotropic loop relative area，S_R）、黏弹性材料的G'和G''、表观黏度、损耗角正切（loss tangent，tanδ=G''/G'）。但有研究表明，将仿制制剂与参比制剂之间流变学参数的差异设定为在±10%范围内，过于苛刻。例如PLEGUEZUELOS-VILLA等[1]在评价双氯芬酸二乙胺凝胶的仿制制剂和参比制剂的等效性时发现，2种制剂的流变学参数差异在±25%范围内，但体外释放和体内生物等效性均满足要求。由此可见，对于结构复杂的体外制剂，即使仿制制剂和参比制剂的微观结构等相关体外参数的偏差超过±10%的范围，也不一定会影响二者在体内的等效性。因此，有必要进一步探讨扩大微观结构等参数的等效标准范围的可行性。

本研究选择糠酸氟替卡松鼻用喷雾剂为模型制剂进行试验。该制剂为白色悬浮液，具有一定的流动性和黏性。采用流变仪在不同模式下测定其屈服值、触变性、线性黏弹区（linear viscoelastic region，LVER）和模量，建立了完整的流变学分析方法，并进行系统的方法学验证。

1 仪器与试药

DHR-1型旋转流变仪（德国TA Instrument公司，配备基于Peltier热电技术的温控单元和基于流体循环的温控单元）。

糠酸氟替卡松鼻用喷雾剂（英国葛兰素史克公司，规格27.5 μg×120喷，批号E53E）；不同黏度的2种仿制制剂（记作F1、F2），由上海上药信谊药厂有限公司提供。

2 方法与结果

选择流动扫描（flow sweep）、流动斜坡（flow ramp）、振荡振幅（oscillation amplitude）和振荡频率（oscillation frequency）等测量模式对所选模型制剂进行检测。通过以上测试模式，可以对制剂的流变学特性进行全面研究和评价。不同测试模式的方法及结果意义如表1所示。

2.1 不同模式检测方法的建立

2.1.1 流动扫描模式检测方法的建立

考虑到鼻腔温度为33～35 ℃，所以选定测试温度为34 ℃。此外，原研制剂的流动性较好，为避免样品在测定时因间隙过大而产生飞溅，初步选定测样间隙为200 μm。对原研制剂进行测定时采用对数刻度（logarithmic scale）设置扫描参数，保证采集点数在各个数量级均等。其他参数初步设定如下：剪切速率100～0.01 s^{-1}；每个数量级测样点数5；平衡时间9 s；平均时间（averaging time）120 s。

根据流动曲线，对所得的剪切应力和剪切速率数据采用Herschel-Bulkley模型（式①）进行拟合；当$\dot{\gamma}$等于0时，σ等于σ_y，此时σ为流体的屈服应力值，记作τ_0。以Sisko模型（式②）对黏度-剪切速率曲线进行拟合，可得到η_∞值。然后计算τ_0和η_∞的RSD值，以RSD小于15%作为标准。

$$\sigma = \sigma_y + \kappa_{HB}\dot{\gamma}^{n_{HB}} \quad ①$$

$$\eta = \eta_\infty + \kappa_s\dot{\gamma}^{n_s-1} \quad ②$$

式中：$\dot{\gamma}$为剪切速率，σ_y为屈服应力，κ_{HB}为Herschel-Bulkley系数，n_{HB}为Herschel-Bulkley指数；κ_s为Sisko系数，n_s为Sisko指数。

在平均时间120 s的条件下，样品会凝固在平行

表 1　流变学研究的常规测试模式

Tab.1　Routine Test Modes for Rheological Studies

测试大类	工作方程 [1)]	测试小类	刺激特征	呈现的流变曲线	结果意义	参数意义
流动测试	$\eta=\sigma/\dot{\gamma}$	流动扫描	阶梯速率	①黏度 - 剪切速率曲线 ②剪切应力 - 剪切速率曲线	获得稳态流动曲线，可获得屈服应力、无穷大剪切黏度（η_∞）	屈服应力：物质流动开始时所需克服的最小应力，可用于评估多相分散体系的稳定性、悬挂性 η_∞：流体在受到无穷大剪切速率时的黏度
		流动斜坡	斜坡速率	①黏度 - 剪切速率触变环曲线 ②剪切应力 - 剪切速率触变环曲线	获得非稳态流动曲线，观察触变行为，获得触变环面积（S_R）	S_R：反映触变性，面积越大说明流体触变性越大，在停止外力作用后，流体体系恢复到初始状态所需的时间越长
振荡测试	$\gamma=\gamma_0\sin(\omega t)$ $\sigma=\sigma_0\sin(\omega t+\delta)$	振荡振幅	恒频变应变 恒频变应力	动态模量 / 应力 - 应变曲线 动态模量 / 应变 - 应力曲线	获得临界应变、临界应力，即 LVER	LVER：在小应力或应变条件下，流体的模量不依赖于应力或应变的增加而改变，呈线性特征；不再呈线性特征时对应的应力或应变为临界应力或临界应变
	$\lvert G^*\rvert=\sigma_0/\gamma_0$ $G'=\lvert G^*\rvert\cos\delta$	振荡频率	小应变变频 小应力变频	动态模量 - 频率曲线	探测结构信息，可获得 G'、G''、G^*	G' 代表了物质 / 材料贮存能量的能力，其数学来源为 $G'=(\sigma_0/\gamma_0)\cos\delta$；对于半固体制剂，$G'$ 值越大，制剂越硬，G' 值越小，制剂越稀薄 G'' 代表了材料耗损能量的能力，其数学来源为 $G''=(\sigma_0/\gamma_0)\sin\delta$

注：[1)] σ 为应力，η 为黏度，$\dot{\gamma}$ 为剪切速率，γ 为应变，ω 为振荡角频率，γ_0 为应变幅值，σ_0 为应力幅值，δ 为应力对应变的相位差，G^* 为复数模量。

板外圈，对后半段试验数据产生影响。虽然表 2 中的结果显示，该法所得 τ_0 和 η_∞ 的 RSD 值均小于 15%，符合设定要求，但在低剪切速率（0.01 ～ 0.1 s^{-1}）段，即样品测定后半段，曲线间的重合性都较差（如图 1A 所示）。所以需要缩短测样时间，以保证在整个测试过程中样品不会出现显著变化。

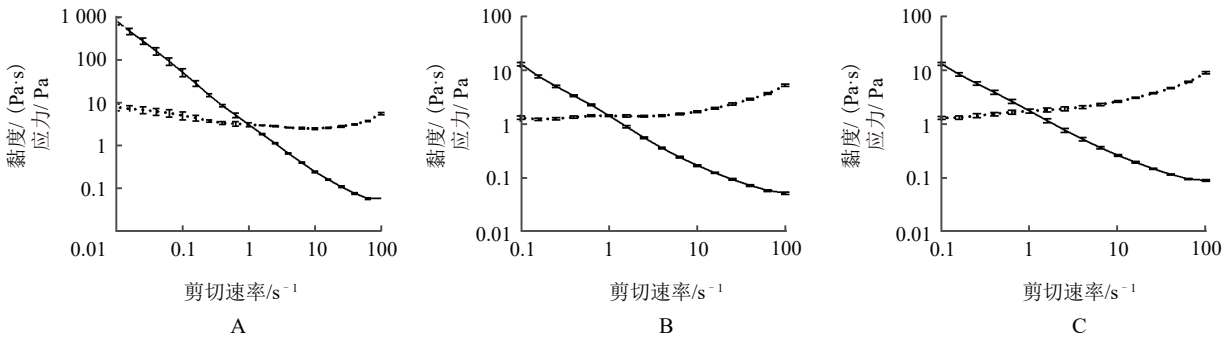
将剪切速率范围设为 100 ～ 0.1 s^{-1}，考察将平均时间设置为40和20 s时对测定结果精密性的影响。结果（表 2）表明，40 和 20 s 条件下所得平均时间的 RSD 值都符合要求，流变曲线重合性较好（如图 1B 和 1C 所示）。为减少总测样时间，优选 20 s 作为该法的平均时间。

流变仪的测试间隙一般推荐为 0.5 ～ 2 mm。若测定分散体系，测样间隙原则上要在分散相尺寸的

表 2　34 ℃时平均时间对流动曲线拟合参数和精密度的影响

Tab.2　Effect of Average Time on the Fitting Parameters and the Accuracies of the Flow Curves Determined at 34 ℃

平均时间 /s	τ_0		η_∞	
	实测值 /Pa（n=3）	RSD/%	实测值 /(Pa·s)（n=3）	RSD/%
20	1.413±0.097	6.85	0.058±0.001	2.15
40	1.329±0.051	3.87	0.038±0.002	5.57
120	3.014±0.175	5.82	0.042±0.002	3.73



实线—黏度 - 剪切速率曲线；虚线—应力 - 剪切速率曲线。

图 1　34 ℃时平均时间为 120 s（A）、40 s（B）和 20 s（C）时测得的流动曲线

Fig.1　Flow Curves Determined at 34 ℃ with Average Time of 120 s（A）、40 s（B）and 20 s（C）

10 倍以上。此外，为了避免样品内部产生温度梯度，测试间隙不建议太大。对测样间隙的考察结果（表 3）表明，100 和 200 μm 时测得结果的 RSD 值更小。但考虑到间测样隙过小时平行板的实际不平行度问题会突显，后续试验中选择 200 μm 为测样间隙。

表 3 34 ℃时测样间隙对流动曲线拟合参数和精密度的影响

Tab.3 Effect of Sample Gap on the Fitting Parameters and the Accuracies of the Flow Curves Determined at 34 ℃

测样间隙 / μm	τ_0		η_∞	
	实测值 /Pa（n=3）	RSD/%	实测值 /（Pa·s）（n=3）	RSD/%
100	1.677±0.107	6.37	0.067±0.003	5.05
200	1.413±0.097	6.85	0.058±0.001	2.15
400	1.109±0.162	14.61	0.060±0.005	9.07

2.1.2 流动斜坡模式检测方法的建立

通过流动斜坡测样模式可获得制剂中流体的触变行为特征，观察到滞后回路区域（即触变环区域）。触变性是非牛顿流体表现出的一种可逆现象，特征是当材料承受恒定剪切速率（变形）时，表观黏度降低，而当剪切速率为 0 时，表观黏度上升（恢复）。试验中，本品的上升曲线位于返回曲线上方。

参考“**2.1.1**”项下筛选结果，采用对数刻度设置扫描参数，测试间隙为 200 μm，剪切速率设定为先从 0.01 s^{-1} 增至 100 s^{-1}、再从 100 s^{-1} 降至 0.01 s^{-1}。对原研制剂进行测定，考察平均时间设定为 2 和 3 min 时所得曲线的稳定性，并计算 S_R，以 RSD 小于 15%作为标准。

结果（表 4）表明，平均时间设定为 2 min 时，2 种曲线 S_R 的 RSD 值更小，曲线间重合性也更佳（图 2）。因此，平均时间设定为 2 min。

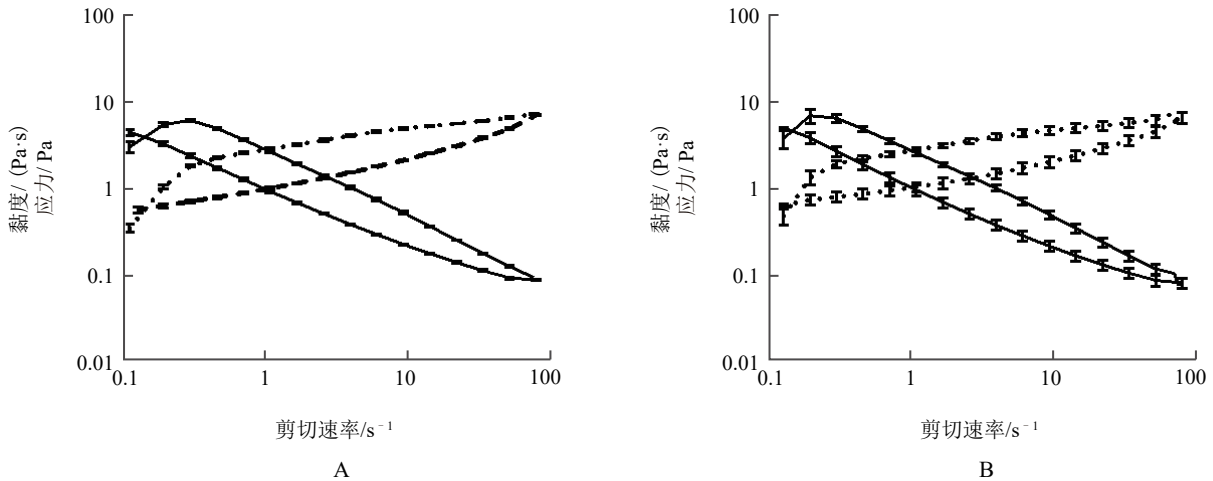
表 4 平均时间对 S_R 值和精密度的影响

Tab.4 Effect of Average Time on the S_R Values and the Accuracies

平均时间 / min	剪切应力曲线的 S_R 值		黏度曲线的 S_R 值	
	实测值 /（Pa·s^{-1}）（n=3）	RSD/%	实测值 /（Pa·s·s^{-1}）（n=3）	RSD/%
2	0.910±0.015	1.63	0.893±0.015	1.65
3	0.883±0.034	3.83	0.873±0.027	3.08

2.1.3 振荡振幅模式检测方法的建立

振荡振幅扫描，又称应变扫描。振荡测试是对样品施加一个周期性变化的正弦刺激（应变或应力）并记录实时响应（应力或应变），待振荡达到稳态时，通过解析响应对刺激的关联关系，得到样品的黏弹性能信息，是评估物质 / 材料黏弹性的有效手段。将动态模量对应变或应力作图，模量基本不变的区域即为 LVER，通过软件中的 Onset Point 模式对曲线进行分析，可获得曲线双切线的交点值（即临界应变 / 临界应力），确定 LVER 的最大值。在 LVER 内，



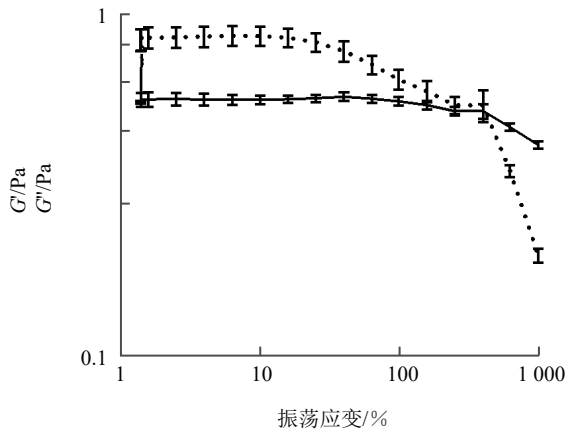
实线—黏度 - 剪切速率曲线；虚线—应力 - 剪切速率曲线。

图 2 34 ℃时测得的平均时间为 2 min（A）和 3 min（B）时的流动曲线

Fig.2 Flow Curves Determined at 34 ℃ with Average Time of 2 min（A）and 3 min（B）

动态模量等线性黏弹参数有明确的物理意义；在非线性区内的 *G'* 和 *G"* 只反映非线性响应的基频贡献对刺激的相关性，没有明确的物理意义。对于分散体系来说，在分散相体积分数固定的情况下，分散越均匀，临界应变越大。

对原研制剂进行测定，参数设置如下：测试温度 34 ℃，数据采集模式为对数刻度，每个数量级测样点数 5，频率 1 Hz，应变范围 0.01%～1 000%，测样间隙 200 μm。结束后通过计算得到临界应变，以 RSD 小于 15%作为标准进行评判。所得流动曲线如图 3 所示。结果（表 5）表明，该法的 RSD<15%，满足测定需求。



实线—*G"*- 振荡应变曲线；虚线—*G'*- 振荡应变曲线。

图 3　34 ℃时测得的流动曲线

Fig.3　Rheological Curves Determined at 34 ℃

表 5　34 ℃时线性黏弹响应的曲线拟合参数及精密度结果

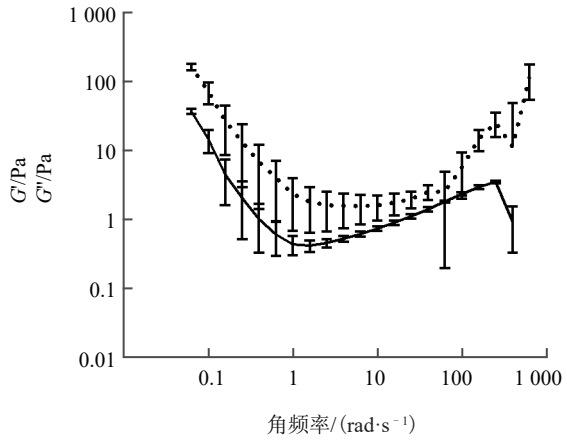
Tab.5　Curve Fitting Parameters and Precision Results of the Linear Viscoelastic Response at 34 ℃

响应量	*G'* 曲线		*G"* 曲线	
	实测值 /Pa（*n*=3）	RSD/%	实测值 /Pa（*n*=3）	RSD/%
应变	23.346±1.851	7.93	40.266±0.747	1.86
应力	0.292±0.017	5.87	0.707±0.028	4.01

2.1.4　振荡频率模式检测方法的建立

振荡频率扫描，简称频率扫描，主要用于探测结构信息，可采用小应变变频或小应力变频模式进行，该法试验时，所设应变或应力最好落在 LVER 内。

采用小应变变频模式对原研制剂进行振荡振幅检测的结果（表 5）显示，其 *G'* 的临界应变值约为 23.35%，*G"* 的临界应变值约为 40.27%，因此将该法应变值设置为 10%，其余检测参数设置如下：测试温度 34 ℃，数据采集模式为对数刻度，每个数量级测样点数为 5，测样频率为 100 ～ 0.01 Hz，测样间隙 200 μm。测样结束后计算最大模量值的 RSD，以 RSD 小于 15%为标准进行评判。结果（图 4）显示，该法测得曲线的重合度不佳，无法准确获得制剂的流变信息。



实线—*G"*- 角频率曲线；虚线—*G'*- 角频率曲线。

图 4　控制应变模式下的流动曲线

Fig.4　Flow Curves in the Controlling Strain Mode

更换为小应力变频模式对原研制剂进行测定，更改测定温度为 25 ℃，角频率为 5 ～ 0.1 rad/s，其他检测参数同上。结果（表 6）表明，应力设置为 1 Pa 时 RSD 值更小。但由振荡振幅结果（表 5）可知，该样品 *G'* 的临界应力为 0.29 Pa，*G"* 的临界应力为 0.71 Pa，并未超过 1 Pa。所以，后续选择 0.1 Pa 作为控制应力值。

将应力控制为 0.1 Pa，在 25 ℃条件下进一步考察角频率“从大到小”（5 ～ 0.1 rad/s）和“从小到

表 6　25 ℃时不同应力值下的测定结果

Tab.6　Results Determined at Different Stress Values and at 25 ℃

应力 /Pa	G'_{max}		G''_{max}	
	实测值 /Pa（*n*=3）	RSD/%	实测值 /Pa（*n*=3）	RSD/%
0.1	0.965±0.069	7.13	0.592±0.027	4.49
0.5	0.407±0.095	23.27	0.455±0.044	9.76
1	0.369±0.008	2.30	0.461±0.007	1.43

大”（0.1 ～ 5 rad/s）对原研制剂测定结果精密性的影响。结果表明，上述 2 种设定下，测得样品的 G'_{max} 分别为（0.965±0.069）和（0.497±0.028）Pa，RSD 分别为 7.13％和 5.54％（n=3）；G''_{max} 分别为（0.592±0.027）和（0.473±0.008）Pa，RSD 值分别为 4.49％和 1.63％（n=3）。可见，将角频率设置为“从小到大”进行测样，所得曲线的重合性更佳，RSD 更小。所以，后续试验选择角频率“从 0.1 ～ 5 rad/s”进行测样。

通过以上考察，最终选定在控制应力（设置为 0.1 Pa）、变换角频率（0.1 ～ 5 rad/s）的模式下进行测定，采用对数刻度设置扫描参数，测样间隙为 200 μm。

2.2 方法学验证

在上述试验基础上，确定了 25 和 34 ℃条件下各检测模式下的参数设置，具体如下。

使用 40 mm 的平行板进行流动扫描，用一次性滴管在测样前进行混合。吸取样品约 1 mL，置下板上，间隙设置为 200 μm。测量剪切速率从 100 s^{-1} 变化至 0.1 s^{-1} 情况下样品的流变特征。确定关键质量属性 τ_0 和 η_∞。

使用 40 mm 的平行板进行流动斜坡试验，评估触变性。测量剪切速率从 0.1 s^{-1} 变化至 100 s^{-1}、再从 100 s^{-1} 变化至 0.1 s^{-1} 的流变特征，计算 S_R 值。

使用 40 mm 的平行板进行振荡振幅试验，评估黏弹性。以 1 Hz 的振荡频率，在 0.01％到 1 000％的应变范围测量，确定 LVER。

随后根据 LVER 范围进行频率扫描，在 0.1 Pa 的应力条件下，测定角频率从 0.1 rad/s 增至 5 rad/s 时样品的流变特性，计算 G'、G'' 和 tanδ。

2.2.1 方法重复性考察

采用上述建立的测定方法于 1 d 内对原研制剂测样 5 次，对流动曲线进行拟合，计算拟合参数的 RSD，以 RSD<15％为验收标准，以评估方法重复性。结果如表 7 所示。

结果表明，各方法的重复性 RSD 都符合设定的验收标准，从而验证了方法的适用性。若照 EMA 的标准（RSD<10％），则在 34 ℃测得的部分参数［例如 τ_0、G'' 曲线的 LVER 和 G'_{max}］结果的 RSD 不符合要求。

2.2.2 方法精密性考察

采用上述建立的测定方法于 3 d 内对原研制剂进行一式三份测量，对流动曲线进行拟合，计算其 RSD，以 RSD<15％为验收标准评估方法精密性。结果如表 7 所示。

表 7 34 和 25 ℃时不同方法的重复性和精密度评估结果 [1)]

Tab.7 Evaluation Results of Repeatability and Precision of Different Methods at 34 and 25 ℃

检测模式	参数	34 ℃			25 ℃		
		重复性结果（n=5）	日内精密度（n=3）	日间精密度（n=9）	重复性结果（n=5）	日内精密度（n=3）	日间精密度（n=9）
流动扫描	τ_0/Pa	1.037±0.131 (12.64)	1.413±0.097 (6.85)	1.292±0.164 (12.70)	0.658±0.052 (7.97)	0.617±0.123 (19.94)	0.634±0.077 (12.10)
	η_∞/(Pa·s)	0.050±0.003 (6.06)	0.058±0.001 (2.15)	0.052±0.007 (12.92)	0.041±0.002 (5.69)	0.046±0.007 (14.48)	0.043±0.004 (10.45)
流动斜坡	剪切应力曲线的 S_R 值/(Pa·s^{-1})	0.931±0.041 (4.40)	0.910±0.015 (1.63)	0.865±0.059 (6.85)	0.924±0.057 (6.15)	0.938±0.035 (3.75)	0.967±0.038 (3.96)
	黏度曲线的 S_R 值/(Pa·s·s^{-1})	0.920±0.041 (4.41)	0.893±0.015 (1.65)	0.862±0.051 (5.87)	0.907±0.051 (5.64)	0.937±0.037 (3.92)	0.959±0.041 (4.31)
振荡振幅	G' 曲线的 LVER/％	24.174±2.210 (9.14)	28.245±2.304 (8.16)	27.911±3.030 (10.86)	23.683±0.763 (3.22)	21.118±1.095 (5.18)	22.515±1.970 (8.75)
	G'' 曲线的 LVER/％	38.942±3.920 (10.07)	53.758±4.492 (8.36)	52.591±7.701 (14.64)	34.768±3.070 (8.83)	35.748±3.546 (9.92)	35.661±3.421 (9.59)
振荡频率	G'_{max}/Pa	0.720±0.081 (11.27)	0.596±0.029 (4.79)	0.618±0.064 (10.43)	0.614±0.037 (6.03)	0.500±0.025 (4.96)	0.569±0.074 (13.01)
	G''_{max}/Pa	0.500±0.018 (3.52)	0.452±0.005 (1.19)	0.472±0.021 (4.36)	0.492±0.010 (1.98)	0.475±0.005 (1.02)	0.493±0.020 (4.04)
	tanδ	0.700±0.059 (8.36)	0.760±0.030 (3.95)	0.770±0.062 (8.02)	0.803±0.032 (4.02)	0.095±0.036 (3.81)	0.877±0.087 (9.95)

注：[1)] 括号内为 RSD 值/％。

结果表明，多数参数都符合验收标准，但 25 ℃时测得 τ_0 的日内精密度 RSD 超出设定范围。若照 EMA 的标准，则有较多参数不符合要求：在 25 ℃条件下检测，τ_0 和 η_∞ 的日内和日间精密度 RSD 超出限定范围，G'_{max} 的日间精密度 RSD 超出限定范围；在 34 ℃条件下检测，τ_0、η_∞、G' 曲线的 LVER、G'' 曲线的 LVER 和 G'_{max} 的日间精密度 RSD 超出限定范围。

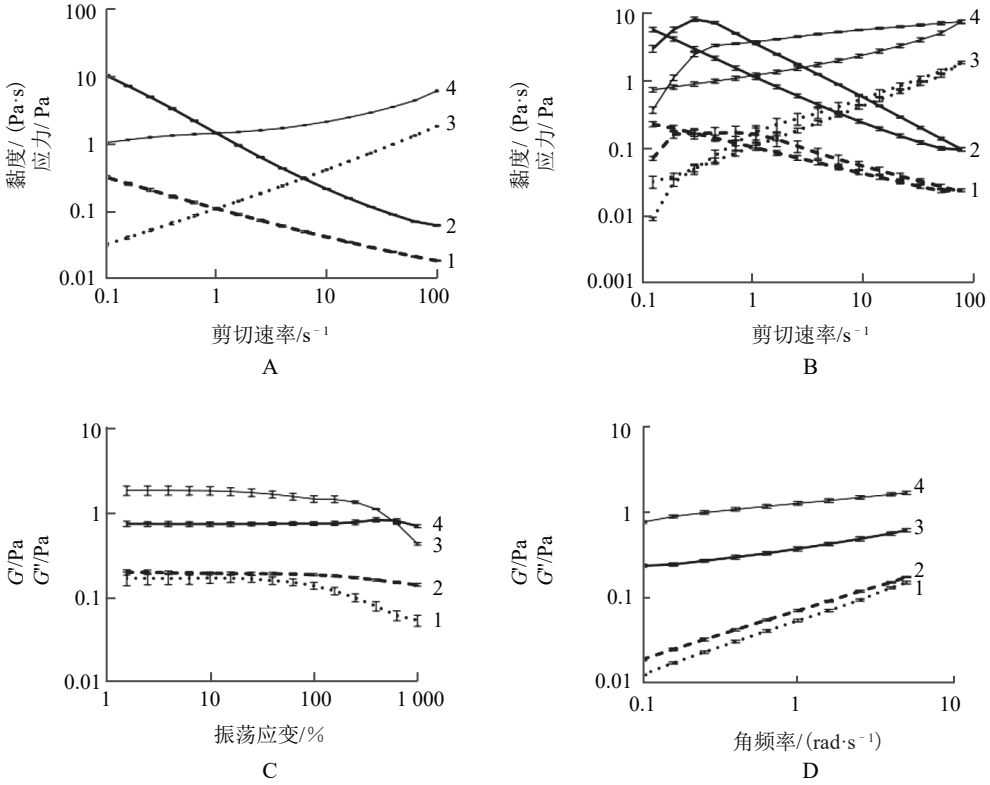
2.2.3　方法特异性考察

通过测定黏度不同的仿制样品（F1 和 F2），评估不同方法对样品处方变化的敏感度，验证流变学方法的特异性。测定结果表明，各模式下不同黏度制剂的流动曲线（图 5 和 6）具有差异，表明所建立方法具有特异性。在 2 种温度（25 和 34 ℃）时不同方法的验证结果（表 8）表明，大部分参数的 RSD 符合设定标准（tanδ 除外）。但若照 EMA 标准，有较多参数超出标准：34 ℃测得的 τ_0、G'' 曲线的 LVER、G''_{max} 和 tanδ，25 ℃测得的 G' 曲线的 LVER。

不过，本项下的验证试验未考察方法的选择性和敏感性。体外透皮试验（*in vitro* permeation test，IVPT）、体外释放试验（*in vitro* release test，IVRT）等还需要考察方法对不同制剂中处方组分浓度变化的检测灵敏度。

2.2.4　方法稳健性考察

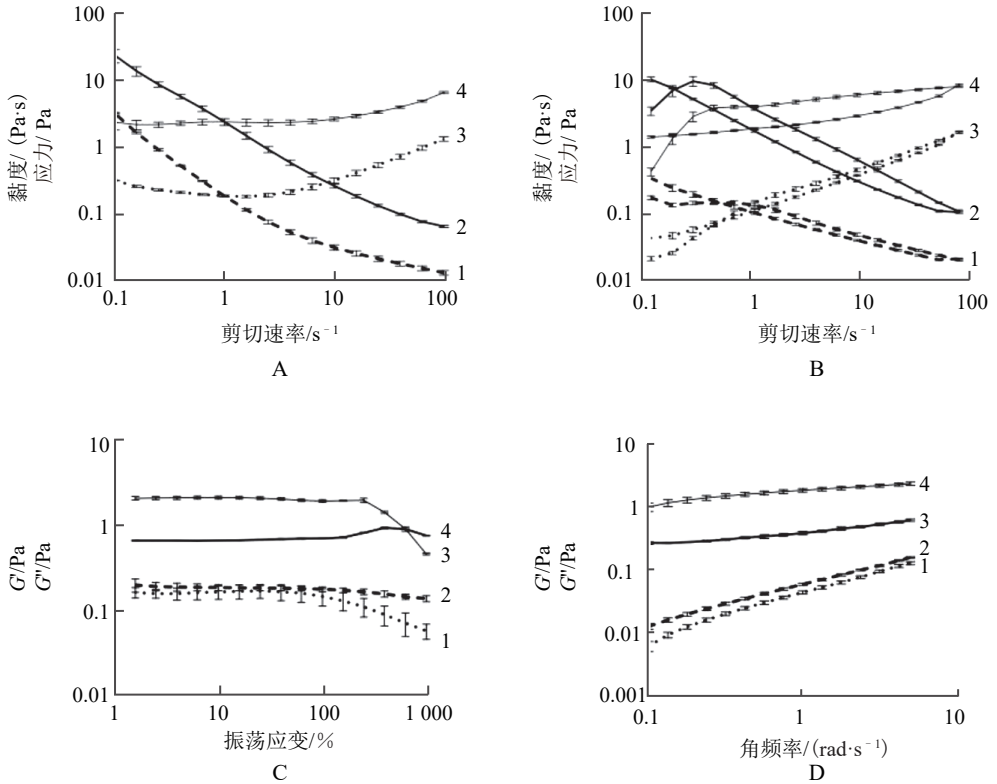
为了评估方法的稳健性，评估了温度波动和平行板的影响。采用不同方法对原研制剂进行检测，根据拟合模型计算各参数，并计算其 RSD；以



A 和 B—流动扫描和流动斜坡模式（1—F1，黏度 - 剪切速率曲线；2—F2，黏度 - 剪切速率曲线；3—F1，应力 - 剪切速率曲线；4—F2，应力 - 剪切速率曲线）；C—振幅振荡模式（1—F1，G'- 振荡应变曲线；2—F1，G''- 振荡应变曲线；3—F2，G'- 振荡应变曲线；4—F2，G''- 振荡应变曲线）；D—振荡频率模式（1—F1，G'- 角频率曲线；2—F1，G''- 角频率曲线；3—F2，G''- 角频率曲线；4—F2，G'- 角频率曲线）。

图 5　25 ℃时测得的不同黏度制剂的流动曲线

Fig.5　Flow Curves of Preparations with Different Viscosities Determined at 25 ℃



A 和 B—流动扫描和流动斜坡模式（1—F1，黏度 - 剪切速率曲线；2—F2，黏度 - 剪切速率曲线；3—F1，应力 - 剪切速率曲线；4—F2，应力 - 剪切速率曲线）；C—振幅振荡模式（1—F1，*G*'- 振荡应变曲线；2—F1，*G*"- 振荡应变曲线；3—F2，*G*'- 振荡应变曲线；4—F2，*G*"- 振荡应变曲线）；D—振荡频率模式（1—F1，*G*'- 角频率曲线；2—F1，*G*"- 角频率曲线；3—F2，*G*"- 角频率曲线；4—F2，*G*'- 角频率曲线）。

图 6 34 ℃时测得的不同黏度制剂的流动曲线

Fig.6 Flow Curves of Preparations with Different Viscosities Determined at 34 ℃

表 8 对不同黏度处方的方法特异性评估结果 [1] ($\bar{x}\pm s$，n=3)

Tab.8 Evaluation Results of Method Specificity to Preparations with Different Viscosities ($\bar{x}\pm s$, n=3)

检测模式	参数	34 ℃		25 ℃	
		F1	F2	F1	F2
流动扫描	τ_0/Pa	0.202±0.004 (2.11)	2.237±0.291 (13.01)	0.024±0.002 (7.55)	1.255±0.022 (1.72)
	η_∞/(Pa·s)	0.015±0.001 (7.15)	0.043±0.002 (3.41)	0.007±0.001 (7.43)	0.039±0.002 (4.01)
流动斜坡	剪切应力曲线的 S_R 值 /(Pa·s^{-1})	0.204±0.017 (8.54)	0.720±0.063 (8.81)	0.338±0.027 (8.02)	1.003±0.048 (4.74)
	黏度曲线的 S_R 值 /(Pa·s·s^{-1})	0.220±0.015 (6.94)	0.706±0.062 (8.73)	0.246±0.019 (7.59)	0.987±0.048 (4.82)
振幅振荡	*G*' 曲线的 LVER/%	29.060±2.695 (9.27)	35.030±3.445 (9.84)	23.778±1.489 (6.26)	18.887±2.745 (14.53)
	G" 曲线的 LVER/%	35.179±3.504 (9.96)	27.072±2.734 (10.10)	24.375±1.342 (5.51)	9.903±0.669 (6.76)
振荡频率	G'_{max}/Pa	0.150±0.014 (9.22)	2.392±0.111 (4.62)	0.150±0.004 (2.89)	1.744±0.058 (3.35)
	G''_{max}/Pa	0.137±0.015 (10.93)	0.624±0.020 (3.21)	0.176±0.003 (1.54)	0.629±0.023 (3.69)
	tanδ	0.932±0.190 (20.35)	0.262±0.016 (6.15)	1.170±0.019 (1.59)	0.361±0.005 (1.48)

注：[1] 括号内为 RSD 值 /%。

RSD<15%为验收标准，评估方法稳健性。

结果（表 9）表明，制剂在室温和应用温度下的测定结果总体是稳定的，各个参数测定结果的 RSD 都小于 15%。但 2 种检测温度下测得的各个参数仍具有一定差异，例如在 34 ℃时测得的屈服值比在 25 ℃时测得结果大。这可能是随温度的上升，制剂组分的分子间作用力加大而造成的；该结果也说明糠酸氟替卡松鼻用喷雾剂在常温放置时黏度低，有利于喷出，而在鼻腔中黏度增高，有利于黏附在鼻腔内而发挥药效。此外，照 EMA 标准，在 34 ℃时（n=9）有 4 个参数（2 种曲线的 S_R 值、G' 和 G'' 曲线的 LVER）RSD 值超出标准，在 25 ℃时有 2 个参数（τ_0、G'' 曲线的 LVER）RSD 值超出标准。

在振荡测试中采用不同直径（40 和 25 mm）的平行板进行试验，以评价平行板稳健性。结果如表 10 所示。可见，采用 25 mm 平行板测得参数的 RSD 超出设定标准较多，推测是产品黏度较低时，选用小直径的平行板会导致扭矩过低。因此，建议对于低黏度产品，在测试时选择直径较大的平行板。

在流动测试中还考察了平行板角度的影响，选择了 40 mm 平行板和 1° 40 mm 锥板。结果如表 11 所示。可见，采用 2 种角度平行板所得参数的 RSD 都符合设定标准；但照 EMA 标准，采用 1° 40 mm 锥板测得参数的 RSD 超出标准更多。

平行板与锥板的差异在于：当使用平行板测量时，间隙处处相等，但当平行板开始旋转时，样品在板中的受力是不均匀的，如边缘处的剪切速率会比中心点的大，也就是说平行板所构建的流场是非均匀的；而锥板测量系统由于两板之间存在夹角，所以锥板所构建的流场是均匀的，即锥板构建的流场不依赖于半径，应变、剪切速率和应力处处相等。从理论来说，应该是锥板的测定结果精密性更佳，但实际测定结果却表明平行板所得结果的精密性更好，这不能排除是方法建立时选用平行板作为测量工具的影响。

2.3 更新风险图

通过以上方法建立和方法验证的研究，确定了可能对结果产生较大影响的参数，并对流变学试验参数对结果的影响程度进行风险判定，结果如表 12 所示。不同测样模式的影响参数不同，在进行具体制剂的流变学测定时需要仔细考虑各参数的设置范围。

3 讨论

以上试验结果表明，本研究建立的测定方法重复性、精密度、特异性、温度稳健性良好，但平行

表 9　温度稳健性评估结果 [1)]

Tab.9　Evaluation Results of Temperature Robustness

检测模式	参数	模拟鼻腔环境				模拟室温环境			
		32 ℃	34 ℃	36 ℃	(34±2) ℃ (n=9)	23 ℃	25 ℃	27 ℃	(25±2) ℃ (n=9)
流动扫描	τ_0/Pa	0.988±0063 (6.34)	0.962±0.048 (4.96)	1.159±0.033 (2.82)	1.036±0.100 (9.66)	0.292±0.011 (3.93)	0.333±0.033 (10.03)	0.3551±0.015 (4.16)	0.325±0.033 (10.17)
	η_∞/(Pa·s)	0.047±0.002 (3.26)	0.044±0.001 (2.97)	0.048±0.001 (2.83)	0.046±0.002 (4.35)	0.028±0.001 (2.08)	0.029±0.001 (4.37)	0.029±0 (1.37)	0.029±0.001 (3.49)
流动斜坡	剪切应力曲线的 S_R 值/(Pa·s^{-1})	0.984±0.062 (6.35)	0.910±0.015 (1.63)	0.775±0.040 (5.10)	0.891±0.095 (10.66)	0.934±0.008 (0.88)	0.899±0.050 (5.57)	0.904±0.015 (1.64)	0.912±0.034 (3.74)
	黏度曲线的 S_R 值/(Pa·s·s^{-1})	0.992±0.064 (6.43)	0.893±0.015 (1.65)	0.751±0.047 (6.26)	0.878±0.109 (12.45)	0.955±0.012 (1.24)	0.897±0.045 (4.97)	0.884±0.028 (3.16)	0.912±0.044 (4.83)
振幅振荡	G' 曲线的 LVER/%	25.699±1.369 (5.33)	23.992±2.828 (11.79)	29.181±2.841 (9.74)	26.290±3.262 (12.41)	23.821±0.799 (3.36)	23.970±0.816 (3.40)	27.876±2.417 (8.67)	25.222±2.430 (9.64)
	G'' 曲线的 LVER/%	44.581±2.197 (4.93)	37.036±3.883 (10.48)	41.934±4.552 (10.86)	41.184±4.828 (11.72)	32.111±4.622 (14.40)	33.311±3.209 (9.63)	32.245±4.551 (14.11)	32.556±4.213 (12.94)
振荡频率	G'_{max}/Pa	0.697±0.065 (9.34)	0.664±0.045 (6.78)	0.735±0.046 (6.23)	0.699±0.060 (8.63)	0.570±0.006 (0.98)	0.639±0.026 (4.02)	0.593±0.039 (6.52)	0.601±0.039 (6.56)
	G''_{max}/Pa	0.495±0.011 (2.26)	0.490±0.007 (1.52)	0.478±0.008 (1.64)	0.488±0.011 (2.36)	0.490±0.003 (0.66)	0.499±0.008 (1.54)	0.486±0.014 (2.84)	0.491±0.011 (2.18)
	tanδ	0.715±0.049 (6.79)	0.740±0.042 (5.61)	0.653±0.039 (5.98)	0.702±0.057 (8.08)	0.859±0.006 (0.74)	0.781±0.019 (2.46)	0.822±0.037 (4.52)	0.820±0.040 (4.90)

注：[1)] 括号内为 RSD 值/%。

表 10 振荡测试中平行板直径的影响 [1)]

Tab.10 Effect of Diameter of the Parallel Plate in the Oscillation Tests

检测模式	参数	34 ℃			25 ℃		
		40 mm 平行板 (n=3)	25 mm 平行板 (n=3)	不同板 (n=6)	40 mm 平行板 (n=3)	25 mm 平行板 (n=3)	不同板 (n=6)
振幅振荡	G' 曲线的 LVER/%	25.579±0.966 (3.78)	30.254±10.603 (35.05)	27.916±7.883 (28.24)	22.44±2.398 (10.67)	21.570±4.854 (11.50)	22.022±3.855 (17.51)
	G'' 曲线的 LVER/%	45.423±4.738 (10.43)	43.734±6.740 (15.42)	44.579±5.886 (13.20)	37.923±1.258 (3.32)	26.136±4.862 (18.60)	32.029±6.881 (21.48)
振荡频率	G'_{max}/Pa	0.664±0.045 (6.78)	0.235±0.027 (11.57)	0.449±0.218 (48.47)	0.639±0.026 (4.02)	0.112±0.005 (4.79)	0.376±0.264 (70.26)
	G''_{max}/Pa	0.490±0.007 (1.52)	0.103±0.001 (1.29)	0.296±0.193 (65.23)	0.499±0.008 (1.54)	0.102±0.006 (6.11)	0.300±0.199 (66.14)
	tanδ	0.740±0.042 (5.61)	0.445±0.048 (10.71)	0.633±0.154 (24.39)	0.781±0.019 (2.46)	0.905±0.027 (2.93)	0.838±0.066 (7.92)

注：[1)] 括号内为 RSD 值 /%。

表 11 流动测试中平行板角度的影响 [1)]

Tab.11 Effect of Angle of the Parallel Plate in the Oscillation Tests

检测方法	参数	34 ℃			25 ℃		
		40 mm 平行板 (n=3)	1° 40 mm 锥板 (n=3)	不同板 (n=6)	40 mm 平行板 (n=3)	1° 40 mm 锥板 (n=3)	不同板 (n=6)
流动扫描	τ_0/Pa	0.633±0.047 (7.41)	0.332±0.010 (2.94)	0.482±0.154 (31.96)	0.333±0.033 (10.03)	0.393±0.047 (12.02)	0.363±0.051 (14.04)
	η_∞/(Pa·s)	0.035±0.001 (3.11)	0.024±0.0004 (1.51)	0.029±0.005 (17.44)	0.029±0.001 (4.37)	0.029±0.002 (8.69)	0.029±0.002 (6.88)
流动斜坡	剪切应力曲线的 S_R 值 /(Pa·s^{-1})	0.899±0.050 (5.57)	0.882±0.093 (10.57)	0.891±0.075 (8.46)	0.735±0.067 (9.07)	0.759±0.057 (7.55)	0.747±0.063 (8.47)
	黏度曲线的 S_R 值 /(Pa·s·s^{-1})	0.897±0.045 (4.97)	0.877±0.096 (10.95)	0.887±0.076 (8.51)	0.730±0.059 (8.12)	0.754±0.065 (8.63)	0.742±0.063 (8.54)

注：[1)] 括号内为 RSD 值 /%。

表 12 流变学试验中设定参数的风险评估结果 [1)]

Tab.12 Risk Assessment Results of the Setting Parameters in Rheological Tests

设定参数	流动扫描		流动斜坡	振幅振荡	振荡频率		
	τ_0	η_∞	S_R	LVER	G'	G''	tanδ
测样间隙	低	低	低	低	低	低	低
上样量	低	低	低	低	低	低	低
上样方式	高	高	高	高	高	高	高
温度	高	中	低	高	中	中	中
数据采集模式	低	低	低	低	高	高	高
平行板	高	高	高	高	高	高	高
测样时间	高	中	中	中	中	中	中
平衡时间	中	中	中	中	中	中	中
剪切速率范围	中	中	中	中	中	中	中
应力 / 应变	—	—	—	中	—	—	—
LVER 内的应力 / 应变	—	—	—	—	高	高	低
频率范围	—	—	—	—	中	中	低

注：[1)] 低、中、高分别表示低风险变量、中风险变量、高风险变量。

板稳健性较差，因此建议测样时使用同一平行板，不宜更换不同的平行板交替测样。

此外，本研究设计中存在一些不足：只在流动扫描模式下考察了测样间隙；在流动斜坡模式试验中选用的剪切速率范围直接参考了流动扫描模式试验，未进一步考察剪切速率对测定结果的影响；对于振荡振幅模式，还可进一步优化剪切速率范围，并考察频率的设定是否对测定结果存在影响。同时，

方法验证试验中的特异性验证不够全面，未能考察组分浓度变化的敏感性。本研究中，重复试验次数只有 3 次，而流变学研究可能还需要增加测定次数来减小上样过程带来的差异。

对于给定黏度的样品，测定时并不总是可以从任意低的剪切速率开始，也不能在达到任意高的剪切速率时为止；剪切速率过低，仪器测量不出比下限更低的应力，可能造成测得的黏度值偏高；反之，剪切速率过高时，测得的黏度值可能会偏低。

在方法学验证时还应该考察上样方式对样品的影响，对于乳膏、软膏等半固体制剂，注射器注射或药匙挖取的上样操作可能会对制剂的微观结构产生影响。对于温度敏感性制剂，还需尽量控制测样时的环境温度。

在流变学的系统验证过程中发现，如果照 EMA 标准（RSD<10%），则有许多参数都超出标准；就算是放宽标准为 RSD<15%，也还有不少参数超出设定范围。确定外用制剂流变学特征等参数的等效标准范围，仍需要更多试验（包括体内试验）的验证。

参考文献：

[1] PLEGUEZUELOS-VILLA M, MERINO-SANJUÁN M, HERNÁNDEZ M J, *et al*. Relationship between rheological properties, *in vitro* release and *in vivo* equivalency of topical formulations of diclofenac [J]. *Int J Pharm*, 2019, **572**: 118755.

[2] TIAN H, WANG K, LAN H B, *et al*. Effect of hybrid gelator systems of beeswax-carrageenan-xanthan on rheological properties and printability of litchi inks for 3D food printing [J]. *Food Hydrocoll*, 2021, **113**: 106482.

[3] LIU Z B, ZHANG M, BHANDARI B, *et al*. Impact of rheological properties of mashed potatoes on 3D printing [J]. *J Food Eng*, 2018, **220**: 76-82.

[4] LI M C, WU Q, MOON R J, *et al*. Rheological aspects of cellulose nanomaterials: governing factors and emerging applications [J]. *Adv Mater*, 2021, **33**(21): e2006052.

[5] ZHANG X, ZHANG S, ZHONG M, *et al*. Soy and whey protein isolate mixture/calcium chloride thermally induced emulsion gels: rheological properties and digestive characteristics [J]. *Food Chem*, 2022, **380**: 132212.

[6] WANATASANAPPAN V V, KANTI P K, SHARMA P, *et al*. Viscosity and rheological behavior of Al_2O_3-Fe_2O_3/water-EG based hybrid nanofluid: a new correlation based on mixture ratio [J]. *J Mol Liq*, 2023, **375**: 121365.

[7] ZHANG F, CAI X X, DING L, *et al*. Effect of pH, ionic strength, chitosan deacetylation on the stability and rheological properties of O/W emulsions formulated with chitosan/casein complexes [J]. *Food Hydrocoll*, 2021, **111**: 106211.

[8] SHARMA A K, TIWARI A K, DIXIT A R. Rheological behaviour of nanofluids: a review [J]. *Renew Sust Energ Rev*, 2016, **53**: 779-791.

[9] 黄乐乐，马晋隆，王嘉明，等. 流变学评价在皮肤局部外用半固体制剂处方开发中的应用进展 [J]. 中国医药工业杂志，2022, **53**(5): 611-620.

[10] 王经纬，陈晓颙，袁　怡，等. 基于流变学研究外用半固体制剂质量等同性的应用进展 [J]. 药学前沿，2024, **28**(10): 300-309.

[11] LI M C, WU Q L, SONG K L, *et al*. Cellulose nanoparticles: structure-morphology-rheology relationships [J]. *ACS Sustainable Chem Eng*, 2015, **3**(5): 821-832.

[12] EMA. Guideline on quality and equivalence of locally applied, locally acting cutaneous products [EB/OL]. (2024-09-09) [2024-11-19]. https://www. ema. europa. eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-quality-equivalence-locally-applied-locally-acting-cutaneous-products_en. pdf.