

· 论著 ·

用星点设计-效应面法优化聚乙烯醇-盐酸普萘洛尔多孔水凝胶处方

张灵娜, 张敏新, 宋洪涛 (联勤保障部队 900 医院, 福建 福州 350000)

[摘要] 目的 采用星点设计-效应面法优化聚乙烯醇-盐酸普萘洛尔多孔水凝胶的处方。方法 以聚乙烯醇和壳聚糖的用量为考察因素, 12 h 体外经皮累积渗透量为评价指标, 分别用多元线性模型、非线性模型描述考察因素和评价指标之间的关系。根据最佳数学模型绘制效应面和等高线图, 确定最优处方。结果 非线性模型中二次多项式拟合的相关系数较高, $r=0.9702$, 按最佳处方制备的多孔水凝胶 12 h 累积渗透量预测值与理论值偏差为 4.32%, 模型具有良好的预测性。结论 该处方应用本设计方法能实现多指标的同步优化, 所建立的模型具有良好的预测性, 可用于处方优化。

[关键词] 普萘洛尔; 循环冷冻-解冻法; 星点设计-效应面法

[中图分类号] R979.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2019)03-0222-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.03.006

Optimization of the formulation of polyvinyl alcohol-propranolol hydrochloride porous hydrogel by central composite design-response surface method

ZHANG Lingna, ZHANG Minxin, SONG Hongtao (No. 900 Hospital of Joint Support Forces, Fuzhou 350000, China)

[Abstract] **Objective** To optimize the formulation of polyvinyl alcohol-propranolol hydrochloride porous hydrogel by central composite design-response surface method. **Methods** The amount of polyvinyl alcohol and chitosan were taken as the investigation factors, the percutaneous cumulative permeation amount *in vitro* was used as the evaluation index, and the relationship between the investigation index and the investigation factor were described by the multivariate linear model and the nonlinear model. The optimal formulation was determined by plotting the effect surface and the contour map according to the model. **Results** The quadratic polynomial fitting in the nonlinear model had a higher complex correlation coefficient, $r=0.9702$. The porous hydrogel's 12 h cumulative permeation deviation between the predicted value and the theoretical value was 4.32% which was prepared by optimal formulation, and the model had good predictability. **Conclusion** The central composite design-response surface method was used to optimize the polyvinyl alcohol-propranolol hydrogel formulation, which could realize the simultaneous optimization of multiple indicators. The established model had good predictability and could be used for formulation optimization.

[Key words] propranolol hydrogel; circulating freezing and thawing; central composite design-response surface method

普萘洛尔是治疗婴幼儿血管瘤的一线药物^[1-2]。临床研究表明, 外用盐酸普萘洛尔和口服盐酸普萘洛尔治疗婴幼儿增生期血管瘤的临床疗效无显著差异^[3]。课题组前期研究的聚乙烯醇-盐酸普萘洛尔多孔水凝胶比普通盐酸普萘洛尔凝胶透皮性能更佳, 使用肤感更好。凝胶基质是聚乙烯醇-盐酸普萘洛尔多孔水凝胶的处方基础, 对于凝胶的透皮性能、

透气性和载药量起决定性作用^[4], 不同比例的聚乙烯醇-壳聚糖经过循环冷冻-解冻法可得到不同孔径的凝胶基质^[5]。本研究以体外经皮累积渗透量为评价指标, 采用星点设计-效应面法对凝胶成型影响较大的聚乙烯醇-124 (PVA-124) 和壳聚糖 (CS) 用量进行优化, 得到孔径更均匀、经皮渗透性能更好的凝胶基质处方。对聚乙烯醇-盐酸普萘洛尔多孔水凝胶的经皮渗透机制进行研究, 为后续研究奠定基础。

[基金项目] 福建省科技厅自然科学基金项目(2018J01185); 解放军联勤保障部队 900 医院院内科研课题(2016L11)

[作者简介] 张灵娜, 硕士, 主管药师, 研究方向: 药物新剂型, Tel: (0591)22859169, Email: 13700495910@163.com

[通讯作者] 宋洪涛, 博士, 主任药师, 博士生导师, 研究方向: 药物新剂型与制剂新技术, Tel: (0591)22859459, Email: sohoto@vip.163.com

1 材料

1.1 仪器

TK-20B 透皮扩散试验仪(上海锴凯科技贸易有限公司); 1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); AL204 电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有

限公司);DF-101B集热式恒温加热磁力搅拌器(郑州长城科工贸有限公司);KQ-800KDE超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

聚乙烯醇-盐酸普萘洛尔多孔水凝胶为实验室自制[批号:20171226,规格:20 ml:0.6 g(3%);批号:20171227,规格:20 ml:1 g(5%);批号:20171228,规格:20 ml:1.6 g(8%);批号:20171229,规格:20 ml:2 g(10%)]；盐酸普萘洛尔对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100783-200401,纯度:99.2%);盐酸普萘洛尔原料药(常州亚邦制药有限公司,批号:20170311,纯度>98%);壳聚糖(济南海得贝海洋生物工程有限公司);PVA-124(西陇科学股份有限公司);甘油、羟苯乙酯(南昌白云药业有限公司);1,2-丙二醇(国药集团化学试剂有限公司);甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯;水为纯化水。

1.3 实验动物

SD大鼠,80只,雄性,体重(200±20)g,购自上海斯莱克实验动物有限公司,生产许可证号:SCXK(沪)2017-0005,实验许可证号:SYXK(闽)2018-0006,动物实验操作员岗位证号:(闽实动会字)第2016-149号;实验动物批号:0351588,经医院动物伦理委员会审核认证。

2 方法与结果

2.1 聚乙烯醇-盐酸普萘洛尔多孔水凝胶(PVA-PPL)的制备

以PVA-124作为致孔剂,采用循环冷冻-解冻法制备多孔水凝胶。取处方量PVA-124分散于适量纯化水中,0℃冰水浴溶胀3h,再置于90℃水浴加热0.5h,不断搅拌至完全溶解;处方量CS分散于适量2%乙酸溶液中,搅拌至完全溶胀。将PVA溶液与CS溶液混合,搅拌均匀,置于-20℃冰箱冷冻16h后取出,于室温解冻8h,如此冷冻-解冻过程循环3次。将所得凝胶置于20%乙醇溶液(V/V)中溶胀1h,加入处方量盐酸普萘洛尔原料药及甘油、羟苯乙酯等辅料,配制成流动性佳的凝胶剂。

2.2 体外分析方法的建立

2.2.1 色谱条件

色谱柱为依利特Hypersil ODS-2(150 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇-乙腈-十二烷基硫酸钠磷酸缓冲液(0.15 mol/L)(9:9:7),流速:

1 ml/min,检测波长:290 nm,柱温:30℃,进样量:10 μl。

2.2.2 标准曲线的建立

精密称取盐酸普萘洛尔对照品适量,加甲醇溶解并稀释至浓度为0.500 0、0.250 0、0.062 5、0.031 2、0.015 6、0.007 8 mg/ml标准系列溶液,经0.22 μm微孔滤膜过滤。按照“2.2.1”项下色谱条件进样,以峰面积(A)为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标,绘制标准曲线,得到盐酸普萘洛尔线性回归方程: $A=13.254C-18.982$,相关系数 $r=1$,线性范围为0.007 9~0.507 0 mg/ml。

2.3 体外透皮试验

SD大鼠断颈处死后立即剪除腹部鼠毛,8%的Na₂S溶液去除绒毛,取腹部皮肤,剥离皮下脂肪和筋膜,用生理盐水清洗干净后,置冰箱4℃保存,备用。将处理好的鼠皮固定于Franz扩散池的两个半池之间,角质层朝上,接收池中加入7.8 ml生理盐水。将扩散池置于水浴中,温度为(32±1)℃,在供体池中加入0.5 g样品,分别于0.5、1、2、4、6、8、12 h从接收池中取样2 ml,同时在接收池中补加等量生理盐水,取出的接收液经0.45 μm微孔滤膜过滤,采用HPLC含量测定法分析,计算药物累积渗透量(Q_n,mg/cm²)。

累积渗透量计算公式:

$$Q_n = \frac{C_n \times V_0 + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times V}{A}$$

式中:Q_n为第n个取样点单位面积经皮累积渗透量;C_n为第n个取样点测得的药物浓度;V₀为接受室的体积;C_i为第i个取样点测得的药物浓度;V为取样体积;A为有效渗透面积。本实验中,V₀=7.8 ml,A=3.14 cm²,V=2 ml。

2.4 星点设计-效应面法优化处方

2.4.1 星点设计及结果

前期实验考察发现,PVA和CS的用量对于凝胶成型和经皮渗透量的影响最为明显。设计2因素5水平的星点设计实验,以PVA-124的质量分数为A因素,CS的质量分数为B因素,浓度范围分别为4%~12%和1%~4%,以0、±1、±λ为水平代码,其中λ=F^{1/4},F=2k,k为因素数,故λ=1.414。采用Design-Expert 8.0.5软件,以A和B为自变量,12 h累积渗透量(Q₁₂)为考察指标优化处方,星点实验设计因素水平代码值如表1所示,实验设计及

结果如表 2 所示。

表 1 因素水平表

| 因素 | 水平 | | | | |
|----|--------|------|-----|-------|-------|
| | -1.414 | -1 | 0 | 1 | 1.414 |
| A | 4 | 5.17 | 8 | 10.83 | 12 |
| B | 1 | 1.44 | 2.5 | 3.56 | 4 |

表 2 实验设计及结果 ($n=3$)

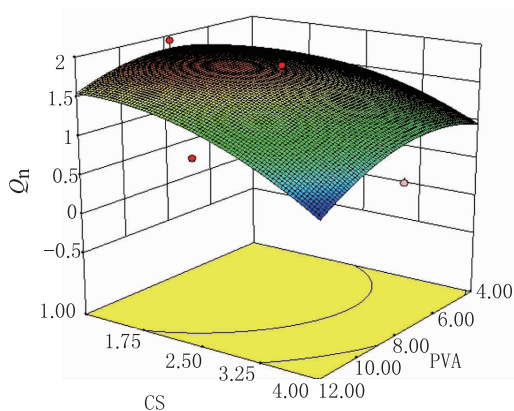
| 序号 | A(%) | B(%) | Q_{12} (mg/cm ²) |
|----|-------|------|--------------------------------|
| 1 | 5.17 | 1.44 | 1.29 |
| 2 | 10.83 | 1.44 | 1.42 |
| 3 | 5.17 | 3.56 | 0.96 |
| 4 | 10.83 | 3.56 | 0.65 |
| 5 | 4 | 2.5 | 1.34 |
| 6 | 12 | 2.5 | 1.01 |
| 7 | 8 | 1 | 1.93 |
| 8 | 8 | 4 | 0.59 |
| 9 | 8 | 2.5 | 1.72 |
| 10 | 8 | 2.5 | 1.67 |
| 11 | 8 | 2.5 | 1.70 |
| 12 | 8 | 2.5 | 1.62 |
| 13 | 8 | 2.5 | 1.81 |

2.4.2 响应曲面回归分析

使用 Design Expert 8.0.5 软件对星点设计实验数据进行整合分析。以 PVA-124 浓度和 CS 浓度为因变量,对各因素进行多种模型拟合分析,结果见表 3,可知二次多项式方程模型有更高的可行性,得方程:

$$Q_{12} = -1.81446 + 0.67484A + 1.11092B - 0.036667AB - 0.038234A^2 - 0.23411B^2$$

($r = 0.9702$)



由方差分析(表 4)可知,CS 浓度(B 因素)对模型的影响达到显著水平($P < 0.01$),此时回归方差模型显著,模型拟合度高,预测性好,表示该方法可靠。

表 3 多种模型拟合分析

| 方差来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F | P 值 |
|------|-------|-----|--------|-------|--------|
| 平均模型 | 24.32 | 1 | 24.32 | | |
| 线性模型 | 1.17 | 2 | 0.59 | 4.92 | 0.0325 |
| 双因素 | 0.048 | 1 | 0.048 | 0.38 | 0.5524 |
| 二次方程 | 1.00 | 2 | 0.50 | 25.29 | 0.0006 |
| 三次方程 | 0.089 | 2 | 0.045 | 4.49 | 0.0764 |
| 剩余方差 | 0.050 | 5 | 0.0094 | | |
| 总计 | 26.68 | 13 | 2.05 | | |

表 4 二次多项式回归模型方差分析

| 方差来源 | 均方和 | 自由度 | 均方 | F | P 值 |
|----------------|-------|-----|-------|-------|--------|
| 模型 | 2.23 | 5 | 0.45 | 22.43 | 0.0004 |
| A-PVA | 0.052 | 1 | 0.052 | 2.63 | 0.1487 |
| B-CS | 1.12 | 1 | 1.12 | 56.48 | 0.0001 |
| AB | 0.048 | 1 | 0.048 | 2.44 | 0.1624 |
| A ² | 0.65 | 1 | 0.65 | 32.78 | 0.0007 |
| B ² | 0.48 | 1 | 0.48 | 24.30 | 0.0017 |
| 残差 | 0.14 | 7 | 0.020 | | |
| 失拟检验 | 0.13 | 3 | 0.042 | | |
| 纯误差 | 0.012 | 2 | 0.003 | | |
| 总误差 | 2.37 | 12 | | | |

2.4.3 效应面优化及预测性评价

采用 Design-Expert 8.0.5 软件绘制因变量 Q_{12} 与 2 个自变量的三维效应面图和二维等高线图,结果如图 1 所示。

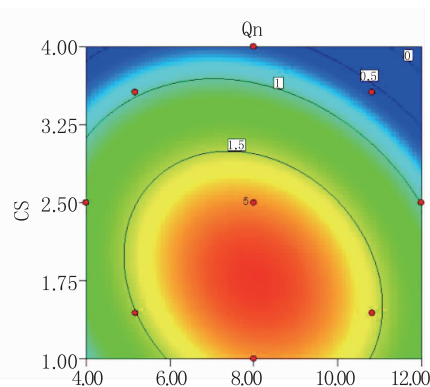


图 1 PVA 和 CS 对累积渗透量(Q_n)影响的效应面和等高线

A. 三维效应面图; B. 二维等高线图

根据三维效应面和二维等高线结果,得到优化最佳结果为 $A=7.99\%$, $B=1.75\%$,即 100 g 凝胶处方中 PVA 用量为 4.00 g、CS 用量为 0.88 g。

按照最优处方制备 3 批盐酸普萘洛尔多孔水凝

胶,按照体外透皮试验方法考察体外经皮累积渗透量,计算实测值与预测值之间的偏差,以此反映星点设计实验的准确性。以偏差作为所建模型预测性良好与否的指标,偏差($\%$)=(实测值-预测值)/预测

值 $\times 100\%$,结果见表5,表明本模型的预测性良好。最终确定盐酸普萘洛尔多孔水凝胶优化处方的组成和用量见表6。

表5 处方验证结果

| 序号 | 实测值 | 实测平均值 | 预测值 | 偏差 |
|----|------|-------|------|-------|
| 1 | 1.90 | 1.77 | 1.85 | 4.32% |
| 2 | 1.69 | | | |
| 3 | 1.72 | | | |

表6 盐酸普萘洛尔多孔水凝胶优化处方的组成和用量

| 组成 | 作用 | 用量(m/g) |
|---------|------|---------|
| 盐酸普萘洛尔 | 主药 | 3 |
| CS | 凝胶基质 | 0.88 |
| PVA-124 | 致孔剂 | 4.00 |
| 甘油 | 保湿剂 | 10 |
| 2%冰醋酸 | 溶剂 | 50 |
| 羟苯乙酯 | 防腐剂 | 0.1 |
| 加40%乙醇至 | | 100 |

3 讨论

冷冻解冻法(物理交联法)是目前医用PVA水凝胶最常使用的一种制备方法。PVA溶液在(-20~-80) $^{\circ}\text{C}$ 冷冻时相互接触的PVA分子链间氢键和范德华力相互作用,形成微晶结构;室温解冻时,部分PVA分子链恢复活动能力并调整相对位置,已形成的微晶结构不消失;再次冷冻时,微晶结构更完善;经过多次冻融后,凝胶成型并交联形成三维网络结构^[6-8]。前期研究表明,盐酸普萘洛尔多孔水凝胶的体外经皮渗透性能优于添加了氮酮的盐酸普萘洛尔凝胶。多孔水凝胶提高透皮吸收的原因可能是,水凝胶中的PVA多孔结构大大增加了凝胶内部的比表面积,使得更多亲水基团可以迅速与水分子接触,溶剂在孔状结构中的吸收或释放是由孔间对流产生,比在非孔凝胶中的扩散速度快。

PVA分子侧链有大量羟基,亲水性极好,因此随PVA含量提高,水凝胶溶胀度会相应升高;CS是目前研究较为广泛的医用生物材料,与PVA进行复合可达到协同增效的作用,CS的加入减少了PVA的结晶性,保证了凝胶的溶胀性和流动性,还能提高凝胶抗菌、止血和生物相容性等性能^[9-11]。另外,PVA中绝大部分羟基会与CS上的伯胺产生分子间氢键作用,PVA含量升高时氢键的凝聚缠结点数目大幅提高,不利于溶胀。因此,适当的PVA/CS比例决定了多孔凝胶的透气性、经皮渗透性和溶胀性。

星点设计-效应面法可通过线性和非线性拟合来预测最优实验条件,具有实验次数少而精度高等特点,常被使用于药制剂工艺和处方筛选,它要求自变量必须是连续的且能够被实验者自由控制。本实验采用2因素5水平星点设计-效应面法对盐酸普萘洛尔多孔水凝胶基质组成进行优化,将得到的累积渗透量数据进行二次多项式非线性拟合,建立的数学模型相关性好,选取效应面最佳取值区域的一组数据进行处方验证,该数据代入模型方程后得到的理论预测值和实测值偏差较小,证实所建模型预测较好。实验结果表明CS和PVA的用量是影响凝胶经皮渗透性能的重要因素,采用星点设计-效应面法优化多孔水凝胶的基质处方,能达到多指标同步优化的目的。

本研究制备的多孔水凝胶较普通凝胶透皮速率快,能够快速到达患病部位,随着时间延长,皮肤滞留量增加,形成良好的药物贮库,凝胶可长时间缓慢释放药物,延长给药时间,减少药物的毒副作用和给药次数,提高患者的依从性,是一种具有良好发展前景的经皮给药载体。

【参考文献】

- [1] LÉAUTÉ-LABRÈZE C, DUMAS DE LA ROQUE E, HUBICHE T, et al. Propranolol for severe hemangiomas of infancy[J]. N Engl J Med, 2008, 358(24): 2649-2651.
- [2] 郑家伟,王绪凯,秦中平,等. 口服普萘洛尔治疗婴幼儿血管瘤中国专家共识[J]. 上海口腔医学, 2016, 25(3): 257-260.
- [3] 王琨,陈涛,张雷. 普萘洛尔不同使用途径治疗婴幼儿血管瘤疗效对比观察[J]. 中国卫生标准管理, 2015, 6(32): 129-130.
- [4] 陈丽萍. 壳聚糖/PVA/明胶复合膜的制备及性能优化[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学, 2011.
- [5] 黄梅. 冷冻解冻法聚乙烯醇凝胶体系研究[D]. 苏州:苏州大学, 2012.
- [6] PEPPAS N A, STAUFFER S R. Reinforced uncrosslinked poly(vinyl alcohol) gels produced by cyclic freezing-thawing processes: a short review[J]. J Control Rel, 1991, 16(3): 305-310.
- [7] 李希明. 高含水聚乙烯醇弹性体[J]. 高分子学报, 1989, 1(5): 519-523.
- [8] YAO L, SWORDS G A. Hydrogels and methods of making and using same[P]. USA: 6268405.
- [9] ZHANG X, YANG D, NIE J. Chitosan/polyethylene glycol diacrylate films as potential wound dressing material [J]. Int J Biol Macromol, 2008, 43(5): 456-462.
- [10] 张步宁,崔英德,陈循军,等. 甲壳素/壳聚糖医用敷料研究进展[J]. 化工进展, 2008, 27(4): 520-526.
- [11] 陈欢欢,管佳,林莹,等. 壳聚糖/聚乙烯醇温敏水凝胶的制备及性质研究[J]. 清华大学学报(自然科学版), 2006, 46(6): 843-846.

【收稿日期】 2018-11-14 【修回日期】 2019-01-16

【本文编辑】 李睿昊