

· 制剂与炮制 ·

酮洛芬-丹皮酚偶合物的稳定性及其降解动力学研究

吴丹, 敖桂珍, 韩莎, 曹青日, 崔京浩*

(苏州大学 医学部 药学院, 江苏 苏州 215123)

[摘要] 目的:研究酮洛芬-丹皮酚偶合物(Ket-Pae)的稳定性及其降解动力学。方法:RP-HPLC测定Ket-Pae的溶解度和油水分配系数,通过初步稳定性试验考察Ket-Pae稳定性,并进行不同pH条件和血浆中的降解动力学研究。结果:在高温条件下Ket-Pae有明显降解的现象;与酮洛芬和丹皮酚相比,Ket-Pae的水溶性降低200~300倍,lnP上升4倍左右;Ket-Pae的降解曲线呈V-型分布,pH=5时最稳定($t_{1/2}$ = 14.4 d)。在血浆中的Ket-Pae降解半衰期很短($t_{1/2}$ = 1.3 min),可迅速降解为酮洛芬和丹皮酚。结论:Ket-Pae的脂溶性增强,其稳定性受高温和pH的影响。

[关键词] 酮洛芬;丹皮酚;偶合物;稳定性;降解动力学

丹皮酚(paeonol, Pae)的化学名为2-羟基-4-甲氧基苯乙酮,是牡丹干燥根或全草的主要有效成分,具有抑菌抗炎、解热镇痛、降压利尿、抗凝血、抗过敏、增强免疫功能等作用。丹皮酚具有熔点低、易挥发和见光易氧化分解的缺点,故其临床应用具有一定的局限性。研究人员通过物理或化学修饰的方法制备丹皮酚衍生物,以改善其物理化学性质^[1]。酮洛芬(ketoprofen, Ket)是一种高效非甾体类抗炎药,具有镇痛、消炎和解热作用,用于治疗风湿性关节炎、类风湿性关节炎、肌炎和骨关节炎等,但长期反复使用会导致胃肠道毒副作用或并发症^[2-3]。

本研究以改善丹皮酚的理化性质及降低酮洛芬结构中的羧基对胃肠道的刺激和损伤、在体内发挥协同作用为目的,首次制备了酮洛芬-丹皮酚偶合物(Ket-Pae),见图1,并对其理化性质、稳定性和降解动力学等进行了初步研究,为药效学研究提供依据。

1 材料

LC-20AD高效液相色谱仪(日本岛津公司); HH-4恒温振荡器(金坛市富华仪器制造有限公司); KQ-100B超声波清洗器(昆山市超声仪器有限

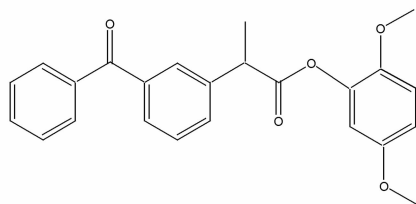


图1 酮洛芬丹皮酚偶合物结构式

公司); TGL-16B高速台式离心机(上海安亭科学仪器有限公司); 数显pH计(PHS-3TC, 上海天达仪器有限公司); AE240型电子分析天平(日本岛津公司); UV-2401PC紫外-可见分光光度计(日本岛津公司); YG120药物光照试验箱(上海恒谊制药有限公司); H-PTH-150AKH程式恒温恒湿试验箱(宏瑞达科技苏州有限公司)。

酮洛芬(国药集团化学试剂有限公司,纯度>98.5%);丹皮酚(西安天一生物技术有限公司,批号20070413,纯度>99%);酮洛芬-丹皮酚偶合物(苏州大学药学院药物化学研究室);甲醇(国药集团化学试剂有限公司,色谱纯,批号T20081015);乙醇(上海振兴化工一厂,分析纯,批号200904318);正辛醇(国药集团化学试剂有限公司,分析纯,批号20060901)。其他试剂均为化学纯或分析纯。

2 方法

2.1 Ket-Pae偶合物含量测定方法的建立

[稿件编号] 20100127009

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09502-009);江苏省高校自然科学基金计划(SZ132826);科技部国际合作项目(2009DFA31330)

[通信作者] *崔京浩,博士,教授, Tel: (0512) 65882077, E-mail: jhcui@suda.edu.cn



2.1.1 最大吸收波长的确定 称取 Ket-Pae, Ket, Pae 适量, 甲醇溶解, 在 200 ~ 600 nm 扫描, 以甲醇作空白。结果 Ket-Pae 在 (210 ± 1) , (259 ± 1) nm、Ket 在 (254 ± 1) nm、Pae 在 (274 ± 1) nm 处有最大吸收, 且无杂峰干扰, 故选择 259 nm 作为 Ket-Pae 的测定波长。

2.1.2 HPLC 色谱条件 Gemini C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相 甲醇-水-磷酸 (65:35:0.3); 紫外检测波长 259 nm; 柱温 35 °C; 流速 1.0 mL · min⁻¹; 进样量 20 μL。此条件下 Ket-Pae 的保留时间为 13.5 min, Ket 为 5 min。

2.1.3 标准曲线的绘制 精密称取 10.35 mg Ket-Pae 于 25 mL 量瓶中得质量浓度为 414 mg · L⁻¹ Ket-Pae 甲醇储备液。取适量于 10 mL 量瓶中, 得质量浓度为 0.102 5, 0.256 7, 0.517 5, 5.175, 31.05, 51.75, 82.8, 103.5 mg · L⁻¹ 的系列溶液。以峰面积 A 对浓度 C 进行线性回归, 得标准曲线方程 $A = 61\ 806C - 3\ 097.2$, $r = 0.999\ 8$ ($n = 5$)。结果表明, Ket-Pae 在 0.102 5 ~ 103.5 mg · L⁻¹ 呈良好的线性关系。同法, 得 Ket 的标准曲线方程 $A = 77\ 235C - 71\ 375$, $r = 0.999\ 8$ ($n = 5$), 结果表明, Ket 在 0.5 ~ 100.0 mg · L⁻¹ 呈良好的线性关系。

2.1.4 回收率与精密度测定 精密称取干燥至恒重的 Ket-Pae, 配制高中低 3 种质量浓度 (5.19, 51.9, 103.8 mg · L⁻¹) 的甲醇溶液 ($n = 3$)。根据标准曲线求得浓度, 测定浓度与实际浓度的比值, 求得方法回收率。另外, 对上述高中低 3 种质量浓度的 Ket-Pae 甲醇溶液, 每隔 1 h 取 20 μL 进样 5 次, 考察日内精密度; 并于第 1 天至第 5 天分别进行测定, 考察日间精密度。

测定结果, 3 种浓度样品的平均回收率为 101.4% ~ 104.9%, 日内及日间精密度的平均相对标准偏差分别为 $(0.39 \pm 0.18)\%$, $(0.95 \pm 0.26)\%$, 均符合测定要求。

2.2 Ket-Pae 初步稳定性考察^[4]

2.2.1 高温试验 称取适量 Ket-Pae 盛装于称量瓶, 敞口放置于恒温恒湿试验箱 (60 °C, 45% RH) 中, 于第 0, 5, 10 天取样, HPLC 测定含量的变化。

2.2.2 高湿试验 称取适量 Ket-Pae 盛装于称量瓶, 敞口放置于恒温恒湿试验箱 [25 °C, $(90 \pm 5)\%$ RH] 中, 于第 0, 5, 10 天取样, HPLC 测定含量的变化。

2.2.3 光照试验 称取适量 Ket-Pae 盛装于称量瓶, 敞口放置于光照箱内 [$(4\ 500 \pm 500)$ lx, 25 °C], 于第 0, 5, 10 天取样, HPLC 测定含量的变化。

2.3 Ket-Pae 在不同 pH 条件下的降解动力学^[5-6]

配制系列 pH (1.2, 2, 3, 4, 5, 6, 6.8, 7.4, 8, 9, 10) 的缓冲溶液 (0.05 mol · L⁻¹, $\mu = 0.5$ mol · L⁻¹, pH 1.2 用盐酸、pH 2 ~ 5 用柠檬酸-柠檬酸钠、pH 6 ~ 8 用磷酸盐缓冲溶液、pH 9 ~ 10 用甘氨酸-NaOH 配制)。精密吸取 0.2 mL Ket-Pae 甲醇贮备液 (5 g · L⁻¹), 加至 9.8 mL 的上述缓冲溶液中 (预热至 37 °C), 终浓度 100 mg · L⁻¹。涡旋, 超声后放置, 并于预定时间点取样 100 μL, 加入 200 μL 甲醇涡旋溶解, 离心 (1 000 r · min⁻¹)。取上清液测定和计算不同时间点的剩余 Ket-Pae 浓度, 以剩余 Ket-Pae 浓度的自然对数值对时间做图, 计算水解速率常数 (k_{obs}) 和半衰期。

2.4 Ket-Pae 在血浆中的降解动力学^[7-8]

取新鲜大鼠血浆, 利用等渗磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 稀释至 80%。取质量浓度为 10 g · L⁻¹ 的 Ket-Pae 甲醇贮备液 40 μL, 加至 4 mL 上述血浆稀释液 (预热至 37 °C), 最终质量浓度为 100 mg · L⁻¹。在 (37 ± 0.5) °C 的条件下孵化, 于不同时间点 (0, 1, 2, 3, 5, 8, 10, 15, 20, 30 min) 取样 200 μL, 并立即用 800 μL 甲醇沉淀蛋白、涡旋、离心 (1 200 r · min⁻¹)。取上清液, 测定 Ket-Pae 浓度, 计算剩余药量以及 Ket 的生成量。

2.5 Ket-Pae 平衡溶解度和油水分配系数的测定^[9-10]

2.5.1 平衡溶解度的测定 将过量的 Ket-Pae 置于 10 mL 具塞玻璃离心管中, 分别加至 2 mL 蒸馏水和柠檬酸盐缓冲液 (pH 3, 4, 5), 超声振荡后, 恒温振荡 [(37 ± 1) °C, 100 r · min⁻¹], 分别在不同时间取上清液至 Ket-Pae 浓度恒定。样品用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 续滤液 20 μL 注入高效液相色谱仪, 计算 Ket-Pae 在不同 pH 水溶液中的平衡溶解度, 每组平行测定 3 份。另外, 同法测定 Ket 和 Pae 在蒸馏水中的平衡溶解度。

2.5.2 表观油/水分配系数的测定 将 3 mL 正辛醇分别和 15 mL 蒸馏水、不同 pH 的柠檬酸盐缓冲溶液 (pH 3, 4, 5) 混合, 振荡 [(25 ± 1) °C, 100 r · min⁻¹ × 24 h], 令其相互饱和, 分离两相, 将两相界面附近的溶剂弃去, 分别保存备用。



精密称取 10.48 mg Ket-Pae 溶于经水饱和的正辛醇中,配制质量浓度 $1.048 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液 (ρ_o)。取该溶液 0.5 mL 置于 10 mL 具塞离心管中,分别加入 4 mL 水及柠檬酸盐缓冲溶液 (pH 3, 4, 5, 经正辛醇饱和,油水相比 1:8)。恒温振摇 [$(25 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$, 72 h],取水相离心,测定 Ket-Pae 浓度 (ρ_w)。按照公式 $P_{o/w} = (\rho_o - \rho_w) / \rho_w$ 计算表观油水分配系数,每组平行测定 3 份。另外,同法测定 Ket 和 Pae 在蒸馏水中的油水分配系数。

3 结果

3.1 初步稳定性试验

在高温条件下, Ket-Pae 有明显降解的现象,但高湿和强光照条件对 Ket-Pae 稳定性未见明显影响。

3.2 Ket-Pae 在不同 pH 水溶液中的降解动力学

Ket-Pae 在不同 pH 下的表观速率常数 (k_{obs}) 及半衰期 ($t_{1/2}$) Ket-Pae 测定结果见表 1。在 pH 1.2 ~ 10 的缓冲溶液中,其降解程度明显不同,在弱酸环境下稳定性高,且在 pH = 5 时最稳定。在 37 $^\circ\text{C}$ 时, Ket-Pae 体外水解曲线基本呈 V-型分布,说明存在酸催化、碱催化和水催化的过程。

表 1 pH 条件对 Ket-Pae 降解的影响

pH	$k_{\text{obs}}/\text{h}^{-1}$	$t_{1/2}/\text{h}$
1.2	0.008 7	79.66
2	0.014 0	49.50
3	0.005 2	133.27
4	0.007 2	96.25
5	0.001 1	346.50
6	0.006 5	106.62
6.8	0.041 0	16.90
7.4	0.125 0	5.50
8	0.148 2	4.68
9	0.240 2	2.88
10	0.584 1	1.19

3.3 Ket-Pae 在血浆中的降解动力学

以残留 Ket-Pae 浓度的自然对数值对时间做图,得 Ket-Pae 在血浆中的降解方程为 $\ln C = -0.538 8t + 1.715 1$, $R^2 = 0.973 5$,由斜率可知 Ket-Pae 在 80% 血浆中的水解速率常数 0.538 8,从而求得其降解半衰期 $t_{1/2} = 1.3 \text{ min}$ 。可见, Ket-Pae 在血浆中可迅速还原为母体药物 Ket 和 Pae,并产生药效。试验结果见表 2。

表 2 37 $^\circ\text{C}$ 血浆对 Ket-Pae 降解的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$) %

t/min	Ket-Pae 剩余率	Ket 生成率
0	100.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
1	52.48 \pm 0.56	59.63 \pm 0.67
2	27.26 \pm 1.94	84.32 \pm 1.77
3	9.13 \pm 1.52	89.22 \pm 1.62
5	3.84 \pm 1.08	98.03 \pm 0.47
8	0.80 \pm 0.44	99.21 \pm 0.72
10	0.70 \pm 0.45	100.00 \pm 0.81
15	0.80 \pm 0.38	100.00 \pm 0.23
20	0.69 \pm 0.83	100.00 \pm 0.36
30	0.56 \pm 0.32	100.00 \pm 0.57

3.4 Ket-Pae 的平衡溶解度和油/水分配系数

Ket-Pae 的平衡溶解度和油/水分配系数测定结果见表 3。与 Ket 和 Pae 的相比, Ket-Pae 的溶解度降低, $\ln P$ 上升,脂溶性明显增强。

表 3 Ket-Pae 在不同 pH 水溶液中的平衡溶解度和油/水分配系数 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

溶液	溶解度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$\ln P$
Ket-水	204.7 \pm 0.74	1.43 \pm 0.78
Pae-水	349.8 \pm 0.58	0.97 \pm 0.93
水	1.02 \pm 0.40	3.96 \pm 0.50
pH 3	1.57 \pm 0.13	3.95 \pm 0.25
pH 4	1.26 \pm 0.80	4.00 \pm 0.09
pH 5	1.36 \pm 0.10	4.03 \pm 0.13

4 讨论

本研究考察了酮洛芬-丹皮酚偶合物在不同 pH 缓冲盐溶液中的降解动力学过程和 80% 大鼠血浆中的降解动力学过程。以剩余药物浓度的自然对数值对时间做图得一条直线,由此可知 Ket-Pae 的降解反应符合伪一级反应动力学方程。 $\ln k_{\text{obs}} - \text{pH}$ 曲线表明, Ket-Pae 在不同 pH 缓冲溶液中的降解过程存在专属酸性、碱性和水催化的机制,在弱酸下相对比较稳定,且在 pH = 5 时最稳定。所以,平衡溶解度和油/水分配系数的测定主要在蒸馏水和弱酸溶液中进行,以减少 Ket-Pae 降解导致的影响。酮洛芬-丹皮酚偶合物的口服生物利用度、对胃肠道的毒副作用及药效学有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] 许文明,冯书晓,柴元武,等. 丹皮酚的结构修饰研究进展[J]. 中外健康文摘·医药学刊, 2007, 4(9): 171.
- [2] 顾希钧,周昕. 非甾体抗炎药物不良反应概述[J]. 中国临床药理学杂志, 2005, 14(6): 388.



- [3] Beetge E, Plessis J, Muller D, et al. The influence of the physicochemical characteristics and pharmacokinetic properties of selected NSAID's on their transdermal absorption [J]. *Int J Pharm*, 2000, 193(2):261.
- [4] Liu D. 药物稳定性实验方案设计研究的国际化规范[J]. *中国药科大学学报*, 2005, 36(3):284.
- [5] Wadhwa L, Sharma P. Glycolamide esters of 6-methoxy-2-naphthylacetic acid as potential prodrugs physicochemical properties, chemical stability and enzymatic hydrolysis [J]. *Int J Pharm*, 1995, 118(1):31.
- [6] Zhao X, Tao X, Wei D, et al. Pharmacological activity and hydrolysis behavior of novel ibuprofen glucopyranoside conjugates [J]. *Eur J Med Chem*, 2006, 41(11):1352.
- [7] Larsen S, Ankersen M, Larsen C. Kinetics of degradation and oil solubility of ester prodrugs of a model dipeptide (Gly-Phe) [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2004, 22(5):399.
- [8] 王海凤, 王东凯, 张翠霞, 等. 吡硫醇丙酯前体药物的合成及其降解动力学[J]. *中国新药杂志*, 2007, 16(18):1488.
- [9] Cao F, Guo J, Ping Q, et al. Prodrugs of scutellarin: Ethyl, benzyl and *N, N*-diethylglycolamide ester synthesis, physicochemical properties, intestinal metabolism and oral bioavailability in the rats [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2006, 29(5):385.
- [10] 张婷婷, 徐文和, 何仲贵, 等. 水飞蓟宾在不同介质中平衡溶解度和表观油水分配系数的测定[J]. *中国药理学杂志*, 2006, 41(20):1569.

Study on stability and degradation kinetics of ketoprofen-paeonol conjugate

WU Dan, AO Guizhen, HAN Sha, CAO Qingri, CUI Jinghao*

(School of Pharmacy, Medical College of Soochow University, Suzhou 215123, China)

[Abstract] **Objective:** To study the stability and degradation kinetics of Ketoprofen-Paeonol conjugate (Ket-Pae). **Method:** RP-HPLC method was used to determine the solubility and partition coefficient of Ket-Pae. Stability test was carried out to investigate the factors affecting Ket-Pae. The kinetic studies of Ket-Pae degradation were conducted in different pH buffer solutions and 80% rat plasma at 37 °C. **Result:** Ket-Pae showed significant degradation phenomenon at high temperature. The solubility of Ket-Pae was decreased about 200 to 300 times compared with parent drugs in water while the $\ln P$ increased about 4 times. The degradation curve displayed a V-shape, and kept maximum stability at week acidic (pH 5.0, $t_{1/2} = 11.4$ d). Ket-Pae degraded quickly with very short half life of 1.3 min in plasma, therefore easily released ketoprofen and paeonol. **Conclusion:** The lipophilicity of Ket-Pae is increased, its stability is affected by temperature and pH value.

[Key words] ketoprofen; paeonol; conjugate; stability; degradation kinetics

doi: 10.4268/cjcm20101506

[责任编辑 周驰]