

酮洛芬贴片体外透皮释放方法学研究

聂渝琼¹, 毕元², 张梅³, 高锦¹, 刘艳娥¹(1. 总后勤部卫生部药品仪器检验所, 北京 100071; 2. 北京市药品监督管理局经济技术开发区分局, 北京 100176; 3. 解放军医学图书馆, 北京 100039)

[摘要] 目的: 建立酮洛芬贴片体外透皮释放方法学。方法: 采用HPLC法测定释放液中酮洛芬的含量, 测定条件: Diamonsil C₁₈色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为pH 3.5磷酸盐缓冲液-乙腈-水(2:53:45), 检测波长为253 nm, 流速为1.0 mL·min⁻¹, 柱温25℃。以裸鼠皮肤为实验皮肤, 采用Frans扩散池方法进行三批酮洛芬贴片样品的体外透皮实验。结果: 在该HPLC条件下, 酮洛芬与其他杂质分离良好, 进样量在0.509~40.72 μg·mL⁻¹时, 酮洛芬浓度与峰面积呈良好的线性关系($r = 0.9999$), 回收率为101.09%, RSD为1.23%。三批酮洛芬贴片样品的透皮释放速率分别为18.157, 17.973, 20.001 μg·cm⁻²·h⁻¹, 药物透皮释放符合零级动力学过程。结论: 本文建立的酮洛芬贴片体外透皮释放方法简便, 重现性好, 可以用于控制产品质量。

[关键词] 酮洛芬; 贴片; 体外; 透皮释放速率

[中图分类号] R944.9; R971⁺.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1672-8157(2012)06-0324-04

Study on transdermal release *in vitro* of ketoprofen patches

NIE Yu-qiong¹, BI Yuan², ZHANG Mei³, GAO Jin¹, LIU Yan-e¹(1. Institute for Drug and Instrument Control of Health Dept GLD of PLA, Beijing 100071, China; 2. Economic-Technological Development Area, Beijing Drug Administration, Beijing 100176, China; 3. PLA Library of Medicine, Beijing 100039, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To establish a test method for transdermal release of ketoprofen patch. **Methods:** An HPLC method was used to determine the content of ketoprofen. A Diamonsil C₁₈ column (150 mm×4.6 mm, 5 μm) was used for separation, the mobile phase consisted of phosphate buffer solution (pH3.5)-acetonitrile-water (2:53:45) at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was set at 253 nm, column temperature was 25℃. The *in vitro* transdermal test was performed using nude mice skin and Frans diffusive pool, and three batch samples were verified by this method. **Results:** Ketoprofen was separated well from other impurity in this chromatogram condition. The calibration curve was linear in the range of 0.509–40.72 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9999$). The average recovery was 101.09% and the RSD was 1.23%. The transdermal release rates of ketoprofen in three batches of patches were 18.157, 17.973 and 20.001 μg·cm⁻²·h⁻¹, respectively. The release of ketoprofen patch followed zero order kinetic model. **Conclusion:** The method was simple and reproducible, which can be used to control product quality.

[KEY WORDS] Ketoprofen; Patch; *In vitro*; Transdermal release rate

30例[J]. 中国药业, 2009, 18(13): 73.

[2] 辛海莉, 何新荣, 刘萍, 等. 高效液相色谱法测定参松养心胶囊中马钱苷含量[J]. 中国药业, 2011, 20(8): 37-38.

[3] 贾彩肖, 王树业. 参松养心胶囊辅助心动过缓伴室性期前收缩的临床观察[J]. 临床合理用药杂志, 2012, 5(3A): 52-53.

[4] 胡昊, 唐海沁, 李洁华, 等. 参松养心胶囊抗心律失常的疗效和安全性系统评价[J]. 中国循证医学杂志, 2011, 11(2): 168-173.

[5] 张靖, 艾俊权, 李卿慧. 参松养心胶囊联合美托洛尔治疗室性早搏的疗效观察[J]. 吉林医学, 2012, 33(4): 749-750.

[6] 胡发明, 黄知秀. 参松养心胶囊治疗冠心病心律失常有效性与安全性Meta分析[J]. 医药导报, 2012, 31(5): 671-674.

[7] 罗涯中. 参松养心胶囊佐治冠心病心绞痛56例临床观察[J]. 中

外医学研究, 2012, 10(7): 62.

[8] 屠鹏飞. 中药指纹图谱指定的方法学探讨[C]. // 现代化中药产业关键技术系列研讨会(国际色谱指纹评价中药质量研讨会). 广州: 广州药学会, 2001.

[9] 宋丽明, 王文燕, 张智超. 陕西安康葛根药材的HPLC指纹图谱研究[J]. 中草药, 2008, 39(3): 436-438.

[10] 王文燕, 赵强, 张铁军, 等. 决明子的HPLC指纹图谱及模式识别研究[J]. 中草药, 2009, 40(10): 1638-1641.

[11] 王文燕, 赵强, 张铁军, 等. 川芎药材的HPLC指纹图谱及模式识别研究[J]. 中草药, 2009, 40(12): 1980-1983.

[12] 孙国祥, 胡玥珊, 智雪枝. 用复杂性科学原理揭示中药指纹图谱的本质特征[J]. 中南药学, 2008, 6(5): 600-605.

[13] 吴燕, 黄志芳, 舒光明, 等. 吴茱萸指纹图谱研究和3种成分的含量测定[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(24): 3329-3332.

[作者简介] 聂渝琼, 女, 主管药师, 主要从事药物分析相关工作。

(收稿日期: 2012-07-03 修回日期: 2012-09-06)

酮洛芬(ketoprofen)又称酮基布洛芬,是一种丙酸类非甾体消炎镇痛药,主要用于风湿、类风湿性关节炎、痛风、外伤引起的关节、腱、韧带和肌肉的疼痛等治疗。目前临床上多应用其片剂、胶囊等口服制剂。该药口服给药时,多有明显的胃肠道刺激反应,如消化不良、胃灼热感、恶心、呕吐、腹泻或便秘等。而经皮给药系统可避免药物的胃肠道不良反应,同时,酮洛芬具有分子量小,熔点低,油水分配系数适宜等理化性质,易于透过皮肤,适合开发成外用透皮制剂。因此,酮洛芬的经皮给药制剂研究一直是国内外关注的热点^[1-4]。PR制药公司推出了酮洛芬凝胶剂,Zyma制药公司推出了酮洛芬凝胶剂和贴剂。国内已上市的有酮洛芬贴片、酮洛芬搽剂和酮洛芬凝胶剂。相比其他剂型,贴片具有给药剂量准确,不易沾染衣物,血药浓度平稳,作用时间长,使用方便,给药次数少等优点。

体外透皮实验是考察贴片药物透过皮肤的重要方法,是保证药物疗效和质量稳定可控的重要手段,我们参考相关文献^[5-6],以Frans扩散池方法进行透皮实验,高效液相色谱法检测透皮释放量,建立酮洛芬贴片体外释放方法学并进行验证。

1 仪器及试剂

LC-10ATvp 高效液相色谱仪(日本岛津公司),SPD-10ATvp 检测器(日本岛津公司),CTO-10ASvp 柱温箱(日本岛津公司),TK-60A型透皮扩散试验仪(上海铠锴科技有限公司),Frans扩散池(上海铠锴科技有限公司),CP225D型电子天平(Sartorius),BS110S型电子天平(Sartorius)。

酮洛芬原料药(浙江九洲药业股份有限公司,含量99.85%,批号11031617),酮洛芬对照品(中国食品药品检定研究院,批号100337-201003)。乙腈为色谱纯,其他试剂为分析纯,水为纯化水。

酮洛芬贴片(自制,批号120511、120520、120521、120522)。

裸鼠Nu/Nu,8周龄,雄性,体重(22±2)g,VAF/SPF级(北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证编号:SCXK(京)2012-0001)

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Diamonsil C₁₈ 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm),柱温:25 °C,流动相:pH3.5磷酸盐缓冲液-乙腈-水(2:53:45),流速:1.0 mL·min⁻¹,检测波长:253 nm。

2.2 透皮释放介质的选择

取酮洛芬原料药约1 g置于3个100 mL锥形瓶,

分别加入煮沸放冷至室温的蒸馏水、20%PEG400-0.9%氯化钠水溶液^[7]、pH7.4磷酸盐缓冲溶液各100 mL,磁力搅拌器不断搅拌24 h,放置,未溶解的固体沉于瓶底,过滤部分上清液,取续滤液测定溶解度。结果,酮洛芬在100 mL的pH7.4磷酸盐缓冲溶液、20%PEG400-0.9%氯化钠水溶液和水中的溶解度分别为965 mg、114 mg和16 mg。考虑到酮洛芬在20%PEG400-0.9%氯化钠水溶液中的溶解度能够满足透皮实验的漏槽条件,不影响药物透皮吸收,pH中性不干扰样品液相测定条件,故选择20%PEG400-0.9%氯化钠水溶液作为透皮释放介质。

2.3 辅料干扰实验

分别取2.22 cm²空白贴片和酮洛芬贴片(批号120511),揭去防黏膜,贴于裸鼠皮肤上,固定于Frans扩散池上,加入透皮释放介质,放入透皮扩散试验仪内,调整转速为100转·min⁻¹。水浴温度35 °C。4 h后取出透皮释放溶液,滤过,精密量取续滤液20 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图,结果见图1和图2。结果表明,空白贴片鼠皮释放液对酮洛芬贴片透皮释放液检测无干扰。

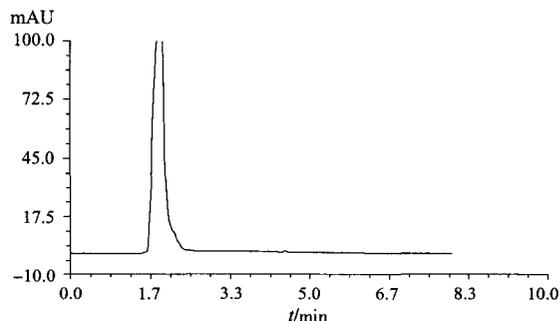


图1 空白贴片HPLC色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of blank patches

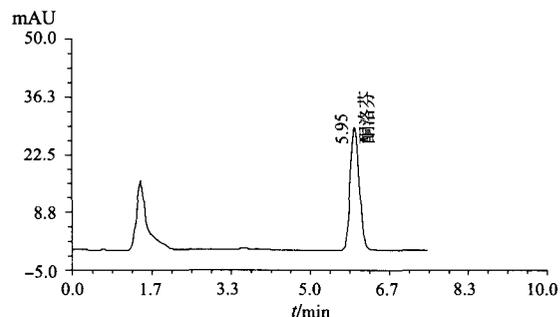


图2 酮洛芬贴片的HPLC色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of ketoprofen patches

2.4 线性范围

精密称取酮洛芬对照品10.18 mg,置100 mL量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀。精密量取0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 2, 2.5, 3, 3.5, 4 mL上

述溶液分别置10 mL棕色量瓶中,加透皮释放介质至刻度,作为供试品溶液。按透皮释放测定项下液相方法检测,分别取20 μL注入液相色谱仪,记录色谱峰面积(A),将峰面积(A)与相应的浓度(C)进行回归,得回归方程为 $A = 77\,900C - 4\,859.3$,相关系数 $r = 0.999\,9$ 。在 $0.509 \sim 40.72 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内,酮洛芬溶液浓度(C)与峰面积(A)呈良好的线性关系。

2.5 重复性实验

取 2.22 cm^2 酮洛芬贴片(批号120511),揭去防黏膜,贴于裸鼠皮肤上,固定于Frans扩散池,加入透皮释放介质,放入透皮扩散试验仪内,调整转速为 $100 \text{ 转}\cdot\text{min}^{-1}$,水浴温度 $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 。按透皮项下测定方法操作,取4 h透皮释放溶液,滤过。取续滤液作为供试品溶液,照2010版《中国药典》二部附录法VD高效液相色谱法^[8],取20 μL注入液相色谱仪,连续进样6次,记录色谱图,以峰面积计算RSD为1.82%,表明方法的重复性良好。

2.6 稳定性实验

取 2.22 cm^2 酮洛芬贴片(批号120511),揭去防黏膜,贴于裸鼠皮肤上,固定于Frans扩散池,加入透皮释放介质,放入透皮扩散试验仪内,调整转速为 $100 \text{ 转}\cdot\text{min}^{-1}$,水浴温度 $35 \text{ }^\circ\text{C}$,按透皮项下测定方法操作,取4 h透皮释放溶液,滤过。取续滤液作为供试品溶液。室温放置分别于0, 2, 4, 6, 11, 16 h进样,记录色谱图,以峰面积计算RSD = 1.38%,表明透皮释放溶液室温放置16 h内稳定。

2.7 回收率实验

量取酮洛芬对照品溶液($10.18 \text{ mg}/100 \text{ mL}$)适量,分别加入空白贴片鼠皮透皮释放液至刻度配成高、中、低三个浓度,平行做三份,共9份。精密量取20 μL注入液相色谱仪,每个样品测定2次,记录色谱图。另取酮洛芬对照品溶液($10.18 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),加释放介质制成 $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液作为对照品溶液,同法测定,按照外标法以峰面积计算回收率,结果该测定方法回收率为101.09%,RSD为1.23%,表明方法的回收率良好,结果见表1。

2.8 透皮释放测定方法

将酮洛芬贴片贴于处理好的裸鼠皮肤上,固定于Frans扩散池,加入透皮释放介质,放入透皮扩散试验仪中,调整转速为 $100 \text{ 转}\cdot\text{min}^{-1}$,水浴温度 $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 。分别于2, 4, 6, 8, 10, 16, 24 h完全取样,同时补充等温释放介质,释放溶液样品用 $0.45, 0.2 \mu\text{m}$ 滤器滤过,取续滤液作为供试品溶液。另取酮洛芬对照品约25 mg,置100 mL棕色量瓶中,甲醇溶解并稀释至刻度,

表1 回收率实验结果

Tab 1 Results of recovery test

终浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	编号	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%
0.203 6	1	2.036	2.085	102.33
		2.036	2.082	
	2	2.036	2.054	100.20
		2.036	2.026	
	3	2.036	2.035	101.40
		2.036	2.094	
2.036	1	20.36	20.89	102.81
		20.36	20.97	
	2	20.36	20.90	102.34
		20.36	20.78	
	3	20.36	20.60	101.39
		20.36	20.69	
6.108	1	61.08	60.76	99.71
		61.08	61.04	
	2	61.08	61.11	100.08
		61.08	61.15	
	3	61.08	60.97	99.56
		61.08	60.65	

摇匀,量取0.2 mL置10 mL量瓶中,加入释放介质稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液(约 $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。照2010版《中国药典》二部附录VD高效液相色谱法,进样20 μL,记录色谱图,计算累积透皮释放量。以单位面积累积透皮释放量(Q)对时间(t)作图,见图3,计算透皮释放速率。结果见表2。

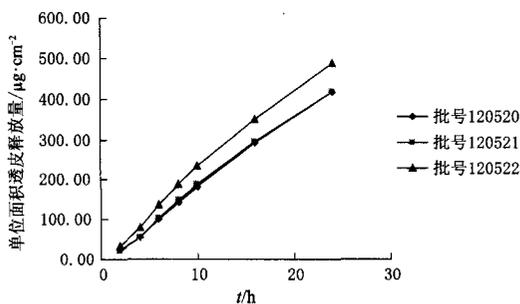


图3 三批酮洛芬贴片样品透皮释放曲线

Fig 3 Transdermal release curves of ketoprofen in tree batches of patches

表2 三批酮洛芬贴片样品透皮释放实验结果

Tab 2 Transdermal release result of ketoprofen in tree batches of patches

批号	拟合方程	透皮释放速率/ $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$
120520	$Q = 18.157t - 7.5834$	18.157
120521	$Q = 17.973t - 2.2875$	17.973
120522	$Q = 20.001t + 19.408$	20.001

3 讨论

作为常用的非甾体解热镇痛抗炎药,酮洛芬贴片

一直是国内外研究热点, Kawai S等^[9]在纳入676名风湿性关节炎患者的研究中发现, 在每日20 mg(一贴)酮洛芬贴片的2周治疗中, 酮洛芬贴片相比空白对照可以有效的减轻患者风湿性关节部位的持续性疼痛, 同时具有较好的安全性和耐受性。Adachi H等^[10]在研究中发现, 酮洛芬贴片引起的胃及小肠的UD₅₀值(半数致溃疡量)分别为49.9 mg·kg⁻¹和48.9 mg·kg⁻¹, 然而口服酮洛芬药物则分别为3.6 mg·kg⁻¹和3.7 mg·kg⁻¹, 酮洛芬贴片可以大大降低胃肠道溃疡的风险。

国内外关于酮洛芬贴片或其他酮洛芬外用透皮制剂中多采用小鼠、兔子等实验动物的皮肤, 进行透皮释放实验, 在实验中都涉及到皮肤的脱毛处理, 一方面在脱毛过程中会伤及皮肤角质层^[11], 另一方面由于这些实验动物毛囊比较多, 药物经皮吸收时毛囊路径很可能成为通过皮肤的重要路径。

乳猪角质层与人类皮肤厚度接近, 毛囊密度与人近似, 是比较理想的实验动物皮肤, 但是在实际操作上存在很多问题, 猪的真皮层厚度大, 需要用切皮刀切除, 切除厚度会造成药物的透过差异, 同时, 在切除中如果皮肤的附属器被割破, 实质上产生了一系列穿透皮肤的小孔, 会导致药物的高通性现象。

人类皮肤是最理想的实验皮肤, 但人皮不易得到且价格昂贵, 最主要的是人皮存在性别、年龄、皮肤部位等差异, 为消除这种差异, 在体外人体皮肤通透性实验时, 专家建议每个样品重复12次。另外, 由于人皮不能即取即用, 皮肤多不新鲜, 在冷藏及解冻过程中会造成皮肤通透性的改变。保存不当, 也会出现皮肤色泽上的改变, 因此, 没有足够的皮肤来源和资金, 采用人皮很难获得真实可靠的实验结果, 更不适合用于常规的透皮实验检查。

国内目前还没有见到采用裸鼠皮肤用于酮洛芬贴片的体外释放实验及用于产品质量控制的研究报道。本研究能为酮洛芬外用制剂的体外透皮研究提供参考价值。裸鼠皮肤结构与人类皮肤结构相似, 毛囊数目和直径与人类最为接近。皮肤与内脏不黏连, 容易移取大片厚度均一的全皮用于实验。因此, 采用裸鼠皮肤进行体外透皮释放实验可以获得比较好的重

复性, 为不同批次产品质量对比提供依据。

有研究者采用紫外分光光度法用于透皮释放的测定, 不能清除皮肤组织等溶出物对测定的干扰, 采用二阶导数法处理虽可排除干扰, 但比较繁琐, 也可能影响准确度。本研究采用的高效液相色谱法测定释放液中的药物浓度, 快速准确无干扰。

本研究建立的酮洛芬贴片体外透皮释放方法, 简便、准确、重复性好、可靠, 可用于贴片产品的处方研究、检查、质量控制。

[参考文献]

- [1] Hussain A, Khan GM, Shah SU, *et al.* Development of a novel ketoprofen transdermal patch: effect of almond oil as penetration enhancers on in-vitro and ex-vivo penetration of ketoprofen through rabbit skin[J]. *Pak J Pharm Sci*, 2012, 25(1): 227-232.
- [2] Atarashi K, Takano M, Kato S, *et al.* Addition of UVA-absorber butyl methoxy dibenzoylmethane to topical ketoprofen formulation reduces ketoprofen-photoallergic reaction[J]. *J Photochem Photobiol B*, 2012, 113: 56-62.
- [3] 卜海涛, 何文, 王军, 等. 酮洛芬醇质体凝胶与脂质体凝胶的体外经皮渗透动力学的比较研究[J]. *广东药学院学报*, 2012, 28(4): 366-369.
- [4] Coaccioli S. Ketoprofen 2.5% gel: a clinical overview[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2011, 15(8): 943-949.
- [5] 屠锡得, 张均寿, 朱家璧. 药剂学[M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [6] 郑俊民. 经皮给药新剂型[M]. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2007.
- [7] 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: 附录19.
- [8] 胡英, 吴遥遥, 吴争, 等. α -细辛醚的黏胶分散型经皮贴剂研究[J]. *中国新药杂志*, 2009, 18(10): 949-952, 916.
- [9] Kawai S, Uchida E, Kondo M, *et al.* Efficacy and safety of ketoprofen patch in patients with rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study[J]. *J Clin Pharmacol*, 2010, 50(10): 1171-1179.
- [10] Adachi H, Ioppolo F, Paoloni M, *et al.* Physical characteristics, pharmacological properties and clinical efficacy of the ketoprofen patch: a new patch formulation[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2011, 15(7): 823-830.
- [11] 王英姿, 杜守颖, 惠建国. 高乌甲素凝胶透皮吸收实验皮肤的选择研究[J]. *中医学报*, 2011, 26(11): 1344-1345

(收稿日期: 2012-07-10 修回日期: 2012-09-24)

《中国药物应用与监测》杂志——《化学文摘》(CA)收录期刊

欢迎投稿、订阅