

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ НАУКИ

PHARMACEUTICAL SCIENCES

УДК 661.12.011: [615.454.1 : 615.276].074
DOI 10.18413/2075-4728-2018-41-3-473-483

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ КЕТОПРОФЕНА

IDENTIFICATION AND ASSAY OF THE KETOPROFEN ESTERS

Н.А. Ляпунов, И.А. Зинченко, Е.П. Безуглая
N.A. Lyapunov, I.A. Zinchenko, E.P. Bezuglaya

Государственное научное учреждение «Научно-технологический комплекс
«Институт монокристаллов» Национальной академии наук Украины»,
Украина, 61072, г. Харьков, проспект Науки, 60

State Scientific Institution «Institute for Single Crystals» of NAS of Ukraine,
60 Nauky Ave., Kharkiv, 61072, Ukraine

E-mail: lyapunov.na@gmail.com

Аннотация

Приведены результаты исследований, обосновывающие подход к качественному и количественному определению сложных эфиров кетопрофена методом жидкостной хроматографии с использованием диодно-матричного детектора и масс-детектора. Разработана методика их определения и проанализированы растворы кетопрофена и его сложных эфиров в конкретных диапазонах концентраций; определены факторы отклика и коэффициенты пересчёта для определения содержания сложных эфиров по стандартному образцу (СО) кетопрофена. Показано, что с увеличением молекулярной массы сложных эфиров кетопрофена пропорционально уменьшаются их удельные показатели поглощения, а также возрастают коэффициенты пересчёта. При рутинном определении сложных эфиров кетопрофена как посторонних примесей каждую из них можно идентифицировать по УФ-спектру, максимуму поглощения и относительному времени удерживания пика, а количественно определять – по СО кетопрофена с учётом коэффициента пересчёта. При этом показатель чистоты пика примеси характеризует его специфичность. Данный подход актуален при разработке методик одновременного определения нескольких примесей, пики которых могут иметь одинаковые или близкие времена удерживания.

Abstract

The results of studies that justify the approach to the qualitative and quantitative determination of the ketoprofen esters by liquid chromatography with diode array detection and mass spectrometry detection are provided. The analytical procedure for their qualitative and quantitative determination has been developed and solutions of ketoprofen and its esters in specific concentration ranges have been tested; the response factors and correction factors were determined to assay of esters using ketoprofen reference standard (RS). It has been shown that with the increase in the molecular weight of the ketoprofen esters, their specific absorbance values are proportionally reduced as well as the correction factors increased. For the routine determination of ketoprofen esters as related substances (impurities) each of them can be identified by the UV spectrum, the absorption maximum and the relative retention of its peak as well as quantitatively determined using ketoprofen RS taking into account the correction factor. In such case, the



peak purity index characterizes the specificity of this impurity peak. This approach is relevant in the development of procedures for the simultaneous determination of several impurities whose peaks might have the same or similar retention times.

Ключевые слова: кетопрофен, сложный эфир, примесь, хроматограмма, пик, спектр поглощения, максимум поглощения, молекулярная масса (М.м.), чистота пика.

Keywords: ketoprofen, ester, impurity, chromatogram, peak, absorption spectrum, absorption maxima, molecular mass (M_r), peak purity index.

Введение

Номенклатура мягких лекарственных средств (МЛС) с кетопрофеном достаточно обширна [Martindale, 2017]. Кетопрофен перспективен для создания комбинированных препаратов в форме гелей, например таких, как метилсалицилат и ментол [Компендиум, 2016]. МЛС, содержащие хондропротекторы и кетопрофен, необходимы для лечения остеоартритов (ОА), поскольку кетопрофен не оказывает хондротоксического действия [Корж и др., 2007; Herndon, 2012]. При этом необходимо обеспечить трансдермальное проникновение кетопрофена и других лекарственных веществ за счёт усилителей проникновения [Lane, 2013; Muro, 2016]. Как правило, усилители проникновения – это разные гидрофильные растворители, например, этанол, диэтиленгликоля моноэтиловый эфир и др. [Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2012; Alkilani et al., 2015].

Кетопрофен – это (2*RS*)-2-(3-бензоилфенил)пропановая кислота [European Pharmacopoeia, 2016]. Поэтому кетопрофен может участвовать в реакции этерификации с гидрофильными растворителями, имеющими в молекулах гидроксильные группы; образование сложных эфиров кетопрофена увеличивается с понижением рН растворов от 7.0 до 3.0 и зависит от природы растворителя и количества гидроксильных групп в его молекуле [Зинченко и др., 2017б]. Кетопрофен образует также сложные эфиры с другими веществами, что позволяет усилить или модифицировать его терапевтическое действие [Mekhafi et al., 2015; Ahmet et al., 2016; Theodosis-Nobelos et al., 2017].

Кетопрофен и продукты его этерификации в МЛС следует стандартизовать и определять [Нормативні документи МОЗ України, 2016]. Перспективным методом определения кетопрофена и его примесей является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [Зинченко, Ляпунов, 2015; Yadav et al., 2016]. Однако в монографии «Ketoprofen Gel» Британской Фармакопеи нормируется только предельное содержание кетопрофена этилового эфира (КЭЭ) ($\leq 4\%$), определяемое методом тонкослойной хроматографии [British Pharmacopoeia, 2016]. Для количественного определения эфиров кетопрофена методом ВЭЖХ требуются соответствующие стандартные образцы (СО), которые могут оказаться недоступными для рутинного анализа серийной продукции.

Цель работы: обосновать подход к идентификации и количественному определению сложных эфиров кетопрофена методом ВЭЖХ с использованием жидкостных хроматографов с диодно-матричным детектором и масс-детектором.

Материалы и методы исследования

Для исследований использовали:

1. СО кетопрофена (*ketoprofen BP CRS*, кат. № 668; $C_{16}H_{14}O_3$, М.м. 254.28, CAS № [22071-15-4]; содержание основного вещества 99.9 %).
2. СО КЭЭ (*ketoprofen ethyl ester LGS RS*, кат. № MM0001.19; $C_{18}H_{18}O_3$, М.м. 282.33, CAS № [60658-04-0]; содержание основного вещества 99.6 %).
3. СО кетопрофена пропиленгликолевого эфира (КПГЭ) (смеси изомеров) (*ketoprofen propylene glycol ester (mixture of isomers) LGS RS*, кат. № MM0001.28; $C_{19}H_{20}O_4$, М.м. 312.36; содержание основного вещества 99.8 %).

4. Диэтиленгликоля моноэтиловый эфир (ДГМЭ) (diethylene glycol monoethyl ether) (Transcutol[®] P, фирма «Gattefosse», серия № 159588, годен до 06.2019, C₆H₁₄O₃, М.м. 134.18, CAS № [111-90-0]; содержание основного вещества 99.98 %).

Поскольку СО сложного эфира кетопрофена и ДГМЭ отсутствует, то его получали следующим способом: к 1 г кетопрофена прибавляли 10 г ДГМЭ, 1 мл концентрированной серной кислоты, 90 мл ацетонитрила и перемешивали до растворения кетопрофена; выдерживали раствор в течение 12 ч. Прибавляли 50 мл воды очищенной, помещали смесь в делительную воронку и экстрагировали полученный продукт этилацетатом три раза по 15 мл. Объединённый органический слой промывали один раз 10 мл воды очищенной для удаления остатков серной кислоты, сушили натрия сульфатом безводным; фильтровали от неорганического осадка через фильтр Шотта; фильтрат испаряли в роторном испарителе. Полученную субстанцию эфира кетопрофена и ДГМЭ (ЭКДГМЭ) высушивали до постоянной массы при температуре 90 °С и контролировали методом ВЭЖХ [Зинченко и др., 2017 а; Зинченко и др., 2017 б]. Кроме того, был определён масс-спектр полученного соединения с использованием хроматографа «Agilent 1260» и колонки Inertsil ODS-2 размером 150×4.6 мм (размер частиц 5 мкм) с предколонкой Inertsil ODS-2 размером 10×4.6 мм (размер частиц 5 мкм). Компоненты подвижной фазы: *A* – раствор кислоты муравьиной с *pH*=2.7 и *B* – ацетонитрил для хроматографии (30:70); скорость потока элюента 1 мл/мин; деление потока 1:1; объём инъекции 5 мкл; температура термостата инжектора 8 °С; температура термостата колонки 35 °С. Параметры детектирования: детектор MS/MS «Agilent 6420 Triple Quad»; источник ионизации ESI (электроспрей); температура газа 350 °С; поток газа 8 л/мин; давление 40 psi; напряжение 4000 V; режим сбора данных: сканирование в диапазоне масс 120-600 а.е.м.; время начала сбора данных 0 мин, продолжительность сбора данных 40 мин; MS2 from 120 m/z; MS2 to 600 m/z; scan time 500 msec; fragmentor 120 V; cell accelerator voltage 7 ΔV; polarity – positive.

Растворы кетопрофена и эфиров кетопрофена готовили массо-объёмным способом. Навески взвешивали на аналитических весах модели AUW-120 D («Shimadzu») и помещали в мерные колбы 1-го класса точности из тёмного стекла («Simax», Чехия), растворяли в части метанола и доводили объём раствора метанолом до метки. Спектры поглощения растворов снимали на спектрофотометре «Shimadzu PharmaSpec UV-1700» с программным обеспечением UVProbe версии 2.21 («Shimadzu»). Растворы хроматографировали на жидкостном хроматографе Shimadzu Prominence-i LC-2030C 3D («Shimadzu», Япония) в следующих условиях: хроматографическая колонка Inertsil ODS-2 размером 250×4.6 мм (размер частиц 5 мкм); подвижная фаза – фосфатный буферный раствор с *pH* 2.5 и ацетонитрил для хроматографии (50:50); скорость потока – 1.5 мл/мин; температура колонки – 40 °С; температура автоинжектора 25 °С; детектор – диодно-матричный в диапазоне от 200 нм до 400 нм, детектирование при длине волны 255 нм; объём вводимой пробы – 10 мкл; время хроматографирования – 15 мин. При хроматографировании снимали спектры поглощения пиков и определяли чистоту пиков [Гризодуб, 2016].

Объектом исследований служил также крем-гель, содержащий 2.5 % кетопрофена, 10 % метилсалицилата, 5 % ментола, 5 % Transcutol[®] P, 10 % пропиленгликоля, эмульгатор 1 рода, карбомер, органический амин и воду до 100 % (состав указан в масс.%).

Результаты и их обсуждение

Для идентификации синтезированного сложного эфира кетопрофена и ДГМЭ были получены хроматограммы на хроматографе с масс-детектором (рис. 3). Как следует из рис. 4, основной ион в масс-спектре пика со временем удерживания (Rt) 4,268 мин имеет значение *m/z* 371.00, что соответствует молекулярному иону [M+H]⁺ примеси кетопрофена C₂₂H₂₆O₅ (М.м. 370.45), ион с соотношением *m/z* 393.00 является ионным аддуктом данной примеси и натрия [M+Na]⁺, а ион с соотношением *m/z* 409.00 – ионным аддуктом данной примеси и калия [M+K]⁺. Т. е., хроматографический пик с Rt=4.268 мин соответ-

ствует сложному эфиру кетопрофена и ДГМЭ, имеющему эмпирическую формулу $C_{22}H_{26}O_5$, с М.м. 370.45.

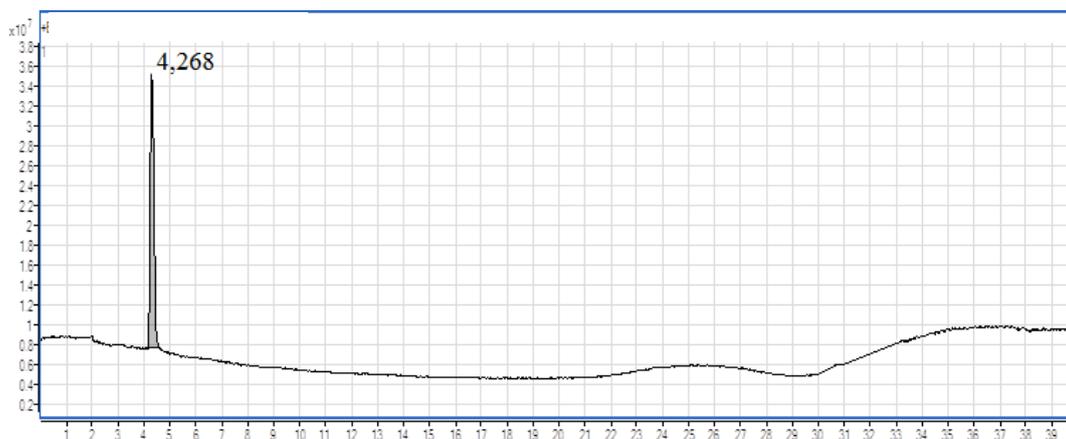


Рис. 1. Хроматограмма раствора сложного эфира кетопрофена и диэтиленгликоля моноэтилового эфира ($R_t=4.268$ мин), полученная в режиме сканирования масс в диапазоне 120–600 m/z
 Fig. 1. The chromatogram of the solution of the ester of ketoprofen with diethylene glycol monoethyl ether ($R_t=4.268$ min), obtained in a mass scanning mode in the range of 120-600 m/z

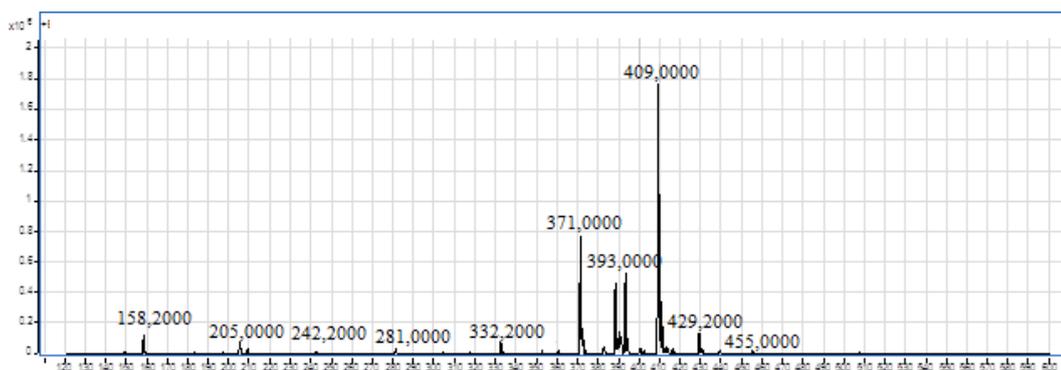


Рис. 2. Масс-спектр пика с $R_t=4.268$ мин (см. рис. 1) вещества с М.м.=370 а.е.м.
 Fig. 2. The mass spectrum of the peak with $R_t=4.268$ min (see Fig. 1) of the substance with $M_r=370$ amu

Кетопрофен и его эфиры в растворах метанола имеют идентичные УФ-спектры поглощения с $\lambda_{max}=255$ нм (рис. 3), поскольку содержат в молекулах одинаковый хромофор.

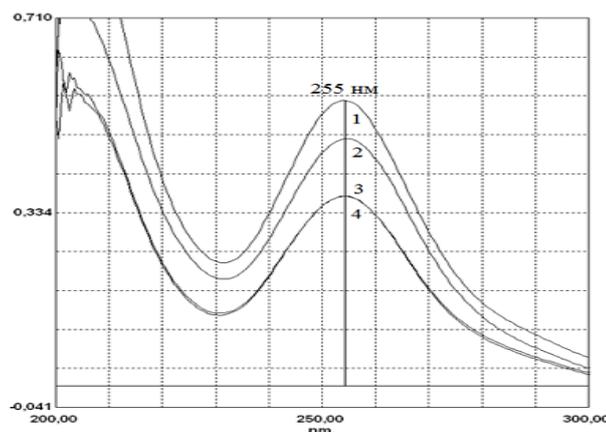


Рис. 3. УФ-спектры поглощения растворов кетопрофена (1), КЭЭ (2), КПГЭ (3) и эфира кетопрофена и ДГМЭ. Для всех спектров $\lambda_{max}=255$ нм
 Fig. 3. UV spectra of ketoprofen (1), ketoprofen ethyl ester (2), ketoprofen propylene glycol ester (3) and ester of ketoprofen with DGME. For all spectra $\lambda_{max}=255$ nm

Разработана методика количественного определения методом ВЭЖХ кетопрофена и его эфиров в диапазоне концентраций от 25 % до 125 % по отношению к предельному содержанию КЭЭ в МЛС 4% [Зинченко и др., 2017а]. Валидацию методики осуществляли по общепринятой методологии [Державна Фармакопея України, 2015; Гризодуб, 2016].

На рис. 4 представлена репрезентативная хроматограмма раствора, содержащего кетопрофен и его эфиры (концентрация веществ составляет ~4.0 % от содержания кетопрофена в испытуемом растворе для его количественного определения), а в табл. 1-3 – результаты исследований по определению факторов отклика и коэффициентов пересчёта при количественном определении эфиров кетопрофена по СО кетопрофена.

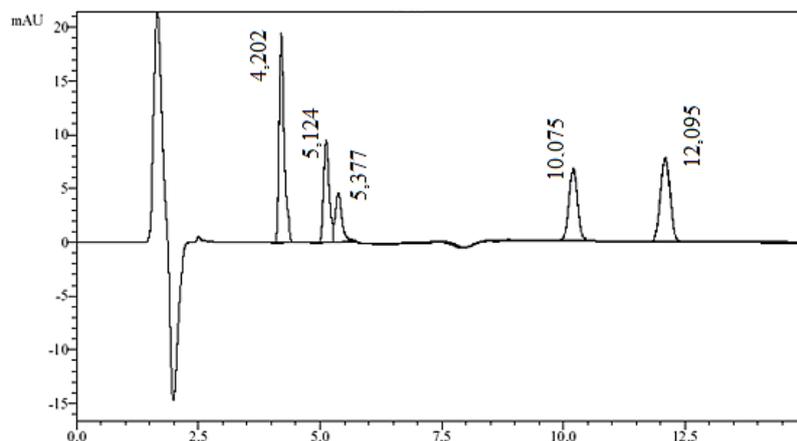


Рис. 4. Хроматограмма модельного раствора, где пик с $R_t=4.202$ мин соответствует кетопрофену, пики с $R_t=5.124$ мин и 5.377 мин – кетопрофена ПГ эфирам, пик с $R_t=10.075$ мин – эфиру кетопрофена и ДГМЭ, пик с $R_t=12.095$ мин – КЭЭ.

Fig. 4. The chromatogram of the model solution, where the peak with $R_t=4.202$ min corresponds to ketoprofen, the peaks with $R_t=5.124$ min and 5.377 min – ketoprofen PG esters, the peak with $R_t=10.075$ min – ester of ketoprofen with DGME, peak with $R_t=12.095$ min – ketoprofen ethyl ester. The concentration of substances is ~4.0 % with respect to the content of ketoprofen in the test solution for its assay

Таблица 1
Table 1

Результаты анализа растворов, содержащих от 1.0 % до 5.0 % кетопрофена (КН) и КЭЭ от номинального содержания кетопрофена в испытуемом растворе
The results of the analyses of solutions containing ketoprofen and ketoprofen ethyl ester from 1.0 % to 5.0 % with respect to the nominal content of ketoprofen in the test solution

С КН, мкг/мл	Введено КН, мкг	S пика КН	Фактор отклика, мВ•с/мкг	С КЭЭ, мкг/мл	Введено КЭЭ, мкг	S пика КЭЭ	Фактор отклика, мВ•с/мкг	К
1.2420	0.01242	34283	2760306	1.0350	0.01035	24641	2380773	1.159
1.7388	0.01739	50286	2891994	1.4490	0.01449	35833	2472947	1.169
2.4840	0.02484	68926	2774799	2.0700	0.02070	50221	2426135	1.144
3.2292	0.03229	91183	2823702	2.6910	0.02691	66080	2455593	1.150
3.7260	0.03726	104929	2816130	3.1050	0.03105	75627	2435652	1.156
4.4712	0.04471	119385	2670089	3.7260	0.03726	85959	2307005	1.157
4.9680	0.04968	136392	2745411	4.1400	0.04140	97934	2365556	1.161
5.7132	0.05713	154080	2696912	4.7610	0.04761	109778	2305776	1.170
6.2100	0.06210	174496	2809919	5.1750	0.05175	124028	2396676	1.172
Среднее			2776585				2394013	1.160
RSD			2.4541				2.5209	0.8210
Δ, %			4.5633				4.6875	1.5266

Таблица 2
Table 2

Результаты анализа растворов, содержащих от 1.0 % до 5.0 % *кетопрофена (КН)* и *КПГЭ* от номинального содержания кетопрофена в испытуемом растворе
The results of the analyses of solutions containing *ketoprofen* and *ketoprofen propylene glycol ester* from 1.0 % to 5.0 % with respect to the nominal content of ketoprofen in the test solution

С КН, мкг/мл	Введено КН, мкг	S пика КН	Фактор отклика, мВ•с/мкг	С КПГЭ, мкг/мл	Введено КПГЭ, мкг	S пика КПГЭ	Фактор отклика, мВ•с/мкг	К
1.2420	0.01242	34283	2760306	1.2114	0.01211	27349	2257636	1.223
1.7388	0.01739	50286	2891994	1.6960	0.01696	38906	2294040	1.261
2.4840	0.02484	68926	2774799	2.4228	0.02423	54681	2256934	1.229
3.2292	0.03229	91183	2823702	3.1496	0.03150	71672	2275562	1.241
3.7260	0.03726	104929	2816130	3.6342	0.03634	82058	2257938	1.247
4.4712	0.04471	119385	2670089	4.3610	0.04361	93117	2135202	1.251
4.9680	0.04968	136392	2745411	4.8456	0.04846	106310	2193949	1.251
5.7132	0.05713	154080	2696912	5.5724	0.05572	119594	2146169	1.257
6.2100	0.06210	174496	2809919	6.0570	0.06057	134730	2224368	1.263
Среднее			2776585				2226867	1.247
RSD			2.4541				2.5454	1.1026
Δ, %			4.5633				4.7332	2.0502

Таблица 3
Table 3

Результаты анализа растворов, содержащих от 1.0 % до 5.0 % *кетопрофена (КН)* и *ЭКДГМЭ* от номинального содержания кетопрофена в испытуемом растворе
The results of the analyses of solutions containing *ketoprofen* and *ester of ketoprofen with DGME* from 1.0 % to 5.0 % with respect to the nominal content of ketoprofen in the test solution

С КН, мкг/мл	Введено КН, мкг	S пика КН	Фактор отклика, мВ•с/мкг	С ЭКДГМЭ, мкг/мл	Введено ЭКДГМЭ, мкг	S пика ЭКДГМЭ	Фактор отклика, мВ•с/мкг	К
1.2420	0.01242	34283	2760306	1.28550	0.01286	22228	1729133	1.596
1.7388	0.01739	50286	2891994	1.79970	0.01800	32846	1825082	1.585
2.4840	0.02484	68926	2774799	2.57100	0.02571	45990	1788798	1.551
3.2292	0.03229	91183	2823702	3.34230	0.03342	60304	1804267	1.565
3.7260	0.03726	104929	2816130	3.85650	0.03857	70659	1832205	1.537
4.4712	0.04471	119385	2670089	4.62780	0.04628	79649	1721099	1.551
4.9680	0.04968	136392	2745411	5.14200	0.05142	90611	1762174	1.558
5.7132	0.05713	154080	2696912	5.91330	0.05913	102308	1730134	1.559
6.2100	0.06210	174496	2809919	6.42750	0.06428	116122	1806643	1.555
Среднее			2776585				1777726	1.562
RSD			2.4541				2.4316	1.1594
Δ, %			4.5633				4.5215	2.1559

Примечания к табл. 1, 2 и 3: С – концентрация; S – площадь; К – коэффициент пересчёта.

Эфиры кетопрофена идентифицируют при хроматографировании на хроматографе с диодно-матричным детектором по характерным для кетопрофена спектрам поглощения с $\lambda_{\max}=255$ нм и относительным временем удерживания (RRt) пиков относительно Rt пика кетопрофена. Так, на хроматограмме на рис. 4 для кетопрофена ПГ эфиров RRt составляют 1.219 и 1.280, для эфира кетопрофена и ДГМЭ – 2.398, а для КЭЭ – 2.878.

Определение эфиров кетопрофена можно проводить по СО кетопрофена с учётом коэффициентов пересчёта. Вещество с гидроксильной группой, образующее эфир с кетопрофеном, не является хромофором, и соотношение между молекулярными массами кетопрофена и эфира коррелирует с соотношением между удельными показателями их поглощения и коэффициентами пересчёта, полученными по результатам анализа (табл. 4).

Таблица 4
Table 4

Молекулярные массы кетопрофена и его эфиров, удельные показатели поглощения их растворов и коэффициенты пересчёта (см. табл. 1–3), а также соотношения между численными значениями этих характеристик кетопрофена и каждого из его эфиров
Molecular masses of ketoprofen and its esters, specific absorbance of their solutions and correction factors (see Tables 1–3), as well as the ratio between the values of these characteristics of ketoprofen and each of its esters

№ пп	Вещество	М.м., а.е.м.	М.м. эфира : М.м. К	$A_{1\text{см}}^{1\%}$	$A_{1\text{см}}^{1\%} \text{ К} : A_{1\text{см}}^{1\%} \text{ эфира}$	К (табл. 1-3)
1	Кетопрофен (К)	254.29		661.11		
2	КЭЭ	282.33	1.110	595.70	1.110	1.160
3	КППЭ	312.36	1.228	536.94	1.231	1.247
4	ЭКДГМЭ	370.45	1.457	457.47	1.445	1.562

Идентификация пиков примесей является важной при анализе комбинированных препаратов, где примеси с одинаковыми или очень близкими временами удерживания являются продуктами разложения или модификации разных лекарственных веществ. Например, при аналитическом сопровождении фармацевтической разработки крем-геля, содержащего 2.5 % кетопрофена, 10 % метилсалицилата, 5 % ментола, 5 % Transcutol® Р и 10 % пропиленгликоля, для анализа методом ВЭЖХ был использован *раствор сравнения*, содержащий СО кетопрофена (Rt=3.430 мин), СО кетопрофена ПГ эфиров (1 – Rt=13,100 мин и RRt=3.819; 2 – Rt=13.376 мин и RRt=3.900) и эфир кетопрофена с Transcutol® Р (Rt=16.037 мин, RRt=4.676), для идентификации пиков по временам удерживания, поскольку предполагалось образование эфиров кетопрофена с ПГ и Transcutol® Р. У пиков кетопрофена и его эфиров были идентичные УФ-спектры с $\lambda_{\max}=255$ нм (рис. 5). Хроматограмма *испытываемого раствора* после хранения препарата при температуре 25 °С представлена на рис. 6, а некоторые спектры поглощения пиков – на рис. 7.

Как следует из хроматограммы на рис. 6, в процессе хранения препарата образовались 2 примеси с Rt= 3.195 мин и Rt=13.389 мин, которые при идентификации только по Rt и/или RRt можно было бы ошибочно принять за кетопрофена ПГ эфиры (Rt=13.100 мин и Rt=13.376 мин) (см. рис. 5). Благодаря использованию диодно-матричного детектора, было показано, что указанные 2 пика на хроматограмме испытываемого раствора имели УФ-спектры с $\lambda_{\max}=305$ нм, характерные для метилсалицилата, а не кетопрофена (см. рис. 7). При этом низкие значения чистоты этих пиков свидетельствовали об их наложении на пики других веществ, которыми, видимо, были кетопрофена ПГ эфиры в незначительных концентрациях (см. рис. 6). По результатам исследований использованная хроматографическая система была признана непригодной для анализа продуктов разложения лекарственных веществ в препарате, в связи с чем методика анализа была модифицирована.

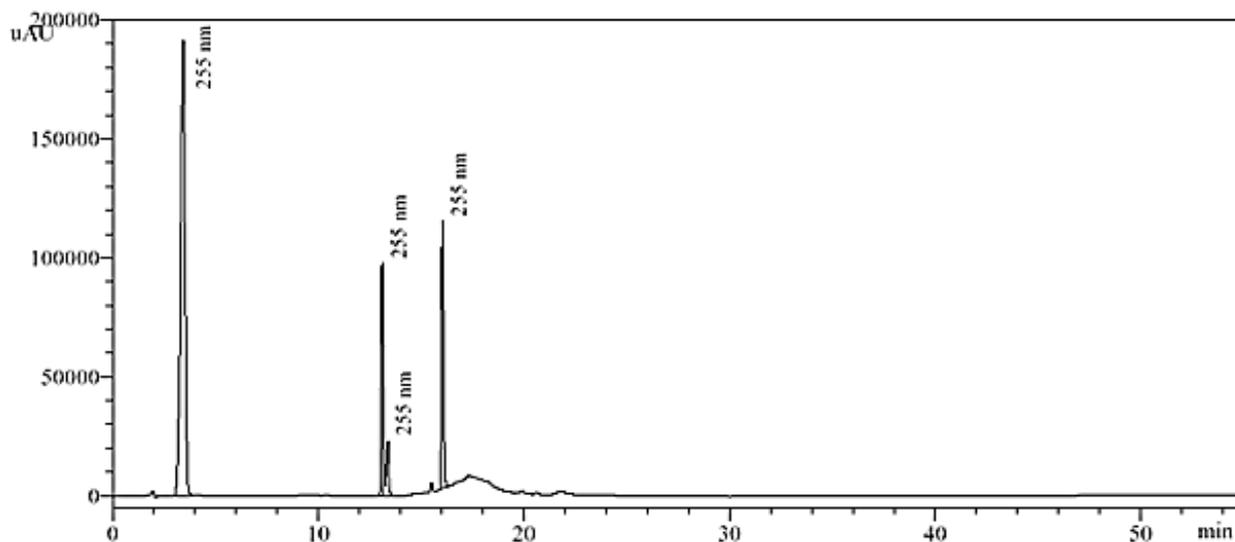


Рис. 5. Хроматограмма *раствора сравнения*, где пики соответствуют: кетопрофену ($R_t=3.430$ мин, чистота пика 0.99998, $\lambda_{\max}=255$ нм); кетопрофена ПГ эфиру ($R_t=13.100$ мин, чистота пика 0.99995, $\lambda_{\max}=255$ нм); кетопрофена ПГ эфиру ($R_t=13.376$ мин, чистота пика 0.99988, $\lambda_{\max}=255$ нм); кетопрофена ДГМЭ эфиру ($R_t=16.037$ мин, чистота пика 0.99955, $\lambda_{\max}=255$ нм)

Fig. 5. Chromatogram of the reference solution, where the peaks correspond: ketoprofen ($R_t=3.430$ min, peak purity index 0.99998, $\lambda_{\max}=255$ nm); ketoprofen PG ether ($R_t=13.100$ min, peak purity index 0.99995, $\lambda_{\max}=255$ nm); ketoprofen PG ether ($R_t=13.376$ min, peak purity index 0.99988, $\lambda_{\max}=255$ nm); ester of ketoprofen with DGME ($R_t=16.037$ min, peak purity index 0.99955, $\lambda_{\max}=255$ nm)

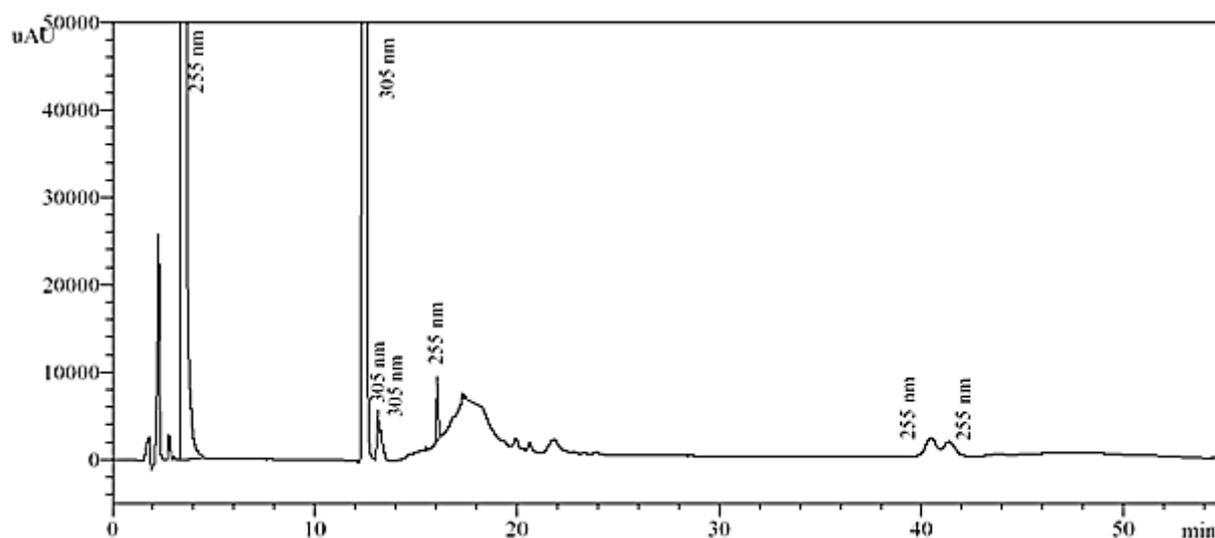


Рис. 6. Хроматограмма *испытуемого раствора* крем-геля, где пики соответствуют: кетопрофену ($R_t=3.436$ мин, чистота пика 0.99991, $\lambda_{\max}=255$ нм); метилсалицилату ($R_t=12.421$ мин, чистота пика 0.99996, $\lambda_{\max}=305$ нм); примеси метилсалицилата ($R_t=13.195$ мин, чистота пика 0.38514, $\lambda_{\max}=305$ нм); примеси метилсалицилата ($R_t=13.389$ мин, чистота пика 0.42154, $\lambda_{\max}=305$ нм); кетопрофена ДГМЭ эфиру ($R_t=16.057$ мин, чистота пика 0.99902, $\lambda_{\max}=255$ нм); кетопрофена ментоловому эфиру ($R_t=40.412$ мин, чистота пика 0.99911, $\lambda_{\max}=255$ нм); кетопрофена ментоловому эфиру ($R_t=41.418$ мин, чистота пика 0.99983, $\lambda_{\max}=255$ нм)

Fig. 6. The chromatogram of the test solution of cream-gel, where the peaks correspond: ketoprofen ($R_t=3.436$ min, peak purity index 0.99991, $\lambda_{\max}=255$ nm); methyl salicylate ($R_t=12.421$ min, peak purity index 0.99996, $\lambda_{\max}=305$ nm); impurities of methyl salicylate ($R_t=13.195$ min, peak purity index 0.3854, $\lambda_{\max}=305$ nm); impurities of methyl salicylate ($R_t=13.389$ min, peak purity index 0.42154, $\lambda_{\max}=305$ nm); ester of ketoprofen with DGME ($R_t=16.057$ min, peak purity index 0.99902, $\lambda_{\max}=255$ nm); ketoprofen menthol ester ($R_t=40.412$ min, peak purity index 0.99911, $\lambda_{\max}=255$ nm); ketoprofen menthol ester ($R_t=41.418$ min, peak purity index 0.99983, $\lambda_{\max}=255$ nm)

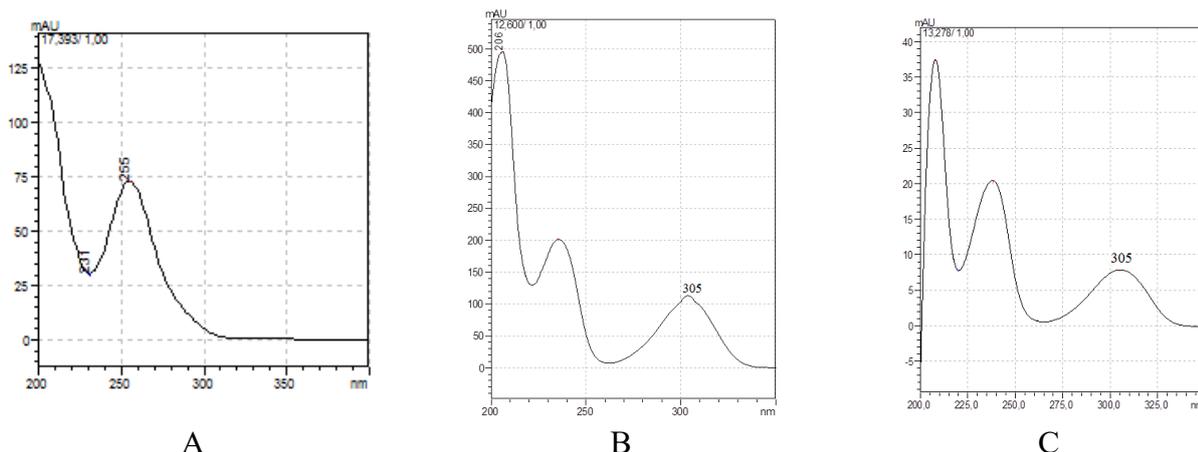


Рис. 7. УФ-спектры пиков кетопрофена ПГ эфира (рис. 5, $R_t=13.100$ мин.) (А), метилсалицилата (рис. 6, $R_t=12.421$ мин.) (В) и примеси метилсалицилата (рис. 6, $R_t=13.195$ мин.) (С), полученные при хроматографировании испытуемого раствора крем-геля

Fig. 7. UV spectra of peaks of ketoprofen PG ester (Figure 5, $R_t=13.100$ min.), methyl salicylate (Figure 6, $R_t=12.421$ min.) and methyl salicylate impurities (Figure 6, $R_t=13.195$ min.), obtained during chromatography of the test solution of cream-gel

Как следует из хроматограммы на рис. 6, в процессе хранения препарата образовались непредусмотренные примеси, пики которых имели времена удерживания 40.412 мин и 41.418 мин. Учитывая УФ-спектры пиков этих примесей с $\lambda_{max}=255$ нм, они были отнесены к продуктам модификации кетопрофена. Масс-спектры, полученные для обоих пиков, оказались идентичны (рис. 8).

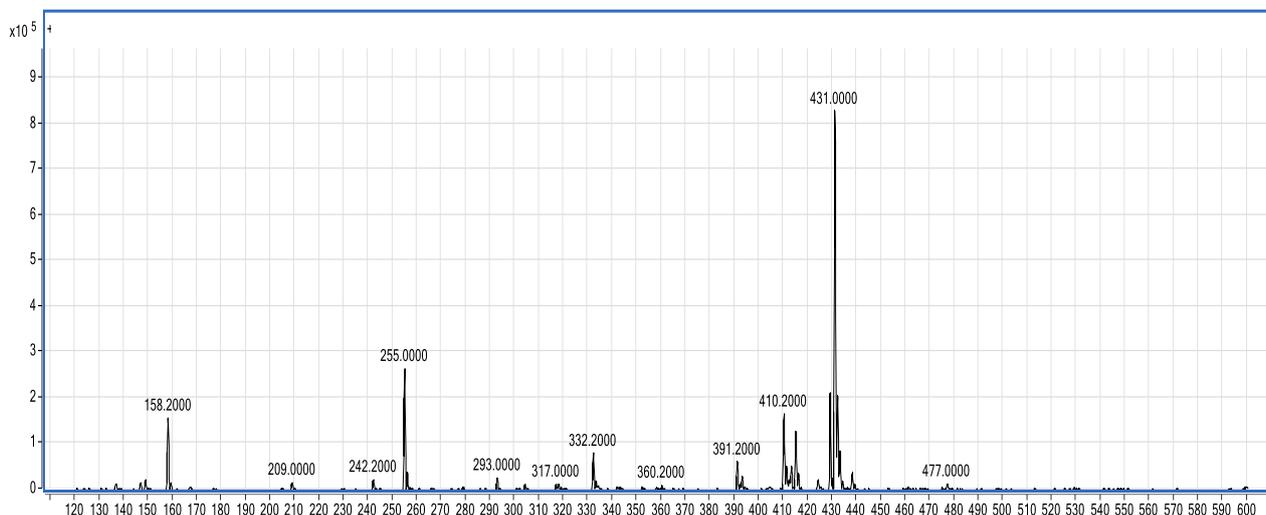


Рис. 8. Масс-спектр пика с $R_t=40.412$ мин (см. рис. 6) вещества с $M_r=392.54$

Fig. 8. The mass spectrum of the peak with $R_t=40.412$ min (see Fig. 6) of the substance with $M_r=392.54$

Основной ион в масс-спектре каждого из этих пиков имеет значение m/z 391.20 что соответствует молекулярному иону $[M+H]^+$ примеси кетопрофена $C_{26}H_{32}O_3$ (M_r 392.54), ион с соотношением m/z 410.20 является ионным аддуктом данной примеси и натрия $[M+Na]^+$, а ион с соотношением m/z 431.00 является ионным аддуктом данной примеси и калия $[M+K]^+$. Таким образом, хроматографические пики соответствуют двум изомерам кетопрофена ментолового эфира с эмпирической формулой $C_{26}H_{32}O_3$ и M_r 392.54.

Чтобы существенно уменьшить образование в препарате кетопрофена ментолового эфира потребовалось изменить производственный процесс под аналитическим контролем с применением модифицированной хроматографической методики определения посторонних примесей. Поскольку СО кетопрофена ментоловых эфиров отсутствует, для количественного определения этих примесей был использован СО кетопрофена с учётом коэффициента пересчёта 1.544, представляющего собой соотношение молекулярных масс кетопрофена ментолового эфира и кетопрофена.

Выводы

1. Научно обоснован подход к качественному и количественному определению сложных эфиров кетопрофена методом жидкостной хроматографии с использованием одно-матричного детектора и масс-детектора. Показано, что данный подход актуален при разработке методик одновременного определения нескольких примесей, пики которых могут иметь одинаковые или близкие времена удерживания.

2. Методом ВЭЖХ определено количественное содержание кетопрофена, кетопрофена этилового эфира, кетопрофена пропиленгликолевых эфиров и эфира кетопрофена с диэтиленгликоля моноэтиловым эфиром в определённых диапазонах их концентраций в растворах. По результатам исследований рассчитаны факторы отклика и коэффициенты пересчёта для количественного определения эфиров кетопрофена по СО кетопрофена. Показано, что с увеличением молекулярной массы сложных эфиров кетопрофена пропорционально возрастают коэффициенты пересчёта, а также уменьшаются их удельные показатели поглощения.

3. При рутинном определении сложных эфиров кетопрофена как посторонних примесей каждую из них можно идентифицировать по относительному времени удерживания пика, УФ-спектру пика и максимуму поглощения пика, а количественно определять – по СО кетопрофена с учётом коэффициента пересчёта. При этом показатель чистоты пика примеси характеризует его специфичность.

Список литературы

References

1. Гризодуб А.И. 2016. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств. Харьков, Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств», 396.

Grizodub A.I. 2016. Standartizovannyye protsedury validatsii metodik kontrolya kachestva lekarstvennykh sredstv. [Standardized approaches to validation of procedures for quality control of medicinal products]. Khar'kov, Gosudarstvennoe predpriyatie «Ukrainskiy nauchnyy farmakopeynyy tsentr kachestva lekarstvennykh sredstv», 396. (in Russian)

2. Зинченко И.А., Ляпунов Н.А. 2015. Аналитические методики определения декскетопрофена и сопутствующих примесей в геле: валидация и применение на этапе разработки препарата. Фармаком, 3/4, 12-20.

Zinchenko I.A., Lyapunov N.A. 2015. Analiticheskie metodiki opredeleniya deksketoprofena i soputstvuyushchikh primesey v gele: validatsiya i primeneniye na etape razrabotki preparata. [Analytical procedures for determination of dexketoprofen and related substances in the gel: validation and application during drug development]. Farmakom, 3/4, 12-20. (in Russian)

3. Зинченко И.А., Ляпунов Н.А., Безуглая Е.П. 2017. Валидация аналитической методики количественного определения примесей кетопрофена методом жидкостной хроматографии. Фармаком, 3: 25-32.

Zinchenko I.A., Lyapunov N.A., Bezuglaya E.P. 2017. Validatsiya analiticheskoy metodiki kolichestvennogo opredeleniya primesey ketoprofena metodom zhidkostnoy khromatografii. [Validation of the analytical procedure for the quantitative determination of ketoprofen impurities by liquid chromatography]. Farmakom, 3: 25-32. (in Russian)

4. Зинченко И.А., Ляпунов Н.А., Безуглая Е.П. 2017. Исследование образования примесей кетопрофена в модельных растворах. Фармаком, 4: 16-22.
Zinchenko I.A., Lyapunov N.A., Bezuglaya E.P. 2017. Issledovanie obrazovaniya primesey ketroprofena v model'nykh rastvorakh. [Study of the formation of ketoprofen impurities in model solutions]. Farmakom, 4: 16-22. (in Russian)
5. Компендиум 2016 – лекарственные препараты. Под ред. В.Н. Коваленко. 2016. Киев, Морион, 2416.
Compendium 2016 – lekarstvennye preparaty. [Compendium 2016 – medicinal products]. Pod red. V.N. Kovalenko. 2016. Kiev, Morion, 2416. (in Russian)
6. Корж Н.А., Хвисяк Н.В., Дедух Н.В. 2007. Остеоартроз: консервативная терапия: Монография. Под ред. Н.А. Коржа, Н.В. Дедух, И.А. Зупанца. Харьков, Золотые страницы, 424.
Korzh N.A., Khvisyuk N.V., Dedukh N.V. 2007. Osteoartroz: konservativnaya terapiya. [Osteoarthritis: conservative therapy]: Monografiya. Pod red. N.A. Korzha, N.V. Dedukh, I.A. Zupantsa. Khar'kov, Zolotyie stranitsy, 424. (in Russian)
7. Державна Фармакопея України: Т. 1. 2-е вид. 2015. Харків: Державне підприємство «Український науковий центр якості лікарських засобів», 1128.
Derzhavna Farmakopeja Ukrainy [State pharmacopoeia of Ukraine]: Т. 1. 2-е vyd. 2015. Harkiv: Derzhavne pidpryjemstvo «Ukrai'ns'kyj naukovyj centr jakosti likars'kyh zasobiv», 1128. (in Ukrainian)
8. Нормативні документи МОЗ України. Стандартизація фармацевтичної продукції: Том 1. 2016. Київ: МОЗ України, Морион, 982.
Normatyvni dokumenty MOZ Ukrainy. Standartyzacija farmacevtychnoi' produkci'. [Regulatory documents of the Ministry of Health of Ukraine. Standardization of pharmaceutical products]: Tom 1. 2016. Kyi'v: MOZ Ukrainy, Morion, 982. (in Ukrainian)
9. Ahmed M., Azam F., Gbai A. 2016. Ester prodrugs of ketoprofen: synthesis, in vitro stability, in vivo biological evaluation and in silico comparative docking studies against COX-1 and COX-2. Current Drug Discovery Technologies, V. 13, 1, March, 41-57.
10. Alkilani A.Z., McCrudden M.T.C., Donnelly R.F. 2015. Transdermal Drug Delivery: Innovative Pharmaceutical Developments Based on Disruption of the Barrier Properties of the Stratum Corneum. Pharmaceutics, 7: 438-470.
11. British Pharmacopoeia. V. III. 2016. London: British Pharmacopoeia Comission, TSO.
12. Muro S. 2016. Drug Delivery Across Physiological Barriers. Pan Stanford Reference, 426 p.
13. European Pharmacopoeia. 9th ed. 2016. Strasbourg: EDQM, Council of Europe, 4016.
14. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 7th Edition. Ed. Rowe R.C., Sheskey P.J., Cook W.G., Fenton M.E. 2012. London : Pharmaceutical Press, 1064.
15. Herndon C.M. 2012. Topical delivery of nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis. J. Pain Palliat. Care Pharmacother, 26 (1): 18-23.
16. Lane M.E. 2013. Skin penetration enhancers. Int. J. Pharm., № 447: 12-21.
17. Martindale: The Complete Drug Reference. 39th Edition. Ed. Alison Brayfield. 2017. London: Pharmaceutical Press, 4774.
18. Mekhafi S., Alkadi H., Kotb E.S.M. 2015. Sinthesis and anti-inflammatory activity of novel ketoprofen and ibuprofen derivatives. J. Chem. And Pharm. Research., 7(2), 503-510.
19. Theodosis-Nobelos P., Tziona P., Poptsis A. 2017. Novel polyfunctional esters of ibuprofen and ketoprofen with hypolipidemic, lipoxygenase inhibitory and enhanced anti-inflammatory activity, Med. Chem. Res., 26: 461.
20. Yadav N.K., Raghuvanshi A., Sharma G. 2016. QbD – based development and validation of a stability – indicating HPLC method for estimating ketoprofen in bulk drug and pronisomal vesicular system. J. of Chromatographie Science, V. 54, № 3: 377-389.