

DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-55-64
УДК 661.12.011: [615.454.1: 615.276].074

Влияние распределения кетопрофена в крем-гелях на образование примесей

Н. А. Ляпунов^{1*}, И. А. Зинченко¹, Е. П. Безуглая¹, А. А. Лысокобылка¹

¹ – ГНУ «НТК «Институт монокристаллов» НАН Украины, 61072, Украина, г. Харьков, пр. Науки, д. 60

*Контактное лицо: Ляпунов Николай Александрович. E-mail: lyapunov.na@gmail.com

Статья получена: 24.03.2019. Статья принята к печати: 24.04.2019

Резюме

Введение. Рациональной является фиксированная комбинация кетопрофена, метилсалицилата и L-ментола в форме крем-геля. Кетопрофен образует соли с основаниями и сложные эфиры с веществами, содержащими гидроксильные группы. Кетопрофен практически нерастворим в воде, а растворимость солей кетопрофена намного выше, что может привести к его различной локализации в эмульсии м/в и повлиять на профиль примесей кетопрофена, образующихся при этерификации.

Цель. Цель работы – исследовать влияние распределения кетопрофена в крем-гелях на образование примесей в процессе хранения.

Материалы и методы. Исследовали крем-гели, содержащие 2,5% кетопрофена, 5% L-ментола и 10% метилсалицилата с рН 5,5 или рН 6,8, при изготовлении которых кетопрофен растворяли в смеси L-ментол – метилсалицилат или смешанном растворителе вода – пропиленгликоль (ПГ) – диэтиленгликоля моноэтиловый эфир (ДГМЭ). Методом жидкостной хроматографии проводили идентификацию примесей, а также определяли распределение кетопрофена между фазами эмульсии и содержание примесей в крем-гелях. Реологические свойства крем-гелей исследованы методом ротационной вискозиметрии, а их микроструктура – методом оптической микроскопии.

Результаты и обсуждение. Исследовано образование сложных эфиров кетопрофена с ПГ, ДГМЭ и L-ментолом в крем-гелях. Показаны различия в локализации кетопрофена в фазах эмульсии м/в при рН 5,5 и рН 6,8. Образующиеся примеси идентифицированы по временам удерживания их пиков на хроматограммах, УФ спектрам и масс-спектрам. Установлено, что при хранении содержание сложных эфиров кетопрофена с ПГ, ДГМЭ и L-ментолом возрастает; скорость их образования оказывается меньше при рН=6,8 и введении кетопрофена в виде соли с трометамолом в дисперсионную среду крем-геля. Однако при этом образуются три примеси, которые по УФ спектрам идентифицированы как продукты разложения метилсалицилата. При хранении крем-гелей с рН=6,8 возрастает содержание продуктов разложения метилсалицилата, которые не обнаружены при рН=5,5.

Заключение. При изготовлении крем-геля кетопрофен целесообразно растворять в смеси метилсалицилата с L-ментолом и нормировать рН на уровне 5,5. В качестве усилителей проникновения рационально использовать гидрофильные растворители без гидроксильных групп, что ограничит профиль примесей ментоловыми эфирами энантиомеров кетопрофена.

Ключевые слова: кетопрофен, метилсалицилат, L-ментол, крем-гель, эмульсия м/в, гидрофильный растворитель, сложный эфир, примесь, хроматограмма, спектр.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Для цитирования: Ляпунов Н. А., Зинченко И. А., Безуглая Е. П., Лысокобылка А. А. Влияние распределения кетопрофена в крем-гелях на образование примесей. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2019; 8(2): 55–64.

Effect of the Ketoprofen Distribution in Cream-gels on the Formation of the Impurities

Н. А. Lyapunov^{1*}, I. A. Zinchenko¹, E. P. Bezuglaya¹, A. A. Lysokobilka¹

¹ – State Scientific Institution «Institute for Single Crystals» of the National Academy of Sciences of Ukraine, 60, Nauki av., Kharkiv, 61072, Ukraine

*Corresponding author: Nikolay A. Lyapunov. E-mail: lyapunov.na@gmail.com

Received: 24.03.2019. Accepted: 24.04.2019

Abstract

Introduction. The fixed combination of ketoprofen, methyl salicylate and levomenthol in the form of a cream-gel is rational. Ketoprofen forms salts with bases and esters with substances containing hydroxyl groups. Ketoprofen is practically insoluble in water, and the solubility of ketoprofen salts is much higher; this can lead to its different localization in the o/w emulsion and affect the profile of ketoprofen impurities resulting from esterification.

Aim. The aim of the work is to study the effect of ketoprofen distribution in cream-gels on the formation of the impurities during storage.

Materials and methods. Cream-gels with pH of 5,5 or 6,8 containing ketoprofen 2,5%, levomenthol 5% and methyl salicylate 10% have been studied. For their production, ketoprofen was dissolved in the mixture of levomenthol – methyl salicylate or in the mixed solvent of water – propylene glycol (PG) – diethylene glycol monoethyl ether (DGME). The impurities have been identified by liquid chromatography and the distribution of ketoprofen between the phases of the emulsion and the content of impurities in cream-gels have been determined by the same method. The rheological characteristics of cream-gels have been studied by viscosity-rotating viscometer method, and their microstructure – by optical microscopy.

Results and their discussion. The formation of ketoprofen esters with PG, DGME and levomenthol in cream-gels have been studied. Differences in the localization of ketoprofen in the phases of the o/w emulsion at pH 5,5 and 6,8 have been shown. The formed impurities have been identified by the retention times of their peaks on chromatograms, by UV spectra and mass spectra. It has been established that during storage the content of ketoprofen esters with PG, DGME and levomenthol increased, but their formation rate was lower at pH=6,8 as well as at the adding of ketoprofen as a salt with trometamol into the dispersion medium of cream-gel. However, this resulted in formation of three impurities that were identified by UV spectra as decomposition products of methyl salicylate. When storing cream-gels with pH=6,8, the content of decomposition products of methyl salicylate, which were not detected at pH=5,5, increased.

Conclusion. When making a cream-gel, ketoprofen is advisable to dissolve in a mixture of methyl salicylate and levomenthol and standardize the pH about 5,5. It is rational to use hydrophilic solvents without hydroxyl groups as penetration enhancers and the impurity profile could be limited to the menthol esters of the enantiomers of ketoprofen as a result.

Keywords: ketoprofen, methyl salicylate, levomenthol, cream-gel, o/w emulsion, hydrophilic solvent, ester, impurity, chromatogram, spectrum.

Conflict of interest: no conflict of interest.

For citation: Lyapunov N. A., Zinchenko I. A., Bezuglaya E. P., Lysokobilka A. A. Effect of the ketoprofen distribution in cream-gels on the formation of the impurities. *Drug development & registration.* 2019; 8(2): 55–64.

ВВЕДЕНИЕ

При боли в суставах и мышцах для местного лечения широко применяют гели кетопрофена, оказывающие противовоспалительное и анальгетическое действие [1, 2]. Для этих целей применяют мази и кремы с метилсалицилатом и ментолом [1, 2], а также крем-гели, содержащие метилсалицилат и ментол в комбинации с диклофенака диэтиламинол или нимесулидом [2]. Рациональной является фиксированная комбинация кетопрофена, метилсалицилата и L-ментола в форме крем-геля. При скрининговых исследованиях на модели каррагенинового отёка лапы у крыс [3] показано, что противовоспалительный и анальгетический эффекты геля кетопрофена 2,5% составили соответственно $37,7 \pm 1,6\%$ и $30,1 \pm 3,4\%$, а крем-геля, содержащего 2,5% кетопрофена, 10% метилсалицилата и 5% L-ментола, – $63,6 \pm 3,2\%$ и $56,2 \pm 2,7\%$.

Кетопрофен представляет собой (2RS)-2-(3-бензоилфенил) пропановую кислоту и образует соли с органическими и неорганическими основаниями, а также сложные эфиры с веществами, содержащими гидроксильные группы. Кетопрофен практически нерастворим в воде [4], но растворимость солей кетопрофена с органическими основаниями в воде и смешанных растворителях вода – этанол оказывается намного выше, что и обуславливает составы вспомогательных веществ в гелях кетопрофена [2]. Различие в растворимости кетопрофена и солей кетопрофена может привести к его различной локализации в дисперсионной среде и дисперсной фазе крем-геля. Это, в свою очередь, может повлиять на профиль примесей кетопрофена, образующихся при хранении препарата вследствие реакции этерификации.

Цель работы – исследовать влияние распределения кетопрофена в крем-гелях на образование примесей в процессе хранения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследований использовали субстанции: кетопрофен («Societa Italiana Medicinali Scandic», Италия; серия 168.718, изготовлен 06.2012, дата повторного контроля 06.2017), метилсалицилат («Novacyl», Франция; серия FMS1215111, изготовлен 30.05.2012, дата повторного контроля 30.05.2017) и L-ментол («Xiangsheng Perfume (Huaian) Co, Ltd», Китай; серия 170314, изготовлен 24.03.2017, годен до 23.03.2020) [4]. Крем-гели имели следующий состав (г/100 г): кетопрофен 2,5, метилсалицилат 10,0, L-ментол 5,0, карбомер 1,5, трометамол q. s. (до требуемого pH), эмульгатор м/в 4,5, диэтиленгликоля моноэтиловый эфир (ДГМЭ) 5,0, пропиленгликоль (ПГ) 10,0, вода очищенная до 100,0. Лекарственные и вспомогательные вещества соответствовали требованиям Европейской Фармакопеи [4]. В состав крем-гелей были введены два гидрофильных неводных растворителя ДГМЭ и ПГ, содержащие

в молекулах, соответственно, одну и две гидроксильные группы и образующие с кетопрофеном в растворах сложные эфиры [5, 6].

Исследование распределения кетопрофена в эмульсиях проводили следующим образом. В три делительные воронки помещали растворы А и Б следующих составов (в граммах):

1 воронка: раствор А – метилсалицилат 10,0 + L-ментол 5,0; **раствор Б** – кетопрофен 2,5 + ПГ 10,0 + ДГМЭ 5,0 + трометамол 2,94 + вода 60,25;

2 воронка: раствор А – метилсалицилат 10,0 + L-ментол 5,0 + кетопрофен 2,5; **раствор Б** – ПГ 10,0 + ДГМЭ 5,0 + вода 60,25;

3 воронка: раствор А – метилсалицилат 10,0 + L-ментол 5,0 + кетопрофен 2,5; **раствор Б** – ПГ 10,0 + ДГМЭ 5,0 + трометамол 2,94 + вода 60,25.

Эмульгировали раствор А в растворе Б путём взбалтывания; эмульсию выдерживали в делительной воронке в течение 3 суток до разделения фаз. Отбирали пробы из верхнего и нижнего слоя, центрифугировали их в течение 10 мин с частотой вращения 15000 об/мин и готовили испытуемые растворы:

- 1,0 мл гидрофобной фазы в мерной колбе вместимостью 50 мл растворяли в 40 мл метанола, доводили объём раствора метанолом до метки и перемешивали. 1,0 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объём раствора метанолом до метки и перемешивали;
- 1,0 мл гидрофильной фазы в мерной колбе вместимостью 50 мл растворяли в 40 мл метанола, доводили объём раствора метанолом до метки и перемешивали. 2,0 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объём раствора метанолом до метки и перемешивали.

Содержание кетопрофена в растворах определяли методом жидкостной хроматографии [4] по валидированной методике [7] с использованием хроматографа модели LC-2010CHT Prominence-i («Shimadzu», Япония) в следующих условиях: колонка Inertsil ODS-2 размером 250×4,6 мм (размер частиц 5 мкм); подвижная фаза – фосфатный буферный раствор pH 2,5 и ацетонитрил (50:50); скорость потока 1,5 мл/мин; температура колонки 40 °С; температура автоинжектора 25 °С; детектор – спектрофотометрический, детектирование при длине волны 255 нм; объём вводимой пробы 10 мкл; время хроматографирования 15 мин.

Для приготовления раствора сравнения 25,36 мг стандартного образца (СО) кетопрофена BP CRS (Ketoprofen BP CRS, кат. № 668) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 80 мл метанола, доводили объём раствора метанолом до метки и перемешивали. На рисунке 1 представлены репрезентативные хроматограммы испытуемых растворов и раствора сравнения.

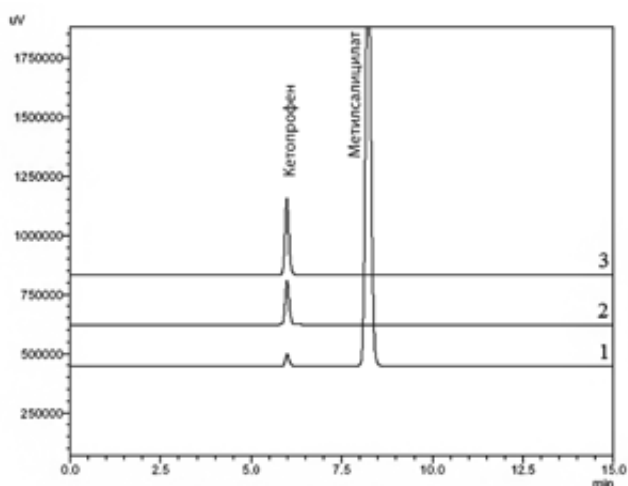


Рисунок 1. Хроматограммы раствора кетопрофена в гидрофобной фазе (1), раствора кетопрофена в гидрофильной фазе (2) и раствора сравнения (3)

Figure 1. Chromatograms of ketoprofen solution in hydrophobic phase (1), ketoprofen solution in hydrophilic phase (2) and reference solution (3)

Крем-гели готовят двумя способами:

Способ 1. В метилсалицилате при перемешивании растворяли L-ментол и затем кетопрофен; смешивали раствор с эмульгатором. В воде диспергировали карбомер до получения однородной дисперсии, которую смешивали с ПГ и ДГМЭ. В дисперсию вводили раствор кетопрофена и L-ментола в метилсалицилате и эмульгировали, после чего при перемешивании массы карбомер нейтрализовали водным раствором трометамола до pH крем-геля 5,5.

Способ 2. В метилсалицилате при перемешивании растворяли L-ментол и смешивали раствор с эмульгатором. В воде диспергировали карбомер до получения однородной дисперсии, которую смешивали с водным раствором трометамола до pH геля 5,5. В смеси ПГ и ДГМЭ при перемешивании растворяли кетопрофен и раствор смешивали с водным раствором трометамола, который брали в эквимолярном количестве по отношению к кетопрофену с избытком 5%. Гель смешивали с раствором кетопрофена, вводили раствор L-ментола в метилсалицилате и эмульгировали до образования крем-геля, доводили pH до 6,8.

Для изготовления крем-гелей использовали вакуумный реактор-гомогенизатор РП-5 («Промвит», Украина). Для предотвращения образования газовой эмульсии процессы диспергирования, перемешивания и эмульгирования вели под вакуумом глубиной от $-0,05$ МПа до $-0,07$ МПа.

Микроструктуру гелей и крем-гелей определяли методом оптической микроскопии [4] с помощью микроскопа с окуляр-микрометром «Krüss MBL 2100» («A. Krüss Optronic», Германия). pH измеряли потенциометрически [4] непосредственно в гелях и крем-гелях pH-метром «Metrohm 827 lab» («Metrohm AG, Швейца-

рия») с электродом типа «Porotrode» (кат. № 6.0235.100). Реологические исследования проводили методом ротационной вискозиметрии на реовискозиметре с коаксиальными цилиндрами «Rheolab QC» («Anton Paar», Австрия) [4]. Для определения структурной вязкости крем-гелей в зависимости от pH по способу 1 были изготовлены лабораторные образцы крем-гелей с pH от 4,5 до 6,8.

Для определения эфиров кетопрофена навески крем-гелей (1,5 г) растворяли в 50 мл метанола и центрифугировали в течение 10 мин с частотой вращения 12000 об/мин. Испытуемым раствором служила прозрачная жидкость над осадком. Испытуемые растворы и раствор сравнения готовили массо-объемным способом. Навески взвешивали на аналитических весах AUW-120 D («Shimadzu», Япония). Растворы хроматографировали на жидкостном хроматографе Shimadzu Prominence-i LC-2030C 3D («Shimadzu», Япония) в следующих условиях: хроматографическая колонка Discovery® RP Amide C16 размером 250×4,6 мм (размер частиц 5 мкм); подвижная фаза А (ПФ А) – фосфатный буферный раствор pH 5,9 и ацетонитрил (70:30); подвижная фаза В (ПФ В) – фосфатный буферный раствор pH 5,9 и ацетонитрил (30:70); состав подвижной фазы программируется: от (0–4) мин ПФ А составляет 100%, ПФ В – 0%, (4–15) мин ПФ А (100→0) %, ПФ В (0→100) %, (15–35) мин ПФ А – 0%, ПФ В – 100%, (35–39) мин ПФ А (0→100) %, ПФ В (100→0) %, (39–42) мин ПФ А 100%, ПФ В 0%; скорость потока 1,5 мл/мин; температура колонки 40 °C; температура автоинжектора 25 °C; детектор – диодно-матричный в диапазоне от 200 нм до 400 нм, детектирование при $\lambda=255$ нм; объем вводимой пробы 10 мкл; время хроматографирования 42 мин. При хроматографировании снимали УФ спектры поглощения.

Для приготовления раствора сравнения 15,0 мг СО кетопрофена BP CRS помещали в мерную колбу темного стекла вместимостью 100 мл, растворяли в 80 мл метанола, доводили объем раствора метанолом до метки и перемешивали. 5,0 мл полученного раствора помещали в мерную колбу темного стекла вместимостью 25 мл, доводили объем раствора метанолом до метки и перемешивали. Количественное содержание эфиров кетопрофена рассчитывали по кетопрофену с учётом коэффициентов пересчёта по молекулярной массе [6].

В таблицах 1 и 2 и на рисунках 2 и 3, представлены результаты валидации методики количественного определения примесей кетопрофена. Диапазон её применения обусловлен тем, что в гелях кетопрофена допускается содержание кетопрофена этилового эфира $\leq 4,0\%$ по спецификации в течение срока хранения и $\leq 0,2\%$ (предельное определение) по спецификации при выпуске. Методика характеризуется достаточной сходимостью и правильностью (таблица 1) [8].

Подтверждена линейность методики в диапазоне её применения (рисунок 2, таблица 2).

Таблица 1. Результаты анализов модельных смесей, содержащих от 5 до 125% кетопрофена по отношению к предельно допустимому содержанию примеси его эфира, их статистическая обработка и оценка

Table 1. The results of analyzes of model mixtures containing from 5 to 125% ketoprofen in relation to the acceptable limit of the impurity (its ester), their statistical processing and evaluation

№	Введено в % от номинальной концентрации (Xi, факт., %)	Найдено в % от номинальной концентрации (Yi, %)	Найдено в % к введённому Zi=100 · (Yi/Xi)
1	5,00	5,18	103,52
2	10,01	9,90	98,95
3	15,01	15,28	101,80
4	20,01	20,36	101,73
5	25,02	25,45	101,72
6	30,02	29,91	99,65
7	40,03	39,67	99,11
8	50,03	50,83	101,59
9	60,04	59,37	98,89
10	70,05	70,09	100,06
11	80,05	81,73	102,09
12	90,06	90,46	100,45
13	95,06	95,01	99,94
14	100,07	99,15	99,09
15	105,07	104,37	99,34
16	110,07	111,85	101,62
17	115,08	115,34	100,23
18	125,08	124,29	99,36
Среднее (Z _{cp})			100,51%
Относительное стандартное отклонение (RSD _z)			1,3573%
Относительный доверительный интервал (Δ _z) Δ _z =t (95%, 18 - 1) · RSD _z =1,7396 · 1,3573%			2,3611%
Критическое значение для сходимости результатов (Δ _{As})			5,0%
Оценка сходимости:			2,3611 < 5,0%
Систематическая ошибка δ % = Z _{cp} - 100			0,51%
Критерий статистической незначимости систематической ошибки:			
δ < Δ _z : √18 = 2,3611% : 4,24 = 0,56%			0,56%
Оценка правильности по критерию статистической незначимости:			0,56 > 0,51%
Критерий практической незначимости систематической ошибки: δ ≤ max δ = 0,32 × 5,0% = 1,6%			1,6%
Оценка правильности по критерию практической незначимости:			1,6 > 0,51%
Общий вывод о методике:			корректна

Специфичность методики проиллюстрирована на рисунке 3. По сравнению с хроматограммой растворителя (1) на хроматограммах испытуемых растворов крем-гелей 3 и 4, которые хранились 3 месяца при температуре (25±2) °С, дополнительно присутствуют пики кетопрофена (Rt≈4,3 мин) и метилсалицилата (Rt≈10,5 мин). На хроматограмме 3 дополнительно обнаружены пики с Rt≈11,6 мин, Rt≈14,3 мин и двойной

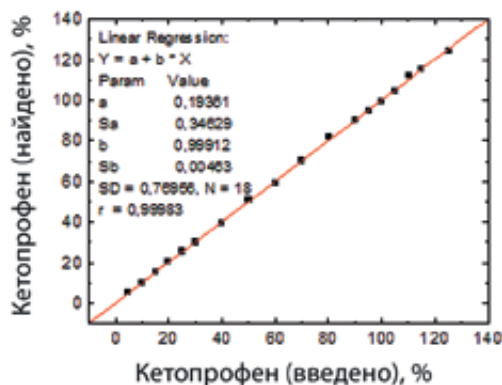


Рисунок 2. Линейная зависимость найденной концентрации кетопрофена от его введённой концентрации в нормализованных координатах

Figure 2. Linear relationship of the determined concentration of ketoprofen on its introduced concentration in normalized coordinates

пик с Rt≈26,4 мин и Rt≈26,9 мин, а на хроматограмме 4 – пики с Rt≈6,8 мин, Rt≈7,4 мин и Rt≈10,1 мин. Пики разных веществ разделяются и имеют разные времена удерживания (Rt). Дополнительные пики на хроматограмме 3 имеют характерный для кетопрофена УФ спектр с максимумом поглощения при λ=255 нм (рисунок 4); пик с Rt ≈ 11,6 мин идентифицирован как пик кетопрофена ПГ эфира, а пик с Rt≈14,3 мин – как пик кетопрофена ДГМЭ эфира (см. хроматограммы 3 и 5 на рисунке 3). Для идентификации использовали вещества сравнения: кетопрофена ПГ эфир и кетопрофена ДГМЭ эфир, идентифицированные ранее по УФ спектрам и масс-спектрам [5, 6]. Дополнительные пики на

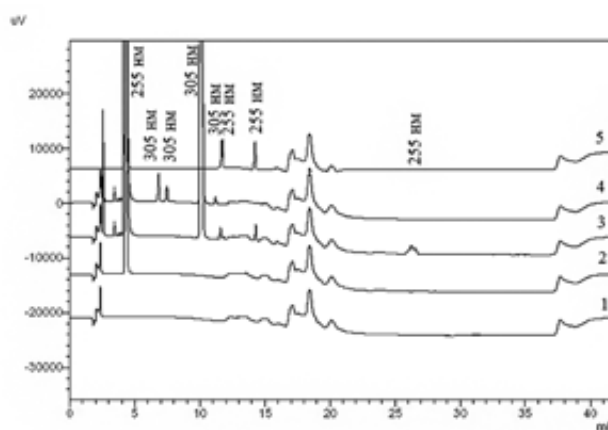


Рисунок 3. Хроматограммы растворителя (1); раствора сравнения кетопрофена (2); растворов крем-гелей, изготовленных по способу 1 (3) и способу 2 (4) после 3 месяцев хранения при температуре (25±2) °С; раствора кетопрофена ПГ эфира и кетопрофена ДГМЭ эфира (5). Значения Rt см. в тексте

Figure 3. Chromatograms of the solvent (1); ketoprofen reference solution (2); solutions of cream-gels produced according to method 1 (3) and method 2 (4) after 3-month storage at (25±2) °С; solution of ketoprofen PG ester and ketoprofen DGME ester (5). Rt values, see text

хроматограмме 4 имеют УФ спектр с максимумом поглощения при $\lambda=305$ нм, характерный для метилсалицилата (рисунок 5), и идентифицированы как продукты разложения метилсалицилата.

Таблица 2. Оценка метрологических характеристик линейной зависимости

Table 2. Evaluation of metrological characteristics of linear relationship

Параметры	Значения	Критерии приемлемости и оценка	Вывод
b	0,99912		
S_b	0,00463		
α	0,19361	$\alpha \leq \Delta_{\alpha} = t(95\%, n-2) \cdot S_{\alpha}$ $0,19361 < 1,7459 \cdot S_{\alpha} =$ $= 0,61 $	соответствует
S_{α}	0,34629		
SD_0	0,76956%		
SD_0/b	0,77024%	$SD/b \leq \Delta_{As} : t(95\%, n-2)$ $0,77024 < 5\% : 1,7459 =$ $= 2,86\%$	соответствует
r	0,99983	$0,99983 > 0,99898 $	соответствует

Для идентификации примесей кетопрофена с $Rt \approx 26,4-26,9$ мин был определён их масс-спектр 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: А – раствор кислоты муравьиной с $pH=2,7$ и В – ацетонитрил (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.

Содержание примесей метилсалицилата (X), в процентах, рассчитывали по формуле:

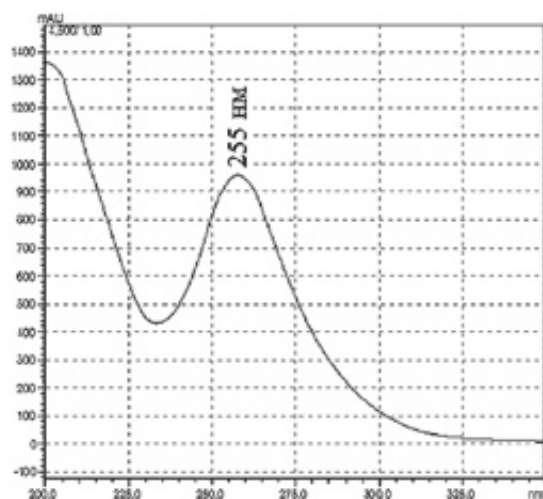
$$X = \frac{S_i}{S_{ms} + \sum S_i} \cdot 100,$$

где S_i – площадь пика примеси метилсалицилата, $\sum S_i$ – сумма площадей пиков примесей метилсалицилата, S_{ms} – площадь пика метилсалицилата.

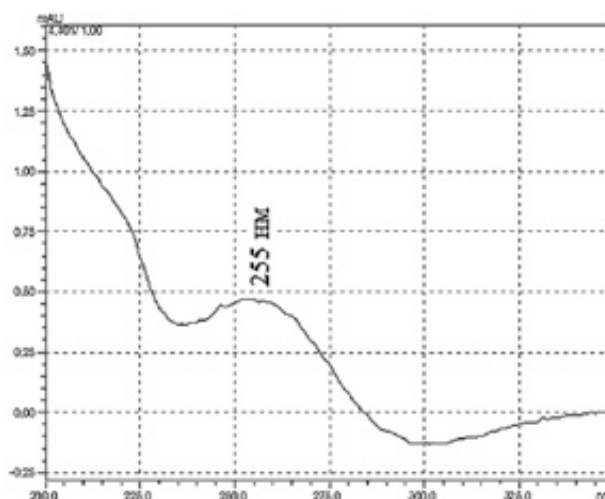
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для идентификации примесей кетопрофена с $Rt \approx 26,4-26,9$ мин (см. хроматограмму 3 на рисунке 3) была получена хроматограмма по методике, позволяющей снять масс-спектр на хроматографе с масс-детектором (рисунок 6).

На хроматограмме (рисунок 6) наблюдается двойной пик с $Rt=36,879$ мин и $Rt=38,329$ мин. Масс-спектры, полученные для первой и второй части пика, являются идентичными (рисунок 7). Основной ион в масс-спектрах хроматографических пиков с $Rt=36,879$ мин и с $Rt=38,329$ мин имеет значение m/z 391,20 что соответствует молекулярному иону $[M + H]^+$ примеси кетопрофена $C_{26}H_{32}O_3$ (М. м. 392 а.е.м.), ион с соотношением m/z 410,20 является ионным аддуктом данной примеси и натрия $[M + Na]^+$, а ион с соотноше-



А



Б

Рисунок 4. Репрезентативные УФ-спектры пиков: А – кетопрофена (рисунок 3, хроматограмма 3, $Rt \approx 4,3$ мин); Б – примеси кетопрофена (рисунок 3, хроматограмма 3, $Rt \approx 26,4$ мин)

Figure 4. Representative UV spectra of peaks: А – ketoprofen (Figure 3, chromatogram 3, $Rt \approx 4,3$ min); Б – impurity of ketoprofen (Figure 3, chromatogram 3, $Rt \approx 26,4$ min)

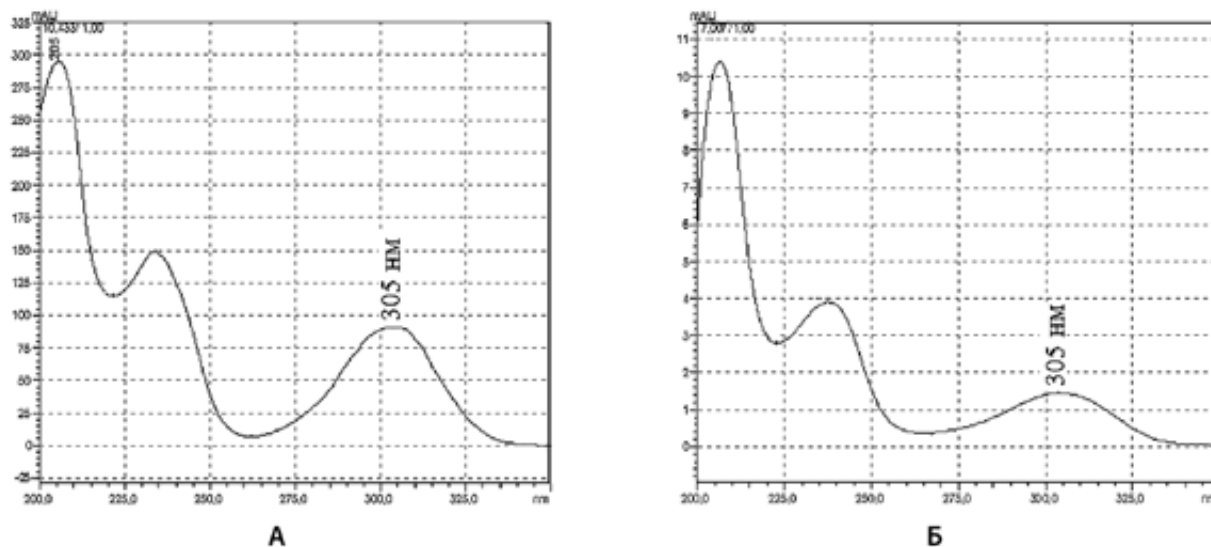


Рисунок 5. Репрезентативные УФ-спектры пиков: А – метилсалицилата (рисунок 3, хроматограмма 4, $R_t \approx 10,5$ мин); Б – примеси метилсалицилата (рисунок 3, хроматограмма 4, $R_t \approx 6,8$ мин)

Figure 5. Representative UV spectra of peaks: А – methyl salicylate (Figure 3, chromatogram 4, $R_t \approx 10,5$ min); Б – methyl salicylate impurities (Figure 3, chromatogram 4, $R_t \approx 6,8$ min)

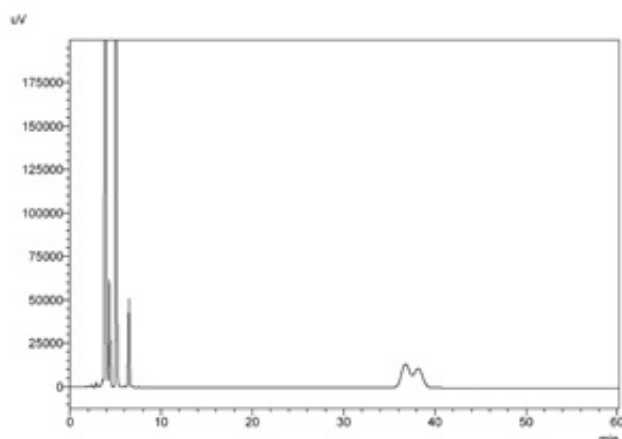


Рисунок 6. Хроматограмма раствора крем-геля, изготовленного по способу 1, после 5 лет хранения, где пики с $R_t=36,879$ мин и $R_t=38,329$ мин соответствуют сложным эфирам кетопрофена и L-ментола

Figure 6. Chromatogram of solution of the cream-gel prepared according to method 1 after 5-year storage, where peaks with $R_t=36,879$ min and $R_t=38,329$ min correspond to esters of ketoprofen and levomenthol

нием m/z 431,00 является ионным аддуктом данной примеси и калия $[M + K]^+$. Таким образом, хроматографические пики с $R_t=36,879$ мин и с $R_t=38,329$ мин принадлежат примеси кетопрофена с формулой $C_{26}H_{32}O_3$ (М. м. 392 а.е.м.), то есть, L-ментоловому эфиру кетопрофена. Раздвоение пика, видимо, обусловлено образованием эфиров L-ментола с разными энантиомерами кетопрофена.

Крем-гели, изготовленные двумя способами, имеют идентичную микроструктуру и являются эмульсиями м/в (рисунок 8), в которых однородно распределе-

ны частицы дисперсной фазы и отсутствуют кристаллы кетопрофена.

Крем-гели имеют пластический тип течения (рисунок 9); их структурная вязкость проходит через максимум при $pH=5,5$ (рисунок 10). Поэтому реологические параметры геля с $pH=5,5$, изготовленного по способу 1, несколько больше, чем у геля с $pH=6,8$, изготовленного по способу 2 (рисунок 9).

При pH геля 5,5 трометамол полностью или преимущественно расходуется на нейтрализацию карбомера. Если в гель с $pH=5,5$ ввести раствор, содержащий 2,5 г кетопрофена, 5,0 г ДГМЭ и 10,0 г ПГ, то кетопрофен кристаллизуется (рисунок 11А). В геле с $pH=6,0$ кетопрофен в виде соли растворён в гидрофильной среде (рисунок 11Б). Т. е., при $pH \leq 5,5$ создаются условия для локализации кетопрофена в гидрофобной фазе, а при $pH \geq 6,0$ – в гидрофильной среде.

В таблице 3 представлены результаты исследования распределения кетопрофена между гидрофильной средой и гидрофобной фазой эмульсий.

Таблица 3. Распределение кетопрофена в эмульсиях

Table 3. Distribution of ketoprofen in emulsions

Номер делительной воронки	pH эмульсии	Количество кетопрофена в гидрофильной среде, в процентах от 2,5 г	Количество кетопрофена в гидрофобной фазе, в процентах от 2,5 г
1	7,25	92,30	7,70
2	3,81	0,85	99,15
3	7,30	90,53	9,47

Как следует из таблицы 3, при отсутствии трометамола, необходимого для нейтрализации кетопрофена, в гидрофильной среде растворилось всего 0,021 г

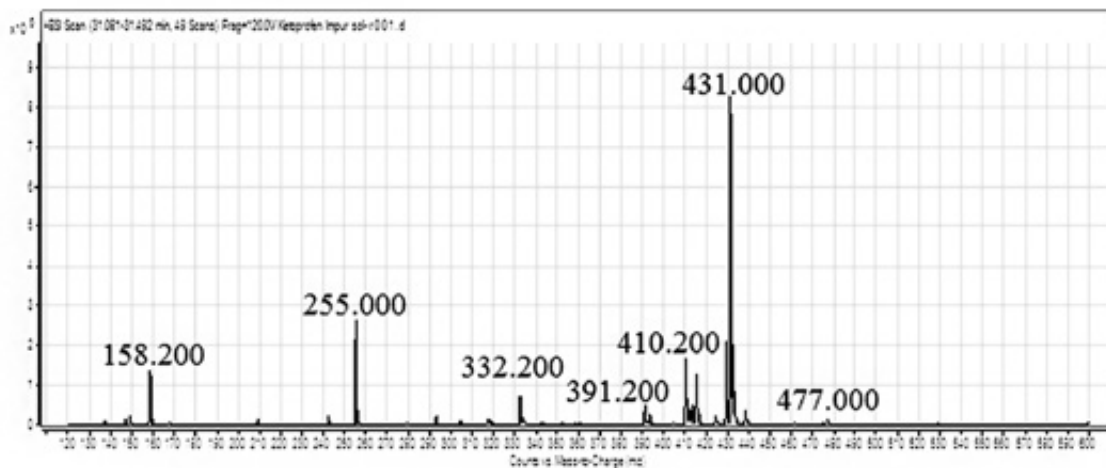
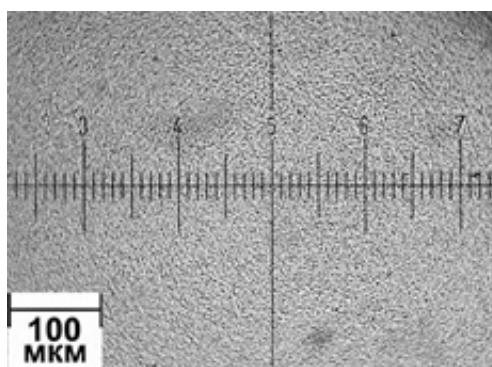
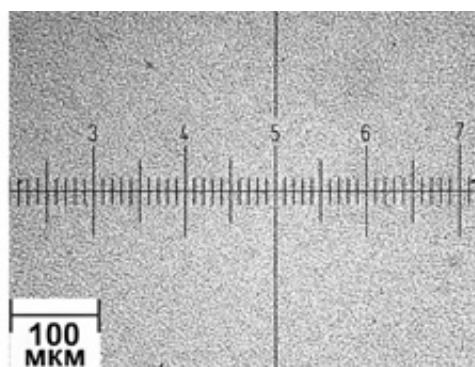


Рисунок 7. Масс-спектр пика с $R_t=36,879$ мин (см. рисунок 6) вещества с $M. m. =392$ а.е.м.

Figure 7. The mass spectrum of the peak with $R_t=36,879$ min (see Figure 6) of the substance with $M_r =392$ amu



Способ 1



Способ 2

Рисунок 8. Микрофотографии крем-гелей, изготовленных двумя разными способами; увеличение $\times 150$

Figure 8. Microphotographs of cream-gels produced in two different ways; magnification $\times 150$

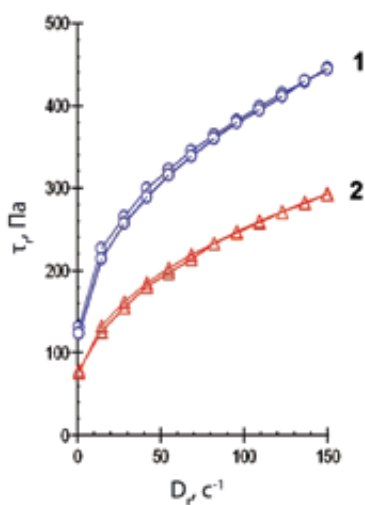


Рисунок 9. Реограммы крем-гелей, изготовленных по способу 1 ($pH=5,5$) и способу 2 ($pH=6,8$), при температуре $25^\circ C$

Figure 9. Rheograms of cream-gels produced according to method 1 ($pH=5.5$) and method 2 ($pH=6,8$), at $25^\circ C$

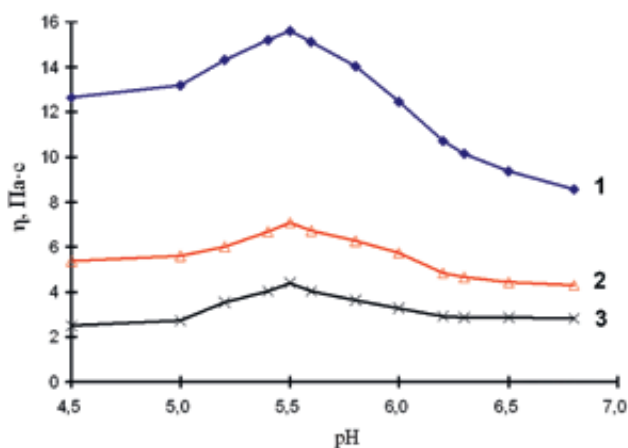


Рисунок 10. Зависимость структурной вязкости (η) крем-гелей от pH при температуре $25^\circ C$ и градиентах скорости сдвига $14,6\text{ c}^{-1}$ (1), $41,6\text{ c}^{-1}$ (2), $82,3\text{ c}^{-1}$ (3)

Figure 10. Relationship between apparent viscosity (η) of cream-gels and their pH at $25^\circ C$ and at shear rates $14,6\text{ s}^{-1}$ (1), $41,6\text{ s}^{-1}$ (2), $82,3\text{ s}^{-1}$ (3)

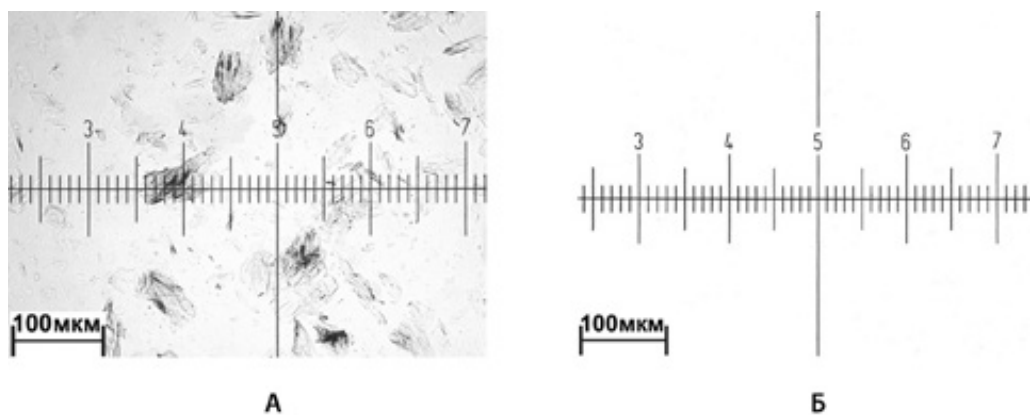


Рисунок 11. Микрофотографии гелей, содержащих кетопрофен, при pH=5,5 (А) и pH=6,0 (Б); увеличение $\times 150$
Figure 11. Microphotographs of containing ketoprofen gels with pH=5,5 (A) and pH=6,0 (B); magnification $\times 150$

кетопрофена (0,85% от 2,5 г); 2,479 г кетопрофена (99,15% от 2,5 г) остались растворены в гидрофобной дисперсной фазе. При введении кетопрофена в виде соли с триметамолом в гидрофильную среду он остаётся преимущественно растворённым в гидрофильной среде, однако 0,193 г кетопрофена из 2,5 г перераспределяются в гидрофобную дисперсную фазу. При введении кетопрофена в гидрофобную фазу и наличии в гидрофильной среде триметамола в эквимолярном кетопрофену количестве с избытком 5% кетопрофен в количестве 2,263 г перераспределяется в гидрофильную среду, но 0,237 г кетопрофена остаются растворёнными в гидрофобной фазе.

Распределение кетопрофена в эмульсиях и их pH влияют на образование сложных эфиров кетопрофена в крем-гелях в процессе хранения (рисунки 3 и 12, таблица 4).

Профиль примесей эфиров кетопрофена и их содержание зависят от способа изготовления и pH

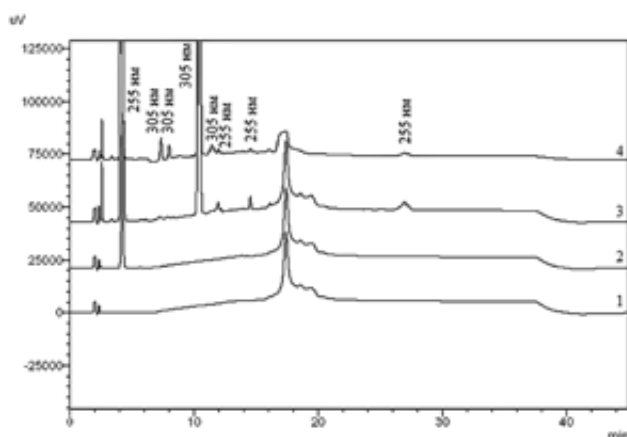


Рисунок 12. Хроматограммы растворителя (1); раствора сравнения кетопрофена (2); растворов крем-гелей, изготовленных по способу 1 (3) и способу 2 (4) после 12 месяцев хранения при температуре $(25\pm 2)^\circ\text{C}$
Figure 12. Chromatograms of the solvent (1); ketoprofen reference solution (2); solutions of cream-gels produced according to method 1 (3) and method 2 (4) after 12-month storage at $(25\pm 2)^\circ\text{C}$

крем-геля, а также от времени хранения (таблица 4). При введении кетопрофена в гидрофобную фазу и pH=5,5 основная часть кетопрофена растворена в смеси метилсалицилата и L-ментола, но некоторая часть оказывается растворённой и в гидрофильной среде (таблица 3). Известно, что снижение pH способствует образованию сложных эфиров, в частности, кетопрофена [5]. Поэтому уже через 3 месяца хранения в крем-геле, который изготовлен по способу 1, профиль примесей включает L-ментоловые эфиры кетопрофена, ПГ эфир кетопрофена и ДГМЭ эфир кетопрофена.

Таблица 4. Содержание примесей кетопрофена и метилсалицилата в крем-гелях с разными pH после 3 и 12 месяцев хранения при температуре $(25\pm 2)^\circ\text{C}$

Table 4. The content of impurities of ketoprofen and methyl salicylate in cream-gels with different pH after 3- and 12-month storage at $(25\pm 2)^\circ\text{C}$

pH (способ 1 или 2)	Содержание примесей (продуктов разложения/ модификации), %					
	кетопрофена			метилсалицилата		
	Rt=11,6 мин ПГ эфир кетопрофена	Rt=14,3 мин ДГМЭ эфир кетопрофена	Rt=26,4/ 26,9 мин L-ментоловые эфиры кетопрофена	Rt=6,8 мин	Rt=7,4 мин	Rt=11,1 мин
Хранение в течение 3 месяцев						
pH 5,5 (способ 1)	0,17	0,17	0,29	НО	НО	НО
pH 6,8 (способ 2)	НО*	НО	НО	0,16	0,09	0,15
Хранение в течение 12 месяцев						
pH 5,5 (способ 1)	0,58	0,60	0,93	НО	НО	НО
pH 6,8 (способ 2)	0,12	0,16	0,35	1,00	0,60	0,41

Примечание. *НО – не обнаружено. По соотношению сигнал/шум предел обнаружения составляет 0,0015%, а предел количественного определения – 0,0044%.

Note. *ND – not detected. By the signal-to-noise ratio, the detection limit is 0.0015%, and the limit of quantitation is 0.0044%.

При введении кетопрофена в гидрофильную среду основная часть кетопрофена в виде соли растворена в смешанном растворителе вода – ПГ – ДГМЭ (таблица 3). При более высоком pH=6,8 скорость образования сложных эфиров кетопрофена с указанными гидрофильными растворителями оказывается меньше, чем при pH=5,5, и через 3 месяца хранения в крем-геле, который изготовлен по способу 2, эфиры кетопрофена не были обнаружены.

Однако в этом крем-геле с pH=6,8 через 3 месяца хранения образовались 3 другие примеси, которые, судя по их УФ спектрам (рисунок 5), являются продуктами разложения метилсалицилата. Эти примеси не были обнаружены в крем-геле с pH=5,5, который был изготовлен по способу 1 (таблица 4).

После 12 месяцев хранения крем-геля с pH=5,5, изготовленного по способу 1, продукты разложения метилсалицилата не были обнаружены, а профиль примесей кетопрофена не изменился (таблица 4). Однако суммарное содержание эфиров кетопрофена возросло в 3,35 раза.

После 12 месяцев хранения крем-геля с pH=6,8, изготовленного по способу 2, профиль примесей кетопрофена изменился; были обнаружены все три эфира кетопрофена: ПГ эфир кетопрофена, ДГМЭ эфир кетопрофена и L-ментоловые эфиры кетопрофена (таблица 4). Содержание этих эфиров оказалось меньше в 4,8 раза, 3,8 раза и 2,7 раза соответственно по сравнению с крем-гелем, изготовленным по способу 1. Уменьшение содержания ПГ эфира кетопрофена и ДГМЭ эфира кетопрофена связано с повышением pH с 5,5 до 6,8, а снижение содержания L-ментоловых эфиров кетопрофена связано с уменьшением концентрации кетопрофена в смеси метилсалицилата и L-ментола (гидрофобной фазе).

В то же время в крем-геле с pH=6,8 после 12 месяцев хранения, существенно возросло содержание продуктов разложения метилсалицилата, которые не были обнаружены в крем-геле с pH=5,5 (таблица 4). Содержание примесей метилсалицилата, пики которых на хроматограммах имеют времена удерживания (Rt) 6,8 мин, 7,4 мин и 11,1 мин, за 12 месяцев хранения увеличилось до 1,00%, 0,60% и 0,41% (таблица 4).

Таким образом, изготовление крем-геля по способу 1, предполагающему растворение кетопрофена в смеси метилсалицилата и L-ментола, и нормирование его pH на уровне 5,5 позволяет предотвратить образование продуктов разложения метилсалицилата (таблица 4, рисунок 6). После 5 лет хранения крем-геля при температуре 25 °C профиль примесей не изменился (рисунок 6); примеси метилсалицилата отсутствуют, на хроматограмме имеются пики кетопрофена (Rt≈3,902 мин), кетопрофена ПГ эфира

(Rt≈5,172 мин), метилсалицилата (Rt≈4,349 мин), кетопрофена ДГМЭ эфира (Rt≈6,502 мин) и двойной пик кетопрофена L-ментоловых эфиров (Rt≈36,879 мин и Rt≈38,329 мин).

Максимальная суточная доза крем-геля составляет 16 г (по 8 г крем-геля 2 раза в сутки), которые содержат 400 мг кетопрофена. При этом в соответствии с нормативным документом СРМР/ICH/2738/99 (ICH Topic Q3B (R2)) «Note for Guidance on Impurities in New Drug Products» порог информирования для сопутствующей примеси составляет 0,1%, а порог идентификации и порог квалификации – 0,8 мг примеси, принимаемой в течение суток [9].

По результатам экстраполяции содержание L-ментоловых эфиров кетопрофена через 24 месяца хранения не будет превышать 1,86%, что соответствует максимальной суточной дозе 7,44 мг примесей (в 16 г крем-геля). Эти величины превышают 0,1% и 0,8 мг соответственно, что требует информирования о L-ментоловых эфирах кетопрофена, а также их идентификации и квалификации – определения биологической безопасности при содержании 1,86% или выше.

При отсутствии СО L-ментоловые эфиры кетопрофена могут быть идентифицированы по времени удерживания пиков на хроматограммах и спектру поглощения пиков при использовании хроматографа с диодно-матричным детектором. Квалификация может быть проведена на этапе доклинических исследований в соответствии с требованиями [9].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследовано образование сложных эфиров кетопрофена с ПГ, ДГМЭ и L-ментолом в крем-геле при pH 5,5 и 6,8 и разной локализации кетопрофена в дисперсной фазе и дисперсионной среде эмульсии м/в. Указанные примеси идентифицированы по временам удерживания их пиков на хроматограммах по сравнению с веществами сравнения, УФ спектрам и масс-спектрам. Показано, что скорость образования и содержание сложных эфиров кетопрофена с ПГ, ДГМЭ и L-ментолом можно снизить при pH=6,8 и введении кетопрофена в виде соли триметамола в водную среду крем-геля. Однако при этом образуются три примеси, которые по УФ спектрам идентифицированы как продукты разложения метилсалицилата. При хранении такого крем-геля содержание продуктов разложения метилсалицилата возрастает. Поэтому следует растворять кетопрофен в смеси метилсалицилата с L-ментолом и нормировать pH на уровне 5,5. В качестве усилителей проникновения рационально использовать гидрофильные растворители без гидроксильных групп, что ограничит профиль примесей L-ментоловыми эфирами энантиомеров кетопрофена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Регистр лекарственных средств России. Available at: <http://grls.rosminzdrav.ru> (accessed 05.03.2019).
2. Комpendиум 2016 – лекарственные препараты / Под ред. В. Н. Коваленко. К.: МОРИОН. 2016; 2416.
3. Шварц Г. Я., Сюраев Р. Д. Методические указания по изучению новых нестероидных противовоспалительных препаратов // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общей ред. Р. У. Хабриева. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ОАО «Изд-во «Медицина». 2005; 695–709.
4. European Pharmacopoeia. 9th Edition. European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). Council of Europe, 67075 Strasbourg Cedex, France. 2016; 4016.
5. Зинченко И. А., Ляпунов Н. А., Безуглая Е. П. Исследование образования примесей кетопрофена в модельных растворах. *Фармаком.* 2017; 4: 16–22.
6. Ляпунов Н. А., Зинченко И. А., Безуглая Е. П. Идентификация и количественное определение сложных эфиров кетопрофена. *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Медицина. Фармация.* 2018; 41(3): 473–483.
7. Зинченко И. А., Ляпунов Н. А. Аналитические методики определения декскетопрофена и сопутствующих примесей в геле: валидация и применение на этапе разработки препарата. *Фармаком.* 2015; 3/4: 12–20.
8. Руководство для предприятий фармацевтической промышленности. Методические рекомендации. Ч. I. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / Под ред. Н. В. Юргеля, А. Л. Младенцева, А. В. Бурдейна и др. М.: Изд-во «Спорт и культура – 2000». 2007; 5–92.
9. CPMP/ICH/2738/99 (ICH Topic Q3B (R2)) Note for Guidance on Impurities in New Drug Products, June 2006.

REFERENCES

1. Register of medicines of Russia. Available at: <http://grls.rosminzdrav.ru> (accessed 05.08.2018) (In Russ.).
2. Compendium 2016 – drugs / Ed. V. N. Kovalenko. Kiev: Publishing house «MORION». 2016; 2416 (In Russ.).
3. Shvarts G. Ya., Syubaev R. D. Guidelines for the study of new nonsteroidal anti-inflammatory drugs // Guidelines for experimental (preclinical) study of new pharmacological substances / Ed. R. U. Khabriev. – 2nd ed., amended. Moscow: Publishing house «Medicine». 2005; 695–709 (In Russ.).
4. European Pharmacopoeia. 9th Edition. European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). Council of Europe, 67075 Strasbourg Cedex, France. 2016; 4016.
5. Zinchenko I. A., Lyapunov N. A., Bezuglaya E. P. Study of the formation of ketoprofen impurities in model solutions. *Farmakom.* 2017; 4: 16–22 (In Russ.).
6. Lyapunov N. A., Zinchenko I. A., Bezuglaya E. P. Identification and assay of ketoprofen esters. *Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Meditsina. Farmatsiya – Belgorod State University Scientific bulletin. Medicine. Pharmacy.* 2018; 41(3): 473–483 (In Russ.).
7. Zinchenko I. A., Lyapunov N. A. Analytical procedures for the determination of dexketoprofen and related impurities in the gel: validation and use during drug development. *Farmakom.* 2015; 3/4: 12–20 (In Russ.).
8. Guide for enterprises of the pharmaceutical industry. Guidelines. Part I. Guidelines on the validation of analytical procedures for analysis of medicinal products / Ed. N. V. Yurgel, A. L. Mladentsev, A. V. Burdein et al. Moscow: Publishing house «Sport and Culture – 2000». 2007; 5–92 (In Russ.).
9. CPMP/ICH/2738/99 (ICH Topic Q3B (R2)) Note for Guidance on Impurities in New Drug Products, June 2006.