

РОЗРОБКА МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛИШКОВИХ КІЛЬКОСТЕЙ КЕТОПРОФЕНУ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ТВАРИН

*О. І. Федякова, канд. біол. наук,
Н. В. Біронт, канд. біол. наук,
М. Р. Курило, молодший науковий співробітник*

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів
та кормових добавок
вул. Донецька, 11, м. Львів, 79019, Україна

У статті описано основні етапи розробки та застосування методики кількісного визначення кетопрофену у сироватці крові тварин методом вискоефективної рідинної хроматографії. Розроблена методика дозволяє хроматографічно визначати концентрацію кетопрофену за умов застосування ультрафіолетового детектора, довжини хвилі 260 нм, використання мобільної фази натрій-фосфатного буферу та ацетонітрилу у співвідношенні 55:45, температури колонки 30 °С. Розглянуто основні етапи підготовки зразків для дослідження, а саме екстрагування етилацетатом, очищення шляхом твердофазної екстракції, пере розчинення та, власне, хроматографії. За потоку 2 мл/хв. час утримання кетопрофену становить 3,6 хв, а час аналізу – 10 хв. Методика лінійна в діапазоні концентрацій 0,1-8 мкг/кг.

Ключові слова: КЕТОПРОФЕН, РОЗРОБКА МЕТОДИКИ, ВЕРХ-УФ, СИРОВАТКА КРОВІ.

Кетопрофен (англ. Ketoprofen, лат. Ketoprofenum) — 3-бензоіл-альфа-метилбензилоцтова кислота, синтетичний препарат, що є похідним пропіонової кислоти [2, 3], та відноситься до групи нестероїдних протизапальних препаратів [4, 5]. Білий або майже білий кристалічний порошок. Емпірична формула $C_{16}H_{14}O_3$, з молекулярною масою 254,3 і температурою плавлення 94–97 °С. Легко розчинний в спирті, ацетоні, дихлорметані, практично нерозчинний у воді.

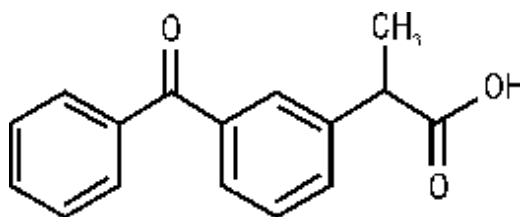


Рис. 1. Структурна формула кетопрофену

В готових лікарських формах можливе застосування у вигляді лізинової солі кетопрофену (D,L-лізин,2-(3-бензоілфеніл)пропіонат). Лізинова сіль володіє вираженою протизапальною, анальгетичною та жарознижуючою дією. Кетопрофен застосовується як перорально, так і парентерально (переважно внутрішньом'язово, рідше внутрішньовенно) [4, 6], так і місцево та ректально [7, 8]. За своїм хімічним складом є рацематом, у якому значно вищу фармакологічну активність має S(+)-ізомер [2], який виступає як самостійний препарат (декскетопрофен). Кетопрофен уперше синтезований у лабораторії французької фармацевтичної компанії «Rhône-Poulenc» у 1967 році та використовується у клінічній практиці з 1971 року [5].

Механізм дії препарату (як і інших представників групи нестероїдних протизапальних препаратів) полягає у інгібуванні ферменту циклооксигенази, яка забезпечує перетворення арахідонової кислоти у простагландини [4, 6]. Кетопрофен переважно діє на циклооксигеназу 1 типу (ЦОГ-1), і лише в незначному ступені впливає на циклооксигеназу 2 типу (ЦОГ-2) [7]. Кетопрофен має здатність інгібувати й ліпооксигеназний шлях метаболізму арахідонової кислоти, що призводить до зменшення вироблення медіаторів запалення — лейкотрієнів [2, 6]. Кетопрофен інгібує активність брадикініну та сприяє стабілізації мембран лізосом [4]. Також він має здатність гальмувати агрегацію тромбоцитів [4]. Добре проникає у синовіальну рідину та синовіальну оболонку суглобів [3], сприяє зменшенню припухлості суглобів, зменшує артралгії, а у високих концентраціях сприяє стимуляції синтезу протеоглікану у хрящовій тканині [3, 4]. Кетопрофен сприяє зменшенню післяопераційної остеопенії при переломах кісток, не впливаючи на процес відновлення кісткової тканини. [6] Окрім периферичної дії, впливає і на центральну нервову систему, добре проходить через гематоенцефалічний бар'єр [5], пригнічує вивільнення ЦОГ-2 у задніх рогах спинного мозку [3], а також діє на таламічні центри больової чутливості і на центр терморегуляції [4], що забезпечує і центральні механізми дії препарату [3]. Кетопрофен володіє синергічною дією при спільному застосуванні з наркотичними анальгетиками при застосуванні у випадках гострих травматичних пошкоджень та злоякісних пухлин.

Кетопрофен швидко та повністю всмоктується при пероральному застосуванні. Його біодоступність більше 90 %. Максимальна концентрація препарату в крові досягається протягом 1–2 годин після введення, залежно від лікарської форми. При внутрішньом'язовому введенні максимальна концентрація препарату досягається протягом 15–45 хвилин, При внутрішньовенному введенні – через 5 хв. При місцевому застосуванні у вигляді гелю/крему дія починається через 30 хв і до 12 годин. Зв'язування з білками плазми становить 99 %. Завдяки вираженій ліофільності швидко долає гематоенцефалічний бар'єр.

Стаціонарна концентрація C_{ss} в сироватці і спинномозковій рідині зберігається від 2 до 18 год.

Кетопрофен добре проникає в синовіальну рідину, де його концентрація через 4 год після прийому перевищує концентрацію в плазмі. Кетопрофен проникає через плацентарний бар'єр та виділяється в грудне молоко. Метаболізується препарат ферментами печінки з утворенням неактивних метаболітів. Виводиться кетопрофен з організму переважно із сечею у вигляді метаболітів, до 8 % препарату виводиться із калом, не акумулюється. Період напіввиведення кетопрофену становить 1,1–4 години, цей час може збільшуватися у осіб похилого віку та у хворих із вираженою нирковою недостатністю [4].

Кетопрофен застосовується у ветеринарії при запальних процесах опорно-рухового апарату, дихальної системи та молочних залоз у великої рогатої худоби та свиней, а також при запальних процесах опорно-рухового апарату та травмах у спортивних коней.

Європейська фармакопея рекомендує кислотно-основне титрування, яке метод аналізу субстанцій кетопрофену, спектрофотометричний метод аналізу для визначення його в таблетованій формі та рідинну хроматографію для аналізу кетопрофену в гелі. Всі ці методи не описують процедуру визначення кетопрофену в біологічних зразках. Тому, основною метою нашого дослідження було розробити специфічну методику кількісного визначення кетопрофену у зразках сироватки крові.

Матеріали і методи. У роботі використовували метод вискоєфективної рідинної хроматографії з ультрафіолетовим детектуванням (ВЕРХ/УФ) та застосовували хроматографічну систему для вискоєфективної рідинної хроматографії виробництва фірми Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 (Німеччина) в складі насосів, автоматичного дозатора, блоку колонок та ультрафіолетового детектора, спорядженого колонкою Acclaim (5 μ m, 250 mm x 4,6mm) (виробництва фірми Thermo Scientific).

Реактиви: метанол, вода високоочищена, натрій дигідрофосфат дигідрат, натрій хлорид, ацетонітрил для хроматографії, сертифікований стандартний зразок кетопрофену.

Результати й обговорення. Першим етапом роботи був підбір умов хроматографування для стандартного зразка кетопрофену. З цією метою був проведений аналіз стандартних розчинів кетопрофену за різних умов, підбір складу та рН елюентів, температури, проведений спектральний аналіз та визначення оптимальної довжини хвилі. Найбільш ефективними для виявлення кетопрофену визначили такі умови:

Температура колонки	30 °C
Рухома фаза Елюенти А/ Б	45 % / 55 %
Довжина хвилі детектування	260 нм
Час розділення піків	10 хв
Час утримання піку кетопрофену	3,6 хв

За вище перелічених умов хроматографічний пік кетопрофену концентрацією 0,5 мкг/мл відповідає нормам директиви ЄС № 657 від 2002 р. півширина піку становить 0,066 хв, коефіцієнт асиметрії – 0,99, а кількість теоретичних тарілок 16860.

Наводимо хроматограму зразка стандартного розчину кетопрофену, концентрацією 0,5 мкг/мл (рис. 1).

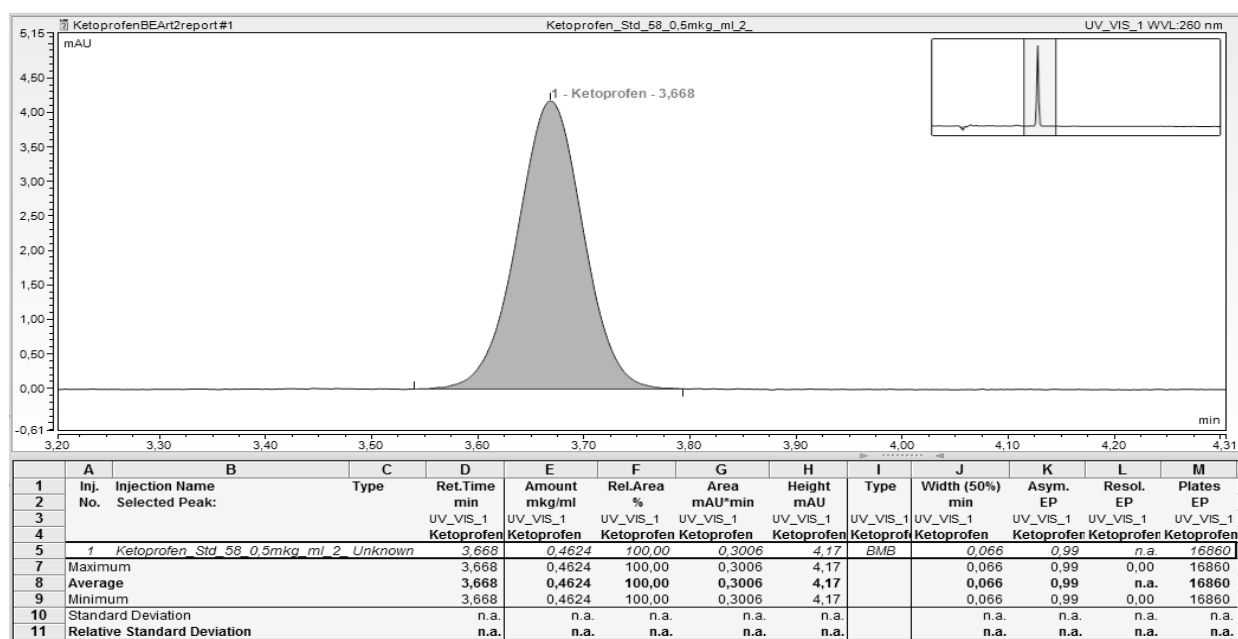


Рис. 1. Хроматограма зразка стандартного розчину кетопрофену, концентрацією 0,5 мкг/мл

Для підтвердження відповідності отриманих результатів у певному діапазоні ми співставили площі піків досліджуваної речовини з концентрацією. Отримані дані (табл.1.) вказують на лінійність методики визначення кетопрофену у діапазоні концентрацій 0,5-8 мкг/мл. Коефіцієнт кореляції в даному діапазоні становить 1,0.

Таблиця 1

Залежність площі піків кетопрофену від концентрації аналізу в розчині

№ п.п.	Концентрація кетопрофену, мкг/мл	Висота піку, mAU	Площа піку, mAU*min
1	0,5	3,841	0,284
2	1	7,541	0,556
3	2	15,453	1,134
4	4	31,267	2,307
5	8	62,062	4,606

Наступним етапом розробки методики була підготовка зразків сироватки крові для визначення аналіту. Одержання сироватки крові проводили за стандартною процедурою [1].

На основі літературних даних і проведених експериментів встановили таку послідовність підготовки зразків:

- відбирали 1,0 мл сироватки крові, додавали 2,0 мл натрій фосфатного буферу рН 3,0;
- екстрагували етилацетатом впродовж 15 хв;
- верхню фракцію після центрифугування висушували;
- перерозчинені зразки переносили у віалу автоматичного дозатора хроматографічної системи для проведення визначання.

Для програмного обрахунку даних побудували калібрувальну криву на матриці, з цією метою у шість поліпропіленових пробірок відбирали по 1,0 мл сироватки крові, яка не містить кетопрофену. Навантаження проводили розчином стандартного зразку кетопрофену у концентрації: 10 та 1 мкг/мл, згідно з таблицею 2.

Таблиця 2

Схема приготування зразків сироватки крові навантажених кетопрофеном для побудови калібрувальної кривої

№ п/п	Об'єм сироватки, мл	Об'єм РСЗ кетопрофену, мкл	Конц. РСЗ кетопрофену, мкг/мл	Об'єм доданого буферу, мкл	Конц. кетопрофену, мкг/мл
1	1	0	1	400	0
2	1	100	1	300	0,1
3	1	50	10	350	0,5
4	1	100	10	300	1
5	1	200	10	200	2
6	1	400	10	0	4

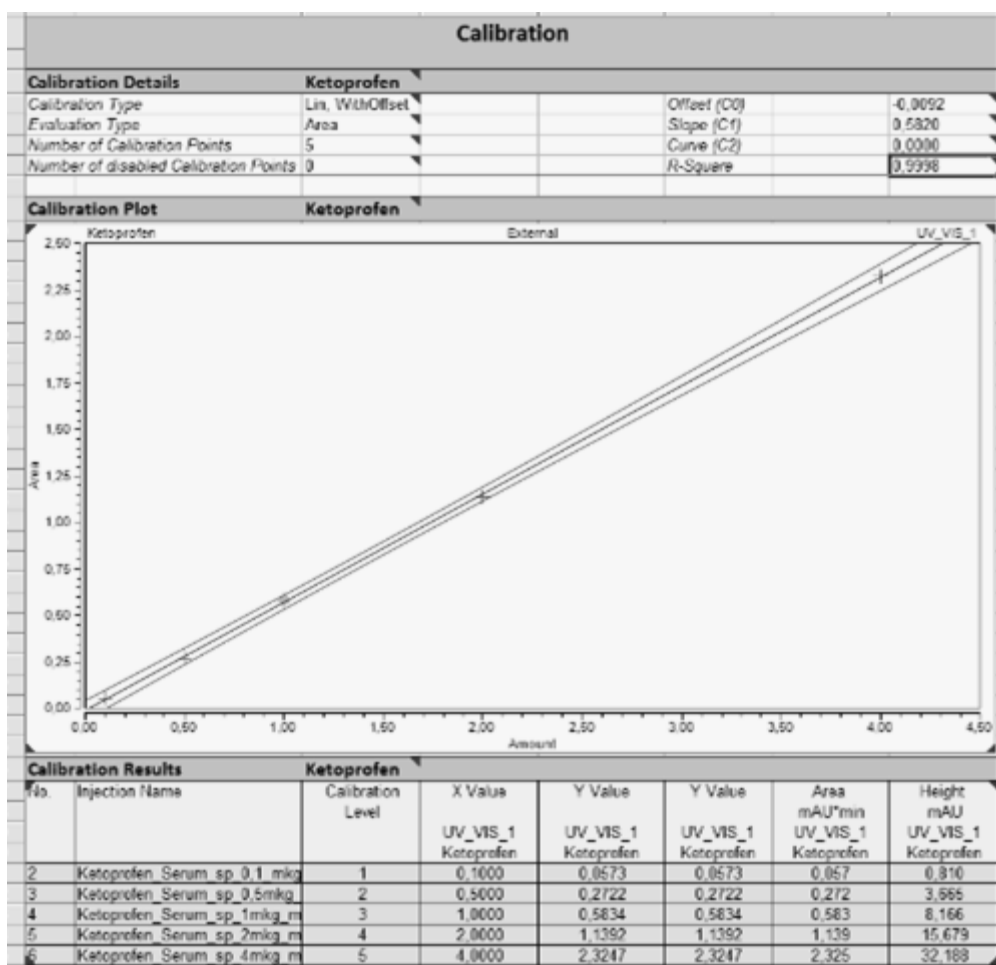


Рис. 2. Графічне зображення калібрувальної кривої кетопрофену у сироватці крові.

Одержані дані свідчать про придатність методики для визначення кетопрофену у сироватці крові тварин. Про лінійність методики свідчить коефіцієнт кореляції, що становить 0,9998. Проте, навіть при такому високому коефіцієнті кореляції можуть спостерігатися помітні відхилення від лінійності в області високих і низьких концентрацій, тому лінійність зобразили графічно (рис. 2).

Отже, результати, отримані на цьому етапі досліджень, свідчать, що розроблену методику можна застосовувати для визначення залишкових кількостей кетопрофену у сироватці крові.

В И С Н О В К И

Розроблено чутливу селективну методику визначення залишкових кількостей кетопрофену у сироватці крові. Встановлено, що методика лінійна в діапазоні концентрацій 0,1-8 мкг/мл.

Перспективи досліджень. У подальшому необхідно провести валідацію розробленої методики визначення кетопрофену.

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR DETERMINATION THE RESIDUES OF KETOPROFEN IN SERUM OF ANIMAL BLOOD

O. I. Fediakova, N. V. Biron, M. R. Kurylo

State Scientific-Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives
11, Donetska street, Lviv, 79019, Ukraine.

S U M M A R Y

Ketoprofen (2-(3-benzoylphenyl)-propionic acid) is a potent non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) used for the treatment of a wide range of painful and inflammatory illness. Like the most NSAIDs, ketoprofen is advantageous because it lacks addictive potential and does not result in sedation or respiratory depression. Ketoprofen is a white or almost white crystalline powder having empirical formula $C_{16}H_{14}O_3$ with molecular weight of 254.3 and melting point 94° to $97^{\circ}C$. It has pKa of 5.94. It is practically insoluble in water, freely soluble in alcohol, acetone, and dichloromethane.

Several types of analytical procedures have been proposed for the analysis of ketoprofen in pharmaceutical formulations. The procedures include capillary zone electrophoresis, UV-spectrophotometry, high-performance liquid chromatography, flow injection technique with hemiluminiscence, flow injection with UV-detection, polarography, micellar electrokinetic chromatography, electrochemical methods.

European Pharmacopoeia recommended acid-base titration for analysis of ketoprofen in substance, UV-spectrophotometry for its determination in capsules as well as liquid chromatography for assay in gel. The aim of this paper is to develop a specific, precise and accurate chromatographic method that could be applied in quality and quantity control for the determination of ketoprofen.

The article describes the main stages of development and application of quantitative determination of ketoprofen in blood serum of animals by the method of high-performance liquid chromatography. The developed method allows to determine the concentration of ketoprofen by using a ultraviolet detector, a wavelength of 260 nm. The mobile phases contains sodium phosphate buffer and acetonitrile in the ratio 55:45, and a column temperature of $30^{\circ}C$.

The main stages of samples preparation for research was observed: extraction with ethyl acetate, purification by solid phase extraction, re-dissolution and, in fact, chromatography. At a flow of 2 ml/min. the retention time for ketoprofen is 3,6 minutes, and the analysis time is 10 minutes. The method is linear in the range of 0.1-8 $\mu g / kg$.

Keywords: KETOPROFEN, METHODOLOGY DEVELOPMENT, HPLC-UV, BLOOD SERUM.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ КЕТОПРОФЕНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЖИВОТНЫХ

О. И. Федякова, Н. В. Биронт, М. Р. Курьло

Государственный научно-исследовательский контрольный институт ветеринарных препаратов и кормовых добавок
ул. Донецкая, 11, г. Львов, 79019, Украина

А Н Н О Т А Ц И Я

В статье представлены основные этапы разработки и применения методики количественного определения кетопрофена в сыворотке крови животных методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Разработанная методика позволяет хроматографически определять концентрацию кетопрофена в условиях применения ультрафиолетового детектора, длины волны 260 нм, использование мобильной фазы в составе натрий-фосфатного буфера и ацетонитрила в соотношении 55:45, температуры колонки 30°C. Рассмотрены основные этапы подготовки образцов для исследования, а именно экстрагирования этилацетатом, очистки путем твердофазной экстракции, пере растворения и, собственно, хроматографии. При потоке 2 мл / мин. время содержания кетопрофена составляет 3,6хв, а время анализа - 10 мин. Методика линейная в диапазоне концентраций 0,1-8 мкг / кг.

Ключевые слова: КЕТОПРОФЕН, РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ, ВЭЖХ-УФ, СЫВОРОТКА КРОВИ.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. *Левченко В. І.* Ветеринарна клінічна біохімія / В. І. Левченко, В. В. Влізло, І. П. Кондрахін // За ред. В. І. Левченка, В. Л. Галяса. – Біла Церква. – 2002. – 400 с.
2. Topical ketoprofen patch in the treatment of tendinitis: a randomized, double blind, placebo controlled study / В. Mazières, S. Rouanet, Y. Guillon et al. // *The Journal of Rheumatology* – 2005. – 32 (8) – P. 1563–1570.
3. *Mazières B.* Topical ketoprofen patch / В. Mazières // *Drugs in R&D.* – 2005. – № 6 (6). – P. 337-344.
4. Ketoprofen Absorption by Muscle and Tendon after Topical or Oral Administration in Patients Undergoing Anterior Cruciate Ligament Reconstruction / Sekiya I.; Morito T.; Hara K. et al. // *AAPS PharmSciTech.* – 2010. – № 11(1). – P. 154–158.
5. Efficacy of ketoprofen vs. ibuprofen and diclofenac: a systematic review of the literature and meta-analysis / P. Sarzi-Puttini, F. Atzeni, L. Lanata, M. Bagnasco // *Clinical and experimental rheumatology.* – 2013. – № 31(5). – P. 731–738.
6. Single dose oral ketoprofen or dexketoprofen for acute postoperative pain in adults / H. Gaskell, Sh. Derry, Ph. Wiffen et al. // *The Cochrane Database of Systematic.* – 2017. – № 5. – P. 1469–1493.
7. Topical NSAIDs for chronic musculoskeletal pain in adults / S. Derry, P. Conaghan, J. A. Da Silva et al. // *The Cochrane Database of Systematic.* – 2016. – № 4. – P. 80–84.
8. *Nondumiso Mkontwana.* Oral analgesia for relieving postcaesarean pain / Nondumiso Mkontwana, Natalia Novikova // *Cochrane Systematic Review.* – 2015. – № 2. – P. 50–51.

Рецензент – Д. В. Янович, д. с.-г. н., ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок.