

М. В. Гаврилин<sup>1</sup>, Ю. В. Мудрецова<sup>2</sup>

## ИЗУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ МЕЛЬДОНИЯ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ МЕТОДАМИ МИЦЕЛЛЯРНОЙ ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

<sup>1</sup> Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону;

<sup>2</sup> Пятигорский филиал ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения России, Пятигорск, Ставропольский край

Изучена кинетика разложения мельдония в кислой среде с использованием методов мицеллярной электрокинетической хроматографии с косвенным детектированием и масс-спектрометрии с позитивным режимом ионизации. Установлено, что в кислой среде происходит поэтапное деметилирование мельдония с образованием 3-(2-метилгидразин)пропионовой кислоты и 3-гидразинпропионовой кислоты. Предложенная методика количественного определения мельдония методом мицеллярной электрокинетической хроматографии с косвенным детектированием позволяет проводить количественное определение в присутствии продуктов деструкции.

**Ключевые слова:** мельдоний; стабильность; мицеллярная электрокинетическая хроматография; масс-спектрометрия.

Мельдоний — 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропаноат — метаболическое средство, предназначенное для профилактики и терапии острых и хронических нарушений мозгового кровообращения. По химической структуре представляет собой четвертичное аммониевое основание и является цвиттер-ионом. Применяется в виде капсул и раствора для инъекций [1].

Для идентификации данного соединения согласно действующей нормативной документации в лекарственных препаратах используют реакцию с калия тетрагидропиримидином, а также по образованию окрашенных ионных ассоциатов с 3',3'-дибромтимолсульфоталеином и их последующей экстракцией хлороформом, кроме того, может быть использован метод тонкослойной хроматографии. Для количественного определения, как правило, используют различные титриметрические методы (ЛСР-010452/09-221209, ЛП 000578-020911).

Наряду с идентификацией и количественным определением мельдония еще одним важным критерием качества препарата является отсутствие в нем посторонних примесей. В ГФ РФ XII издания описана методика количественного определения посторонних примесей (триметиламмония бромид, 1,1,1-триметилгидразина бромид, 3-гидрокси-1,1-диметил-4,5-дигидро-1Н-пиразолий-1-бетаина гидрат, 3-(2,2,2-триметилгидразиний)метилпропионата бромид, 3-(2,2,2-триметилгидразиний)изопропилпропионата бромид и 3-(2,2,2-триметилгидразиний)этилпропионата бромид) в субстанции методом ВЭЖХ/МС/МС [2, 3]. Однако эти соединения являются полупродуктами синтеза мельдония, при этом возможные продукты разложения не идентифицированы. Также в литературе нет исчерпывающих сведений о стабильности мельдония в водных растворах и методах идентификации продуктов разложения. В нормативных документах описывается опре-

деление посторонних примесей в препаратах методом ТСХ. Однако описанные методы не достаточно информативны и достоверны.

Анализ препаратов мельдония осложняется отсутствием хромофорных групп в структуре данного вещества, что делает невозможным его детектирование в УФ области, а, следовательно, усложняет анализ данных препаратов общеизвестными методами (ВЭЖХ). Более целесообразным является использование метода мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ) [4], который позволяет анализировать различные соединения, в том числе и не поглощающие в УФ области, используя режим косвенного детектирования [5]. Этот метод позволяет произвести оценку процесса деструкции мельдония в водных растворах.

Однако использование вышеуказанного метода ограничено недостаточной чувствительностью, что делает его непригодным для определения примесей. Таким образом, для идентификации продуктов деструкции мельдония целесообразно использование метода масс-спектрометрии.

Целью данного исследования являлось изучение стабильности мельдония в водных растворах методом мицеллярной электрокинетической хроматографии и идентификация примесей, предположительно образующихся в процессе хранения.

### *Экспериментальная часть*

**Мицеллярная электрокинетическая хроматография (МЭКХ).** В работе использовали систему капиллярного электрофореза «Капель 103Р» производства фирмы «Люмэкс», Санкт-Петербург. Длина капилляра 65 см, эффективная длина 55 см, диаметр капилляра 50 мкм. Обработку данных вели с помощью программного обеспечения «Мультихром».

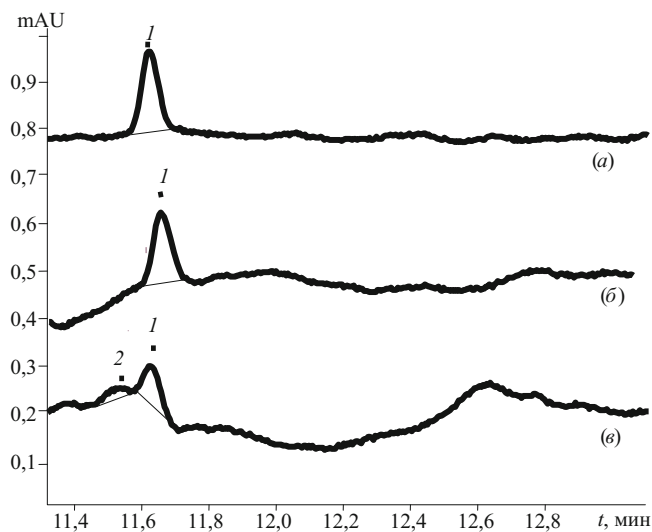


Рис. 1. Электрофореграммы растворов мелдония (1), при нагревании с кислотой хлористоводородной в концентрации 0,1 М (а), 0,5 М (б) и 1 М (в).

**Масс-спектрометрический анализ.** Анализ проводили при прямом вводе пробы на квадрупольном масс-анализаторе типа “ионная ловушка” (Amazon SL, производства фирмы Bruker, Германия), оснащенном источником ионов с электрораспылительной ионизацией при атмосферном давлении, автосамплером и программным обеспечением обработки данных Data analysis.

**Кислотное разложение.** Продукты деструкции мелдония получали путем воздействия хлористоводородной кислоты с последующей нейтрализацией натрием гидроксидом. При этом около 0,1 г мелдония, соответствующего требованиям ГФ XII (точная навеска), помещали в сухую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляли кислоту хлористоводородную 0,1; 0,5; и 1 М до получения 20 мл раствора с концентрацией мелдония 5 мг/мл. Растворы нагревали с обратным холодильником на водяной бане в течение 30 мин, после чего охлаждали и нейтрализовали, прибавляя 10 М раствор натрия гидроксида (0,2; 1 и 2 мл соответственно). Необходимость нейтрализации обусловлена невозможностью анализа сильно кислых растворов методом МЭКХ, а также тем, что образующиеся при нейтрализации аддукт-ионы возможных продуктов разложения с ионами натрия будут иметь большую интенсивность при масс-спектрометрическом анализе, что позволит с большей достоверностью провести их идентификацию.

#### Возможные примеси мелдония, образующиеся в процессе хранения (деструкции)

Структурная формула	Наименование	Молярная масса, Мг
$\text{H}_3\text{C}-\text{NH}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OH} \end{matrix}$	3-(2-метилгидразин) пропионовая кислота	118
$\text{H}_2\text{N}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OH} \end{matrix}$	3-гидразинпропионовая кислота	104

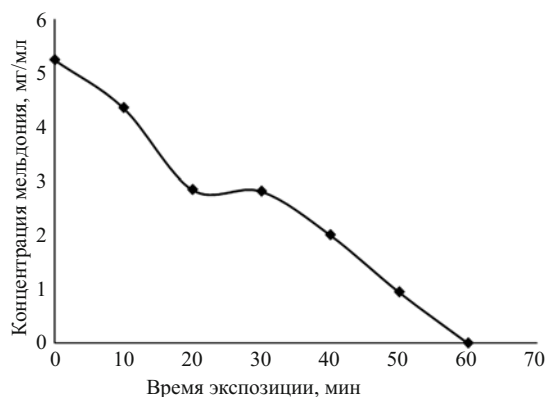


Рис. 2. Кинетическая кривая концентрации мелдония при воздействии на него кислотой хлористоводородной при нагревании.

Исследуемые растворы фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,02 мкм и центрифугировали 5 мин при 7000 об/мин.

В качестве ведущего электролита при анализе полученных растворов методом МЭКХ использовали боратный буфер (раствор натрия тетрабората декагидрата 50 мМ) с рН = 9,17 с добавлением натрия додецилсульфата 75 мМ и кислоты ацетилсалициловой 30 мМ. Анализ проводили при фиксированной длине волны 254 нм и напряжении 20 кВ. Ввод пробы осуществляли под давлением. Режим ввода пробы 150 мБар · с. Объем пробы около 2 нл.

При хроматомасс-спектрометрическом анализе ионизация осуществлялась электрораспылением при атмосферном давлении в режиме регистрации положительных ионов. Напряжение на капилляре и противоэлектроде составляло 4,0 кВ и – 500 В соответственно. Давление на распылителе составляло 1 атм. Скорость потока газа-осушителя (азот) — 5 л/мин. Температура в камере ионизации — 220 °С. Сканирование по полному ионному току проводили в диапазоне  $m/z$  100 – 500. Стабильность мелдония в водных растворах методом МЭКХ оценивали по изменению его концентрации.

#### Результаты и их обсуждение

Из полученных электрофореграмм следует, что при термостатировании растворов мелдония (5 мг/мл) в среде 0,1 и 0,5 М кислоты хлороводородной в течение 30 мин, площадь и характер пика мелдония оставались неизменными, а в 1 М растворе кислоты хлори-

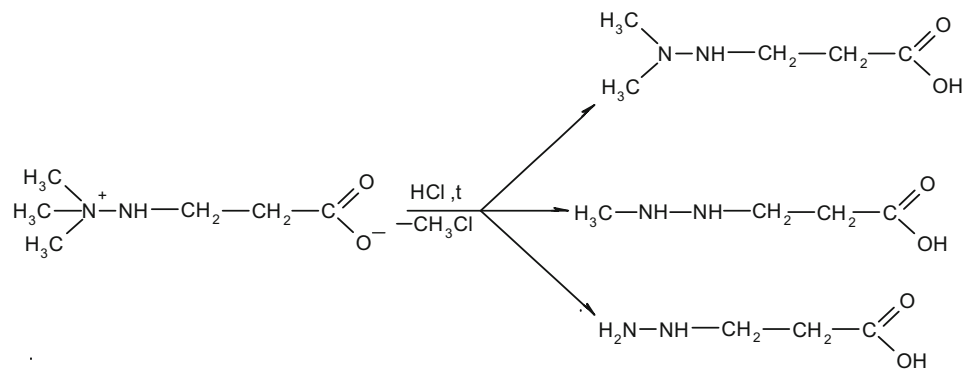


Рис. 3. Схема деструкции мелатонина в кислой среде.

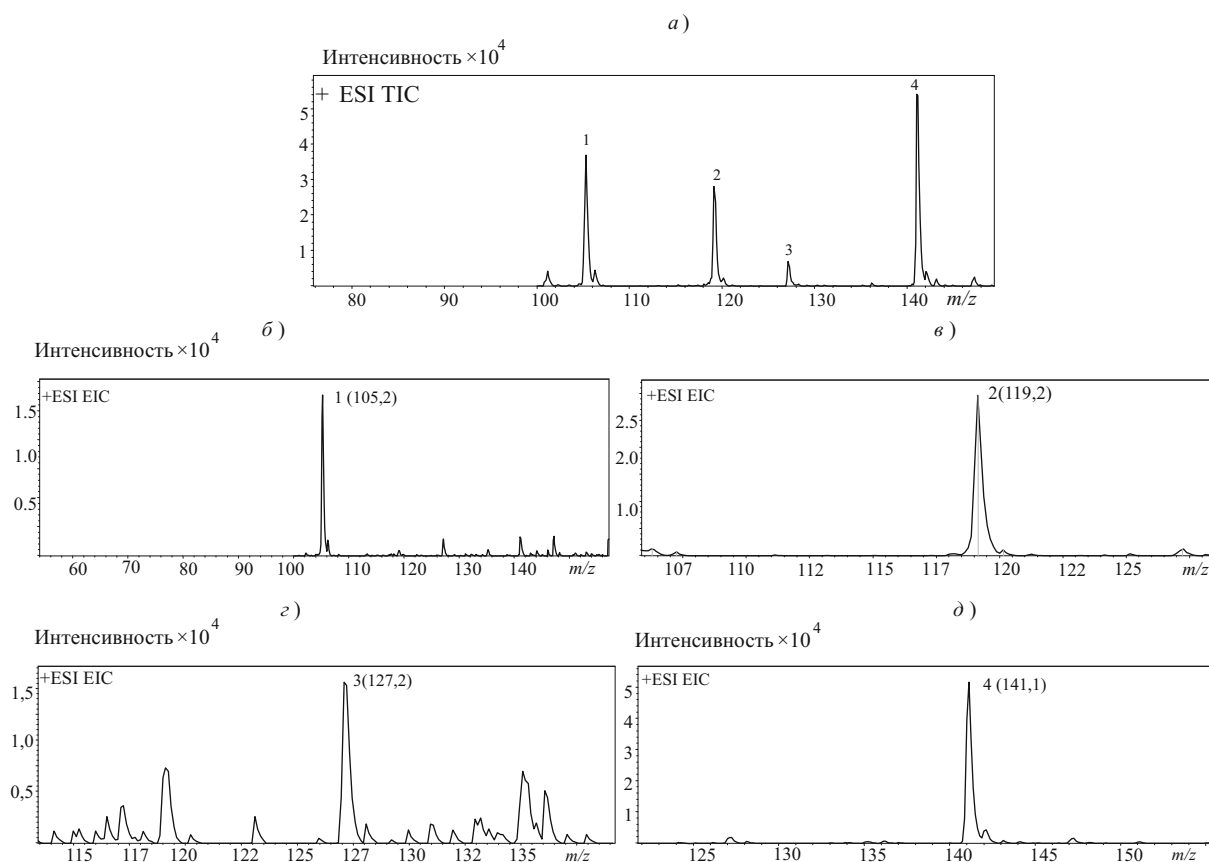


Рис. 4. Масс-спектры примесей мелатонина, полученные в результате деструкции: а) полный ионный ток; б, в) ионный ток выделенных ионов  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; г, д) ионный ток выделенных ионов  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

стоводородной пик мелатонина существенно уменьшился. Кроме того, наблюдалось появление спутного пика ( $11,6 \pm 0,2$  мин), а также изменился характер базовой линии, на которой можно выделить сигналы с временами миграции 12,6 и 12,7 мин соответственно, что может свидетельствовать о наличии продуктов деструкции (рис. 1).

Из полученных данных следует, что процесс деструкции мелатонина в большей степени протекает в среде 1 М кислоты хлористоводородной концентрированной.

Для дальнейшего изучения процесса деструкции готовили растворы мелатонина (5 мг/мл), и нагревали их на кипящей водяной бане в среде 1 М кислоты хло-

ристоводородной, варьируя время от 10 до 60 мин. Каждый из анализируемых растворов затем подвергался нейтрализации и использовался для количественного определения, которое проводили методом МЭКХ, описанным в [5]. При этом установлено, что при нагревании испытуемого раствора в течение 1 ч наблюдается полная деструкция мелатонина. Полученные результаты в виде кинетической кривой представлены на рис. 2. Параллельно, в аналогичных условиях, проводили нагревание водных растворов мелатонина без добавления кислоты. При этом установлено, что концентрации мелатонина в растворе остаётся неизменной на всем протяжении эксперимента.

Анализ полученной кинетической кривой показывает, что процесс деструкции мельдония сопровождается расщеплением его структуры через 2 последовательных стадии. Для расчета констант использовали временные промежутки от 0 до 20 мин и от 30 до 60 мин, так как на данных участках кривые имеют характерный профиль. Константы скорости рассчитывались по формуле:

$$K = \frac{\ln C_{t2} - \ln C_{t1}}{\Delta t},$$

где  $C_{t1}$  и  $C_{t2}$  — концентрация анализируемых растворов, мг/мл;  $\Delta t$  — разница во времени, мин.

При этом установлено, что  $K_1$  равна  $0,0305 \text{ мин}^{-1}$ , а  $K_2 - 0,0544 \text{ мин}^{-1}$ . Это свидетельствует о том, что процесс разложения мельдония протекает не менее, чем в 2 стадии, что может говорить о наличии нескольких примесей, образующихся в процессе деструкции мельдония.

Исходя из химической структуры данного соединения, наиболее вероятно образование в данных условиях продуктов деметилирования (рис. 3).

Идентификацию продуктов деструкции проводили путем сопоставления значений молекулярных масс этих соединений со значениями  $m/z^+$  сигналов масс-спектра. Для скрининг-анализа в режиме сканирования по полному ионному току в качестве диагностиче-

ских ионов были выбраны не только протонированные молекулы  $[M^+ H]^+$ , но и натриевые соли вышеуказанных замещенных пропионовой кислоты  $[M^+ Na]^+$ , обладающие максимальной интенсивностью. Это позволяет точно определить молекулярную массу примесей и идентифицировать их. Масс-спектры, полученные в вышеописанных условиях, представлены на рис. 4.

Анализ ионного тока показал наличие 2 примесей с молярной массой 104 и 118, что подтверждается также наличием натриевых солей замещенных пропионовой кислоты с молярной массой 126 и 140 (таблица).

Таким образом, как установлено в ходе проведенных исследований, при деструкции мельдония в сильно кислой среде образуются 3-(2-метилгидразин)пропионовая кислота и 3-гидразинпропионовая кислота.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Л. М. Житникова, *Рус. мед. ж.*, **4**(20), 137 – 143 (2012).
2. *Государственная Фармакопея Российской Федерации*, Ч. 1, Науч. центр экспертизы средств мед. применения, Москва (2008).
3. Y. Peng, J. Yang, Z. Wang, et al., *J. Chromatog. B*, **878**(5 – 6), 551 – 556 (2010).
4. L. Vernez, W. Thormann, S. Krähenbühl, *J. Chromatogr. A*, **895**(1 – 2), 309 – 316 (2000).
5. М. В. Гаврилин, Ю. В. Мудрецова, С. П. Сенченко, С. А. Рожнова, *Вопр. биол., мед. и фарм. химии*, № 4, 1 – 16 (2012).

Поступила 19.02.13

## STUDYING MILDRONATE STABILITY IN AQUEOUS SOLUTIONS BY THE MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY AND MASS SPECTROMETRY TECHNIQUES

M. V. Gavrilin<sup>1</sup> and Yu. V. Mudretsova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, 344022 Russia.

<sup>2</sup> Pyatigorsk State Medico-Pharmaceutical Institute, Division of Volgograd State Medical University, Pyatigorsk, 357532 Russia

The kinetics of mildronate destruction in acid medium has been studied by the methods of micellar electrokinetic chromatography (MEC) with indirect detection and mass spectrometry (MS) with positive ionization mode. It was established that mildronate exhibits stage-by-stage demethylation in acid media with the formation of 3-(2-methylhydrazinium) of propionic acid and 3-hydrazinepropionic acid. The proposed method of the quantitative determination of mildronate by MEC can be used for the quantitative determination of mildronate in the presence of destruction products.

**Keywords:** mildronate; stability; micellar electrokinetic chromatography; mass spectrometry