

# Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© Коллектив авторов, 2009

А. И. Ермаков, Ю. Ю. Хомяков, Л. П. Сошенко, В. Г. Плющиков

## ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВОДНОСПИРТОВЫХ РАСТВОРОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ. I. ПРОИЗВОДНЫЕ МЕНТОЛА И пара-АМИНОБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ

Центр инструментальных методов и инновационных технологий анализа веществ и материалов, Российский Университет Дружбы Народов, Москва, Россия

Проведен хроматомасс-спектрометрический анализ водных и спиртоводных растворов лекарственных препаратов: ментола, валидола, анестезина, новокаина и меновазина на хроматомасс-спектрометре Varian 3900/2100T (США) с использованием капиллярной колонки Varian FactorFour VF-5ms. Подтверждена структура ряда примесей, строение которых ранее было основано на теоретических соображениях. Исследованы структурно-аналитические возможности хроматомасс-спектрометра последней модификации фирмы Varian с ионным источником типа “ионная ловушка”. Данная комбинация прибора позволяет получать чистые масс-спектры из малоинтенсивных и перекрывающихся хроматографических пиков. Результаты работы могут быть использованы при контроле качества лекарственных препаратов на основе изученных соединений.

**Ключевые слова:** лекарственные препараты, ментол, валидол, анестезин, новокаин, меновазин, хроматомасс-спектрометрический анализ, химическая структура примесей

Проведен хроматомасс-спектрометрический анализ водных и спиртоводных растворов соединений (I – VI) (рис. 1), относящихся к препаратам, оказывающим воздействие на нервные окончания. Вещества I, IV и V входят в состав лекарственного препарата меновазин. Готовые лекарственные средства были закуплены в торговой розничной аптечной сети: валидол производства ОАО “Фармстандарт-Лексредства” (Курск), меновазин — ОАО Татхимфармпрепараты” (Казань), новокаин — АО “Воронежхимфарм”.

Вначале были изучены 1 % растворы в 70 % этиловом спирте индивидуальных соединений I – IV и VI, а новокаин (V) в форме 0,5 % водного раствора. Раствор меновазина VI изучался без разведения и извлекался непосредственно из флакона микрошприцем.

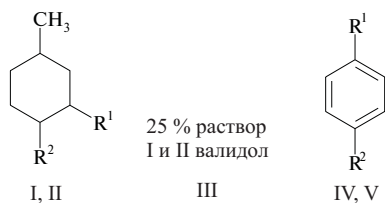
Известно, что при хроматографических исследованиях водных и водноспиртовых растворов на обычной набивной хроматографической колонке в качестве детектора используется, в основном, катарометр, который, по сравнению с другими хроматографическими анализаторами, имеет самую низкую чувствительность. Это не дает возможности надежно анализировать и идентифицировать в растворах “следовые количества” примесей в препаратах. Поэтому, как правило, при исследованиях лекарственных вещества экстрагируют из растворов органическими растворителями, что увеличивает время анализа. При неполном экстрагировании одного или нескольких веществ могут наблюдаться аналитические ошибки.

Ментол, как известно, существует в 8 стереоизомерных формах. Анализ стереоизомеров ментола, их разделение в хроматографической колонке более 30 лет назад изучался в работах [1 – 4]. В это же время

[5] рассматривались масс-спектры производных ментола и ментогликолей. В [6] разработана методика анализа ментола в моче методом ГЖХ. В [7] метод газо-жидкостной хроматографии использовался для определения качества растворов новокаина. Подлинность валидола при фармакопейном анализе в настоящее время определяется методом хроматографии [8 – 10].

Основная цель наших исследований — изучение структурно-аналитических возможностей хроматомасс-спектрометра Varian 3900/2100T (США), автоматизированного и компьютеризированного на самом современном уровне. Речь в данном случае идет о способности прибора регистрировать “чистые” масс-спектры минимальных по интенсивности хроматографических пиков и о чувствительности прибора в целом. Прибор снабжен базой данных в объеме 365 тыс. масс-спектров различных химических соединений. По желанию оператора прибор может выдавать спектр и вероятную структурную формулу химического вещества по хроматографическому пику.

При идентификации и установлении структур посторонних соединений в лекарственных препаратах, если они состоят из нескольких веществ, как, например, меновазин, предварительно изучают масс-спектры индивидуальных компонентов и определяют степень их чистоты. Хотя соединения I – V известны более 100 лет и масс-спектры их есть в базе данных прибора, но, по нашим данным, закономерности их поведения под электронным ударом в литературе не обсуждались. Масс-спектры ментола, его ментилового эфира, анестезина, новокаина, определенные при хро-

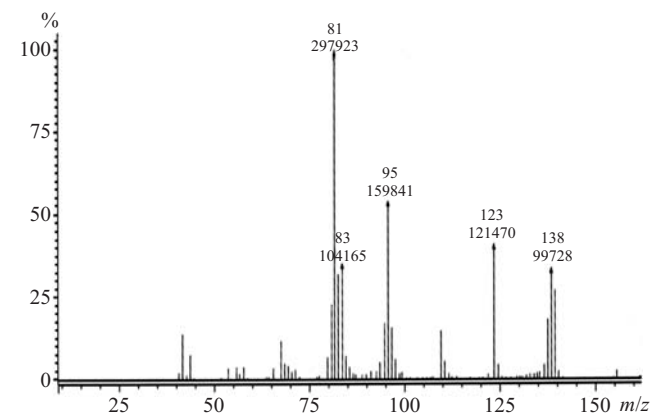


**Рис. 1.** Химические формулы исследованных соединений: (I):  $R^1 = OH$ ,  $R^2 = CH(CH_3)_2$ , ментол; (II):  $R^1 = OCOCH_2CH(CH_3)_2$ ,  $R^2 = CH(CH_3)$ , ментильный эфир изовалериановой кислоты; 25% раствор I во II валидол (III); (IV):  $R^1 = NH_2$ ,  $R^2 = COOC_2H_5$ , анестезин; (V):  $R^1 = NH_2$ ,  $R^2 = COOCH_2N(C_2H_5)_2$ , новокаин; (VI): 2,5 г (I) + 1 г (IV) + 1 г (V) в 100 мл 70% этилового спирта, меновазин.

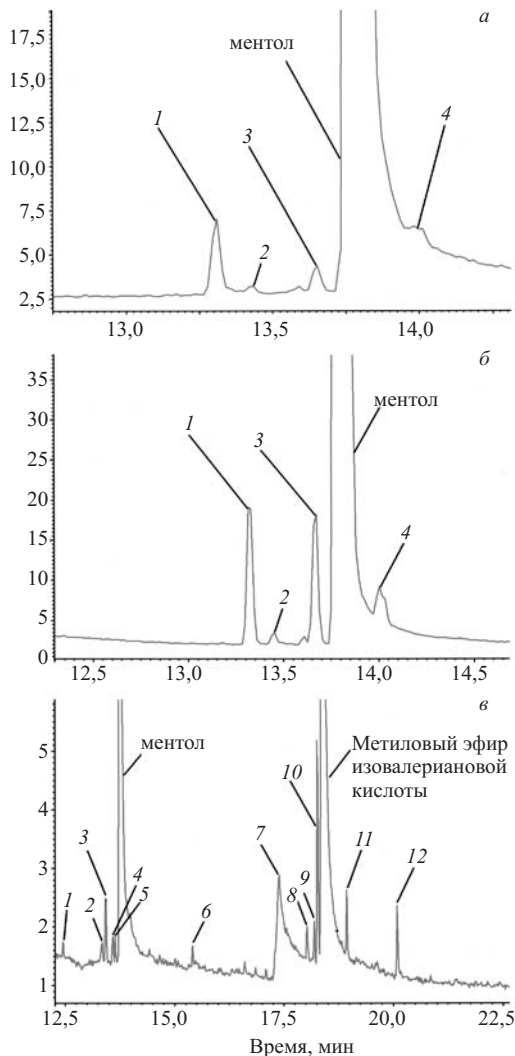
матографировании, полностью совпадают со спектрами из базы данных.

С точки зрения теоретической и практической масс-спектрометрии представляет интерес исследование ментола (рис. 2). Пик молекулярного иона ментола с  $m/z$  156 имеет низкую интенсивность, что характерно для насыщенных шестичленных циклов. В спектре ментилового эфира изовалериановой кислоты (II) пик молекулярного иона отсутствует, один из максимальных пиков отвечает иону, образуемому при отрыве от молекулярного иона нейтральной молекулы изовалериановой кислоты. Значение его  $m/z$  равно 138 ( $M^+ - HOCOSCH_2CH(CH_3)$ ). Интенсивности фрагментных ионов в спектре соединений I, II отвечают массовым числам  $m/z$  138 ( $M^+ - H_2O$ ) (в ментоле),  $m/z$  123 ( $M^+ - H_2O - CH_3$ ),  $m/z$  95 ( $M^+ - H_2O - CHCH_3CH_3$ ) и  $m/z$  81 ( $M^+ - OH - CHCH_3CH_3 - CH_3$ ) возрастают в последовательности ( $I_{отн}$ ) 25, 30, 65 и 100%, где  $M^+$  — значение  $m/z$  молекулярного иона.

На рис. 3, а, б и в, представлены хроматограммы, зарегистрированные при максимальном масштабировании. Хроматограмма 3, а свидетельствует об относительно высокой чистоте аналитического образца рацемического ментола. Однако четко зарегистрированы и 4 малоинтенсивных хроматографических пика, относящихся к посторонним соединениям и имеющих по данным масс-спектров циклическую шестичленную ненасыщенную структуру. Масс-спектры соединений, относящихся к пикам 1 и 2, имеют молекулярные ионы с  $m/z$  154 ( $M^+ - H_2$ ). По характеру масс-спектра эти вещества (VII – VIII) (рис. 4) соответствуют дегидрированной молекуле ментола. Вещества, соответ-



**Рис. 2.** Масс-спектр ментола.



**Рис. 3.** а – Хроматограмма ментола (показаны пик ментола и пики примесей); б – часть хроматограммы меновазина (показаны пик ментола и пики посторонних соединений); в – хроматограмма валидола, выделенного из таблеток. Показаны пики ментилового эфира изовалериановой кислоты с пиками посторонних соединений и пик ментола также с пиками посторонних соединений.

вующие пикам 3 и 4, имеют молекулярные массы  $m/z$  138 ( $M^+ - H_2O$ ). По характеру масс-спектров эти пики по массе отвечают молекулам веществ (IX – X). Из хроматограммы следует, что суммарное содержание этих 2 компонентов не превышает 1%.

Те же примеси в ментоле, обнаруженные при хроматографировании меновазина, в состав которого он входит, имеют довольно высокую относительную интенсивность, как это следует из рис. 3, б. Пик 1 соответствует веществу с  $m/z$  154 ( $M^+ - H_2$ ), соединение пика 2 имеет ту же самую массу (вещества VII – VIII). Пик 3 соответствует веществу с  $m/z$  138 ( $M^+ - H_2O$ ), пик 4 соответствует соединению с тем же значением молекулярной массы  $m/z$  138 (вещества IX – X). Характеры масс-спектров веществ, полученных из пиков 1 – 2 и 3 – 4, имеют значительные отличия, хотя и имеют одинаковые значения  $M^+$ . Все вышесказанное говорит о том, что указанные соединения могут иметь структуры, представленные на рис. 4.

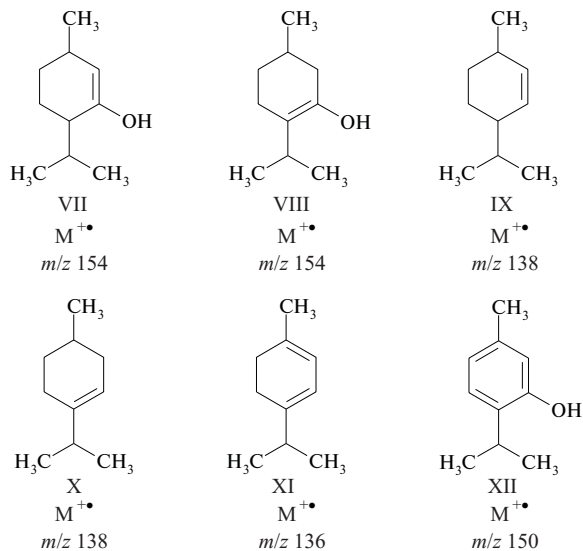


Рис. 4. Химические структуры предполагаемых компонентов в ментоле.

Соединения VII – XI в самом ментоле вероятнее всего образуются при его синтезе из тимола (XII) методом гидрирования водородом в присутствии катализатора (никель, платина и др.) [11]. Отсюда следует, что изученный нами ментол является синтетическим продуктом. В природе ментол содержится в эфирном масле мяты перечной в смеси с эфиром уксусной кислоты. Из эфирного масла мяты его получают боратым методом или методом вымораживания [11].

При хроматографировании валидола (III) наблюдается более сложная картина. На основании данных масс-спектров нами идентифицированы по пикам  $M^{+\bullet}$  все вещества, хроматографические пики которых наблюдаются на рис. 3, в, так как почти все они присутствовали на рис. 2 и 3, за исключением пика под номером 7. Из характера масс-спектра следует, что это вещество отвечает изовалериановому альдегиду. Максимальные пики в спектре этого соединения отвечают пикам  $m/z$  86 (пик молекулярного иона) и  $m/z$  57, соответствующему фрагменту, образовавшемуся при отрыве альдегидной группы.

В таблице представлены предлагаемые химические структуры компонентов, которым отвечают пики в хроматограмме валидола, обозначенные номерами 1 – 12. Группа пиков, относящихся к ментолу, — под номерами 1 – 6, а пики, относящиеся к ментиловому эфиру, — под номерами 7 – 12.

Из таблицы и рис. 4 следует, что компоненты в индивидуальном ментоле и ментола в валидоле имеют одинаковое строение. Структуры соединений (XII, XIIa, IX, X) подтверждены спектрами соответствующих соединений из базы данных прибора. Соединения, отвечающие пикам XII и XIIa, отвечающие пикам 3 и 4, являются, очевидно, геометрическими изомерами. На капиллярной длинной колонке (30 м) такие изомеры разделяются, хотя и имеют близкие времена удерживания. Следует отметить, что в ментоле эти пики не разделяются. Соединения IX и X, отвечающие пикам 5 и 6, являются структурными изомерами, что также подтверждено идентичностью масс-спектров

#### Химические структуры предлагаемых компонентов в валидоле

Номер пика	Структура	$M^{+\bullet}$
1	Неидентифицированная примесь (очевидно из веществ наполнителя таблетки)	
2	Соединение XI см. рис. 4	136
3		154
4		154
5	Соединение IX см. рис. 4	138
6	Соединение X см. рис. 4	138
7	Изовалериановый альдегид	86
8	Соединение X см. рис. 4	138
9	Соединение XI см. рис. 4	136
10		156
11		156
12	Соединение IX см. рис. 4	138

этих соединений из базы данных. Времена удерживания этих соединений различаются довольно значительно, что вполне характерно для хроматографического поведения структурных изомеров.

Из вышеизложенного можно сделать вывод, что в хроматографической колонке осуществляется деструкция в шестичленном цикле не только ментола и ментилового эфира, а также молекулы эфира в целом. Косвенно это подтверждается тем фактом, что в хроматограмме обнаруживается пик изовалерианового альдегида. Следует отметить, что пики 11 и 12 в эфире примерно в 3 раза интенсивнее, чем пики 5 и 6 в группе ментола, что соответствует концентрациям ментола и эфира в валидоле как 1:3. В ФСП [10] говорится о порядке выхода компонентов в валидоле в последовательности: октанол, ментол, ментиловый эфир. Иных пиков они не обнаруживают. В ФС [9] последовательность выхода компонентов валидола следующая: ментен-1, ментен-2, ментен-3, неидентифицированная примесь, неоментол, ментол, изоментол, ментиловый эфир изовалериановой кислоты. Обращает на себя

внимание тот факт, что обнаружены пики, отвечающие геометрическим изомерам неоментолу и изоментолу. Хроматограмма получена на 3-метровой набивной колонке без подтверждения химической структуры каким-либо физико-химическим методом. Приведены только тривиальные названия этих компонентов. По нашему мнению, разделить геометрические изомеры ментола на 3-метровой колонке является довольно сложной задачей.

При хроматомасс-спектрометрическом исследовании меновазина в его хроматограмме обнаружена пара-аминобензойная кислота. Процентное содержание ее не превышает 0,1 %. При хроматографировании меновазина наблюдаются четкие и острые пики ментола и анестезина. Так как новокаин входит в состав этого препарата в виде хлоргидрата, его хроматографический пик размыт и имеет интенсивность, которая не коррелирует строго с объемом вводимой пробы. В меновазине без предварительной подготовки пробы количественно можно определять только ментол и анестезин. Для количественного определения новокаина необходима предварительная обработка пробы для перевода его в основание.

Следует отметить положительные стороны хроматомасс-спектрометра Varian 3900/2100T (США). В отличие от хроматомасс-спектрометров с традиционным источником ионов, используемый нами прибор позволяет регистрировать очень чистые масс-спектры среди малоинтенсивных хроматографических пиков. По нашему мнению, компактный ионный квадрупольный анализатор типа "ионная ловушка" практически не обладает эффектом памяти масс-спектра предыдущего пика. Кроме того, это дает возможность получать четкие спектры частично перекрывающихся хроматографических пиков. Это возможно благодаря тому, что частота сканирования масс-спектров в данном приборе очень высока, поскольку он является безынерционным источником ионов. Такая скорость сканирования не может быть использована в традиционном источнике ионов, что делает данный инструмент незаменимым при анализе следовых количеств примесей в любом изучаемом объекте.

#### Экспериментальная химическая часть

Исследования соединений проводились с использованием капиллярной колонки Varian FactorFour

VF-5ms длиной  $l = 30$  м, диаметром  $d = 0,25$  мм на хроматографе Varian 3900 (США). Использовался масс-спектрометр модели Varian Saturn 2100T. Метод ионизации — электронный удар, энергия ионизации — 70 эВ.

Выделение ментола и ментилового эфира из таблеток валидола проводилось по методу [9]. Следует отметить, что определение подлинности валидола и его количественный состав проводится методом газовой хроматографии на стеклянной колонке или на колонке из нержавеющей стали с детектором по ионизации пламени (ДИП) или катарометром.

Параметры режима хроматографирования в нашем случае: температура инжектора — 200 °С; температура колонки (менялась во время хроматографирования по программе) начальная — 50 °С — удерживалась в течение 5 мин, затем линейно повышалась до 200 °С с градиентом 10 °С/мин. По достижению максимального значения температурный режим сохранялся в течение 10 мин. Полное время хроматографирования составило 30 мин.

Ввод пробы осуществлялся при помощи автоинжектора Varian CP-8410. Количество вводимой пробы 1 мкл. Делитель потока 1:100. Количество пробы, поступающей в ионный источник, например, для ментола варьировалось в пределах  $10^{-3} - 2 \cdot 10^{-3}$  мкг.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. К. Когали, К. Аоки, Т. Аисака, et al., *J. Japan Oil Chemist. Soc.*, **14**(3), 129 – 130 (1965).
2. W. J. Houlihan, *Analyt. Chem.*, **34**(13), 1846 (1962).
3. M. H. Klowen, R. Heide, *Soap, Perfum. Cosmet.*, **35**(12), 1082 – 1083 (1962).
4. N. Uricaru, L. Dimofie, M. Sterescu, *J. Rizescu, Rev. Chim. (RSR)*, **20**(2), 68 (1969).
5. M.-G. Ferreti-Aloise, A. Jacot-Guillarmod, Y.-R. Naves, *J. Chem. Acta*, **53**(2), 201 – 208 (1970).
6. H. Gleispach and E. Schanclara, *J. Anal. Chem.*, **252**(2/3), 140 – 143 (1970).
7. Н. Н. Деметьева, М. И. Кулешова, *Фармация*, **20**(4), 17 – 21 (1971).
8. ВФС 42-2394-94. Таблетки валидола 0,06 г.
9. ФС 42-3392-97 (Курский ХФЗ).
10. ФСП 42-0055073801 (ОАО "Щелковский витаминный завод").
11. Г. А. Мелетьева, Л. А. Антонова, *Фармацевтическая химия*, Медицина, Москва (1985), сс. 287 – 289.

Поступила 21.01.09

## GC/MS ANALYSIS OF AQUEOUS ETHANOL SOLUTIONS OF DRUGS. PART 1. MENTHOL AND PARAAMINOBENZOIC ACID DERIVATIVES

A. I. Ermakov, Yu. Yu. Khomyakov, L. P. Soshenko, and V. G. Plyushchikov

Center for Instrumental Methods and Innovative Analytical Techniques and Materials, Peoples Friendship University, Moscow, Russia

A joint gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) analysis of aqueous and aqueous-ethanol solutions of some medicinals, including menthol, validol, benzocaine, novocaine, and menovazin, has been performed using Varian 3900/2100T (USA) instrument equipped with a Varian Factor Four VF-5ms capillary column. The structure of some impurities, the structure of which was previously based on theoretical considerations, is confirmed. Structural-analytical possibilities of the last modification of Varian GC/MS system with a source of the "ion trap" type are investigated. Using the given device combination, it is possible to obtain clear mass spectra even in the case of low-intensity and partly overlapping chromatographic peaks. The obtained results can be used in the quality control of medicinal products based on the investigated compounds.

**Key words:** Drug analysis, menthol, validol, benzocaine, novocaine, menovazin, chromatography/mass spectrometry (GC/MS), chemical structure of impurities