

## ХИМИЯ И ТЕХНОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 543.393:543.544.5.068.7

### ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТЕЙ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТОДОМ ОФ ВЭЖХ СОДЕРЖАНИЯ ПРИРОДНЫХ МАСЕЛ В РЕПЕЛЛЕНТНЫХ КОМПОЗИЦИЯХ

**Л.А. Носикова<sup>1</sup>, доцент, А.Н. Кочетов<sup>2,@</sup>, химик-аналитик**

<sup>1</sup>Кафедра химии и технологии редких и рассеянных элементов, наноразмерных и композиционных материалов им. К.А. Большакова МИТХТ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119571 Россия

<sup>2</sup>Испытательная аналитическая лаборатория ЗАО «МЕТТЭМ-Технологии», Балашиха, 143900 Россия

@ Автор для переписки, e-mail: [kochchem@mail.ru](mailto:kochchem@mail.ru)

*Рассмотрены подходы к определению содержания природных многокомпонентных масел в репеллентных средствах от насекомых и грызунов. Для анализа готовых препаратов рассмотрен метод ОФ ВЭЖХ с УФ-детектированием в качестве альтернативы более дорогостоящим вариантам с масс-селективным детектированием. Предложены методы групповой оценки содержания компонентов масел с привязкой к определенному веществу или без таковой. Для разработки и валидации конечных методик анализа необходимо применять дифференцированный подход в оценке составов действующих веществ, содержащих многокомпонентные природные смеси. Возможно, корректная процедура анализа будет включать определение не только основного компонента (например, цитраля), но и минорного/ых компонентов, определение которых будет более точно свидетельствовать о реальном содержании в средствах композиций действующих веществ дезинфекционных средств.*

**Ключевые слова:** репелленты, продукты «green chemistry», ОФ ВЭЖХ.

### EVALUATION OF POSSIBLE APPROACHES TO THE DETERMINATION BY THE METHOD RP HPLC NATURAL OILS IN REPELLENT COMPOSITIONS

**L.A. Nosikova<sup>1</sup>, A.N. Kochetov<sup>2,@</sup>**

<sup>1</sup>M.V. Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies, Moscow, 119571 Russia

<sup>2</sup>CJCS «METTEM-Technology», Balashikha, Moscow region, 143900 Russia

@ Corresponding author e-mail: [kochchem@mail.ru](mailto:kochchem@mail.ru)

*Considered the possibility of determining the content of natural multicomponent oils in repellent means from insects and rodents. For the analysis of finished products on the basis of Lavandin oil and a blend of essential oils containing as a main component citral, the method RP HPLC with UV detection as an alternative to more expensive options with mass-selective detection. Proposed methods of group content evaluation components of the oils with reference to a specific substance (citral), or without it. For the development and validation of the final analysis it is necessary to apply a differentiated approach in the evaluation of formulations of active substances containing multicomponent natural mixture. Perhaps the correct procedure of the analysis is to identify not only the main component (for example, citral), and minor/s components, the definition of which will more accurately indicate the actual content in the media compositions of active ingredients of disinfectants.*

**Keywords:** repellents, «green chemistry», RP HPLC.

В последнее время интерес к продукции с использованием природных органических масел постоянно усиливается, при этом спектр применения подобных масел расширяется. Традиционно их включают в составы косметических средств, однако в данном исследовании рассмотрены подходы к оценке составов масел, используемых в дезинфекционных средствах и служащих реальной альтернативой традиционным пестицидам.

Усилия исследователей [1–4], как правило, сконцентрированы на скрининге и получении относительно дешевых и безопасных для человека и окружающей среды соединений природного происхождения, обладающих ярко выраженной инсектицидной активностью. Однако производители конкретной продукции зачастую ограничиваются только лишь получением экстрактов из «organic»-продукции, не вкладывая дополнительные средства в очистку, и редко выделяют конкретное производное (фракцию) для дальнейшего использования в качестве действующей основы/ингредиента. Это существенно затрудняет разработку документации, содержащей корректную информацию о составе действующих веществ конечных композиций, а также рекомендаций по их определению. Между тем, наличие простых и доступных широкому кругу исследователей методик количественного определения природных многокомпонентных масел крайне важно для мониторинга сырья при производстве продукции дезинфекционного профиля и на всех этапах пути до конечного потребителя.

Исследованные нами репеллентные композиции содержат в качестве действующих веществ природное многокомпонентное (свыше 50 соединений) лавандиновое масло (репеллентное средство от мышей, полевок и кротов «ДЕТИА») и смесь природных эфирных масел, содержащих цитраль, цитронеллол, гераниол, линалоол, гексилциннамаль, лимонен, кумарин и др. (моющее средство для полов с репеллентным эффектом от тараканов «Флор Плюс»). Существующая методическая документация для анализа дезинфекционных средств [5–7] не содержит рекомендаций по анализу многокомпонентных систем природного происхождения. Вместе с тем, имеющиеся литературные данные свидетельствуют о том, что основным методом анализа многокомпонентных масел природного происхождения является газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием, позволяющая идентифицировать на качественном и количественном уровне большую часть компонентов [8–10]. Хроматографические методы используются при мониторинге содержания монокомпонентов, составляющих основу масел (имеющих максимальное содержание в смеси). Примером этого может служить анализ основных компонентов [11, с. 129], содержащихся в лавандиновом

масле: линалилацетата и линалоола, которые могут быть определены в сложных составах природного происхождения методами газовой хроматографии [12] или ВЭЖХ [13]. Основная сложность при анализе природных многокомпонентных систем – воспроизводимость состава по опорным значениям реперных соединений от партии к партии и в процессе хранения сырья/готовой продукции.

Нами рассмотрены возможные направления использования метода ОФ ВЭЖХ с УФ-детектированием как более доступной альтернативы методам ГЖХ/ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием при анализе продукции, содержащей природные многокомпонентные масла.

### Экспериментальная часть

Для проведения исследований использовали следующие реактивы: цитраль 99.0% (Jinan Naohua Industry Co., Ltd., Китай), кумарин 99.0% (Acros, Бельгия), лавандиновое масло 93.2% (Cosmetics АТОК International, Франция).

Изопропанол (х. ч., ГОСТ 18300-87), хлороформ (х. ч., ТУ 6-09-06-800-76), вода дистиллированная (ГОСТ 6709-72) и ацетонитрил (для ВЭЖХ, Panreac, Испания) использовались без предварительной очистки.

ОФ ВЭЖХ в сочетании с УФ-детектированием проводили на хроматографе «Waters 490» (Waters Ltd., Watford, UK), оснащенном насосом Altex модели 110A, инжектором Rheodyne с объемом петли 20 мкл, УФ-детектором модели 490 с переменной длиной волны. Использовали колонку из нержавеющей стали (4.0×150 мм), заполненную Сепарон SGX C18 Супер, зернение 5 мкм («Элсико», Россия). Подвижная фаза ацетонитрил – вода (60:40), скорость потока 0.5 и 1.0 мл/мин (предварительно дегазировали при помощи ультразвуковой установки). Детектирование осуществляли при 220 и 250 нм (температура комнатная). Запись хроматограмм проводили с помощью программы «Мультихром» (Ampersand Ltd. версия 1,52i, Россия).

Анализ моющего средства для полов с репеллентным эффектом от тараканов «Флор Плюс» (фирма «Сано Брунос Энтерпрайзис», Израиль), содержащего смесь эфирных масел, проводили без дополнительной пробоподготовки (см. рис. 1А).

Для анализа репеллентного средства в отношении мышей, полевок и кротов «ДЕТИА» (фирма «Detia Freyberg GmbH», Германия) использовали предварительное экстракционное извлечение компонентов лавандинового масла хлороформом. Средство массой 3–4 г (3 шарика) последовательно взвешивали на аналитических весах, помещали в коническую колбу, экстрагировали при перемешивании (4 ч) хлороформом (25 мл), далее аликвоту экстракта (5 мл)

разбавляли в 5 раз изопропиловым спиртом и подвергали хроматографическому исследованию (см. рис. 2А).

Стандартные растворы цитраля и кумарина готовили растворением навесок в изопропиловом спирте. Навеску лавандинового масла предварительно растворяли в небольшом количестве хлороформа (1-2 мл), а затем в изопропанол.

### Результаты и их обсуждение

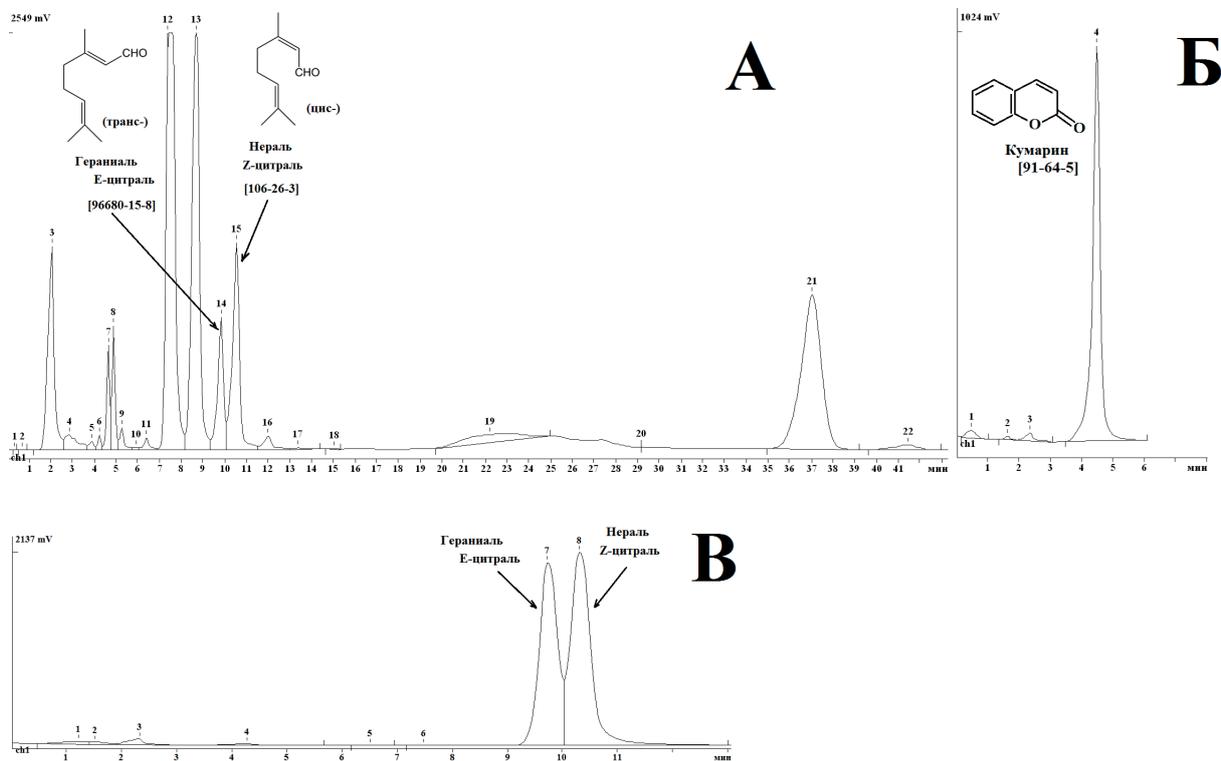
Анализ продукции «green chemistry» представляет серьезную аналитическую задачу, для решения которой в отсутствие сложного хроматографического оборудования (ГХ МС) нами были рассмотрены следующие возможности:

- определение содержания только реперного/ых соединений, содержащихся в природном продукте (готовой композиции);
- групповое определение всех компонентов (при одновременном наличии и стандартных образцов природных компонентов и продукции на их основе) суммарно в пересчете на один идентифицированный компонент;
- использование стандартных добавок известных веществ (внутренний стандарт) для пересчета по ним суммарного содержания компонентов (при

одновременном наличии и стандартных образцов природного происхождения, и продукции) масел.

При реализации перечисленных выше подходов были рассмотрены несколько альтернативных способов анализа конкретной продукции.

Поскольку основным компонентом природного происхождения в эфирных маслах готового инсекторепеллентного средства «Флор Плюс» является цитраль, представляющий собой смесь геометрических изомеров: нералья (*цис*-цитраля) и гераниаля (*транс*-цитраля), то основной метод анализа готовой продукции корректнее будет соотносить именно с содержанием цитраля. Альтернативой этому может служить проведение группового определения компонентов, входящих в состав исходных эфирных масел, с временами удерживания, например, 2.0, 2.8, 9.8, 10.5, 20.2÷24.8, 37.0, 41.4 мин (пики № 3, 7, 8, 14, 15, 19–22 на рис. 1А, соответственно) с приведением к содержанию цитраля (рис. 1В). Неоднозначность этого подхода заключается в проведении детектирования при определенной длине волны, совпадающей с максимумом поглощения цитраля, однако спектральные характеристики остальных компонентов могут существенно превосходить значения, установленные для цитраля (см. пики № 12, 13 на рис. 1А), хотя цитраль является основным компонентом [11, с. 129] масла.



**Рис. 1.** Хроматограммы образца средства моющего для полов с репеллентным эффектом от тараканов «Флор Плюс» (фирма «Сано Брунос Энтерпрайзис», Израиль), содержащего смесь эфирных масел (А), и стандартных растворов кумарина в изопропанол с концентрацией 0.224 мг/мл (1.53 мМ) (Б) и цитраля в изопропанол 0.495 мг/мл (3.18 мМ) (В). Колонка 4.0×150 мм Сепарон SGX C18 Супер, 5 мкм. Система CH<sub>3</sub>CN – H<sub>2</sub>O, 60:40; λ = 250 нм; 0.5 мл/мин.

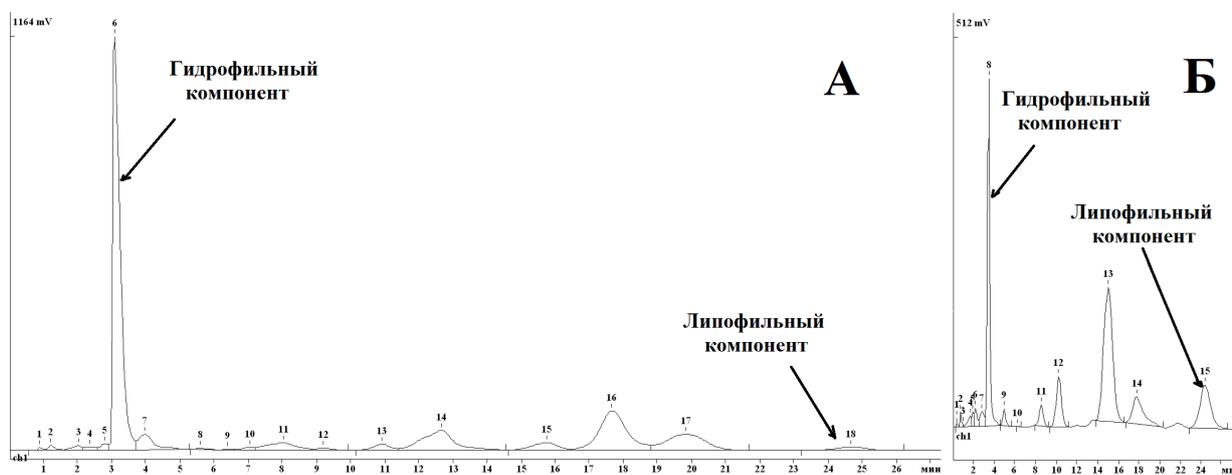
Третий путь – осуществлять нормирование путем внесения внутреннего стандарта – кумарина, который также входит в состав исходной смеси масел [11, с. 129] (хроматограмма кумарина приведена на рис. 1Б). Выбор именно кумарина продиктован доступностью и относительной стабильностью последнего. Стандартизация смесевой композиции только по кумарину, содержащемуся в исходном сырье (без добавки – пик № 7 рис. 1А), затруднена наличием дополнительного компонента (пик № 8 рис. 1А) и вынуждает рекомендовать величину добавки кумарина из расчета содержания не менее 0.01% (0.1 мг/мл в средстве). Этот путь предпочтителен с точки зрения воспроизводимости результатов, поскольку устойчивость кумарина значительно выше устойчивости непредельных альдегидов (цитраль). В случае изменения содержания природных компонентов (например, при хранении или использовании в смеси с другими средствами) нормирование по более «стабильному» кумарину может приводить к необъективно завышенным значениям.

Необходимо отметить, что базовая хроматограмма готового средства также содержит фоновые сигналы моющих компонентов средства, однако опыт работы с подобными рода композициями, не содержащими природные компоненты, показывает, что их влияние на вид хроматограмм при длине волны детектирования 250 нм незначительно [14].

Методом группового определения, как правило, пользуются при анализе гомологов, например, при анализе фенольных производных природного происхождения, пересчитывая содержание на один компонент (хлорогеновую кислоту) [15, 16]. Судя по большому диапазону времён удерживания в исходном природном масле, спектр определяемых компонентов достаточно широк, что подтверждается одновременным содержанием цитраля и кумарина, а значит, и неопределенность при нормировании по одному из них будет значительна.

Нормирование исключительно по цитралю также вносит некоторую неопределенность. Разное содержание изомеров нераль/гераниаль в природном сырье (продукции на его основе) и синтетическом стандарте (в нашем случае 60/40 и 55/45, соответственно) могут приводить к погрешностям в случае нормирования по одному из компонентов. Содержание изомеров цитраля в зависимости от индивидуальных особенностей масла (разновидности, времени производства, условий хранения и пр.) может варьироваться в широком диапазоне [17] и не изменяться симбатно с другими компонентами растительного происхождения.

Низкие спектральные характеристики компонентов лавандинового масла при УФ-детектировании (рис. 2Б) заставляют исследовать репеллентное средство в отношении мышей, полевок и кротов «ДЕТИА» при  $\lambda = 220$  нм.



**Рис. 2.** Хроматограммы экстракта из репеллентного средства в отношении мышей, полевок и кротов «ДЕТИА» (фирма «Detia Freyberg GmbH», Германия), содержащего лавандиновое масло (А) и стандартного раствора лавандинового масла в смеси хлороформа и изопропанола (1:5) с концентрацией 4.66 мг/мл (Б).

Колонка 4.0×150 мм Сепарон SGX C18 Супер, 5 мкм. Система  $\text{CH}_3\text{CN} - \text{H}_2\text{O}$ , 60:40;  $\lambda = 220$  нм; 1.0 мл/мин.

Нормирование компонентов в смеси рациональнее осуществлять по характеристичным пикам (на хроматограмме лавандинового масла № 8 и № 15 рис. 2Б), которые с уверенностью можно отнести к представителям полярных и неполярных компонентов смеси соответственно. Эти пики идентифицируются (№ 6 и № 18) в экстракте из репеллентного средства

«ДЕТИА» (рис. 2А). По-нашему мнению, для липофильного состава масла корректнее осуществлять нормирование по соединению с минимальной полярностью (т.е. по пику № 18). Допустимо и усреднение по двум пикам и пересчет по характеристичным пикам лавандинового масла или определение по гидрофильному производному (пик № 6). Возможно

проводить оценку компонентов, вводя весовой вклад между липофильными и гидрофильными соединениями, например, в соотношении 70:30 и осуществляя нормирование по обоим опорным сигналам (пики № 18 и 6, соответственно), но в этом случае не исключено асинхронное изменение концентраций компонентов при хранении.

### Заключение

На примере реперных композиций, для которых отсутствует какое бы то ни было методическое сопровождение и рекомендации по контролю, показана возможность идентификации природных компонентов в готовой продукции дезинфекционного профиля доступным широкому кругу исследователей методом ОФ ВЭЖХ. Для разработки и валидации конечных методик анализа необходимо применять дифференцированный подход в оценке составов действующих веществ, содержащих многокомпонентные природные смеси. Возможно, корректная процедура анализа будет включать определение не только основного компонента (например, цитраля), но и минорных/ых компонентов, определение которых будет более точно свидетельствовать о реальном содержании композиций действующих веществ в дезинфекционных средствах. Последнее обстоятельство крайне важно, поскольку производители средств указывают в качестве действующих веществ в составах продукции суммарное содержание масла (экстрактов) или же, в лучшем случае, приведенное содержание смеси действующих веществ к одному основному (по содержанию, но не по биологической эффективности) компоненту, а значит, отдавать предпочтение следует подходу «групповой», а не индивидуальной оценки компонентов.

### Список литературы:

1. Khambay B.P.S., Jewess P. // Crop Protection. 2000. V. 19. P. 597–601.
2. Wang J., Zhi X., Yu X., Xu H. // J. Agric. Food Chem. 2013. V. 61 № 26. P. 6336–6343.
3. Рославцева С.А. // РЭТ-инфо. 2007. № 3. С. 32–35.
4. López O., Fernández-Bolanos J.G., Gil M.V. // Green Chem. 2005. V. 7. P. 431–442.
5. Крейнгольд С.У. Практическое руководство по химическому анализу дезинфекционных препаратов. М.: ЦИОРИД Биор, 1998. 150 с.
6. Крейнгольд С.У. Практическое руководство по химическому анализу дезинфекционных препаратов. М.: Экспресспринт, 2002. 156 с.
7. Р 4.2.2643-10. Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. 615 с.

8. Li J., Liu X.G., Dong F.S., Xu J., Zheng Y.Q., Shan W.L. // Molecules. 2010. V. 15. P. 233–240.
9. Li L., Zhao J.C. // Molecules. 2009. V. 14. P. 2195–2201.
10. Shang C.Q., Hu Y.M., Deng C.H., Hu K.J. // J. Chromatogr. A. 2002. V. 942. P. 283–288.
11. Войткевич С.А. Эфирные масла для парфюмерии и ароматерапии. М.: Пищевая промышленность, 1999. 284 с.
12. Neukum H.P., Meier D.J. // Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 1993. V. 84. P. 537–544.
13. Xia E.-Q., Song Y., Ai X.-X., Guo Y.-J., Xu X.-R., Li H.-B. // Molecules. 2010. V. 15. P. 4890–4897.
14. Носикова Л.А., Кочетов А.Н. // Тонкие хим. технологии (Вестник МИТХТ). 2015. Т. 10. № 3. С. 56–61.
15. Жукова О.Л., Абрамов А.А., Даргаева Т.Д., Маркарян А.А. // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Хим. 2006. Т. 47. № 5. С. 342–345.
16. Гаврилин М.В., Попова О.И., Губанова Е.А. // Хим. растит. сырья. 2010. № 4. С. 99–104.
17. Sacks J., Greenley E., Leo G., Willey P., Gallis D., Mangravite J. // J. Chem. Educ. 1983. V. 60. № 5. P. 434–436.

### References:

1. Khambay B.P.S., Jewess P. // Crop Protection. 2000. V. 19. P. 597–601.
2. Wang J., Zhi X., Yu X., Xu H. // J. Agric. Food Chem. 2013. V. 61 № 26. P. 6336–6343.
3. Roslavceva S.A. // RET-info. 2007. № 3. P. 32–35.
4. López O., Fernández-Bolanos J.G., Gil M.V. // Green Chem. 2005. V. 7. P. 431–442.
5. Krejngol'd S.U. Prakticheskoe rukovodstvo po khimicheskomu analizu dezinfekcionnykh preparatov (A practical manual on chemical analysis of disinfection preparations). М.: CIORID Bior, 1998. 150 p.
6. Krejngol'd S.U. Prakticheskoe rukovodstvo po khimicheskomu analizu dezinfekcionnykh preparatov (A practical manual on chemical analysis of disinfection preparations). М.: Expressprint, 2002. 156 p.
7. Р 4.2.2643-10. Metody laboratornykh issledovaniy i ispytaniy dezinfekcionnykh sredstv dlya ocenki ikh ehffektivnosti i bezopasnosti (Methods of laboratory research and testing of disinfectants to assess their efficacy and safety). М.: Federal center of hygiene and epidemiology of Rospotrebnadzor, 2010. 615 p.
8. Li J., Liu X.G., Dong F.S., Xu J., Zheng Y.Q., Shan W.L. // Molecules. 2010. V. 15. P. 233–240.
9. Li L., Zhao J.C. // Molecules. 2009. V. 14. P. 2195–2201.
10. Shang C.Q., Hu Y.M., Deng C.H., Hu K.J. // J. Chromatogr. A. 2002. V. 942. P. 283–288.
11. Vojtkevich S.A. Efirnye masla dlya parfumerii i aromaterapii (Essential oils for perfumery and aromatherapy). М.: Pishchevaya promyshlennost', 1999. 284 p.

12. Neukum H.P., Meier D.J. // *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 1993. V. 84. P. 537–544.
13. Xia E.-Q., Song Y., Ai X.-X., Guo Y.-J., Xu X.-R., Li H.-B. // *Molecules.* 2010. V. 15. P. 4890–4897.
14. Nosikova L.A., Kochetov A.N. // *Fine Chemical Technologies (Vestnik MITHT).* 2015. V. 10. № 3. P. 56–61.
15. Zhukova O.L., Abramov A.A., Dargaeva T.D., Markaryan A.A. // *Vestnik Moskovskogo Universiteta (Moscow University Press).* Ser. 2. Chem. 2006. V. 47. № 5. P. 342–345.
16. Gavrilin M.V., Popova O.I., Gubanova E.A. // *Khimiya rastitel'nogo syrja (Chemistry of plant raw material).* 2010. № 4. P. 99–104.
17. Sacks J., Greenley E., Leo G., Willey P., Gallis D., Mangravite J. // *J. Chem. Educ.* 1983. V. 60. № 5. P. 434–436.