

ISSN 2225-6016

ВЕСТНИК

*Смоленской государственной
медицинской академии*

Том 18, №3

2019



УДК 543:615.276:547.583.5

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА СУБСТАНЦИИ 4-МЕТИЛФЕНИЛАМИДА N-БЕНЗОИЛ-5-БРОМАНТРАНИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

© Андрюков К.В., Люст Е.Н., Тумилович Е.Ю., Коркодинова Л.М., Новикова В.В.

Пермская государственная фармацевтическая академия, Россия, 614990, Пермь, ул. Полевая, 2

Резюме

Цель. Изучение физико-химических свойств, разработка методик доказательства подлинности, доброкачественности по содержанию родственных примесей и остаточных органических растворителей, и количественного определения субстанции 4-метилфениламида N-бензоил-5-бромантраниловой кислоты.

Методика. В качестве объекта исследования использовали субстанцию 4-метилфениламид N-бензоил-5-бромантраниловой кислоты. Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на пластинках «Sorbfil» ПТСХ – АФ-А-УФ (тип сорбента – силикагель СТХ 1А) в системах органических растворителей различного состава и полярности. Детектирование исследуемых веществ проводили с помощью облучателя УФС при длине волны 254 нм. Исследования на содержание остаточного органического растворителя – этилацетата, проводились на газовом хроматографе «Кристалл 5000.2» (ЗАО СКБ «Хроматэк», Йошкар-Ола) с пламенно-ионизационным детектором. Ввод проб осуществлялся с помощью автоматического дозатора ДАЖ-2М. Разделение производилось на капиллярной колонке HP-FFAP 50 м × 0,32 мм, 0,52 мкм (неподвижная жидкая фаза представляет собой полиэтиленгликоль, модифицированный нитротерефталевой кислотой). Обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения «Хроматэк Аналитик 2.6». Спектрофотометрию в УФ-области проводили с использованием спектрофотометра Portlab 511 UV/Vis.

Результаты. Разработаны методики доказательства подлинности, доброкачественности по содержанию родственных примесей и остаточных органических растворителей – этилацетат, и количественного определения спектрофотометрическим методом в УФ-области, проведено исследование микробиологической чистоты.

Заключение. Разработанные методики анализа 4-метилфениламида N-бензоил-5-бромантраниловой кислоты для субстанции этого соединения являются наиболее перспективными и будут использованы при разработке методик его определения в лекарственных препаратах.

Ключевые слова: антраниловая кислота, амид, подлинность, хроматография, спектрофотометрия

DEVELOPMENT OF METHODS FOR ASSESSING THE QUALITY OF THE SUBSTANCE OF 4-METHYLPHENYLAMIDE N-BENZOYL-5-BROMOANTHRANILIC ACID

Andryukov K.V., Lyust E.N., Tumilovich E.YU., Korkodinova L.M., Novikova V.V.

Perm State Pharmaceutical Academy, 2, Polevaya St., 614990, Perm, Russia

Abstract

Objective. The study of physico-chemical properties, the development of methods to prove the authenticity, good quality of the content of related impurities and residual organic solvents, and quantitative determination of the substance of 4-methylphenylamide N-benzoyl-5-bromoanthranilic acid.

Methods. As the object of the study substance 4-methylphenylamide N-benzoyl-5-bromoanthranilic acid was used. Thin-layer chromatography (TLC) was performed on plates "Sorbfil" PTSH – AF-A-UV (type of sorbent – silica gel STX 1A) in systems of organic solvents of different composition and polarity. Detection of the studied substances was carried out with the help of an UFS irradiator at a wavelength of 254 nm. Studies on the content of residual organic solvent – ethyl acetate were carried out on the gas chromatograph "Crystal 5000.2" (JSC SKB "Chromatek", Yoshkar-Ola) with a flame ionization detector. Introduction of samples was carried out using an automatic dispenser EV-2M. The separation was performed on a capillary column HP-FFAP 50 m × 0.32 mm, 0.52 μm (the stationary liquid phase is polyethylene glycol modified by nitroterephthalic acid). The results were processed using the software

"Chromatech Analyst 2.6". Spectrophotometry in the UV region was performed using the Portlab 511 UV/Vis spectrophotometer.

Results. Techniques were developed to prove the authenticity, good quality by the content of related impurities and residual organic solvents – ethyl acetate, and quantitative determination by a spectrophotometric method in the UV region; a study of microbiological purity was carried out.

Conclusions. The developed methods for the analysis of 4-methylphenylamide N-benzoyl-5-bromoanthranilic acid for the substance of this compound are the most promising and will be used in the development of methods for its determination in medicinal preparations.

Keywords: anthranilic acid, amide, authenticity, chromatography, spectrophotometry

Введение

Многие патологические состояния, связанные с инфекционными и неинфекционными агентами сопровождаются воспалением, поэтому в медицинской практике очень важно его рациональное подавление. В настоящее время нестероидные противовоспалительные средства (НПВС) обязательно включают в фармакотерапию многих заболеваний и патологических состояний, и относятся к наиболее часто используемым препаратам. В настоящее время не существует препарата, полностью удовлетворяющего требованиям высокой эффективности и безопасности, поэтому поиск и внедрение новых НПВС остается актуальной проблемой.

С целью поиска и создания, новых НПВС возможно использование различных методов молекулярного дизайна биологически активных веществ. Одним из широко используемых методов целенаправленного поиска соединений с определенным видом биологической активности является молекулярный докинг. К механизмам действия соединений обладающих противовоспалительной активностью относятся взаимодействие с ферментом циклооксигеназа (ЦОГ) 1. При проведении поиска структуры с выраженной противовоспалительной активностью использовали количественную модель «структура-активность» основанную на молекулярном докинге по ферменту ЦОГ 1 [1].

Цель настоящего исследования – изучение физико-химических и химических свойств, разработка методик [7] определения подлинности, доброкачественности, остаточных органических растворителей, количественного определения и исследования микробиологической чистоты соединения – 4-метилфениламида N-бензоил-5-бромантраниловой кислоты (метфенак) (рис.).

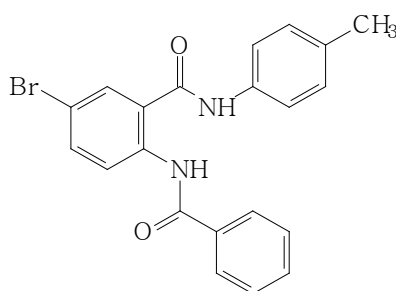


Рис. Структурная формула 4-метилфениламида N-бензоил-5-бромантраниловой кислоты

Методика

В качестве объекта исследования использовали субстанцию 4-метилфениламида N-бензоил-5-бромантраниловой кислоты. Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на пластинках «Sorbfil» ПТСХ – АФ-А-УФ (тип сорбента – силикагель СТХ 1А) в системах органических растворителей различного состава и полярности. Исследование осуществляли восходящим способом, пробег фронта растворителей составил 8 см. После прохождения фронта растворителей пластинку вынимали из камеры и просушивали под тягой на столике для нанесения образцов УСП-1 (температура нагрева на уровне 50⁰С) в течение 15 мин. Детектирование исследуемых веществ проводили с помощью облучателя УФС при длине волны 254 нм. «Микробиологическая чистота» субстанции была определена в соответствии с требованиями ОФС.1.2.4.00 02.18.

Исследования на содержание остаточного органического растворителя – этилацетата, проводились на газовом хроматографе «Кристалл 5000.2» (ЗАО СКБ «Хроматэк», Йошкар-Ола) с пламенно-ионизационным детектором. Ввод проб осуществлялся с помощью автоматического дозатора ДАЖ-2М. Разделение производилось на капиллярной колонке HP-FFAP 50 м × 0,32 мм, 0,52 мкм (неподвижная жидкая фаза представляет собой полиэтиленгликоль, модифицированный нитротерефталевой кислотой), которая оптимально подходит для разделения спиртов, эфиров и других низкомолекулярных летучих веществ. Обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения «Хроматэк Аналитик 2.6».

Спектрофотометрию в УФ-области проводили с использованием спектрофотометра Portlab 511 UV/Vis. Измерение оптической плотности в исследуемых объектах проводили при длинах волн 220–400 нм с использованием кварцевых кювет с толщиной поглощающего слоя 1 см и при температуре $20 \pm 1^\circ\text{C}$ по сравнению с ДМФА.

На кафедре фармацевтической химии очного факультета ПГФА синтезировано и исследовано новое биологически активное соединение – 4-метилфениламид N-бензоил-5-бромантраниловой кислоты (рис.), проявляющее высокую противовоспалительную активность и практически нетоксичное [2]. Исследования проведены на четырёх сериях субстанции, полученных в ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России.

Метфенак представляет собой белый аморфный или кристаллический порошок, без запаха. Практически не растворим в воде, этаноле 96%, легко растворим в диметилформамиде (ДМФА), диметилсульфоксиде (ДМСО), очень мало растворим в ацетоне. Субстанция плавится без разложения в диапазоне температур от 236 до 238°C . Потеря в массе при высушивании, определенная при температуре от 100 до 105°C , не превышает 0,5%.

ИК-спектр соединения, снятый на спектрометре «Specord M-80» в дисках с калия бромидом в области от 4000 до 400 см^{-1} , имеет характеристические полосы поглощения. В области 3334, 3268 см^{-1} присутствуют полосы, связанные с валентными колебаниями аминогруппы амидного (CONH) и NH-ацильного (NHCO) фрагментов, а полоса поглощения в области 1660 см^{-1} соответствует валентным колебаниям карбонила в амидной группе (CONH), сигнал карбонила для NHCO при 1632 см^{-1} . Характерные полосы поглощения углерод-углеродных связей ароматических колец наблюдаются при 1603, 1568, 1543 см^{-1} . В спектрах ЯМР ^1H соединения, записанном на ЯМР-Фурье спектрометре Mercury-300WB (рабочая частота прибора 300 МГц) в ДМСО-d₆ (внутренний стандарт – гексаметилдисулфоксид), наблюдались: синглет метильной группы в четвертом положении бензольного кольца в амидной группе при 2,35 м.д., мультиплет двенадцати ароматических протонов трёх бензольных колец в интервале 7,10–8,30 м.д., синглет протона амидной группы при 8,40 м.д., и сигнал протона NH-ацильной группы при 11,50 м.д..

Для определения подлинности метфенака были предложены следующие реакции. Наличие ковалентно-связанного брома доказывали по реакции с серебра нитратом после проведения восстановительной минерализации при кипячении в растворе натрия гидроксида с цинковой пылью. Амидную группу доказывали гидроксамовой реакцией при нагревании на водяной бане с щелочным раствором гидроксиламина, при прибавлении к раствору железа (III) хлорида, образуется красно-коричневое окрашивание [6]. Чистоту субстанции метфенака определяли по показателю родственные примеси методом ТСХ в хроматографической системе толуол : триметиламин : ледяная уксусная кислота (10:0,02:0,03) (продукты деструкции субстанции, технологические примеси). Исследовали полученные гидролизаты метфенака и технологически обусловленные примеси: 5-бромантраниловая кислота, 4-метиланилин, 6-бром-2-фенил-3,1-бензоксазин-4(3H)-он и хлорангидрид бензойной кислоты относительно раствора стандартного образца (СО) метфенака. Осуществлен выбор условий определения субстанции метфенак методом тонкослойной хроматографии. В данной системе для всех анализируемых веществ наблюдаются отличные друг от друга величины R_f: метфенак – 0,24, 4-метиланилин – 0,013, 6-бром-2-фенил-3,1-бензоксазин-4(3H)-он – 0,58.

Результаты исследования и их обсуждение

Разработана методика идентификации метфенака спектрофотометрическим методом в УФ-области. УФ спектр 0,001% раствора метфенака в ДМФА показал, что в интервале длин волн от 190 до 400 нм имеется максимум при 280 ± 2 нм и плечо в области 305–325 нм. Определен удельный показатель поглощения вещества – $608,3 \pm 3,3$.

Для количественного определения метфенака целесообразно использовать его поглощение в растворе ДМФА; аналитическая длина волны – 280 нм; область линейной зависимости оптической плотности растворов от концентрации составляет 4-10 мкг/мл; предел обнаружения – 0,6 мкг/мл. График зависимости оптической плотности от концентрации имеет линейный характер и описывается уравнением регрессии: $Y = 0,00002 \times X - 2 \times 10^{-8}$.

Проведена разработка методики количественного определения содержания остаточного органического растворителя этилацетата [4, 5], в субстанции Метфенак. Исследования проводились на газовом хроматографе «Кристалл 5000.2» (ЗАО СКБ «Хроматэк», Йошкар-Ола) с пламенно-ионизационным детектором. Ввод проб осуществлялся с помощью автоматического дозатора ДАЖ-2М. Разделение производилось на капиллярной колонке HP-FFAP 50 м × 0,32 мм, 0,52 мкм (неподвижная жидкая фаза представляет собой полиэтиленгликоль, модифицированный нитротерефталевой кислотой), которая оптимально подходит для разделения спиртов, эфиров и других низкомолекулярных летучих веществ. Обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения «Хроматэк Аналитик 2.6».

В качестве объектов исследования выступали стандартные растворы этилацетата в диметилформамиде (ДМФА) с концентрацией 0,1%, а также растворы субстанции Метфенак разных серий в ДМФА. В результате проведенных исследований были выбраны следующие условия анализа: хроматографическая колонка – HP-FFAP (50 м×0,32 мм, 0,52 мкм); газ-носитель – азот; давление газа-носителя 75,0 кПа; температура испарителя – 180°C; температура детектора – 250 °C; температура колонки программируемая: начальная температура 50°C, выдержка 5 мин., подъем со скоростью 15°C/мин до 200 °C; расход водорода – 30 мл/мин; расход воздуха – 300 мл/мин; деление потока – 1:5; объем вводимой пробы – 1 мкл. Идентификацию этилацетата осуществляли на основе определения абсолютного времени удерживания, которое в предложенных условиях составило 5,75±0,09 мин. Специфичность методики была продемонстрирована полным хроматографическим разделением пиков этилацетата с пиками балластных веществ, а также отсутствием пика этилацетата на хроматограмме растворителя.

Для апробации разработанных условий и определения наличия указанного в схеме синтеза органического растворителя нами в разработанных условиях были проанализированы 4 серии субстанции Метфенак. Расчет содержания этилацетата проводился по градуировочному графику. Уравнение линейной зависимости $y=10834x$, коэффициент корреляции составляет 0,9972. Во всех исследуемых субстанциях установлено наличие этилацетата, содержание которого варьировалось от 0,025% до 0,094%.

При разработке раздела ФС «Микробиологическая чистота» установлено, что субстанция метфенак (категория 2.2 – субстанция синтетического происхождения для производства нестерильных лекарственных препаратов) в условиях проведения испытания (разведение 1:10) не оказывает антимикробного действия в отношении рекомендованных тест-микроорганизмов. Исследование 5 серий субстанции показало соответствие требованиям ОФС.1.2.4.00 02.18 «Микробиологическая чистота» [3].

Для количественного определения субстанции метфенак была разработана методика с использованием спектрофотометрии в УФ-области. Суть методики. Около 0,050 г (точная навеска) соединения переносили в мерную колбу на 100 мл, прибавляли 50 мл ДМФА, перемешивали до полного растворения соединения (10-15 мин.), доводили до метки ДМФА, перемешивали (раствор А). Далее 1 мл раствора А переносили в мерную колбу на 50 мл, доводили до метки ДМФА, перемешивали (раствор Б). Измеряют оптическую плотность раствора Б на спектрофотометре при длине волны 280 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения использовали ДМФА. Удельный показатель поглощения вещества ($A_{1\text{см}}^{1\%}$) = 608,3. Содержание метфенака в процентах (С (%)) вычисляют по формуле:

$$C(\%) = \frac{A \times V_{\text{развед. (1)}} \times V_{\text{развед. (2)}}}{A_{1\text{см}}^{1\%} \times b \times a \times V_{\text{аликв.}}}$$

где А – оптическая плотность исследуемого раствора; $A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения вещества; b – толщина поглощающего слоя, в см, а – навеска исследуемой субстанции, г, $V_{\text{аликв.}}$ – объём аликвотной части разведения, мл, $V_{\text{развед. (1)}}$, $V_{\text{развед. (2)}}$ – объёмы последовательных разведений, мл.

Оценка повторяемости (сходимости) результатов осуществлялась путём статистической обработки выборок, полученных в ходе количественного анализа исследуемого вещества в модельных

пробах на 3-х уровнях концентрации в пределах рекомендуемой аналитической области методик – 80, 100, 120% от количества принятого за 100% – 0,05 г (табл.).

Таблица. Метрологическая характеристика спектрофотометрической методики анализа субстанции метфенак

Уровень	Навеска метфенака, г	Оптическая плотность (A)	Определено метфенака, %	Метрологические данные					
				n	X _{средн.}	S	S _{x̄}	ΔX	ε
80%	0,0400	0,482	99,04	3	99,31	0,58	0,33	1,42	1,41
	0,0400	0,485	99,66						
	0,0400	0,483	99,25						
100%	0,0500	0,602	98,96	3	99,45	0,83	0,48	2,06	2,05
	0,0500	0,608	99,95						
	0,0500	0,605	99,45						
120%	0,0600	0,726	99,45	3	99,31	0,74	0,42	1,81	1,82
	0,0600	0,721	98,77						
	0,0600	0,728	99,73						
Вся аналитическая область				9	99,36	0,59	0,19	0,43	0,43
Уравнение линии тренда				Y = 12,083X + 0,0003					

На основании полученных результатов построен график зависимости оптической плотности от навески. Линия тренда пересекала ось ординат в точках, близких к нулю (0), что свидетельствовало о правильности разработанной методики. Согласно данным исследования, на каждом уровне концентрации метфенака и в целом в пределах рекомендуемой аналитической области методик получены результаты, удовлетворительные по сходимости. Методика проста в исполнении и не требует дорогостоящих, токсичных реагентов.

Выводы

1. Изучены ИК-, ЯМР ¹H- и УФ-спектры, предложены реакции подлинности соединения метфенак.
2. В субстанции метфенак определена потеря в массе при высушивании, которая не превышает 0,5% (в среднем 0,044±0,004%).
3. Установлены нормы качества по содержанию родственных примесей и остаточных органических растворителей.
4. Разработана методика количественного определения спектрофотометрическим методом в УФ-области субстанции метфенак. Разработанные методики анализа 4-метилфениламида N-бензоил-5-бромантраниловой кислоты для субстанции этого соединения являются наиболее перспективными и будут использованы при разработке методик его определения в лекарственных препаратах.

Литература (references)

1. Андрюков К.В., Коркодинова Л.М. Молекулярный докинг в изучении взаимодействия амидов и гидразидов N-ароилзамещенных галоген(Н)антраниловых кислот с циклооксигеназой 1, проявляющих противовоспалительную активность // Химико-фармацевтический журнал. – 2018. – Т.52, №5. – С. 29-32. [Andryukov K.V., Korkodinova L.M. *Himiko-farmaceuticheskij zhurnal. Pharmaceutical chemistry journal.* – 2018. – V.52, N5. – P. 29-32. (in Russian)]
2. Андрюков К.В., Коркодинова Л.М., Гольдштейн А.Г. 4-Метилфениламид N-бензоил-5-бромантраниловой кислоты, проявляющий противовоспалительную активность // Патент РФ на изобретение №2679892. Опубликовано 14.02.2019. Бюллетень №5. [Andryukov K.V., Korkodinova L.M., Gol'dshtejn A.G. *Patent RF na izobretenie N2679892. Opublikovano 14.02.2019.* Patent of Russian Federation №2679892. Publication 14.02.2019. Bulletin N5. (in Russian)]
3. Государственная фармакопея РФ. 14 издание. Т.1. – М., 2018. [Gosudarstvennaya farmakopeya RF. 14 izdanie. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 14th edition. V.1. – Moscow, 2018. (in Russian)]

4. Садчикова Н.П., Белов А.Б., Карманова Т.М. Определение остаточных количеств органических растворителей в субстанциях диклофенака натрия // Вестник ВГУ. – 2004. – №1. – С. 184-188. [Sadchikova N.P., Belov A.B., Karmanova T.M. *Vestnik VGU. Bulletin of the Voronezh State University.* – 2004. – N1. – P. 184-188. (in Russian)]
5. Рудаков О.Б., Востров И.А., Фёдоров С.В. и др. Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии. – Воронеж, Изд-во «Водолей», 2004. – 528 с. [Rudakov O.B., Vostrov I.A., Fyodorov S.V. i dr. *Sputnik hromatografista. Metody zhidkostnoj hromatografii.* Chromatograph companion. Liquid chromatography methods. – Voronezh, Publishing House "Aquarius". – 2004. – 528 p. (in Russian)]
6. Сливкин А.И., Садчикова Н.П. Функциональный анализ органических лекарственных веществ / Под ред. академика РАМН, проф. А.П. Арзамасцева. – Воронеж: Воронежский государственный университет, 2007. – 426 с. [Slivkin A.I., Sadchikova N.P. *Funkcional'nyj analiz organicheskikh lekarstvennyh veshchestv / Pod red. akademika RAMN, prof. A.P. Arzamastseva.* Functional analysis of organic medicinal substances / Ed. academician of RAMS, prof. A.P. Arzamastseva. – Voronezh: Voronezh State University, 2007. – 426 p. (in Russian)]
7. Сакарян Е.И., Шемеринкина Т.Б., Бармин А.В. и др. Фармацевтические субстанции. Требования Государственной фармакопеи к их стандартизации // Антибиотики и химиотерапия. – 2017. – Т.62, № 5-6. – С. 63-67. [Sakaryan E.I., Shemerinkina T.B., Barmin A.V. i dr. *Antibiotiki i himioterapiya.* Antibiotics and chemotherapy. – 2017. – V.62, N5-6. – P. 63-67. (in Russian)]

Информация об авторах

Андрюков Константин Вячеславович – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической химии ФОО ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России. E-mail: k_andrukov@mail.ru

Люст Елена Николаевна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры токсикологической химии ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России. E-mail: elenalyust@mail.ru

Тумилович Екатерина Юрьевна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры токсикологической химии ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России. E-mail: e.tumilovich@gmail.com

Коркодинова Любовь Михайловна – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармацевтической химии ФОО ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России. E-mail: korkodinovalm@pfa.ru

Новикова Валентина Васильевна – кандидат фармацевтических наук, доцент, заведующий кафедрой микробиологии ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России. E-mail: novikova-vv@pfa.ru