

ИССЛЕДОВАНИЯ ПО МОДИФИКАЦИИ МЕТОДИКИ СИНТЕЗА СУБСТАНЦИИ АЛЛАТРАМА (АМИДА N–АЛЛИЛАНТРАНИЛОВОЙ КИСЛОТЫ)

Курбатов Е.Р., Басс С.М., Ярыгина Т.И., Коркодинова Л.М., Карпенко Ю.Н.,
Перевозчикова Г.Г.

ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Пермь, Россия (614990, Пермь, ул. Полевая, 2), e-mail: perm@pfa.ru

Аллатрам – амид N–аллилантраниловой кислоты – получают реакцией алкилирования амида антраниловой кислоты бромистым аллилом при перемешивании в водной среде без нагревания в течение 1 ч. Изучено качество различных серий субстанции аллатрама для модификации методики синтеза указанного соединения. Для обнаружения примеси амида антраниловой кислоты в аллатраме использованы методы обращённо-фазной ВЭЖХ и ТСХ. Предельное содержание хлоридов, сульфатов и солей аммония определяли по методикам Государственной фармакопеи; количественное содержание действующего вещества – видоизменённым методом Къельдаля (методом щелочного гидролиза). Анализ двух серий субстанции аллатрама показал несоответствие требованиям ФС по показателям «Посторонние примеси», «Соли аммония», «Количественное определение», что свидетельствует о частичном разложении соединения. Проведена модификация методики получения субстанции аллатрама: предложено проведение высушивания субстанции в сушильном шкафу при температуре, не превышающей 60 °С. Исследование трех серий субстанции на соответствие требованиям ФСП свидетельствуют о приемлемости модифицированной методики синтеза, а также об устойчивости субстанции в процессе хранения.

Ключевые слова: Аллатрам, амид N-аллилантраниловой кислоты; фармацевтический анализ; модификация методики синтеза.

STUDY ON MODIFICATION METHOD OF SYNTHESIS OF THE SUBSTANCE ALLATRAM (AMIDE N- ALLILANTRANILIC ACID)

Kurbatov E.R., Bass S.M., Yarigina T.I., Korkodinova L.M., Karpenko Y.N.,
Perevozchikova G.G.

GBOU VPO "Perm State Pharmaceutical Academy" of the Ministry of Health of the Russian Federation , Perm, Russia (614990, Perm, Polevay st.), e-mail: perm@pfa.ru

Allatram – amide N- allilantranilic acid – obtained by alkylation reaction of amide anthranilic acid with allyl bromide with stirring in the aqueous medium without heating for 1 h. The quality of different series of substance allatram for modifying the synthesis of this compound was studied. The methods of reversed-phase HPLC and TLC for the detection of impurities of amide anthranilic acid in allatram were used. Limiting content of chlorides, sulfates and ammonium salts were determined by the procedures of the State Pharmacopoeia, the quantitative content of the active substance – a modified Kjeldahl method (by alkaline hydrolysis). The analysis of two series of substances allatram showed no compliance PS in terms of «Substances», «The salts of ammonium», «Quantification» which indicates the partial decomposition of the compound. Modification of procedures for the preparation of substance allatram: suggested holding dried substance in an oven at a temperature not exceeding 60 °C. The study of three series of substances in compliance with the admissibility of evidence binders modified technique of synthesis, as well as the stability of the substance during storage.

Keywords: Allatram, amide N- allilantranilic acid, pharmaceutical analysis, modification of methods of synthesis.

Введение

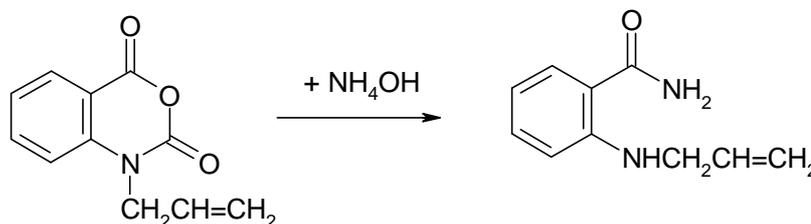
Аллатрам – амид N–аллилантраниловой кислоты – новое биологически активное соединение, обладающее противовоспалительным эффектом. Исследование фармакологической активности на разных моделях воспалений (карагениновой, серотониновой, гистаминовой и формалиновой) при внутрибрюшинном и пероральном введении показало, что амид N-аллилантраниловой кислоты не уступает диклофенаку

натрия, а по анальгетической и жаропонижающей активности проявляет эффект на уровне препарата сравнения, проявляет слабое ulcerогенное действие и является практически нетоксичным по классификации Сидорова [7,8].

В связи с рекомендацией к проведению доклинических испытаний нами проводятся исследования по разработке методов контроля качества и стандартизации субстанции [1,2,4].

Согласно литературным данным [9] амид N-аллилантраниловой кислоты впервые был получен взаимодействием N-аллилизатового ангидрида с раствором аммиака, который порциями приливали в течение 15 мин. Полученную суспензию разбавляли водой (50–100 мл) и перемешивали 15 ч:

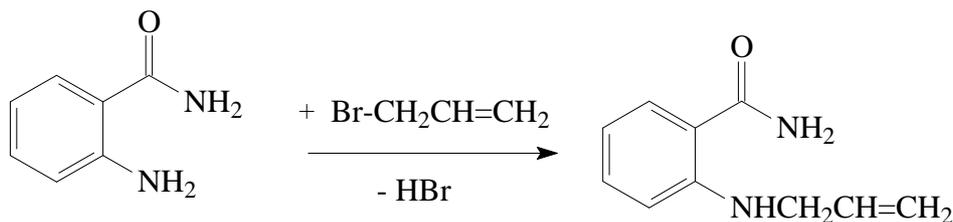
Схема 1



Выделившийся осадок отфильтровывали, промывали водой до нейтральной реакции среды, сушили под вакуумом при 50 °С, перекристаллизовывали из смеси циклогексана и этилацетата. Температура плавления соединения 145–146 °С.

Аллатрам получен нами реакцией алкилирования амида антраниловой кислоты бромистым аллилом при перемешивании в водной среде без нагревания (при комнатной температуре) в течение 1 ч [7,8]:

Схема 2



Полученное соединение представляет собой белый кристаллический порошок, который практически не растворим в воде, легко растворим в диметилформамиде и ацетоне, мало растворим в этаноле 96 % и хлороформе. Температура плавления 140–142 °С. Структура полученного соединения подтверждена данными ИК- (спектрометр «Specord M-80» в дисках с калия бромидом в области от 4000 до 400 см⁻¹), ЯМР¹H- (Фурье-спектрометр фирмы Tesla BS-567A (рабочая частота 100 МГц) в дейтерированном диметилсульфоксиде,

внутренний стандарт – ГМДС) и хроматомасс – спектров (хроматомасс-спектрометр «НР-6890» с МСД-5973 в хлороформе) [1,7]. Для обнаружения посторонней (специфической) примеси амида антралиловой кислоты в аллатраме предложены методы обращённо-фазной ВЭЖХ [6] и ТСХ [1,2]. Предельное содержание хлоридов, сульфатов и солей аммония определяют согласно требованиям Государственной фармакопеи [2,5].

Для разработки методик количественного определения нами проведен анализ исследуемой субстанции классическим и видоизмененным методом Къельдаля. Классический метод основан на сжигании соединения в присутствии концентрированной серной кислоты, а видоизменённый – на гидролизе амидной группы в щелочной среде. Полученные данные свидетельствуют, что оба варианта метода Къельдаля дают сопоставимые результаты, но проект ФС мы включили более простой в исполнении – видоизмененный метод Къельдаля [1,3,5].

Целью настоящей работы явилось изучение качества различных серий субстанции аллатрама для модификации методики синтеза указанного соединения.

Материалы и методы исследования

В исследованиях использовался высокоэффективный жидкостный хроматограф «Shimadzu LC Prominence» (Япония), оснащённый колонкой из нержавеющей стали (25см×4,6мм, сорбент Discovery® C18 с размером частиц 5 мкм) и диодноматричным детектором.

Разработанные условия хроматографического анализа:

- ✓ подвижная фаза: ацетонитрил - 0,1% раствор трифторуксусной кислоты (30:70);
- ✓ скорость потока подвижной фазы – 1 мл/мин;
- ✓ длина волны детектирования – 212 нм;
- ✓ объем вводимой пробы - 20 мкл;
- ✓ температура термостата колонки – 40 °С [4].

В методе ТСХ применялись пластинки «Сорбфил ПТСХ-П-В» (ТУ 26-11-17-89); подвижная фаза хлороформ: спирт этиловый 96 % (9:1). При определении данным методом субстанцию и примесь амида антралиловой кислоты растворяли в ацетоне, наносили на хроматографическую пластинку и хроматографировали восходящим способом. Затем пластинку сушили и обрабатывали парами йода в затемненной йодной камере в течение 10 мин. Отмечали появление желто-коричневых пятен [1,2].

Приготовление реактивов для определения примесей хлоридов, сульфатов и солей аммония в субстанции аллатрама и его количественного содержания проводили по методикам Государственной фармакопеи [5].

В работе использовали пять серий субстанции аллатрама, синтезированные на кафедре фармацевтической химии ФОО ПГФА в 2008-2012 гг. Все исследования выполнены не менее чем в трех повторностях.

Результаты исследований и их обсуждение

Проведен анализ двух серий субстанции аллатрама (серии 06.2008 и 04.2009), на соответствие требованиям ФС, полученных по методике: к раствору амида антраниловой кислоты в воде при постоянном перемешивании по каплям добавляли бромистый аллил при комнатной температуре в течение часа. Полученную смесь нейтрализовали карбонатом натрия до pH=7 по универсальной индикаторной бумаге. Образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали холодной водой 2 раза по 20 мл, сушили и перекристаллизовывали из смеси воды с этанолом (2:1). Перекристаллизованный осадок высушивали при температуре 90 °С в сушильном шкафу.

Полученные серии субстанции аллатрама исследовали по показателям ФС: «Посторонние примеси», «Хлориды», «Сульфаты», «Соли аммония», «Количественное определение». Результаты анализов приведены в таблице 1. Указанные серии субстанции не соответствуют требованиям стандарта по показателям «Посторонние примеси», «Соли аммония», «Количественное определение», что свидетельствует о частичном разложении (гидролизе) аллатрама, произошедшем при получении или хранении соединения.

Таблица 1

Результаты анализа 2-х серий субстанций аллатрама, полученных по ранее используемой методике

Серия	Посторонние примеси, определённые методом ТСХ	Общие примеси			Количественное определение, % (не менее 99,0)
		Хлориды	Сульфаты	Соли аммония	
06.2008	Не соотв.	Соотв.	Соотв.	Не соотв.	93,15±0,45
04.2009	Не соотв.	Соотв.	Соотв.	Не соотв.	93,15±0,45

В связи с завышенным содержанием солей аммония и заниженными результатами количественного содержания методика синтеза аллатрама была подвергнута модификации: изменены условия сушки субстанции, т.к. предположительно гидролиз мог пройти в процессе высушивания.

Установлено, что при использовании температурного режима 18–20 °С процесс высушивания занимал длительное время: 20–24 ч. Оптимальной явилась модифицированная

методика, при которой сушка проводится в сушильном шкафу при температуре, не превышающей 60 °С.

Полученные по модифицированной методике серии 12.2010, 11.2011, 10.2012 субстанции аллатрама исследованы на соответствие требованиям ФС. Результаты анализов (таблица 2) свидетельствуют о приемлемости модифицированной методики синтеза, а также об устойчивости субстанции в процессе хранения (не менее двух лет).

Таблица 2

Результаты анализа 3-х серий субстанций аллатрама, полученных по модифицированной методике

Серия	Дата анализа (месяц и год)	Посторонние примеси		Общие примеси			Количественное определение, % (не менее 99,0)
		Метод ТСХ	Метод ВЭЖХ	Хлориды	Сульфаты	Соли аммония	
12.2010	12. 2010	Соотв.	Не проводили	Соотв.	Соотв.	Соотв.	99,45±0,34
12.2010	12. 2011	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	99,58±0,48
12.2010	12. 2012	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	99,35±0,32
11.2011	11.2011	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	99,63±0,32
11.2011	11.2012	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	99,54±0,41
10.2012	10.2012	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	99,48±0,37

Выводы

1. Анализ двух серий субстанции аллатрама показал их несоответствие требованиям ФСП по показателям «Посторонние примеси», «Соли аммония», «Количественное определение», что свидетельствует о частичном разложении соединения.
2. Проведена модификация методики получения субстанции аллатрама: предложено проведение высушивания субстанции в сушильном шкафу при температуре, не превышающей 60 °С.
3. Исследование трех серий субстанции на соответствие требованиям ФСП свидетельствует о приемлемости модифицированной методики синтеза, а также об устойчивости субстанции в процессе хранения.

Список литературы

1. Басс, С.М. Разработка методов оценки качества субстанции амида N – аллилантраниловой кислоты / С.М. Басс [и др.] // Вестн. Рос. ун-та дружбы народов. Сер. Медицина. – № 4 . – 2010. – С. 165-167.
2. Басс, С.М. Разработка методик определения доброкачественности нового биологически активного амида N-аллилантраниловой кислоты / С.М. Басс [и др.] // Современные проблемы химической науки и образования, Чебоксары, 19–20 апр. 2012 г. – Т. 2. – Чебоксары, 2012. – С. 115-116.
3. Басс, С.М. Разработка методик количественного определения нового биологически активного амида N-аллилантраниловой кислоты / С.М. Басс и [и др.] // Вестн. Перм. гос. фармацев. акад. – 2010. – № 6. – С. 147-149.
4. Васильева, М.Ю. Биологическая активность производных N- замещенных антраниловых кислот и их амидов: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.25 / Васильева Марьяна Юрьевна. – Уфа, 2002. – 23 с.
5. Государственная фармакопея СССР: Вып. 1. Общие методы анализа / М-во здравоохранения СССР. – 11. изд., доп. – М.: Медицина, 1987. – 336 с.
6. Карпенко, Ю.Н. Разработка и валидация методики определения посторонней примеси в субстанции амида N–аллилантраниловой кислоты [Электронный ресурс] / Ю.Н. Карпенко [и др.] // Современные проблемы науки и образования: электрон. науч. журн. – 2013. – № 1. – Режим доступа: <http://www.science-education.ru/107-8511>.
7. Курбатов, Е.Р. Синтез, физико-химические свойства и биологическая активность амида N-аллилантраниловой кислоты / Е.Р. Курбатов [и др.] // Вестн. Рос. ун-та дружбы народов. Сер. Медицина. – № 4 . – 2010. – С. 295 -297.
8. Пат. 2180656. Амид N-аллилантраниловой кислоты, проявляющий противовоспалительную, анальгетическую и антигипоксическую активности / А.Б. Шакирова., Л.М. Коркодинова., М.Ю. Васильева [и др.]; Перм. гос. фармацев. акад. – № 2000119954; заявл. 26.07.00; опубл. 20.03.02; приор. 26.07.00 (Россия). – 3 с.
9. Vincent, M. 2-(Alkenylamino)benzamides and Related 1-(alkenyl)-4(1H)-quinazolinones as Analgetics and Antiinflammatories / M. Vincent, Jean-Glaude Poignant , G. Remond // Journal of Med. Chem. – 1971. – Vol. 14, № 8. – P. 714-717.

Рецензенты:

Гейн В.Л., д.х.н., профессор, заведующий кафедрой общей и органической химии ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России, г. Пермь.

Хомов Ю.А., д.х.н., профессор кафедры фармацевтической химии ФДПО и ФЗО ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России, г. Пермь.