

УДК 535.243; 547.7

<https://www.doi.org/10.34907/IPQAI.2025.45.98.003>

СИНТЕЗ И АНАЛИЗ НОВОГО ДИГИДРОКСИФЕНИЛЬНОГО ПРОИЗВОДНОГО О-БЕНЗОИЛАМИНОБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ, ОБЛАДАЮЩЕГО ВЫРАЖЕННОЙ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

И.П. Кодони́ди, доктор фарм. наук, профессор, зав. кафедрой фармацевтической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ставропольский край, г. Пятигорск

kodonidiip@mail.ru

А.Ю. Айрапетова, канд. фарм. наук, доцент кафедры фармацевтической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ставропольский край, г. Пятигорск

asyarpgfa@mail.ru

А.С. Чиряпкин, канд. фарм. наук, старший преподаватель кафедры фармацевтической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ставропольский край, г. Пятигорск

alexey.chiriapkin@yandex.ru

Л.В. Лигай, канд. фарм. наук, доцент кафедры органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ставропольский край, г. Пятигорск

ligay_59@mail.ru

В.М. Рукови́цина, канд. фарм. наук, доцент кафедры органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ставропольский край, г. Пятигорск

rukovitsina.vika@mail.ru

В настоящее время поиск и создание новых высокоэффективных и безопасных активных фармацевтических субстанций с целью получения инновационных жизненно важных лекарственных препаратов является актуальной задачей фармацевтической химии. С этой целью является целесообразным получение производного о-бензоиламинобензойной кислоты с остатком нейромедиатора дофамина. Для разработки лабораторного регламента нами рассмотрен предполагаемый механизм реакции, позволяющий модифицировать условия реакции получения целевого продукта. Синтез 2-бензоиламино-N-[2-(3,4-дигидроксифенил)этил]бензамида осуществлялся взаимодействием 2-фенилбензоксазинона-4 с дофамина гидробромидом в ледяной уксусной кислоте с прибавлением небольшого количества диметилсульфоксида в качестве реагента, увеличивающего нуклеофильность аминной компоненты. Полученное соединение следует рассматривать как ациклический предшественник производного хиназолинона-4. Возможно,

что полученная нециклическая структура, имеющая большую конформационную подвижность, обладает увеличенным сродством к биосубстрату. Соответственно, для контроля селективного прохождения реакции в направлении ациклического производного следует разработать оптимальные условия качественного определения вещества с помощью цветных характерных химических реакций на функциональные группы, что и выполнено в ходе данной научной работы. Исходя из уравнения градуировочного графика, определено количественное содержание соединения спектрофотометрическим методом анализа. Проведена валидационная оценка разработанной методики, которая соответствует требованиям ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик».

Ключевые слова: о-бензоиламинобензойная кислота, 2-фенилбензоксазинон-4, механизм реакции, противовоспалительная активность, качественный анализ, количественный анализ, спектрофотометрия, валидация

В фармацевтической химии существует множество подходов, позволяющих осуществлять поиск новых биологически активных соединений (БАС), однако наиболее перспективным является молекулярное моделирование виртуальных структур с заданными фармакологическими свойствами. Одним из таких подходов является конструирование БАС на основе эндогенных соединений или структур апробированных лекарственных препаратов [1,2]. Основываясь на таком подходе к молекулярному моделированию, предлагается использовать фрагмент нейромедиатора дофамина, связанный с ациклическими предшественниками хиназолинона-4 и амидом N-бензоиламинобензойной кислоты. Эти группы соединений обладают разнообразной биологической активностью в сочетании с низкой токсичностью, поэтому их синтез является весьма перспективным [3–5].

В качестве экономически выгодного и экологически безопасного метода синтеза амидов о-бензоиламинобензойной кислоты является взаимодействие 2-фенилбензоксазинона-4 с дофамином в среде ледяной уксусной кислоты с прибавлением небольшого количества диметилсульфоксида. Использование диметилсульфоксида вполне оправданно, поскольку это вещество применяется в ряде лекарственных средств, что является важным для получения активной фармацевтической субстанции без минимальных остатков токсичных растворителей [6–8]. Зачастую реакция протекает с образованием смеси трудноразделимых амидов и производных 2-фенилхиназолинона-4. Соответственно, для модификации условий реакции, позволяющей проводить синтез более селективно, нами рассмотрен предполагаемый механизм. Первичный фармакологический скрининг показал выраженную противовоспалительную активность, превосходящую классический препарат диклофенак [4]. Это послужило основанием для разработки качественного и количественного определения целевого продукта.

Цель исследования — модифицировать условия синтеза и разработать методику качественного и количественного анализа нового дигидроксифенильного производного о-бензоиламинобензойной кислоты для создания активной фармацевтической субстанции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования выбран 2-бензоиламино-N-[2-(3,4-дигидроксифенил)этил] бензамид (7), полученный путем взаимодействия

2-фенилбензоксазинона-4 с дофамином гидробромидом в среде ледяной уксусной кислоты, используя в качестве катализатора диметилсульфоксид (ДМСО). *Методика:* Смесь 2,23 г (0,01 моль) 2-фенил-3,1-бензоксазинона-4 и 2,34 г (0,01 моль) 2-(3,4-дигидроксифенил) — этиламина гидробромида растворяют при нагревании в 5,0 мл ледяной уксусной кислоты с прибавлением эквимолярного количества ацетата натрия. Затем в реакционную смесь добавляют 0,5 мл ДМСО и кипятят в течение полутора часов. В результате синтеза получается бензоиламино-N-[2-(3,4-дигидроксифенил)этил] бензамид. После смесь выливают в 100 мл диэтилового эфира. При охлаждении раствора выпадает в осадок продукт, который отфильтровывают, сушат и перекристаллизовывают из спирта.

Определение содержания вещества осуществлялось с помощью спектрофотометрии в ультрафиолетовой части спектра. Для этого точная навеска вещества массой 30 мг была отвешена в мерную колбу объемом 100 мл. Затем добавили 40 мл 96% этилового спирта и тщательно перемешивали до полного растворения. После этого объем раствора довели до 100 мл тем же спиртом, получив раствор А. Затем из раствора А отбирали 2 мл и переносили в мерную колбу объемом 50 мл. Этот раствор также довели до метки 96% этиловым спиртом. Полученный раствор подвергался спектральному анализу в диапазоне длин волн от 200 до 400 нм.

Валидация методики проводилась по критериям линейности, прецизионности и правильности. Для формирования градуировочной кривой были приготовлены серии растворов путем последовательного отбора 1, 2, 3, 4, 5 и 6 мл раствора А. Каждая аликвота переносилась в мерную колбу объемом 50 мл, и объем мерной колбы доводился до метки 96% этиловым спиртом. Измерение оптической плотности каждого приготовленного раствора осуществлялось при длине волны 270 нм. Полученные экспериментальные данные были представлены в виде градуировочной кривой с нанесенной линией тренда, ее аналитическим выражением и значением коэффициента корреляции. На основании полученных данных строилась градуировочная кривая, отражающая зависимость оптической плотности вещества 7 от его концентрации. Количественное определение соединения 7 выполнялось с использованием уравнения, полученного для данной градуировочной кривой.

Критерием для оценки достоверности полученных результатов служила открываемость (R), являющаяся наиболее наглядным показателем. В процессе проведения анализа было зафиксиро-

вано 9 значений открываемости. Статистическая обработка полученных данных включала расчет стандартных и относительных стандартных отклонений. Для проведения данного анализа использовались навески растворов, приготовленных на 3 уровнях концентрации: 0,0006% (I), 0,0018% (II) и 0,0030% (III).

Идентификация соединения проводилась с использованием цветных химических реакций (реактив Бушарда, реактив Зонненштейна, раствор железа (III) хлорид, реакция азосочетания), направленных на выявление функциональных групп. Определение органолептических свойств, растворимости и температуры плавления синтезированного соединения выполняли в соответствии с методиками ГФ XV издания.

Процедура идентификации вещества 7 методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) включала следующие этапы. Для приготовления аналитического раствора брали около 0,02 грамма исследуемой субстанции и помещали ее в мерную колбу объемом 10 мл. Затем добавляли 7 мл 96% этилового спирта, добиваясь полного растворения. После это-

го объем раствора доводили до метки с помощью того же спирта и тщательно перемешивали. Для нанесения на хроматографическую пластинку Sorbfil-ПТСХ-А-УФ (ООО «ИМИД», Россия) использовали 200 микрограммов полученного спиртового раствора, нанося его на стартовую линию. После высыхания нанесенного пятна пластинку помещали в хроматографическую камеру, заполненную этиловым спиртом, под углом 80–90 градусов к поверхности подвижной фазы. Когда растворитель проходил расстояние в 10 см до финишной линии, пластинку извлекали. Далее ее высушивали при комнатной температуре до полного исчезновения запаха растворителя, после чего проводили визуализацию в ультрафиолетовом свете при длине волны 254 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью модификации условий синтеза целевого продукта предлагается механизм прохождения реакции в среде ледяной уксусной кислоты (**рис. 1**). Выбор ледяной уксусной кис-

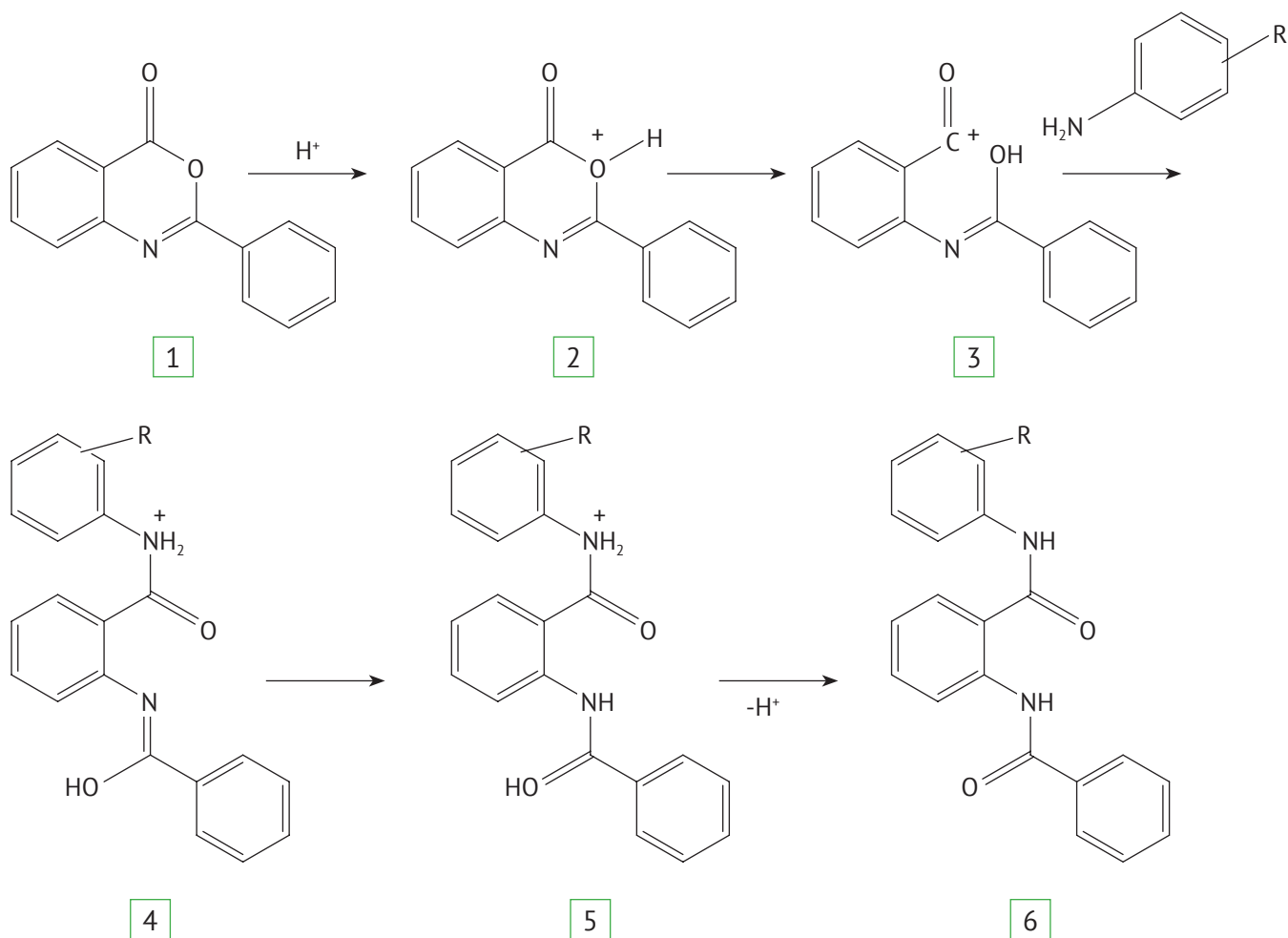


РИС. 1. Механизм образования амидов *о*-бензоиламинобензойной кислоты

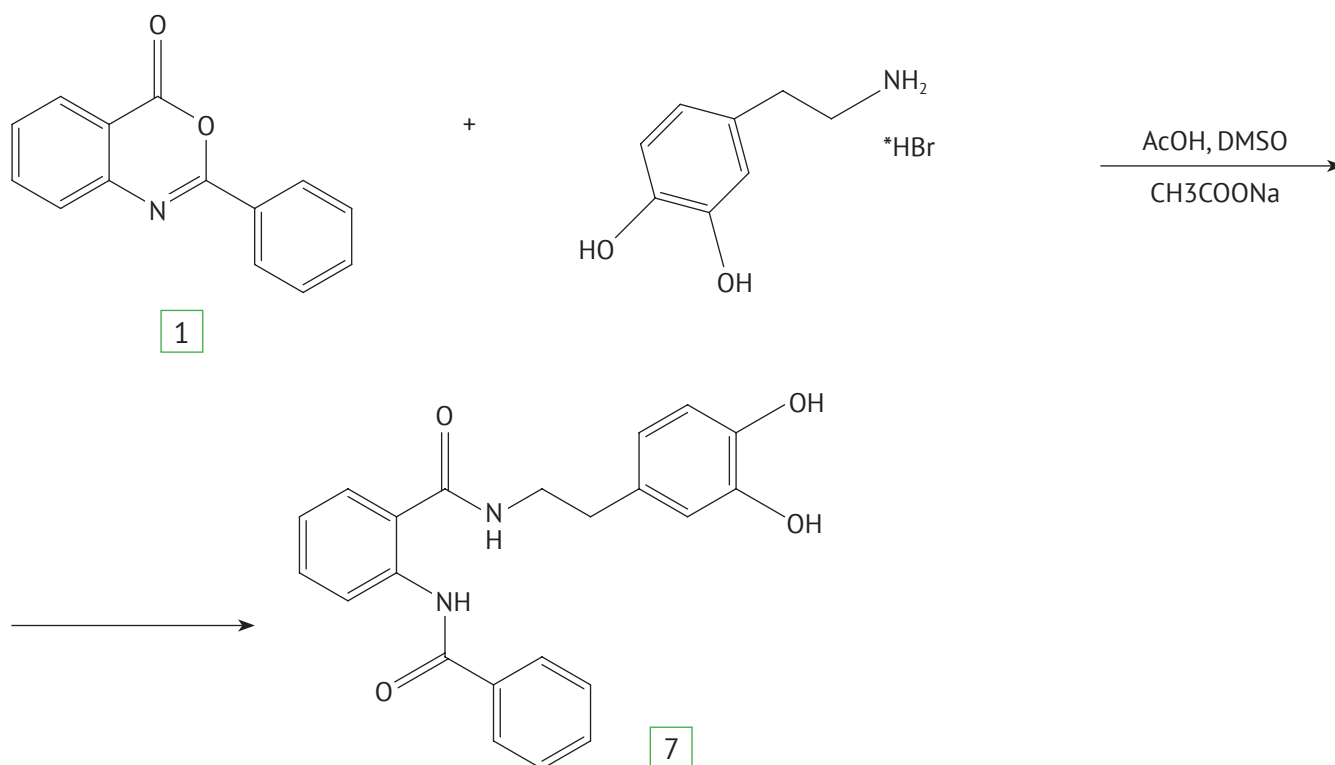


РИС. 2. Схема синтеза 2-бензоиламино-N-[2-(3,4-дигидроксифенил)этил]бензамида

лоты в качестве реакционной среды оправдан тем, что позволяет осуществлять процесс в условиях кислотного катализа. Использование более сильных кислот приводит к протонированию амина и дезактивированию его нуклеофильных свойств. На первой стадии происходит протонирование гетероатома кислорода 2-фенил-3,1-бензоксазинона-4 (1), что далее приводит к раскрытию цикла и образованию карбкатиона (2) (рис. 1). Предполагается, что на следующем этапе образуется ациклический карбкатион (3), который подвергается нуклеофильной атаке ароматическим амином с формированием протонированного неустойчивого аддукта (4), переходящего в более устойчивый амид (5). Завершающим этапом реакции предполагается депротонированная промежуточная структура (5) с образованием целевого продукта (6).

Получение 2-бензоиламино-N-[2-(3,4-дигидроксифенил)этил] бензамида протекает взаимодействием 2-фенил-3,1-бензоксазинона-4 (1) с 2-(3,4-дигидроксифенил)-этиламина гидробромидом согласно химизму, представленному на рис. 2. В качестве полярного апротонного растворителя использовался диметилсульфоксид, который усиливает нуклеофильные свойства ароматического амина 2-(3,4-дигидроксифенил)-этиламина гидробромид после его депротонирования и перевода в основание. Реакция протекает с образованием минорного количества циклического производного, что потребовало разработки аналитических методик (качественных и количественных) для мониторинга селективности и определения целевого соединения.

В табл. 1 обобщены данные по органолептическим характеристикам, температуре плавления

Таблица 1

ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ, РАСТВОРИМОСТЬ И ТЕМПЕРАТУРА ПЛАВЛЕНИЯ

Определяемая характеристика	Результат испытания
Описание	Светло-желтый кристаллический порошок, без запаха
Растворимость	Малорастворим в этаноле, практически нерастворим в воде, эфире, хлороформе
Температура плавления	219–220°C

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ С ПОМОЩЬЮ ЦВЕТНЫХ ХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

Наименование реактива	Реакция Бушарда	Реакция Зонненштейна	Раствор железа (III) хлорида	Реакция азосочетания
Вещество 7	Коричневый осадок	Желтый осадок	Зеленое окрашивание	Красное окрашивание

субстанции 7 и растворимости в различных растворителях.

Результаты идентификации, основанной на применении цветных химических реакций, приведены в **табл. 1**. Экспериментальные данные подтверждают наличие в анализируемой структуре фенольных групп и третичного атома азота (**табл. 2**).

В ходе тонкослойной хроматографии было обнаружено, что после облучения УФ-светом с длиной волны 254 нм на хроматограмме визуализировалось одно пятно темно-фиолетового цвета. Его коэффициент удерживания (R_f) составил $0,85 \pm 0,02$. Параллельно был получен УФ-спектр поглощения спиртового раствора субстанции 7, который характеризовался четырьмя основными пиками в областях 210, 230, 270 и 310 нм, что подтверждается данными, представленными на **рис. 3**.

Следующим шагом стала разработка методики количественного определения вещества с использованием спектрофотометрии. Первостепенной задачей было установление прямо пропорциональной зависимости между оптической плотностью раствора, измеренной при 270 нм, и его концентрацией. Для иллюстрации этой зависимости

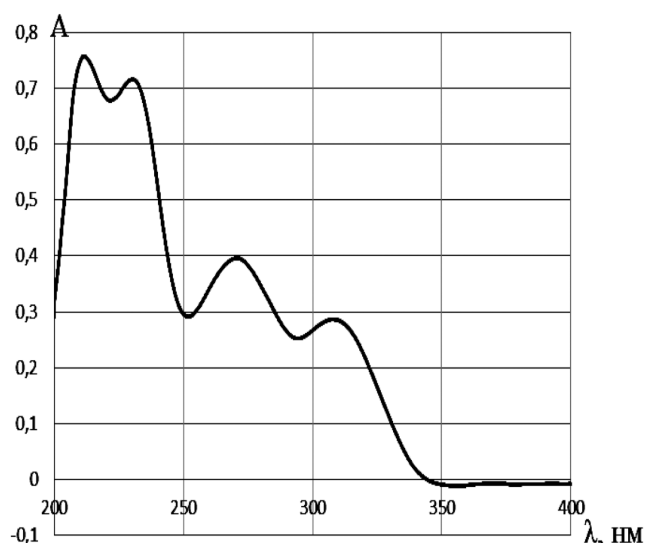


РИС. 3. УФ-спектр поглощения спиртового раствора субстанции 7

на **рис. 4** приведены УФ-спектры растворов, полученные при различных концентрациях.

По полученным данным строили градуировочный график зависимости оптической плотности от концентрации (**рис. 5**). Рассчитанное уравнение представлено в виде: $y = 328,52x - 0,0074$. По полученным данным рассчитывали коэффициент корреляции, который составил $R = \sqrt{0,9997} = 0,998$. Установлено, что методика линейна.

Данные о количественном содержании целевого компонента в субстанции 7, полученные в ходе анализа, отражены в **табл. 3**. Для расчета использовался градуировочный график.

Оценка повторяемости проводилась путем выполнения как минимум девяти определений концентраций, находящихся в пределах рабочего диапазона аналитической методики. Для этого были

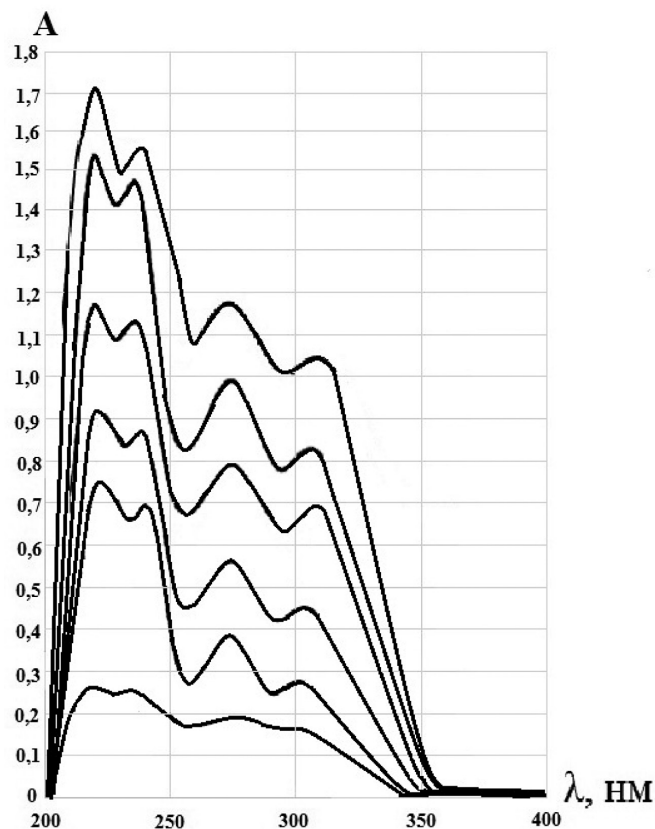


РИС. 4. УФ-спектры поглощения растворов вещества 7 при определении линейности

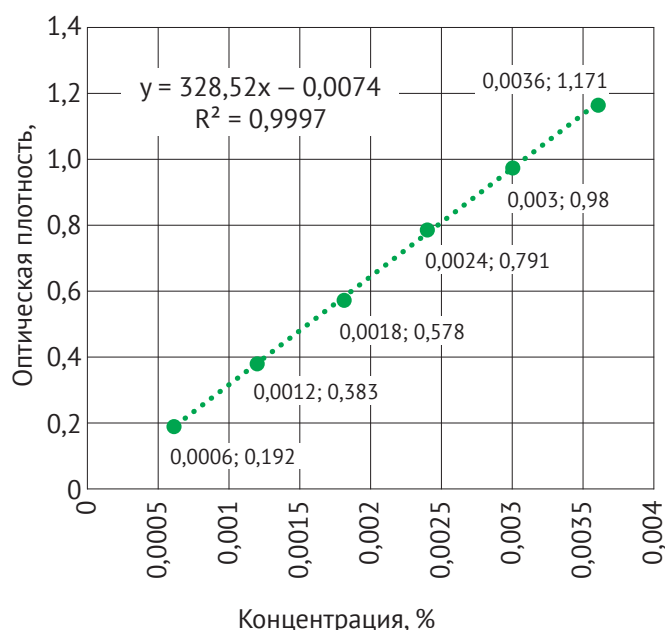


РИС. 5. Градуировочный график зависимости оптической плотности от концентрации

выбраны три концентрации, каждая из которых была измерена в трех повторностях. Результаты определения правильности изложены в **табл. 4**.

По результатам проведенных экспериментов значение открываемости (R) было зафиксировано на уровне 100,3. Этот показатель полностью соответствует установленным требованиям аналитических методик. Для оценки точности методики был рассчитан коэффициент Стьюдента. Его вычисленное значение составило 0,560, что значительно меньше табличного значения $t_{\text{табл}}$, равного 2,36 для 9 опытов. Поскольку вычисленное значение меньше табличного ($t_{\text{выч}} < t_{\text{табл}}$ (P, f)), это указывает на отсутствие систематических ошибок

Таблица 3

РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРЕЦИЗИОННОСТИ

№	Оптическая плотность	Содержание, %	Метрологические характеристики при $P = 95\%$
1	0,5054	99,88	$\bar{X} = 99,83$ $SD = 0,392$ $S_{\bar{x}} = 0,160$ $RSD = 0,39\%$ $\Delta\bar{x} = 0,41$ $\varepsilon = \pm 1,09\%$
2	0,4031	99,32	
3	0,4051	99,83	
4	0,4075	100,42	
5	0,4038	99,50	
6	0,4060	100,05	

Таблица 4

РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРАВИЛЬНОСТИ

C, %	A	X, %	R, %
I уровень			
0,0006%	0,215	93,88	99,05
0,0006%	0,210	91,05	96,93
0,0006%	0,217	95,01	101,15
II уровень			
0,0018%	0,551	94,63	100,75
0,0018%	0,553	95,01	101,15
0,0018%	0,541	92,75	98,74
III уровень			
0,0030%	0,882	94,22	101,31
0,0030%	0,892	95,35	101,51
0,0030%	0,898	96,02	102,23
		Хср. = 99,70	R = 100,30

при определении соединения и подтверждает высокую точность разработанной методики.

ВЫВОДЫ

Осуществлен целенаправленный синтез 2-бензоиламино-N-[2-(3,4-дигидроксифенил)этил]бензамида с модификацией условий проведения реакции согласно предложенному механизму. Проведена идентификация нового синтезированного вещества 2-бензоиламино-N-[2-(3,4-дигидроксифенил)этил]бензамида с помощью качественных реакций и методов ТСХ. На основе градуировочного графика было рассчитано количественное содержание соединения. После проведения валидационной оценки по фармакопейным показателям было установлено, что методика является валидной.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Aleo M.D., Shah F., Allen S. et al. Moving beyond binary predictions of human drug-induced liver injury (DILI) toward contrasting relative risk potential // Chem.Res. Toxicol. 2020; 33: 223–238. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.9b00262

2. Deore A.B., Dhumane J.R., Wagh R. et al. The Stages of Drug Discovery and Development Process // *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*. 2019; 7(6): 62–67. DOI: 10.22270/ajprd.v7i6.616
3. Channer B., Matt S.M., Nickoloff-Bybel E.A. et al. Dopamine, Immunity, and Disease. *Pharmacol. Rev.* 2023; 75(1): 62–158. DOI: 10.1124/pharmrev.122.000618
4. Луговой И.С., Кодониди И.П., Сергеева Е.О. и др. Исследование противовоспалительной активности новых производных 1,3-диазинона-4 и их ациклических предшественников, полученных на основе дофамина // *Журнал научных статей «Здоровье и образование в XXI веке»*. 2017; 19(3): 140–143.
5. Melcangi R.C. Commentary: Neuroactive steroids and the dopaminergic system // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2025;176:106298. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2025.106298
6. Кодониди И.П., Золотых Д.С., Смирнова Л.П. и др. Синтез N-замещенных амидов о-бензоиламинобензойной кислоты // *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*. 2012, с. 36–38.
7. Кодониди И.П., Оганесян Э.Т., Золотых Д.С. и др. N-производные хиназолинона-4 и их ациклические предшественники: синтез и взаимосвязь структура – психотропная активность // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2012; 4: 27–33.
8. Кодониди И.П., Боровский Б.В., Коваль Н.О. и др. Оптимизированный синтез производного о-бензоиламинобензойной кислоты – 2-бензоиламино-N-[4-(4,6-диметилпиримидин-2-илсульфамойл)фенил]-бензамида, обладающего анксиолитической активностью // *Химико-фармацевтический журнал*. 2021; 55(9): 49–53. DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-9-49-53.

SYNTHESIS AND ANALYSIS OF A NEW DIHYDROXYPHENYL DERIVATIVE OF O-BENZOYL AMINO BENZOIC ACID WITH PRONOUNCED ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY

I.P. Kodonidi, A.Yu. Ayrapetova, A.S. Chiryapkin, L.V. Ligai, V.M. Rukovitsyna

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of the Volgograd State Medical University, Stavropol Region, Pyatigorsk, Russia

Currently, the search and creation of new highly effective and safe active pharmaceutical substances in order to obtain innovative vital medicines is an important task of pharmaceutical chemistry. For this purpose, it is advisable to obtain a derivative of o-benzoyl aminobenzoic acid with a residue of the neurotransmitter dopamine. To develop laboratory regulations, we considered the proposed reaction mechanism that allows us to modify the reaction conditions for obtaining the target product. The synthesis of 2-benzoyl amino-N-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl]benzamide was carried out by the interaction of 2-phenylbenzoxazinone-4 with dopamine hydrobromide in glacial acetic acid with the addition of a small amount of dimethyl sulfoxide as a reagent increasing the nucleophilicity of the amine component. The resulting compound should be considered as an acyclic precursor of the quinazolinone-4 derivative. It is possible that the resulting non-cyclic structure, which has a high conformational mobility, has an increased affinity for the biosubstrate. Accordingly, in order to control the selective passage of the reaction in the direction of the acyclic derivative, optimal conditions for the qualitative determination of the substance should be developed using color characteristic chemical reactions to functional groups, which was carried out in the course of this scientific work. Based on the equation of the calibration graph, the quantitative content of the compound was determined by the spectrophotometric analysis method. A validation assessment of the developed methodology has been carried out, which meets the requirements of the general pharmacopoeia article 1.1.0012 "Validation of analytical techniques".

Keywords: o-benzoyl aminobenzoic acid, 2-phenylbenzoxazinone-4, reaction mechanism, anti-inflammatory activity, qualitative analysis, quantitative analysis, spectrophotometry, validation