

УДК 547.551.42:543.544.5.068.7:615.22

## СИНТЕЗ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРАТА 2-МЕТИЛАНИЛИДА *N,N*-ДИЭТИЛАМИНОУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

© 2019 г. Л. А. Чекрышкина<sup>a</sup>, А. М. Дёмин<sup>b,\*</sup>, А. А. Тумашов<sup>b,c</sup>,  
Е. А. Бабилова<sup>d</sup>, Н. В. Слепова<sup>a</sup>

<sup>a</sup> ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия Минздрава России»,  
614990, Россия, г. Пермь, ул. Полевая 2

<sup>b</sup> ФГБУН «Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН»,  
620990, Россия, г. Екатеринбург, ул. С. Ковалевской 22/20

<sup>c</sup> ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет», Институт естественных наук и математики,  
620002, Россия, г. Екатеринбург, ул. Мира 19

<sup>d</sup> ГБПОУ «Свердловский областной медицинский колледж (Фармацевтический филиал)»,  
620014, Россия, г. Екатеринбург, ул. Бебеля 71  
\*e-mail: demin@ios.uran.ru

Поступила в редакцию 15 апреля 2019 г.  
После доработки 14 августа 2019 г.  
Принята к публикации 15 августа 2019 г.

Оптимизирован метод синтеза нитрата 2-метиланилида *N,N*-диэтиламиноэтановой кислоты (мономекаин), обладающего выраженными антиаритмическими свойствами. Разработана методика установления подлинности мономекаина и контроля чистоты исследуемого соединения в субстанции с использованием метода ВЭЖХ, установлен предел обнаружения примеси *o*-толуидина в образцах субстанции мономекаина, который составил 0.02%. Для количественного определения содержания основного вещества в субстанции мономекаина разработаны методики ВЭЖХ и экстракционного титрования и проведена их валидация. Величина относительного стандартного отклонения (RSD) для мономекаина свидетельствует о хорошей специфичности, линейности, прецизионности и правильности разработанных методик.

**Ключевые слова:** мономекаин, синтез, ВЭЖХ, экстракционное титрование, валидация.

**DOI:** 10.1134/S0514749219100112

Заболевания сердечно-сосудистой системы занимают по летальности одно из первых мест в мире. Согласно статистическим данным, каждый тринадцатый гражданин РФ страдает той или иной патологией сердца или сосудов, а смертность от сердечно-сосудистых заболеваний в России составляет 53% от всех летальных исходов. Указанные заболевания, как правило, сопровождаются аритмией – нарушениями сердечного ритма, которые могут усугублять течение основного заболевания. Хотя арсенал лекарственных антиаритмических средств достаточно велик, многие из них имеют нежелательные побочные эффекты, поэтому разработка и внедрение в медицинскую практику новых антиаритмических лекарственных средств

является актуальной задачей [1, 2]. С этой целью исследуются соединения, относящиеся к различным классам. Наиболее распространённый класс анестезирующих и антиаритмических соединений составляют производные *N*-фенилацетамида и амидов ароматических карбоновых кислот [3–11], среди которых самым известным препаратом является лидокаин [12]. Отдельный интерес представляют соли 2-метиланилида *N,N*-диэтиламиноуксусной кислоты с неорганическими кислотами. Способ получения гидрохлорида 2-метиланилида *N,N*-диэтиламиноуксусной кислоты описан в работах [9, 13]. Впоследствии были синтезированы различные соли 2-метиланилида *N,N*-диэтиламиноуксусной кислоты с  $\text{HBr}$ ,  $\text{HI}$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  [9] и салицилат

**Таблица 1.** Антиаритмическая активность солей 2-метиланилида *N,N*-диэтиламиноуксусной кислоты.

Соединение	ЛД <sub>50</sub> , мг·кг <sup>-1</sup>	ЭД <sub>50</sub> , мг·кг <sup>-1</sup>	Антиаритмический индекс ЛД <sub>50</sub> /ЭД <sub>50</sub>
Нитрат 2-метиланилида <i>N,N</i> -диэтиламиноуксусной кислоты (мономекаин)	65.0 (56–75)	1.4 (1.2–1.7)	46.4
Гидрохлорид 2-метиланилида <i>N,N</i> -диэтиламиноуксусной кислоты	46.0 (33–60)	1.4 (1.1–1.7)	32.8
Гидробромид 2-метиланилида <i>N,N</i> -диэтиламиноуксусной кислоты	81.5 (71–84)	17.8 (15–21)	4.6
Гидроидрид 2-метиланилида <i>N,N</i> -диэтиламиноуксусной кислоты	60.0 (48–74)	35.5 (29–42)	1.7
Дигидрофосфат 2-метиланилида <i>N,N</i> -диэтиламиноуксусной кислоты	44.7 (37–59)	20.5 (18–24)	2.2
Лидокаин <sup>a</sup>	39.5 (34–45)	7.7 (6–9)	5.1

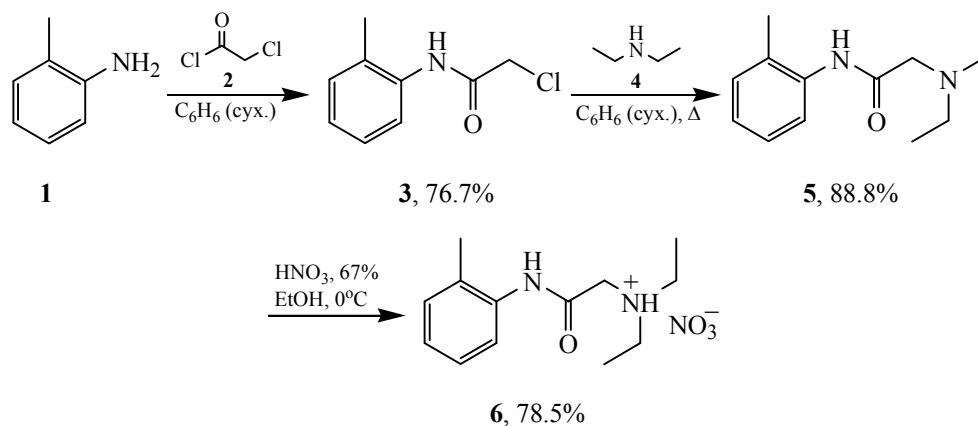
<sup>a</sup> Структурный аналог мономекаина, применяющийся в качестве антиаритмического лекарственного средства.

2-метиланилида морфолинуксусной кислоты [10]. Была изучена антиаритмическая активность, показана перспективность дальнейшего исследования данного класса соединений для внедрения в медицинскую практику. Как потенциальное антиаритмическое средство представляет интерес нитрат 2-метиланилида *N,N*-диэтиламиноуксусной кислоты, получивший условное название мономекаин. Установлено, что он проявил наиболее выраженную активность среди выше указанных солей 2-метиланилида *N,N*-диэтиламиноуксусной кислоты (табл. 1) [9–11], поэтому его можно рассматривать как потенциальное лекарственное средство антиаритмического действия.

На доклиническом этапе исследования биологической активности соединения необходима его стандартизация, предполагающая разработку способа получения, гарантирующего высокую чистоту полученного соединения, эффективных способов оценки его качества в субстанции и создаваемых

лекарственных формах, методик его анализа в биологических средах. Удобные методы контроля его чистоты в субстанции, приемлемые для разработки государственной фармакопейной статьи на лекарственную форму, в литературе не представлены. Поэтому целью данного исследования являлась оптимизация метода синтеза нитрата 2-метиланилида *N,N*-диэтиламиноуксусной кислоты, разработка методики установления его подлинности и чистоты методом ВЭЖХ и количественное определение его содержания в лабораторных сериях полученных субстанций методами ВЭЖХ и экстракционного титрования.

Ранее 2-метиланилид *N,N*-диэтиламиноуксусной кислоты (как ключевое соединение в синтезе мономекаина) получали ацилированием *o*-толуидина хлорацетилхлоридом в ледяной уксусной кислоте или в ацетоне (двухступенчатая методика) [13]. В данной работе методика была упрощена: реакция ацилирования проводилась в одну стадию в аце-

**Схема 1.**

тоне или бензоле с добавлением к *o*-толуиду (1) 1-, 1.5- или 2-кратного мольного избытка хлор-ацетилхлорида (2) (схема 1). Показано, что максимальный выход достигается при проведении реакции в бензоле (осушенном над Na) с использованием 1.5-кратного мольного избытка хлор-ацетилхлорида 2. Установлено, что реакция ацилирования протекала практически в момент смешивания реагентов: после добавления хлор-ацетилхлорида 2 к раствору *o*-толуидина 1 сразу же выпадал белый осадок, следов исходного амина при этом обнаружить не удалось. На втором этапе проводили аминирование 2-метиланилида хлоруксусной кислоты 3 диэтиламином 4, а мономекаин 6 был получен после добавления по каплям концентрированной HNO<sub>3</sub> к раствору 2-метиланилида *N,N*-диэтиламиноуксусной кислоты 5 в EtOH при 0°C. Чистоту и строение синтезированных соединений подтверждали данными спектров <sup>1</sup>H ЯМР, элементного анализа, ВЭЖХ, ТСХ.

Согласно современным требованиям, при оценке качества лекарственных средств актуальными являются хроматографические методы, которые могут использоваться на разных стадиях анализа субстанций и лекарственных форм [14–16]. Для контроля чистоты мономекаина в проект фармакопейной статьи нами предложена методика с использованием метода ВЭЖХ. Поскольку мономекаин и основные возможные родственные примеси [*o*-толуидин (1) и 2-метиланилид хлоруксусной кислоты (3)] являются полярными соединениями, применение обращённо-фазовой ВЭЖХ представлялось более предпочтительным. На первом этапе исследования были найдены хроматографические условия для анализа мономекаина и вышеуказанных примесей (рис. 1).

Показано, что полученные по разработанной методике синтеза мономекаин и 2-метиланилид хлоруксусной кислоты не содержали родственных примесей. На следующем этапе с целью установления предела количественного определения возможной примеси *o*-толуидина в образцах субстанции мономекаина был проведен анализ модельных растворов мономекаина, содержавших 0.01 и 0.02% *o*-толуидина.

Найденные хроматографические условия позволили успешно решить эту задачу ввиду значительного разрешения между пиками основного вещества и примеси (*R* = 8.8). Показано, что величина пика 0.01% *o*-толуидина на хроматограмме

первого модельного раствора несущественно отличалась от уровня шумов, тогда как в случае 0.02% раствора *o*-толуидина соотношение сигнал/шум (*S/N*) составило 10.4 (рис. 1в). Таким образом, в соответствии с ОФС.1.1.0012.15 [14] предел количественного определения примеси *o*-толуидина

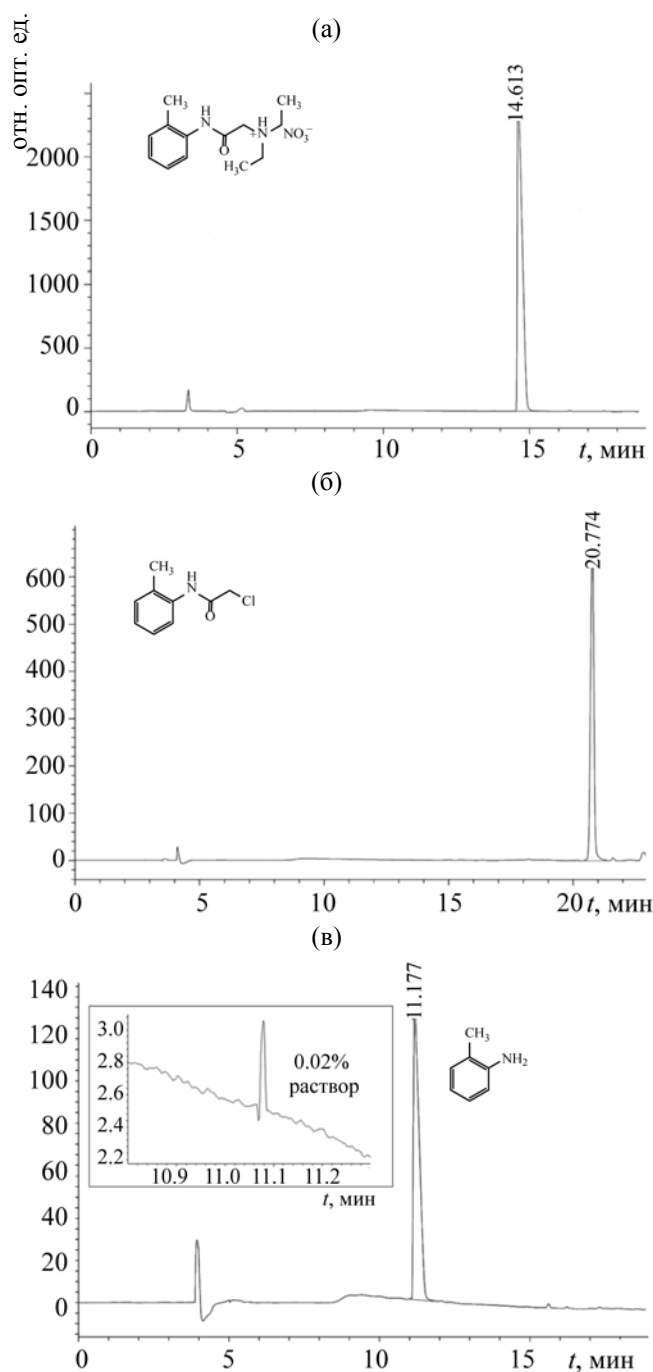


Рис. 1. Хроматограммы ВЭЖХ: (а) мономекаина, (б) 2-метиланилида хлоруксусной кислоты, (в) 1 и 0.02% раствора *o*-толуидина (во вставке). По оси абсцисс – время, мин, по оси ординат – интенсивность сигнала, отн. опт. ед.

методом ВЭЖХ в образцах мономекаина был принят равным 0.02%. Анализ 4 лабораторных серий мономекаина, выполненный по разработанной методике, выявил отсутствие примеси о-толуидина в исследуемых образцах. Данная методика также пригодна и для испытания мономекаина на подлинность из-за существенной разницы во времени удерживания мономекаина и родственных соединений.

Для количественного определения вышеуказанного биологически активного соединения (БАС) в субстанции и потенциальных лекарственных формах, разрабатываемых на стадии доклинических исследований, изучение метаболизма и фармакокинетики, возможности применения метода

ВЭЖХ также представлялось перспективным. Известно, что для использования методики ВЭЖХ в фармакокинетических исследованиях лекарственных форм мономекаина или для разработки государственной фармакопейной статьи на его лекарственную форму необходима оценка её пригодности [15–17]. Поэтому в данной работе была выполнена валидация методики количественного определения содержания основного вещества в субстанции мономекаина. Для этого получали хроматограммы ВЭЖХ растворов мономекаина в различных концентрациях, а также холостой пробы (без добавления мономекаина) (рис. 2). Валидацию аналитической методики количественного определения содержания мономекаина в субстанции проводили по следующим характеристикам: специфичность, линейность, аналитическая область, прецизионность и правильность.

Для определения специфичности проводили анализ подвижной фазы, используемой для приготовления испытуемых растворов субстанции мономекаина. На хроматограмме образца подвижной фазы не наблюдали пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания анализируемого БАС (рис. 2в).

Для оценки линейности строили калибровочный график (рис. 3) с использованием растворов субстанции мономекаина в 5 различных концентрациях: 0.001, 0.0107, 0.0535, 0.214 и 1.07 мг/мл. Каждый раствор анализировали по описанной выше методике в 3 параллелях. Установлено, что зависимость площади хроматографического пика от концентрации мономекаина в указанном диапазоне концентраций линейна. Значение коэффициента корреляции составляет 0.9997, а калибровочный график описывается уравнением:

$$y = 26859.6 \cdot x + 131 \quad (1)$$

Аналитическую область методики определяли в интервале от 80 до 120% от концентрации исследуемого вещества 1.00 мг/мл, принятой за 100%.

Для оценки прецизионности проводили статистическую обработку результатов определения концентраций мономекаина в разные рабочие дни. Для этого выполняли анализ 3 модельных смесей, содержавших субстанцию мономекаина в различных концентрациях – 80, 100, 120% от допустимого содержания, что составляло 0.80, 1.00 и 1.20 мг/мл, соответственно.

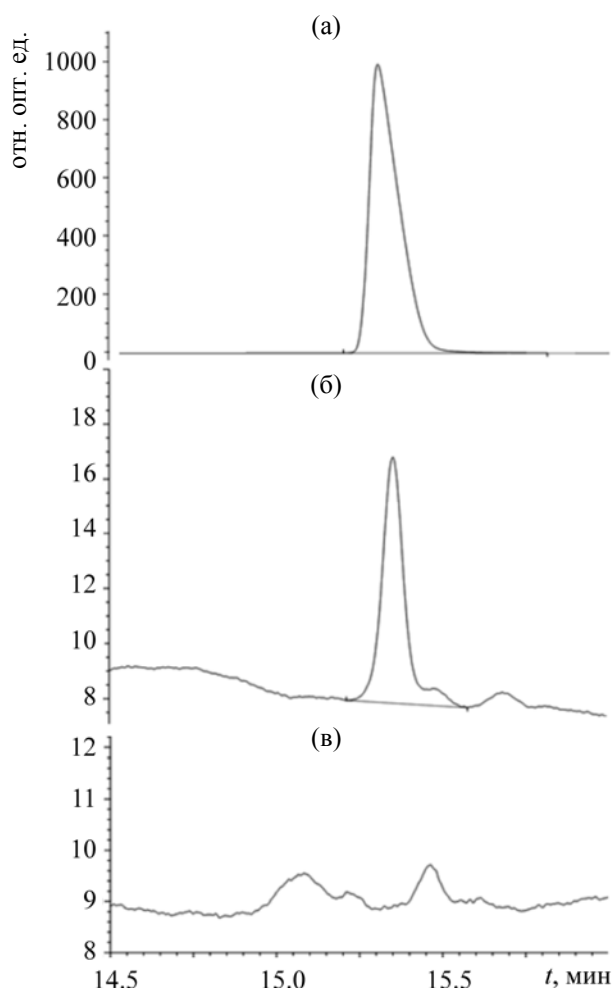


Рис. 2. Хроматограммы ВЭЖХ растворов мономекаина (б) в концентрации: (а) 214 мкг/мл и (б) 2 мкг/мл, а также (в) холостой пробы, не содержащей мономекаина. По оси абсцисс – время, мин, по оси ординат – интенсивность сигнала, отн. опт. ед.

Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины стандартного отклонения ( $S_{\delta}$ ) и относительного стандартного отклонения ( $S_{\delta \text{ сред}}$ ). Величина относительного стандартного отклонения результатов количественного определения содержания мономекаина в субстанции не превышала 3% (табл. 2), что свидетельствует о соответствии разработанной методики требуемым критериям приемлемости.

Правильность методики оценивали на основании статистической обработки результатов анализа 3 лабораторных образцов субстанции мономекаина. Рассчитывали и сравнивали с табличными значения критерия Стьюдента ( $t$ ) при числе степеней свободы  $f = L - 1 = 4$  и доверительной вероятности  $P = 0.95$ . Для всех образцов мономекаина  $t < t_{\text{табл}}$ , следовательно, смещение незначимо на фоне случайного разброса и принято равным 0, относительная ошибка среднего результата определения ( $\epsilon_{\text{ср}}$ ) не превысила 3% (табл. 3). Полученные данные позволили сделать вывод о том, что методика дает правильные воспроизводимые результаты.

В целом, по результатам валидации методики количественного определения мономекаина на основе обращённо-фазовой ВЭЖХ установлено, что она характеризуется специфичностью, отвечает требованиям линейности, прецизионности и правильности и может быть использована для аналитических целей.

Следует также отметить, что для количественного определения мономекаина в субстанции ранее была разработана методика на основе метода неводной ацидиметрии [18]. В данном исследовании нами представлена ещё одна методика количественного определения этого соединения методом экстракционного двухфазного титрования лаурилсульфатом натрия. Как соль органического

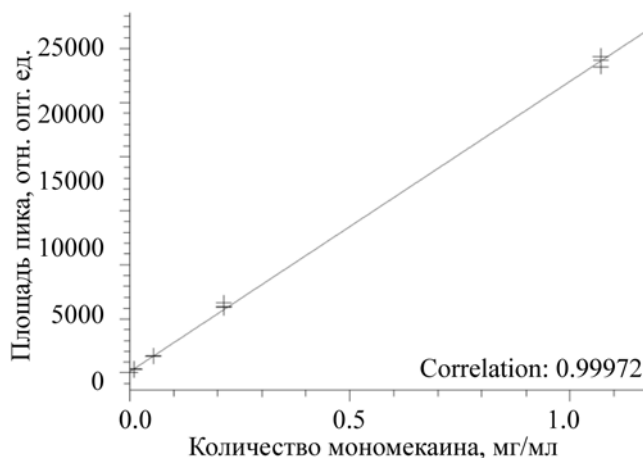


Рис. 3. Калибровочный график зависимости площади пика, соответствующего мономекаину (6), от его концентрации в пробе. По оси абсцисс количество мономекаина, мг/мл, по оси ординат площадь хроматографического пика.

основания, мономекаин образует с титрантом ассоциат, который экстрагируется в органическую фазу, в качестве которой используется хлороформ.

Основными факторами, влияющими на экстракцию вещества в процессе титрования лаурилсульфатом натрия, являются значение pH среды водной фазы, соотношение водной и органической фаз, выбранный индикатор. Оптимальные условия титрования, связанные с данными факторами, устанавливали при изменении одного из параметров и при постоянстве всех остальных. Найдено, что оптимальными являются условия, при которых значение pH среды для титрования должно находиться в интервале 2.18–2.60, что соответствует исходной концентрации хлористоводородной кислоты 0.02 М; соотношение водной и органической ( $\text{CHCl}_3$ ) фаз составляет 1:1 и 1:2 соответственно; используют смешанный индикатор – смесь диметилового желтого и метиленового синего (5:1), при

Таблица 2. Оценка прецизионности ВЭЖХ методики количественного определения основного вещества в субстанции мономекаина (6) (серия 250115).

Модельный раствор субстанции, мг/мл	Метрологические характеристики ( $P = 95\%$ , $f = 4$ )			
	$\bar{x}$ , мг/мл	$S_{\delta}$ , мг/мл	$S_{\delta \text{ сред}}$ , %	$\Delta\bar{x}$ , мг/мл
0.80	0.79	0.016	2.00	0.044
1.00	1.01	0.021	2.10	0.059
1.20	1.20	0.023	1.91	0.064

**Таблица 3.** Результаты статистической обработки данных анализа 2 серий субстанции мономекаина (6) методом ВЭЖХ.

Серия субстанции	Метрологические характеристики ( $P = 95 \%, f = 4$ )				
	$\bar{x}$ , мг/мл	$S_{\delta}$ , мг/мл	$S_{\delta \text{ сред}}$ , %	$\Delta\bar{x}$ , мг/мл	$\bar{\varepsilon}$ , %
250115	1.01	0.0095	0.94	0.026	2.61
170314	1.00	0.0071	0.71	0.020	1.97
050713	0.99	0.0095	0.96	0.026	2.66

**Таблица 4.** Оценка прецизионности результатов титрования мономекаина (6) (серия 050713).

Уровень содержания, %	Метрологические характеристики ( $P = 95 \%, f = 6$ )			
	$\bar{x}$ , мг/мл	$S_{\delta}$ , мг/мл	$S_{\delta \text{ сред}}$ , %	$\Delta\bar{x}$ , мг/мл
80	99.46	0.091	0.091	0.084
100	99.28	0.088	0.089	0.082
120	99.36	0.089	0.090	0.082

этом наблюдается четкий переход окраски в точке эквивалентности от светло-желтой до голубой.

Пригодность предлагаемой методики количественного определения мономекаина оценивали на основании валидации по показателям: линейность результатов, аналитическая область методики, прецизионность и правильность.

Для установления линейной зависимости осуществляли статистическую обработку выборки, полученной в результате количественного определения навесок исследуемого БАС на 7 уровнях концентрации. Показано, что регрессия эквивалентного объема титранта от содержания вещества строго линейна (коэффициент корреляции равен 0.9999), а калибровочный график выражается уравнением прямой:

$$y = 355.5 \cdot x - 0.028 \quad (2)$$

Аналитическую область методики определяли в интервале от 80 до 120% от количества исследуемого вещества 0.03 мг/мл, принятого за 100%.

Доказано, что полученные результаты имеют приемлемый уровень правильности и прецизионности.

Оценку прецизионности результатов проводили на основании статистической обработки выборок, полученных в ходе количественного определения исследуемого БАС на 3 уровнях концентрации в пределах рекомендуемой аналитической области методики. Относительное стандартное отклонение ( $S_{\delta \text{ сред}}$ ) результатов количественного определения мономекаина не превышало 0.09% (табл. 4), что соответствует критериям приемлемости при содержании вещества в исследуемом объекте, близком к 100%.

Правильность методики оценивали на основании статистической обработки результатов титрования 3-х лабораторных образцов мономекаина. Полученные результаты (табл. 5) позволили сделать вывод о том, что методика дает правильные воспроизводимые результаты, найденное содержание мономекаина близко к 100%, а величины относительных погрешностей невелики.

**Таблица 5.** Результаты титрования 3 серий мономекаина (6).

Серия мономекаина (6)	Метрологические характеристики ( $P = 95 \%, f = 6$ )				
	$\bar{x}$ , мг/мл	$S_{\delta}$ , мг/мл	$S_{\delta \text{ сред}}$ , %	$\Delta\bar{x}$ , мг/мл	$\bar{\varepsilon}$ , %
250712	99.35	0.068	0.026	0.063	0.17
050713	99.28	0.086	0.033	0.080	0.21
080813	99.35	0.096	0.036	0.089	0.24

Методика экстракционного титрования имеет определенное преимущество перед ранее предложенной методикой титрования в неводной среде. Она позволяет определять количественное содержание основного вещества в присутствии продуктов разложения, существенным фактором при этом, кроме названных ранее, является молярная масса определяемого вещества, которая должна составлять не менее  $200 \text{ г} \cdot \text{моль}^{-1}$ . Применение данной методики перспективно на стадии разработки лекарственной формы мономекаина, в частности, раствора для инъекций.

Таким образом, оптимизирован метод синтеза нитрата 2-метиланилида *N,N*-диэтиламиноуксусной кислоты, в частности, упрощена методика синтеза 2-метиланилида хлоруксусной кислоты – исходного соединения для получения солей 2-метиланилида *N,N*-диэтиламиноуксусной кислоты. Показано, что максимальный выход 2-метиланилида хлоруксусной кислоты достигается при проведении реакции в 1 стадию в бензоле (осушенном над Na) при использовании 1.5-кратного мольного избытка хлорацетилхлорида. Чистота и строение синтезированных соединений подтверждены данными  $^1\text{H}$  ЯМР спектров, элементного анализа, ВЭЖХ и ТСХ. Разработана методика установления подлинности мономекаина и контроля его чистоты в субстанции методом ВЭЖХ, установлен предел обнаружения примеси *o*-толуидина в лабораторных образцах исследуемого соединения, который составил 0.02%. Для количественного определения содержания основного вещества в субстанции мономекаина предложены методики ВЭЖХ и экстракционного титрования. Проведена валидация разработанных методик. Показано, что величина относительного стандартного отклонения (RSD) для мономекаина свидетельствует о хорошей специфичности, линейности, прецизионности и правильности предлагаемых аналитических методик. Это позволяет использовать их для разработки государственной фармакопейной статьи на лекарственную форму мономекаина.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ЯМР ( $\delta$ , м.д., *J*, Гц) регистрировали на приборе Bruker Avance 500 (500 МГц для  $^1\text{H}$ , Германия)  $\text{DMSO}-d_6$  с  $\text{SiMe}_4$  в качестве внутреннего стандарта при комнатной температуре. Химические сдвиги ( $\delta$ ) приведены в миллионных

долях, константы спин-спинового взаимодействия (КССВ) *J* – в герцах. Элементный анализ образцов проводили на автоматическом CHN-анализаторе Perkin Elmer PE 2400, серия II (США). Для обращенно-фазовой ВЭЖХ использовали хроматограф Agilent 1100 (США), колонку Kromasil 100-5C18 (Швеция),  $250 \times 4.6$  мм, 5 мкм, подвижные фазы (ПФ): А – 0.1% водный раствор  $\text{CF}_3\text{COOH}$  и Б –  $\text{CH}_3\text{CN}$ , скорость элюирования 0.8 мл/мин. Подвижные фазы и времена удерживания соединений ( $\tau$ , мин) указаны в конкретных методиках. Для ТСХ использовали пластинки Sorbfil (ООО «Имид», Россия), которые проявляли в УФ-свете и парами йода. Коммерчески доступные *o*-толуидин, хлорацетилхлорид и диэтиламин с чистотой ч.д.а. использовали без дополнительной очистки.

**2-Метиланилид хлоруксусной кислоты (3).** Растворяли 1 мл (9.32 ммоль) *o*-толуидина в 10 мл бензола (сух.), охлаждали до  $0^\circ\text{C}$  и по каплям добавляли 1.11 мл (14.0 ммоль) хлорацетилхлорида, при этом сразу выпадал белый осадок. Реакционную массу упаривали, осадок промывали водой до нейтрального значения pH и сушили. Выход 1.31 г (76.7%), белые кристаллы, т.пл.  $111\text{--}113^\circ\text{C}$  ( $102\text{--}104^\circ\text{C}$  [13]). Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР,  $\delta$ , м.д.: 2.20 с (3H,  $\text{CH}_3$ ), 4.30 с (1H,  $\text{CH}_2$ ), 7.10 д (1H, Ar, *J* 7.3 Гц), 7.15 д (1H, Ar, *J* 7.5 Гц), 7.20 д (1H, Ar, *J* 7.4 Гц), 7.40 д (1H, Ar, *J* 7.8 Гц), 9.65 с (1H, NH). Найдено, %: C 58.86; H 5.48; N 7.65; Cl 19.22.  $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{ClNO}$ . Вычислено, %: C 58.86; H 5.49; N 7.63; Cl 19.31. ВЭЖХ, режим элюирования: 0–3 мин 100% ПФ А; 3–20 мин от 0 до 100 % ПФ Б; 20–22 мин 60% ПФ Б,  $\tau$  20.77. ТСХ: бензол–EtOAc, 9:1,  $R_f$  0.57.

**2-Метиланилид *N,N*-диэтиламиноуксусной кислоты (5).** Растворяли 9.10 г (49.56 ммоль) 2-метиланилида хлоруксусной кислоты (3) при нагревании в 110 мл сухого бензола и добавляли 12.64 мл (123.9 ммоль) диэтиламина. Реакционную массу кипятили 5 ч. Выпавший осадок гидрохлорида диэтиламина отфильтровывали, раствор упаривали. Полученный продукт использовали в дальнейшем синтезе без дополнительной очистки. Выход 9.69 г (88.8%), коричневое подвижное масло. Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР,  $\delta$ , м.д.: 1.05 д (6H,  $2\text{CH}_2\text{CH}_3$ , *J* 7.13 Гц), 2.23 с (3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.61 д (4H,  $2\text{CH}_2\text{CH}_3$ , *J* 7.1 Гц), 3.14 с (2H,  $\text{CH}_2$ ), 7.03 д.д (1H, Ar, *J* 7.5, 1.1 Гц), 7.18 д.д (1H, Ar, *J* 7.6, 1.1 Гц), 7.22 д (1H, Ar, *J* 7.4 Гц), 7.90 д (1H, Ar, *J* 7.9 Гц), 9.47 с (H, NH). Найдено, %: C 70.46; H 9.06; N 13.53.  $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}$ . Вычислено, %: C 70.87; H 9.15; N 12.72. ТСХ: бензол–EtOAc, 9:1,  $R_f$  0.40.

**Нитрат 2-метиланилида *N,N*-диэтиламиноуксусной кислоты (6).** Растворяли 9.69 г (43.98 ммоль) 2-метиланилида *N,N*-диэтиламиноуксусной кислоты (5) в 9 мл EtOH, охлаждали до 0°C и добавляли по каплям 2.96 мл (43.98 ммоль) конц. HNO<sub>3</sub> (67%), в течение 5 мин выпадал белый кристаллический осадок. Реакционную массу упаривали, кристаллический продукт перекристаллизовывали из ацетона, сушили. Выход 9.03 г (78.5%), белый кристаллический продукт, т.пл. 138.5–139.5°C. Спектр <sup>1</sup>H ЯМР, δ, м.д.: 1.24 д (6H, 2CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, *J* 7.2 Гц), 2.23 с (3H, CH<sub>3</sub>), 3.23 д (4H, 2CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, *J* 6.9 Гц), 4.15 с (2H, CH<sub>2</sub>), 7.16 д.д (1H, Ar, *J* 7.4, 1.2 Гц), 7.22 д.д (1H, Ar, *J* 7.5, 1.2 Гц), 7.27 д (1H, Ar, *J* 7.5 Гц), 7.42 д (1H, Ar, *J* 7.7 Гц), 9.45 уш.с (1H, HNO<sub>3</sub>), 9.96 с (1H, NH). Найдено, %: С 55.23; Н 7.73; N 14.70. C<sub>13</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Вычислено, %: С 55.11; Н 7.47; N 14.83. ВЭЖХ, режим элюирования: 0–3 мин. 5% ПФ Б; 3–20 мин от 5 до 60% ПФ Б; 20–22 мин 60% ПФ Б, τ 14.61. ТСХ: бензол–диизопропилэтиламин, 3:0.05, R<sub>f</sub> 0.30.

**Методика количественного определения нитрата 2-метиланилида *N,N*-диэтиламиноуксусной (6) кислоты методом ВЭЖХ.** В мерную колбу вместимостью 25 мл переносили 0.025 г субстанции мономекаина (6), колбу заполняли смесью 95% ПФ А и 5% ПФ Б на 2/3 объема и перемешивали до полного растворения субстанции. Объем раствора доводили до метки смесью 95% ПФ А и 5% ПФ Б, перемешивали и фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0.45 мкм, отбрасывая первые порции фильтрата. Вводили 20 мкл полученного раствора в колонку аналитического жидкостного хроматографа. Режим элюирования: 0–3 мин 95% ПФ А – 5% ПФ Б; от 3 до 20 мин изменение состава ПФ от 5 до 60% Б; 20–23 мин 40% ПФ А – 60% ПФ Б, τ мономекаина составляет 14.9–15.4 мин (рис. 2).

Содержание мономекаина рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot 25 \cdot P}{S_0 \cdot a_1 \cdot 25} = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot P}{S_0 \cdot a_1}, \quad (3)$$

где *S*<sub>1</sub> – среднее значение площади пика мономекаина на хроматограмме испытуемого раствора; *S*<sub>0</sub> – среднее значение площади пика мономекаина на хроматограмме раствора стандартного образца субстанции мономекаина; *a*<sub>0</sub> – навеска стандартного образца субстанции мономекаина; *a*<sub>1</sub> – навеска субстанции испытуемого образца; *X* – содержание основного вещества в субстанции испытуемого

образца мономекаина, %; *P* – содержание основного вещества в субстанции стандартного образца мономекаина, %.

**Методика количественного определения нитрата 2-метиланилида *N,N*-диэтиламиноуксусной кислоты (6) методом экстракционного двухфазного титрования лаурилсульфатом натрия.** Для проведения анализа 0.03 г образца субстанции мономекаина (6), предварительно высушенного до постоянной массы при температуре 100°C, помещали в коническую колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 10 мл 0.02 М HCl, добавляли 10 мл CHCl<sub>3</sub>, 2 капли раствора смешанного индикатора (диметиловый желтый – метиленовый синий, 5:1) и титровали при энергичном встряхивании 0.01 М раствором лаурилсульфата натрия до изменения окраски органического слоя от светло-желтой до голубой. Анализ проводили в 2 параллелях.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность к.х.н. М.И. Кодессу за регистрацию спектров ЯМР.

#### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках темы государственного задания (АААА-А19-119011790130-3) с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Спектроскопия и анализ органических соединений» (ЦКП «САОС», ИОС УрО РАН).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Camm A.J. *Int. J. Cardiol.* **2017**, *237*, 71. doi 10.1016/j.ijcard.2017.03.056
2. Nadimi A.E., Ebrahimipour S.Y., Afshar E.G., Falahati-Pour S.K., Ahmadi Z., Mohammadinejad R., Mohamadi M. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *157*, 1153. doi 10.1016/j.ejmech.2018.08.080
3. Kalinin D.V., Pantsurkin V.I., Syropyatov B.Ya., Kalinina S.A., Rudakova I.P., Vakhnin M.I., Dolzhenko A.V. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *63*, 144. doi 10.1016/j.ejmech.2013.02.003
4. Neumeyer J.L., Perianayagam C., Ruchirawat S., Feldman H.S., Takman B.H., Tenthorey P.A. *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 894. doi 10.1021/jm00217a005



5. Corbo F., Franchini C., Lentini G., Muraglia M., Ghelardini C., Matucci R., Galeotti N., Vivoli E., Tortorella V. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1907. doi 10.1021/jm061078e
6. Franchini C., Corbo F., Lentini G., Bruno G., Scilimati A., Tortorella V., Camerino D.C., De Luca A. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3792. doi 10.1021/jm0009311
7. Хайруллина В.Р., Тарасов Г.П., Герчиков А.Я., Зарудий Ф.С., Тюрина Л.А. *Биомед. хим.* **2010**, *56*, 471. [Khairullina V.R., Tarasov G.P., Gerchikov A.Ya., Zarydiy F.S., Tyurina L.A. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B.* **2010**, *4*, 130.] doi 10.1134/S1990750810020034
8. Шепель Ф.Г., Зозуля Р.Н., Шепель Д.Ф., Макаев Ф.З. *Хим.-фарм. ж.* **2010**, *44*, 3. [Shepel' F.G., Zozulya R.N., Shepel' D.F., Makeev F.Z. *Pharm. Chem. J.* **2010**, *44*, 469.] doi 10.1007/s11094-010-0493-7
9. Гашкова О.В., Панцуркин В.И., Рудакова И.П., Сыропятов Б.Я., Вахрин М.И. *Хим.-фарм. ж.* **2008**, *42*, 8. [Gashkova O.V., Pansurkin V.I., Rudakova, I.P., Syropyatov B.J., Vahrin M.I. *Pharm. Chem. J.* **2008**, *42*, 665.] doi 10.1007/s11094-009-0217-z
10. Гашкова О.В., Рудакова И.П., Сыропятов Б.Я. *Хим.-фарм. ж.* **2017**, *51*, 9. [Gashkova O.V., Rudakova I.P., Syropyatov B.J. *Pharm. Chem. J.* **2017**, *51*, 641.] doi 10.1007/s11094-017-1667-3
11. Гашкова О.В. Дис. ... канд. фарм. наук. Пермь. **2009**.
12. Mao J., Chen L.L. *Pain.* **2000**, *87*, 7. doi 10.1016/S0304-3959(00)00229-3
13. Кудряшова Н.И., Ремизов А.Л., Хромов-Борисов Н.В. *ЖОХ.* **1959**, *29*, 1240.
14. ОФС.1.1.0012.15. *Валидация аналитических методов.* Государственная фармакопея Российской Федерации, XIV изд. Т.1. М.: НЦЭСМП. **2018**.
15. Эпштейн Н.А. *Хим.-фарм. ж.* **2004**, *38*, 40. [Épshtein N.A. *Pharm. Chem. J.* **2004**, *38*, 212.] doi 10.1023/B:PHAC.0000038422.27193.6c
16. Pendela M., Kahsay G., Baekelandt I., Van Schepdael A., Adams E. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *56*, 641. doi 10.1016/j.jpba.2011.06.028
17. Zivanovic Lj., Zecevic M., Markovic S., Petrovic S., Ivanovic I. *J. Chromatogr. A.* **2005**, *1088*, 182. doi 10.1016/j.chroma.2005.04.049
18. Чекрышкина Л.А., Бабилова Е.А., Слепова Н.В. *Фундам. исслед.* **2015**, *2*, 3333.

## Synthesis and Quantification of *N,N*-Diethylaminoacetic Acid 2-Methylanilide Nitrate

L. A. Chekryshkina<sup>a</sup>, A. M. Demin<sup>b,\*</sup>, A. A. Tumashov<sup>b,c</sup>,  
E. A. Babikova<sup>d</sup>, and N. V. Slepova<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Perm state pharmaceutical Academy Ministry of health of Russia, 614990, Russia, Perm, ul. Polevaya 2

<sup>b</sup> Postovsky Institute of Organic Synthesis of RAS (Ural Branch), 620990, Russia, Yekaterinburg, ul. S. Kovalevskoy 22/20

<sup>c</sup> Institute of Natural Sciences and Mathematics, Ural Federal University, 620002, Russia, Yekaterinburg, ul. Mira 19

<sup>d</sup> Sverdlovsk Regional Medical College (Pharmaceutical branch), 620014, Russia, Yekaterinburg, ul. Bebelya 71

\*e-mail: demin@ios.uran.ru

Received April 15, 2019; revised August 14, 2019; accepted August 15, 2019

The synthetic method of *N,N*-diethylaminoacetic acid 2-methylanilide nitrate (named as “monomekaine”), a promising antiarrhythmic drug, has been optimized. We developed the method for purity determination of this compound using a high performance liquid chromatography (HPLC). A detection limit of *o*-toluidine as impurity in monomekaine samples was 0.02%. For monomekaine quantification in substance we suggested technics based on HPLC and on extraction titration methods, and validated them. The relative standard deviation (RSD) values for monomekaine indicated a good specificity, linearity, precision and accuracy of the developed technics.

**Keywords:** *N,N*-diethylaminoacetic acid 2-methylanilide, monomekaine, synthesis, HPLC, extraction titration, validation