

Дослідження антиметаболітів піримідинового обміну, які виступають у якості преформованих сполук в низці біосинтетичних процесів та гальмують пухлинний рост, є найбільш успішним напрямком пошуку нових протипухлинних засобів. З метою отримання нових потенційних протипухлинних засобів синтезовано нове *bis*-похідне 5-бромоурацилу, створено оригінальний хіміко-біологічний аддукт на основі 1,1-*bis*-(5-бромопіримідин-2',4'-діон-1'-іл)-2-бромо-2-хлороетилену та протипухлинного бактерійного лектину *Bacillus polytuxa*. Встановлено, що хіміко-біологічний аддукт *bis*-похідного 5-бромоурацилу та бактерійного лектину, є малотоксичним (LD₅₀: 635 мг/кг) та виявляє значний протипухлинний ефект на Саркомі 45 (% гальмування пухлинного росту 82,0). Це свідчить про те, що новий хіміко-біологічний аддукт є перспективним для подальшого вивчення як малотоксична речовина з високою протипухлинною активністю на Саркомі 45.

Ключові слова: 5-бромоурацил, протипухлинна активність, лектин.

Резюме

Вельчинская Е.В. Новый химико-биологический аддукт на основе 1,1-бис-(5-бромопиримидин-2',4'-дион-1'-ил)-2-бромо-2-хлорэтилена и противоопухолевого бактериального лектина *Bacillus polytuxa*.

Исследования антиметаболитов пириимидинового обмена, которые выступают в качестве преформированных соединений в цепочке биосинтетических процессов и тормозят опухолевый рост, являются наиболее успешным направлением поиска новых противоопухолевых средств. С целью получения новых потенциальных противоопухолевых средств синтезировано новое *bis*-производное 5-бромоурацила, создан оригинальный химико-биологический аддукт на основе 1,1-*bis*-(5-бромопиримидин-2',4'-дион-1'-ил)-2-бромо-2-хлорэтилена и противоопухолевого бактериального лектина *Bacillus polytuxa*. Установлено, что химико-биологический аддукт *bis*-производного 5-бромоурацила и бактериального лектина, является малотоксичным (LD₅₀: 635 мг/кг) и проявляет значительный противоопухолевый эффект на Саркоме 45 (% торможения опухолевого роста 82,0). Это свидетельствует о том, что новый химико-биологический аддукт является перспективным для дальнейшего изучения как малотоксичное вещество с высокой противоопухолевой активностью на Саркоме 45.

Ключевые слова: 5-бромоурацил, противоопухолевая активность, лектин.

Summary

Welchinska E.V. New chemical-biological adduct on the base of 1,1-*bis*-(5-bromopyrimidine-2',4'-diono-1'-il)-2-bromo-2-chloroethylene and antitumour bacterial lectin *Bacillus polytuxa*.

Investigation of the antimetabolites of pyrimidin's change which forwards as preformed compounds at the link of biosynthetic processes and brakes tumour's growth is more successful finding direction of new antitumour preparations. With a purpose of new potential antitumour preparation the new *bis*-derivative of 5-bromouracile was synthesised, the chemical-biological adduct on the base of 1,1-*bis*-(5-bromopyrimidine-2',4'-diono-1'-il)-2-bromo-2-chloroethylene and antitumour bacterial lectin *Bacillus polytuxa* was produced. It was discovered that chemical-biological adduct of *bis*-derivative of 5-bromouracile and bacterial lectin applies to a little toxic preparation (LD₅₀: 635 mg/kg) and demonstrates considerable antitumour effect upon to 82,0% on *Sarcoma 45* tumour. It confirms that new chemical-biological adduct is perspective for the future investigation as substance with a little toxicity and high antitumour activity on the *Sarcoma 45*.

Key words: 5-bromouracile, antitumour activity, lectin.

Рецензент: д.фарм.н., проф. М.М. Слободянюк

УДК 615.074: 615.454.12

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ СЕЧОВИНИ В КРЕМІ ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ ПРИ СИНДРОМІ ДІАБЕТИЧНОЇ СТОПИ

А.А. Гончарова, І.І. Баранова, М.Є. Блажеєвський
Національний фармацевтичний університет (Харків)

Вступ

Захворювання на цукровий діабет в останні роки у зв'язку зі стрімким зростанням кількості хворих в усьому світі набуває загрозливого масштабу. Підвищений вміст глюкози в крові є причиною виникнення та швидкого прогресування специфічних для діабету ускладнень, таких як патологія серця, ниркова недостатність, сліпота, ураження стоп тощо [1, 2]. В Україні за даними МОЗ щорічно синдром діабетичної стопи стає причиною близько 3370 ампутацій нижніх кінцівок. Смерть від гангрени нижніх кінцівок у хворих на цукровий діабет спостерігається в 40 разів частіше, ніж у загальній популяції [3].

Дія існуючих лікарських препаратів спрямована на усунення інфекційного процесу, а також на загоєння вже наявного виразкового дефекту. Саме тому розробка лікарського засобу для застосування при синдромі діабетичної стопи, який сприяв би правильній обробці ніг при щоденному догляді, є перспективною задачею.

На базі Національного фармацевтичного університету було розроблено крем для застосування при синдромі діабетичної стопи [4, 5]. До складу крему як активні компоненти були введені α-ліпоєва кислота, сечовина, та етерна олія чайного дерева. Враховуючи патогенез синдрому діабетичної стопи, як лікарську форму було обрано емульсію І-го роду на основі натуральних емоментів (оливкової олії та масла ши).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана у відповідності з планом науково-дослідних робіт Національного фармацевтичного університету та є фрагментом теми «Технологія одержання оригінальних та комбінованих фармацевтичних засобів у різних лікарських формах» (№ держреєстрації 0108U009174).

Метою даного етапу експерименту є розробка методу якісного (підтвердження тотожності і/або здійснення ідентифікації) та кількісного визначення сечовини в розробленому кремі для його стандартизації.

Актуальні проблеми фармації та фармакотерапії

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проводились під керівництвом професора кафедри фізичної та колоїдної хімії НФаУ Блажесівського М.Є. Було встановлено, що оптимальними методами для якісного та кількісного аналізу сечовини у кремі є хімічні методи, а саме для якісного визначення - біуретова реакція та реакція з концентрованою нітратною кислотою, а для кількісного визначення - броматометрія. Нами була розроблена методика визначення сечовини в кремі запропонованими методами.

Об'єктом дослідження був крем для застосування при синдромі діабетичної стопи наступного складу: оливкова олія, масло ши, комплекс емульгаторів I-го та II-го роду, α -ліпоева кислота, сечовина, етерна олія чайного дерева, вода очищена. Сечовина входить до складу крему у кількості 10 %.

Отримані результати та їх обговорення

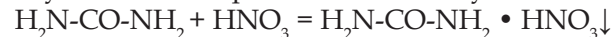
Для аналізу сечовини в розробленому засобі необхідно вилучити досліджувану речовину з емульсійної основи, а також відокремити від інших речовин, що можуть заважати проведенню аналізу. Зважаючи на те, що сечовина є єдиним водорозчинним компонентом у складі крему, а також на її високу розчинність у воді, раціональним є приготування водного витягу сечовини з розробленого засобу. Для повнішого розділення водної та масляної фази використовували властивості електролітів (висолоння).

Для цього біля 2 г (точна наважка) крему розчиняють у 40 мл дистильованої води при перемішуванні в хімічному стакані на 100 мл, додають 1 г калій броміду та знову ретельно перемішують до повного його розчинення та по чергово двічі екстрагують по 35 мл метилен хлоридом (нижній шар) та двічі гексаном (верхній шар) основу крему з ліпофільними компонентами (α -ліпоева кислота тощо) з використанням ділільної лійки на 100 мл. Отриманий водний розчин, який містить сечовину, використовують для якісного та кількісного визначення сечовини в лікарській формі.

Для ідентифікації речовин у лікарській формі користуються двома-трьома реакціями, що є найбільш показовими, специфічними для даної субстанції, а також не обтяжливими у виконанні [6, 7].

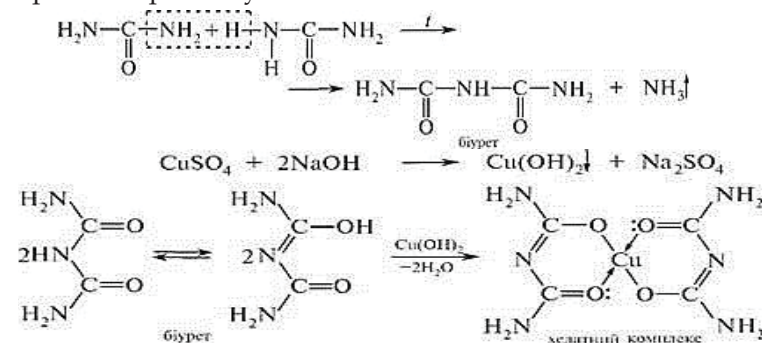
Відомі реакції ідентифікації (температура плавлення, ІЧ спектроскопія) можливі за умов аналізу чистої субстанції, а реакції розкладу сечовини нітратною кислотою або баритовою водою не є показовими.

Тому, для якісного визначення сечовини доцільно використовувати реакцію з концентрованою нітратною кислотою. У пробірку з водним розчином сечовини додають 2-3 краплі концентрованої нітратної кислоти. Спостерігають виділення рясного важкорозчинного у воді білого кристалічного осаду - сечовини нітрату.



Здатність сечовини до утворення важкорозчинних солей з концентрованою нітратною, а також щавлевою кислотами широко використовується для виявлення сечовини в розчинах [7, 8].

Також, ідентифікувати сечовину у лікарській формі можливо за біуретовою реакцією [7-9]. Для цього отриманий розчин сечовини необхідно випарити. Сухий залишок нагрівають у полум'ї пальника. Через кілька секунд спостерігають виділення бульбашок газу. Відчувають характерний запах амоніаку. Плав поступово густіє і твердне - утворюється біурет. Плав охолоджують і розчиняють у суміші 10 мл води Р1 1 мл розчину натрію гідроксиду розведеного Р. До одержаного розчину додають 0.05 мл розчину міді (II) сульфату; з'являється червонувато-фіолетове забарвлення, зумовленого утворенням комплексної мідної солі біурету (біуретова реакція). Надлишок купруму (II) сульфату небажаний, тому що він маскує характерне рожеве забарвлення за рахунок інтенсивного синього забарвлення розчину:



За вимогами ДФУ при аналізуванні м'яких лікарських форм необхідно проводити кількісне визначення діючих речовин [9]. Кількісне визначення сечовини можливо здійснити декількома способами.

Сечовина з діацетилмонооксимом у кислому середовищі в присутності тіосемікарбозиду та іонів тривалентного заліза утворює забарвлений комплекс. Інтенсивність забарвлення пропорційна концентра-

ції сечовини в пробі. За даним комплексом здійснюють кількісне визначення сечовини в біологічних рідинах (сироватка крові, сеча).

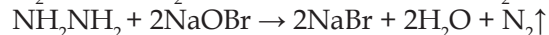
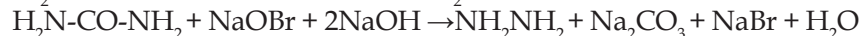
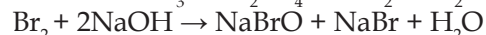
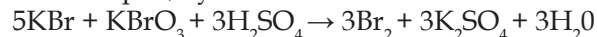
Також відомі ферментативні (уреазні) методи визначення сечовини. Як реактив на сечовину використовують уреазу, для якої сечовина є єдиним специфічним субстратом, що свідчить про високу специфічність методів. Ферментативні методи набули найбільшої розповсюдженості у клініко-лабораторній практиці [10].

Здійснити визначення вмісту сечовини можливо і за допомогою відносно чутливих фізико-хімічних методів аналізу, проте дані методи застосовувати не доцільно, оскільки концентрація сечовини в досліджуваному кремі більша 5%.

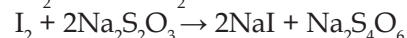
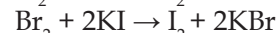
При аналізі концентрованих розчинів найбільш придатними є хімічні (безстандартні) методи аналізу (кислотно-основне та окисно-відновне титрування). Для кількісного визначення сечовини в розробленому кремі доцільним є застосування методу броматометрії.

Для проведення аналізу готують водний витяг сечовини з крему за вищенаведеною методикою. Водний розчин, який містить сечовину, кількісно переносять за допомогою дистильованої води у мірну колбу на 100 мл, доводять до позначки дистильованою водою при 20°C і ретельно перемішують. За допомогою піпетки відбирають 10 мл розчину, переносять у конічну колбу з притертим корком на 100 мл, приливають 20,00 мл 0,0167 моль/л (0,1 н.) розчину KBrO_3 , додають 2 г KBr та 2,5 мл 1 моль/л H_2SO_4 , перемішують, колбу закорковують і витримують 20 хв при 40°C. Потім розчин охолоджують, швидко приливають 8 мл 1 моль/л NaOH і знову при частоту перемішуванні витримують протягом 20 хв при 40°C. Охолоджують, додають 2 г KI та 25 мл 1 моль/л H_2SO_4 , колбу закорковують, ретельно перемішують і через 15 хв титрують 0,1 моль/л стандартним розчином $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ з додаванням крохмалю в кінці титрування. Паралельно проводять контрольний дослід (за відсутності досліджуваного розчину сечовини). За різницею результатів титрувань (кількістю вільного броду, необхідного для окиснення аналіту) розраховують вміст сечовини. 1,00 мл 0,0167 моль/л (0,1 н.) розчину KBrO_3 відповідає 0,002002 г $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ [11].

Хімізм процесу:



Сумарне рівняння процесу має вигляд:



Масову частку сечовини у кремі, w , %, розраховують за формулою:

$$w = \frac{(V_0 - V) \cdot 0,002002 \cdot 100,00 \cdot 100\%}{m_n \cdot 10,00}$$

де V_0 – об'єм 0,1 моль/л розчину натрій тіосульфату, витрачений у контрольному досліді, мл; V – об'єм 0,1 моль/л розчину натрій тіосульфату, витрачений у робочому досліді, мл; m_n – наважка крему, г; 10,00 – об'єм досліджуваного водного розчину сечовини, взятий на аналіз, мл; 100 – об'єм мірної колби; 0,002002 – титр 0,1н. розчину KBrO_3 за визначуваною речовиною, г/мл.

Результати кількісного визначення сечовини у досліджуваному кремі представлені в табл.

Таблиця

Результати кількісного визначення сечовини в кремі
($n=5$, $P=0,95$)

Взято крему, г	Знайдено сечовини, г	Метрологічні характеристики
0,9275	9,98	9,84 %
(9,85 %)*	9,65	$S = 0,156$
	9,93	$S_{\bar{x}} = 0,070$
	9,70	$\Delta\bar{x} = 0,194$
	9,96	$RSD = 1,59 \%$
		$\varepsilon = 1,97 \%$
		$(\delta = -0,1 \%)$

Примітка: * вміст сечовини, знайдений референтним біохімічним методом.

Результати не перевантажені систематичною похибкою ($\delta < RSD$).

Отже, можна вважати, що дана методика забезпечує необхідну точність та відтворюваність результатів аналізу крему з регламентованим верхнім та нижнім вмістом діючої речовини на рівні $10,0 \pm 0,5 \%$.

Висновки

1. Розроблено методику ізолювання, ідентифікації та кількісного визначення сечовини в кремі для застосування при синдромі діабетичної стопи. Визначений вміст сечовини у виготовленому кремі, який становив $9,84 \pm 0,12 \%$ ($99,90 \pm 1,97 \%$), $RSD = 1,59 \%$ ($\delta = -0,1 \%$). Правильність одержаних результатів за розробленою методикою підтверджена даними незалежного біохімічного методу.

2. Результати проведеного дослідження будуть використані при розробці проекту методів контролю якості (МКЯ) на розроблений крем для застосування при синдромі діабетичної стопи. Надалі планується розробка методик якісного та кількісного аналізу для α -ліпоевої кислоти та ефірної олії чайного дерева.

Література

1. Всемирное руководство по сахарному диабету 2 типа // *Therapia. Укр. мед. вісник.* – 2006. – № 4. – С. 5–10.
2. American Diabetes Association: Standards of medical care in diabetes // *Diabetes Care.* – 2008. – Vol. 31, Suppl. 1. – P. 12–54.
3. «Про затвердження державної цільової програми «Цукровий діабет» на 2009-2013 роки»: постановва КМУ від 19 серпня 2009 р. № 877 // *Офіційний вісник України.* – 2009. – № 64. – С. 32.
4. Гончарова А.А. Обґрунтування складу крему для застосування при синдромі діабетичної стопи / А.А. Гончарова, І.І. Баранова, Ю.В. Ковтун // *Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «КОС-МЕТОЛОГІЯ: сьогодні та майбутнє» (15 листопада 2013 р., м. Харків).* – Харків, 2013. – С. 60–61.
5. Гончарова А.А. Методологія дослідження нового засобу для застосування при синдромі діабетичної стопи / А.А. Гончарова, І.І. Баранова // *Тези доповідей науково-практичної конференції «Актуальні питання безпечного застосування ліків» (17-18 жовтня 2013 р., м. Тернопіль).* – Тернопіль, 2013. – С. 20–22.
6. Надлежащая производственная практика лекарственных средств. Активные фармацевтические ингредиенты. Готовые лекарственные средства. Руководства по качеству. Рекомендации РИС/S / Под ред. Н.А. Ляпунова, В.А. Загоря, В.П. Георгиевского, Е.П. Безуглой. – Киев: Морион, 2001. – 472 с.
7. Фармацевтичний аналіз / [П.О. Безуглий, В.О. Грудько, С.Г. Леонова та ін.; за заг. ред. П. О. Безуглого]. – Харків: Вид-во НФАУ, Золоті сторінки, 2001. – 240 с.
8. Vogel A.I. Practical organic chemistry including qualitative organic analysis / A.I. Vogel. – [3d ed.]. – London: Longman, 1974. – 1188 p.
9. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – [1-е вид.]. – Харків: РІРЕГ, 2001. – 556 с.
10. Биохимические методы анализа (ферментативный анализ, биосенсоры, иммуноанализ). Т.12 / Под ред. Б. Б. Дзантиева. – М.: Наука, 2010. – 391 с.
11. Полудек-Фабини Р. Органический анализ. Руководство по анализу органических соединений, в том числе лекарственных веществ / Р. Полудек-Фабини, П. Бейрих; пер. с нем. – Л.: Химия, 1981. – 624 с.

Резюме

Гончарова А.А., Баранова І.І., Блажеєвський М.Є. Ідентифікація та кількісне визначення сечовини в кремлі для застосування при синдромі діабетичної стопи.

На базі Національного фармацевтичного університету було розроблено крем для застосування при синдромі діабетичної стопи. Метою даного дослідження стала розробка методу якісного та кількісного визначення одного з обраних активних компонентів – сечовини в розробленому кремлі для його стандартизації. Було встановлено, що оптимальними методами для якісного та кількісного аналізу сечовини у кремлі є хімічні методи, а саме для якісного визначення – біуретова реакція та реакція з концентрованою нітратною кислотою, а для кількісного визначення – броматометрія. У ході роботи розроблено методику ізольовання, ідентифікації та кількісного визначення сечовини в кремлі для застосування при синдромі діабетичної стопи запропонованими методами. Визначений вміст сечовини у виготовленому кремлі. Правильність одержаних результатів за розробленою методикою підтверджена даними незалежного біохімічного методу.

Ключові слова: крем, сечовина, кількісне визначення, броматометрія.

Резюме

Гончарова А.А., Баранова І.І., Блажеєвський М.Є. Ідентифікація і кількісне визначення сечовини в кремлі для застосування при синдромі діабетичної стопи.

На базі Національного фармацевтичного університету був розроблений крем для застосування при синдромі діабетичної стопи. Целью даного дослідження стала розробка методу якісного та кількісного визначення одного з обраних активних компонентів – сечовини в розробленому кремлі для його стандартизації. Було встановлено, що оптимальними методами для якісного та кількісного аналізу сечовини в кремлі є хімічні методи, а іменню для якісного визначення – біуретова реакція та реакція з концентрованою азотною кислотою, для кількісного визначення – броматометрія. В ході роботи розроблена методика ізольовання, ідентифікації та кількісного визначення сечовини в кремлі для застосування при синдромі діабетичної стопи запропонованими методами. Визначений вміст сечовини в розробленому кремлі. Правильність одержаних результатів по розробленій методикі підтверджена даними незалежного біохімічного методу.

Ключевые слова: крем, мочевины, количественное определение, броматометрия.

Summary

Goncharova A.A., Baranova I.I., Blazheyevskiy M.E. Identification and quantitative determination of urea in the cream for use in diabetic foot.

At the National University of Pharmacy cream for use in diabetic foot syndrome was developed. The aim of this study was to develop a method for qualitative and quantitative determination of one of the selected active ingredients of the developed cream - urea for its standardization. It was found that the optimal methods for qualitative and quantitative analysis of urea in the cream are chemical methods, namely for the qualitative determination - biuret reaction and the reaction with concentrated nitric acid, for quantitative analysis - bromatometry. During the research the technique of isolation, identification and quantification of urea in the cream for use in diabetic foot with proposed methods was developed. The content of urea in the cream was determined. Correctness of the results obtained by the developed technique was confirmed by an independent biochemical method.

Key words: cream, urea, quantitative determination, bromatometry.

Рецензент: д.фарм.н., проф. О.А. Євтіфєєва