

**САУШКИНА А. С., САНАЕВА Э. П., САМОУКОВА Т. С.,
РОМАНОВА Э. В., ФОМИЧЕВА В. И.
РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ АНАЛИЗА МАЗИ, СОДЕРЖАЩЕЙ
АНЕСТЕЗИН, МЕТИЛУРАЦИЛ, ФУРАЦИЛИН**

Аннотация. Для количественного определения анестезина, метилурацила и фурацилина в мази рекомендуется спектрофотометрическая методика, позволяющая определить все ингредиенты в одной навеске. При этом количественное определение анестезина и метилурацила основано на использовании модифицированного метода Фирордта, фурацилина – метода изолированной абсорбции. Установлено, что предлагаемая мазь противовоспалительным действием не обладает, однако ранозаживляющее действие превосходит аналогичное действие мази метилурациловой на 10%.

Ключевые слова: мазь, анестезин, метилурацил, фурацилин, способы качественного и количественного анализа, фармакологическое действие.

**SAUSHKINA A. S., SANAEVA E. P., SAMOUKOVA T. S.,
ROMANOVA E. V., FOMICHEVA V. I.
DEVELOPMENT OF METHODS FOR ANALYSIS**

OF OINTMENT CONTAINING ANAESTHESIN, METHYLURACIL, FURACILIN

Abstract. For the quantitative analysis of anaesthesin, methyluracil and furacilin in the ointment, the spectrophotometric technique is recommended, which allows to identify all the ingredients in a single sample. In this case, the quantitative analysis of anaesthesin and methyluracil is based on the use of the modified Fierordt method, furacilin is identified by the method of isolated absorption. The proposed ointment does not have an anti-inflammatory effect, but the wound healing effect is 10% higher than that of the methyluracil ointment.

Keywords: ointment, anaesthesin, methyluracil, furacilin, methods of qualitative and quantitative analysis, pharmacologic effect.

Актуальность темы. Проблема создания лекарственных средств, обладающих комплексным и многонаправленным действием, по-прежнему актуальна, особенно в связи с резистентностью микроорганизмов ко многим химиотерапевтическим фармацевтическим субстанциям.

В данном сообщении приведены результаты разработки способов стандартизации мази, содержащей анестезин, метилурацил, фурацилин, и оценки её противовоспалительной и ранозаживляющей активности.

Цель работы. Разработка способов идентификации и количественного определения ингредиентов многокомпонентной мази на гидрофильной основе, содержащей анестезин, метилурацил, фурацилин. Оценка воздействия мази предлагаемого состава на воспалительный и раневой процессы в опытах на животных.

Используемые материалы и методы. Объектом исследования служили опытные образцы разработанной ранее мази на гидрофильной основе ПЭО-1500, содержащие анестезин, метилурацил и фурацилин. Идентификацию действующих веществ мази проводили с помощью химических реакций, описанных в нормативной документации и научной литературе для соответствующей фармацевтической субстанции.

Спектры поглощения и необходимые для расчетов характеристики спектров растворов многокомпонентного стандарта и анализируемой мази измеряли на спектрофотометрах марок «Shimadzu UV mini-1240» и «СФ-56».

Методика количественного определения анестезина и метилурацила в модельной мази модифицированным методом Фирордта: около 0,5 г мази (точная навеска) помещали в химический стакан вместимостью 50 мл, добавляли по 25 мл воды и спирта этилового, подогревали на кипящей водяной бане до образования однородной массы. Фильтровали в тёплом виде в мерную колбу вместимостью 100 мл. Фильтр промывали теплой смесью воды и спирта этилового (около 40 мл). Фильтрат охлаждали и доводили водой до метки, перемешивали (раствор А). 10,0 мл раствора А доводили водой до метки в мерной колбе вместимостью 100 мл, перемешивали (раствор Б).

Для приготовления раствора многокомпонентного стандарта точные навески метилурацила (около 0,25 г), анестезина (около 0,2 г), фурацилина (около 0,01 г) вносили в мерную колбу вместимостью 250 мл, добавляли около 50 мл спирта этилового, взбалтывали в течение 10 мин до растворения действующих веществ. Затем доводили водой до метки, перемешивали (раствор В). 1,0 мл полученного раствора доводили водой до метки в мерной колбе вместимостью 100 мл, перемешивали (раствор Г).

Измеряли на спектрофотометре оптические плотности испытуемого раствора Б мази и раствора Г многокомпонентного стандарта относительно воды в кювете с толщиной слоя 10 мм при 240 нм и 290 нм.

Содержание анестезина и метилурацила (х, %) рассчитывали по формулам (соответственно 1, 2) (см. результаты и обсуждение).

Методика количественного определения фурацилина в испытуемом растворе мази методом изолированной абсорбции: 5,0 мл раствора А (приготовление указано выше) доводили водой до метки в мерной колбе вместимостью 50 мл, перемешивали (раствор Д). Для приготовления раствора многокомпонентного стандарта 1,0 мл раствора В

многокомпонентного стандарта (приготовление указано выше) доводили водой до метки в мерной колбе вместимостью 50 мл, перемешивали (раствор Е).

Измеряли на спектрофотометре оптическую плотность раствора Д испытуемого образца мази и раствора Е многокомпонентного стандарта в кювете с толщиной слоя 10 мм при 375 нм относительно воды. Содержание фурацилина в мази (x_f , %) рассчитывали по формуле (3) (см. ниже).

Противовоспалительную и ранозаживляющую активность мази предлагаемого состава оценивали в опытах на белых беспородных крысах обоего пола массой 180-200 г, содержащихся в стандартном режиме вивария в соответствии с правилами GLP[1].

Противовоспалительную активность мази оценивали на модели каолинового отёка [2]. Согласно данной методике измеряли исходный объём задней лапки подопытных животных. Затем вводили в дорсовентральную часть лапки крысы 0,1 мл 1% раствор взвеси каолина и наносили исследуемую мазь на раневую поверхность лапки в количестве 250 мг. Повторно объём лапки крысы измеряли спустя 3 часа после травмы в момент наибольшего развития воспалительного процесса при данной модели. Прирост объёма лапки отражал степень экссудации. В качестве препарата сравнения использовали мазь бутационовую [3]. Контролем служили нелеченные животные.

Ранозаживляющую активность мази разработанного состава изучали на модели термического повреждения кожи у белых беспородных крыс. Для этого на спинке животного выстригали шерстяной покров площадью 4 см². Под лёгким наркозом с помощью разогретой до 100⁰С плоскодонной пробирки с площадью доньшка 2 см² создавали контактным способом ожоговое повреждение. Время экспозиции составляло 20 сек. Динамику ожогового повреждения оценивали по площади раны весовым методом [2; 4].

Исследуемую мазь и мазь сравнения ежедневно наносили на повреждённую поверхность кожи тонким слоем без втирания по 250 мг. Контролем служили нелеченные животные. Результаты ожогового повреждения оценивали на 2-е и 8-е сутки. Препаратом сравнения служила 10% мазь метилурациловая [3].

Результаты опытов обрабатывали методами вариационной статистики с помощью таблиц ускоренной оценки фармакологического эффекта [5].

Результаты и обсуждение. Для идентификации компонентов исследуемой мази (качественный анализ) было предложено устанавливать подлинность анестезина по реакции образования азокрасителя после растворения 0,2-0,3 г мази в 2 мл воды [6].

Метилурацил предложено идентифицировать по реакции солеобразования с нитратом серебра по выпадению белого осадка после растворения 0,2-0,3 г мази в 2 мл воды [7]. Кроме того, метилурацил может быть идентифицирован по фиолетовому окрашиванию со

спиртовым раствором кобальта нитрата и раствором аммиака после нагревания 0,5 г мази с 2-3 мл этанола [8].

Фурацилин даёт оранжево-красное окрашивание после нагревания 0,5 г мази со смесью 2 мл воды и 2 мл раствора натрия гидроксида [9].

Для количественного определения действующих веществ в мази разработана методика на основе использования УФ-спектрофотометрии, позволившая оценивать содержание каждого ингредиента в одной навеске в присутствии сопутствующих. Ранее было установлено, что мазевая основа не поглощает в максимумах поглощения анестезина, метилурацила и фурацилина и не мешает их количественному определению методом спектрофотометрии [10].

Наложение полос поглощения всех ингредиентов в области 200-340 нм делает невозможным количественное определение анестезина и метилурацила в мази методом непосредственной спектрофотометрии без предварительного разделения, но позволяет использовать для их количественного определения при совместном присутствии модифицированный метод Фирордта [11].

В то же время полоса поглощения фурацилина с максимумом при 375 нм, свободная от поглощения сопутствующих ингредиентов, позволяет определять его количественное содержание методом изолированной абсорбции.

Для использования модифицированного метода Фирордта особенно важен правильный выбор аналитических длин волн. Учитывая наложение полос поглощения всех ингредиентов, выбор аналитических длин волн проводили по максимальному значению коэффициентов Каца-Розкина для каждой фармацевтической субстанции [11]. Результаты расчёта приведены в таблице 1.

Таблица 1

Значения информационных (Каца-Розкина) и аналитических коэффициентов ингредиентов анализируемой мази

Длина волны	240 нм		290 нм		Аналитические коэффициенты	
	$A_{1\text{см}}^{1\%}$	г	$A_{1\text{см}}^{1\%}$	г	240, нм	290, нм
Субстанция						
Анестезин	108,0	0,1896	1118,0	0,963	0,0478	1,0478
Метилурацил	347,0	0,7613	23,0	0,0248	1,324	0,324
Фурацилин	559,0	0,0490	284,0	0,0122	–	–

На основе проведённых расчётов (см. табл. 1) в качестве оптимальных аналитических длин волн для количественного определения модифицированным методом Фирордта выбраны для анестезина 290 нм и 240 нм, метилурацила – 240 нм и 290 нм.

На основе значений коэффициентов Каца-Розкина рассчитаны аналитические коэффициенты и выведены расчётные формулы (1, 2):

$$x_M\% = \frac{(1,324 \cdot \frac{A_x^{240}}{A_{ст}^{240}} - 0,324 \cdot \frac{A_x^{290}}{A_{ст}^{290}}) \cdot a_{ст}^M \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{100 \cdot 1 \cdot a_x^M} \quad (1)$$

$$x_a\% = \frac{(1,0478 \cdot \frac{A_x^{290}}{A_{ст}^{290}} - 0,0478 \cdot \frac{A_x^{240}}{A_{ст}^{240}}) \cdot a_{ст}^a \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{100 \cdot 1 \cdot a_x^a} \quad (2)$$

где A_x^{240} , A_x^{290} – оптические плотности растворов испытуемого образца мази; $A_{ст}^{240}$, $A_{ст}^{290}$ – оптические плотности раствора многокомпонентного стандарта (метилурацила, анестезина, фурацилина); a_x^M , a_x^a – соответственно навески метилурацила и анестезина в испытуемых образцах мази, г; $a_{ст}^M$, $a_{ст}^a$ – соответственно навески метилурацила и анестезина в растворе многокомпонентного стандарта, г.

Содержание фурацилина в мази (x_ϕ , %) рассчитывали по формуле (3):

$$x_\phi\% = \frac{A_x^{375} \cdot a_{ст}^\phi \cdot 1 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{A_{ст}^{375} \cdot 100 \cdot 25 \cdot 1 \cdot a_x^\phi} \quad (3)$$

где A_x , $A_{ст}$ – соответственно оптические плотности растворов испытуемого образца мази и многокомпонентного стандарта; a_x^ϕ , $a_{ст}^\phi$ – соответственно навески фурацилина в растворах испытуемых образцов мази и в растворе многокомпонентного стандартного образца, г.

Статистически обработанные результаты количественного определения анестезина, метилурацила и фурацилина разработанной методикой приведены в табл. 2. Приведенные результаты свидетельствуют о том, что разработанная методика позволяет с достаточной точностью проводить количественное определение соответствующими методами спектрофотометрии всех действующих веществ мази предлагаемого состава без предварительного разделения ингредиентов. Относительная погрешность определения анестезина в мази составляет $(98,5 \pm 0,6)\%$, метилурацила – $(101,6 \pm 1,1)\%$, фурацилина – $(100,1 \pm 1,4)\%$.

**Результаты количественного определения ингредиентов
модельной мази, содержащей анестезин, метилурацил, фурацилин (n=6)**

№ п/п	Взято	Найдено		Метрологические характеристики
	г	г	%	
Анестезин (модифицированный метод Фирордта; $\lambda - 290$ нм и 240 нм)				
1	2,0000	1,9670	98,34	$\bar{X} = 98,45$
2		1,9900	99,50	$S = 0,54$
3		1,9680	98,40	$S_{\bar{x}} = 0,22$
4		1,9630	98,17	$\bar{x} = 0,60$
5		1,9590	97,94	$\varepsilon = 0,60$
6		1,9670	98,35	$\bar{X} \pm \Delta \bar{x} = 98,5 \pm 0,6$
Метилурацил (модифицированный метод Фирордта; $\lambda - 240$ нм и 290 нм)				
1	2,5000	2,5420	101,68	$\bar{X} = 101,57$
2		2,4980	99,42	$S = 1,02$
3		2,5300	101,20	$S_{\bar{x}} = 1,13$
4		2,5390	101,56	$\bar{x} = 1,10$
5		2,5760	103,03	$\varepsilon = 0,60$
6		2,5500	102,01	$\bar{X} \pm \Delta \bar{x} = 101,6 \pm 1,1$
Фурацилин (метод изолированной абсорбции; $\lambda - 375$ нм)				
1	0,0500	0,0492	98,40	$\bar{X} = 100,07$
2		0,0496	99,20	$S = 1,30$
3		0,0503	100,60	$S_{\bar{x}} = 0,53$
4		0,0510	102,00	$\bar{x} = 1,44$
5		0,0504	100,80	$\varepsilon = 1,40$
6		0,0497	99,40	$\bar{X} \pm \Delta \bar{x} = 100,1 \pm 1,4$

Объединённые показатели качества анализа мази, содержащей анестезин, метилурацил и фурацилин, приведены в виде спецификации в таблице 3.

**Показатели качества мази, содержащей анестезин, метилурацил и фурацилин
(спецификация) и допустимые значения**

Показатель качества	Метод определения	Должно быть
Описание. Гомогенная пластичная масса светло-жёлтого цвета.	Визуальный	Соответствовать
Подлинность: – анестезин – метилурацил – фурацилин	образования азокрасителя реакция солеобразования с раствором нитрата серебра после нагревания с раствором натрия гидроксида	вишнёвое окрашивание выпадение белого осадка оранжево-красное окрашивание
рН 10% водного раствора	6,7 ± 0,2	6,3 ± 0,2
Количественное определение (УФ-спектрофотометрия)		
– анестезин – метилурацил	Модифицированный метод Фирордта	1,9 – 2,1 % 2,4 – 2,6 %
– фурацилин	Метод изолированной абсорбции	0,85 – 1,15 %

Проведенные исследования фармакологической активности показали, что мазь предлагаемого состава не обладает противовоспалительным действием. Прирост объёма лапки животных, которых лечили указанной мазью, не отличался от прироста объёма лапки нелеченых животных. При этом мазь бутадионовая (препарат сравнения) оказывала хороший противовоспалительный эффект (см. табл. 4).

**Сравнительная оценка противовоспалительной активности мази предлагаемого
состава (n = 6)**

Показатель	Прирост объёма лапки, мл		
	M + m	P	%
Группы животных			
Нелеченые животные	0,60 ± 0,02		100,0
Животные, получившие основу – гель	0,60 ± 0,00	>0,05	100,0
Животные, получившие предлагаемую мазь	0,63 ± 0,13	>0,05	105,0
Животные, получившие бутадионовую мазь	0,23 ± 0,05	<0,01	38,3

Исследование ранозаживляющей активности мази предлагаемого состава (см. табл. 5) показало, что нелеченое термическое ожоговое повреждение кожи животных, вызванное контактным способом, на вторые сутки имело площадь раны в весовых единицах 13,5±0,25 мг, а на восьмые сутки – 6,6±0,25 мг. Эти значения были приняты за 100% фармакологического действия.

**Сравнительная оценка влияния мази предлагаемого состава
на процесс заживления ожоговой раны (n = 6)**

Группы животных	Площадь раны в весовых единицах, мг					
	Вторые сутки			Восьмые сутки		
	M + m	P	%	M + m	P	%
Нелеченные животные	3,5±0,3		100,0	6,6±0,3		100,0
Животные, получившие основу – гель	3,2±0,3	>0,05	97,8	5,9±0,1	>0,05	89,4
Животные, получившие предлагаемую мазь	4,1±0,1	>0,05	30,1	2,3±0,1	<0,01	34,4
Животные, получившие мазь метилурацила 10%	7,1±0,3	<0,05	52,6	3,1±0,1	<0,01	46,9

Примечание: P – вероятность различия результатов с контрольными животными.

У животных, получивших основу-плацебо (гель ПЭО-1500), отмечалось незначительное уменьшение, на 2,2%, общей площади раны на вторые сутки и на 10,6% – на восьмые сутки. Применение предлагаемой мазевой композиции снизило площадь раны на вторые сутки на 69,9%, а на восьмые – на 65,5% по сравнению с контролем. Препарат сравнения – мазь метилурациловая – снижала площадь ожоговой поверхности на вторые сутки на 47,4%, на восьмые – на 53,1% по сравнению с контролем.

Таким образом, в опытах на животных установлено, что мазь предлагаемого состава при изучении ранозаживляющей активности на модели термического ожога кожи крыс показала более выраженный эффект на саногенез по сравнению с препаратом сравнения в ранние и более поздние сроки (см. табл. 5). Это обусловлено аддитивным фармакологическим действием каждого компонента, поскольку у группы животных, получавших для лечения основу-плацебо, аналогичного эффекта не проявлялось.

Выводы. Разработаны способы стандартизации мази на основе геля ПЭО-1500, содержащей анестезин, метилурацил и фурацилин. Идентификацию ингредиентов мази предложено проводить с помощью химических реакций, описанных в литературе, после экстракции действующих веществ в водную вытяжку.

Для количественного определения анестезина, метилурацила и фурацилина в мази рекомендуется спектрофотометрическая методика, позволяющая определить все ингредиенты в одной навеске. При этом количественное определение анестезина и метилурацила основано на использовании модифицированного метода Фирордта, фурацилина – метода изолированной абсорбции. Погрешность определения составляет соответственно для анестезина (98,5±0,6) %, метилурацила – (101,6±1,1) %, фурацилина – (100,1±1,4) %. Установлено, что предлагаемая мазь противовоспалительным действием не

обладает, однако ранозаживляющее действие превосходит аналогичное действие мази метилурациловой на 10%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. ГОСТ 33647-2015. Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP).
2. Гацура В. В. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ. – М.: Медицина, 2000. – 141 с.
3. Машковский М. Д. Лекарственные средства. – 16-е изд. – М.: Новая волна, 2019. – 1216 с.
4. Парамонов Б. А., Порембский Я. О., Яблонский В. Г. Ожоги. – СПб.: СпецЛит, 2000. – 480 с.
5. Стрелков Р. Б. Статистические таблицы для ускоренной оценки фармакологического эффекта // Фармакология и токсикология. – 1986. – № 4. – С. 100–104.
6. Государственная Фармакопея Республики Беларусь. В 3 т. Т. 3. Контроль качества фармацевтических субстанций / УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»; под общ. ред. А. А. Шерякова. – Минск: Минский государственный ПТК полиграфии им. В. Хоружей, 2009.
7. Диоксометилтетрагидропиримидин. ФС.2.1.0095.18 / Государственная фармакопея Российской Федерации. – 14-е изд. – М.: Москва, 2018. – С. 3779–3783.
8. Справочник провизора-аналитика / под ред. Д. С. Волоха, Н. П. Максютинной. – Киев: Здоровья, 1989. – 200 с.
9. Нитрофурал. ФС.2.1.0148.18 / Государственная фармакопея Российской Федерации. – 14-е изд. – М.: Москва, 2018. – С. 4522–4527.
10. Саушкина А. С., Савченко Л. Н., Романова Э. В., Санаева Э. П. Разработка состава и технологии мази, содержащей анестезин, метилурацил и фурацилин // XLVII Огарёвские чтения: материалы науч. конф.: в 3 ч. / сост. А. В. Столяров; отв. за вып. П. В. Сенин. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2019. – С. 247–254.
11. Саушкина А. С., Нгуен Нгок Ань. Анализ мази «Левомеколь» модифицированным методом Фирордта // Региональная конференция по фармации, фармакологии и подготовке кадров. – Пятигорск, 1997. – С. 96–97.