

## ВИЗНАЧЕННЯ ДОМІШОК КУПРУМУ У СУБСТАНЦІЇ АДРЕНАЛІНУ ТА 0,18% РОЗЧИНІ ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙ

Блажеєвський М.Є., Боровська І.М. <sup>1</sup>

Національний фармацевтичний університет; <sup>1</sup>ДЗ «Луганський державний медичний університет»

Адреналін (син. епінефрин) (L-1-(3,4-діоксіфеніл)-2-метиламіноетанол) – відомий як гормон надниркових залоз та нейромедіатор. За хімічною будовою є катехоламіном. Адреналін міститься в різних органах і тканинах, у значних кількостях утворюється у хромафінній тканині, особливо у мізковій речовині надниркових залоз [1]. Його випускають у вигляді гідрохлориду та гідротартрату.

У літературних джерелах повідомлено, що катехіни пригнічують процеси перекисного окиснення ліпідів, що індукуються водорозчинними радикальними генераторами [2 – 4]. Крім того, катехіни за певних умов легко піддаються окисненню киснем з утворенням радикалу  $O_2^{\cdot-}$ , а відтак гідроген пероксиду [5 – 6]. Також повідомлено, що катехіни прискорюють розкладання ДНК і жирних кислот через перекисну регенерацію АФК, особливо у присутності купруму (II) [7 – 8] та піддаються автоокисненню [9].

У праці [12] повідомлено результати вивчення процесу окиснення адреналіну за флуоресценцією утворених продуктів у лужному середовищі карбонатного буферного розчину.

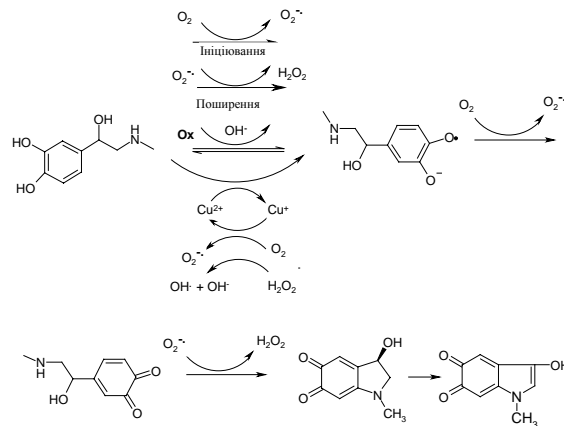
**Метою даного дослідження** було з'ясування можливості застосування доступного кінетико-спектрофотометричного варіанту для визначення вмісту домішок купруму у субстанціях та розчину лікарського засобу адреналіну гідрохлориду (АГХ) та гідротартрату (АГТ) без попереднього здійснення мінералізації зразків проби. Як індикаторна на купрум нами запропонована реакція автоокиснення адреналіну до адренолютину в лужному середовищі. Швидкість індикаторної реакції реєстрували за світлопоглинанням продукту реакції адренолютину при 360 нм.

Окиснення адреналіну можна зобразити такою схемою 1.

**Матеріали і методи дослідження. Реагенти.** У роботі використовували реагенти кваліфікації х.ч. або ч.д.а.; розчини виготовляли на одержаній за допомогою кварцового дистилятора двічі дистильованій воді. Випробовували субстанції лікарських речовин «Адреналіну гідротартрат», серія – 080902 (Китай) та «Адреналіну гідрохлорид» – серія 048K1260, виробник Sigma-Aldrich, USA. Розчин лікарського засобу «Адреналіну гідротартрат», серія - 171210, 0,18%, 1,0 мл № 10, виробник ТОВ ФК «Здоров'я» Україна.

Вихідний розчин  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л купруму (II) був виготовлений об'ємно-ваговим методом шляхом розчинення 0,2497 г купруму сульфату п'ятиводного (Мерк) у двічі дистильованій воді у мірній колбі, об'ємом 1 літр. Одержаний роз-

чин стандартизували методом йодометричного титрування [10]. Робочий розчин  $10^{-5}$  моль/л купруму (II) виготовлений розбавленням вихідного розчину двічі дистильованою.



**Схема 1.** Механізм автоокиснення похідних адреналіну у лужному середовищі.

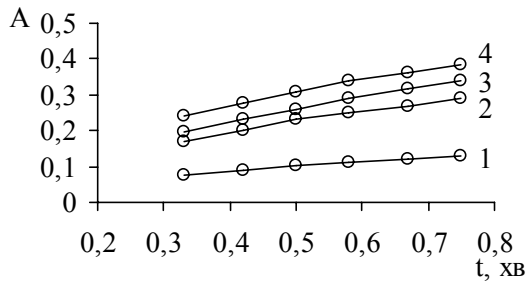
Амонію хлорид кваліфікації «о.с.ч.» отримували із реактиву «х.ч.» за методикою [11]. Амоніаковий буферний розчин виготовляли шляхом розчинення 6,75 г амоній хлориду у 500 мл отриманого ізотермічною дистиляцією [11] 18% розчину амоніаку, рН=11,8. рН вимірювали за допомогою скляного електроду в парі з насиченим калій хлоридом аргентумхлоридним електродом на рН-метрі-мілівольтметрі 150 МА.

Карбонатний буферний розчин виготовляли шляхом розчинення 4,2 г натрій гідрокарбонату та 5,3 г натрій карбонату у двічі дистильованій воді в мірній колбі на 500 мл, рН=11,2. Розчин натрій едетату  $0,01$  моль/л виготовляли масо-об'ємним способом, шляхом розчинення  $0,3722$  г у мірній колбі на  $100$  мл у двічі дистильованій воді. Робочий розчин  $10^{-3}$  моль/л натрій едетату готували розбавленням вихідного розчину двічі дистильованою. Температуру  $+30 \pm 0,5^\circ\text{C}$  підтримували за допомогою термостату ТС-80 та термостатованого пристрою.

Оптичну густина розчинів вимірювали на спектрофотометрі UNICO SPECTRO QUEST 2800 (Японія) у кварцовій кюветі з товщиною  $10$  мм. Використовували диференціальний варіант кінетичного методу; швидкість реакції характеризували тангенсом кута нахилу лінійних ділянок кінетичних кривих у координатах оптична густина – час ( $\text{tg}\alpha, \text{хв}^{-1}$ ).

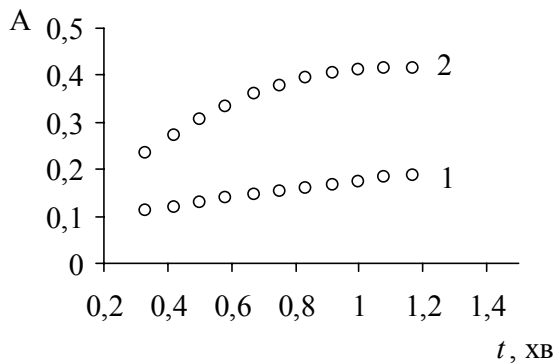
**Результати дослідження та їх обговорення.** Оптимальна концентрація адреналіну та природа буферного розчину були встановлені експериментально.

На рис. 1 наведена залежність швидкості утворення адренोलютину в реакції автоокиснення АГХ залежно від концентрації адреналіну у випробуваному розчині.



**Рис. 1.** Кінетичні криві утворення адренोलютину в реакції автоокиснення АГХ залежно від концентрації АГХ у лужному середовищі: 1 –  $1,8 \cdot 10^{-4}$  моль/л, 2 –  $4,55 \cdot 10^{-4}$  моль/л, 3 –  $9,1 \cdot 10^{-4}$  моль/л, 4 –  $1,09 \cdot 10^{-3}$  моль/л. рН=11,2, карбонатний буферний розчин.

На рис. 2 наведені кінетичні криві утворення адренोलютину у реакції автоокиснення субстанції АГХ залежно від природи буферного розчину.

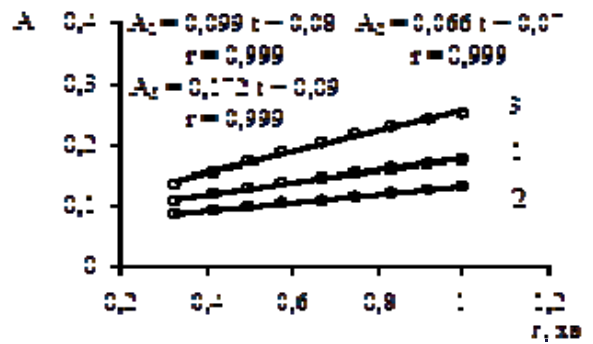


**Рис. 2.** Кінетичні криві утворення адренोलютину під час автоокиснення АГХ залежно від природи буферу: 1 – амоніаковий, рН=11,8; 2 – карбонатний, рН=11,2, с (адр) =  $9,1 \cdot 10^{-4}$  моль/л

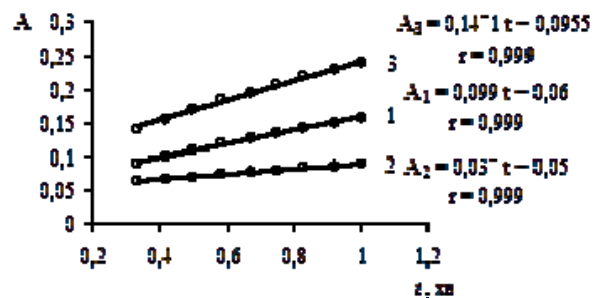
За оптимальну було обрано концентрацію  $1,33 \cdot 10^{-4}$  моль/л для АГТ та  $9,1 \cdot 10^{-4}$  моль/л для АГХ і застосування амоніакового буферного розчину, що дозволяло здійснювати достатню кількість вимірювань оптичної густини в часі на лінійній ділянці кінетичної кривої.

На рис. 3 наведені кінетичні криві залежності швидкості утворення адренोलютину у досліді з випробуваною субстанцією АГХ та додатково з добавками натрій едетату (2) та солі купруму (3). Як видно з рис. 3, добавка солі купруму  $4,77$  нг/мл призводить до збільшення швидкості реакції у 1,7 рази.

На рис. 4 наведені кінетичні криві залежності швидкості утворення адренोलютину у досліді з випробуваною субстанцією АГТ та додатково з добавками натрій едетату (2) та солі купруму (II) (3). Як видно, добавка купруму  $4,77$  нг/мл призводить до збільшення швидкості реакції у 1,5 рази.

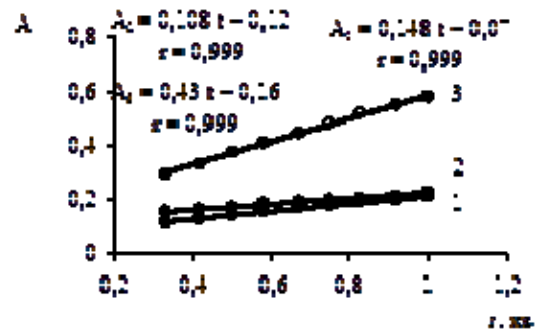


**Рис. 3.** Кінетичні криві утворення адренोलютину у реакції автоокиснення АГХ у середовищі амоніакового буферного розчину: 1 – АГХ, 2 – АГХ з додаванням натрій едетату  $1 \cdot 10^{-4}$  моль/л, 3 – АГХ з добавкою купруму  $4,77$  нг/мл; с (АГХ) =  $9,1 \cdot 10^{-4}$  моль/л, рН=11,8.



**Рис. 4.** Кінетичні криві утворення адренोलютину у реакції автоокиснення АГТ в середовищі амоніакового буферного розчину: 1 – АГТ, 2 – АГТ субст. з додаванням натрій едетату  $1 \cdot 10^{-4}$  моль/л, 3 – АГТ з добавкою купруму  $4,77$  нг/мл; с (АГТ) =  $1,33 \cdot 10^{-4}$  моль/л, рН=11,8.

На рис. 5 наведені кінетичні криві залежності швидкості утворення адренोलютину у досліді з випробуванням розчином лікарського засобу АГТ та додатково з добавками натрій едетату та солі купруму. Як видно, добавка купруму  $6,35$  нг/мл призводить до збільшення швидкості реакції у 4 рази.



**Рис. 5.** Кінетичні криві утворення адренोलютину у реакції автоокиснення розчину лікарського засобу АГТ в середовищі амоніакового буферного розчину: 1 – АГТ, 2 – АГТ розчин з додаванням натрій едетату  $1 \cdot 10^{-4}$  моль/л, 3 – АГТ з добавкою купруму  $4,77$  нг/мл; с (АГТ) =  $1,33 \cdot 10^{-4}$  моль/л, рН=11,8.

У спеціально здійснених досліді з додаванням розчину натрій едетат була виміряна швидкість некаталітичної реакції.

За оптимальних умов перебігу індикаторної реакції нами опрацьована нова кінетична методика кількісного визначення домішок купруму у субстанціях АГХ і АГТ та розчину лікарського засобу АГТ методом добавок.

**Методика кількісного визначення домішок купруму в субстанціях адреналіну та 0,18% розчині для ін'єкцій АГТ.** Близько 0,100 г субстанції адреналіну гідрохлориду або гідротартрату (точна наважка) розчиняли у мірній колбі на 50,0 мл у двічі дистильованій воді. Ретельно перемішували і переносили у термостат. Розчини термостатували впродовж 15-20 хвилин при +30°C. Під час аналізу розчину для ін'єкцій 0,18% адреналіну гідротартрату використовували розчин лікарського засобу без додаткового розбавлення.

1,00 мл отриманого розчину адреналіну перенесли у мірну колбу на 10 мл та доводили до позначки амоніаковим буферним розчином з рН=11,8, ретельно перемішували та вимірювали оптичну густину при 360 нм у кварцовій кюветі на 1 см впродовж 1,5 хв у автоматичному режимі з інтервалом кожних 5 с.

Аналогічно здійснювали досліди з додаванням 0,75 мл  $1 \cdot 10^{-5}$  моль/л стандартного розчину купруму (II) для субстанцій АГХ та АГТ та 1,00 мл  $1 \cdot 10^{-5}$  моль/л стандартного розчину купруму (II) до розчину лікарського засобу АГТ.

1,00 мл отриманого розчину вміщували в мірну колбу на 10 мл, додавали 0,75 – 1,00 мл  $1 \cdot 10^{-5}$  моль/л стандартного розчину купруму (II) та доводили до мітки амоніаковим буферним розчином, рН=11,8 ретельно перемішували та вимірювали оптичну густину при 360 нм у кварцовій кюветі на 1 см впродовж 1,5 хв з інтервалом кожних 5 с у автоматичному режимі.

**Таблиця.** Результати кількісного визначення вмісту домішок купруму у субстанціях АГХ, АГТ та розчині лікарського засобу АГТ

№ п/п	Випробуваний об'єкт	Вміст купруму, мкг/г	Метрологічні характеристики ( $n=5; P=0,95$ )
1	Субстанція адреналіну гідрохлориду, серія 048K1260, виробник Sigma-Aldrich, USA	8,76 9,12 9,11 9,42 9,6	$\bar{X} = 9,2 \cdot \text{мкг/г}$ $\Delta X = 4,03 \cdot 10^{-7}$ $S = 3,42 \cdot 10^{-7}$ $S_{x(\text{cp})} = 1,45 \cdot 10^{-7}$ $RSD = 3,52\%$ $-\varepsilon = 4,38\%$
2	Субстанція адреналіну гідротартрату, серія 080902, виробник Китай.	2,89 2,86 2,86 2,77 2,86	$\bar{X} = 2,85 \cdot \text{мкг/г}$ $\Delta X = 5,75 \cdot 10^{-8}$ $S = 4,62 \cdot 10^{-8}$ $S_{x(\text{cp})} = 2,07 \cdot 10^{-8}$ $RSD = 1,62\%$ $-\varepsilon = 2,01\%$
3	0,18% розчин для ін'єкцій адреналіну гідротартрату 1,0 мл № 10, серія 171210, виробник ТОВ ФК «Здоров'я» Україна	4,26 4,64 4,81 4,96 4,69	$\bar{X} = 4,67 \cdot \text{мкг/г}$ $\Delta X = 3,23 \cdot 10^{-7}$ $S = 2,59 \cdot 10^{-7}$ $S_{x(\text{cp})} = 1,16 \cdot 10^{-7}$ $RSD = 5,56\%$ $\varepsilon = 6,91\%$

Методом добавок встановлено, що вміст купруму у субстанціях не перевищував 10 мкг/г, причому RSD середнього результату  $\leq 3,52\%$ , в розчині лікарського засобу вміст купруму становив 4,67 мкг/г,  $RSD \leq 5,56\%$ .

Швидкість некаталітичної реакції вимірювали в дослідах з добавкою 1,00 мл  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л розчину натрій едетату. 1,00 мл отриманого розчину вміщували в мірну колбу на 10 мл, додавали 1,00 мл  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л розчину натрій едетату та доводили до мітки амоніаковим буферним розчином, рН=11,8 ретельно перемішували та вимірювали оптичну густину при 360 нм у кварцовій кюветі на 1 см впродовж 1,5 хв з інтервалом кожних 5 с у автоматичному режимі.

За одержаними результатами знаходили тангенс кута нахилу лінійної ділянки кінетичних кривих,  $\text{tg}\alpha$ , у  $\text{хв}^{-1}$ .

Кількісний вміст купруму у субстанціях адреналіну гідрохлориду та гідротартрату та розчині лікарського засобу адреналіну гідротартрату розраховували за формулою:

$$C = \left[ \frac{C_1}{(\text{tg}\alpha_2 - \text{tg}\alpha_1)} \cdot (\text{tg}\alpha_1 - \text{tg}\alpha_3) \right] \cdot 1/m$$

де:  $C$  – вміст купруму у субстанції адреналіну або лікарському засобі, мкг/г;

$C_1$  – кінцева концентрація добавки купруму (II), г/л;

$\text{tg}\alpha_1$  – тангенс кута нахилу кінетичної кривої у досліді з випробуванням розчином субстанції або лікарського засобу;

$\text{tg}\alpha_2$  – тангенс кута нахилу кінетичної кривої у досліді з випробуванням розчином субстанції або лікарського засобу з добавкою купруму(II);

$\text{tg}\alpha_3$  – тангенс кута нахилу кривої некаталітичної реакції у досліді з додаванням натрій едетату;

$m$  – маса наважки субстанції або об'єм розчину лікарського засобу, г.

#### Висновки:

1. Вивчено вплив природи буферного розчину на швидкість процесу окиснення адреналіну до адренолітину.
2. Запропоновані нові кінетико-спект-

рофотометричні методики кількісного визначення домішок купруму у лікарських засобах адреналіну, заснованих на реакції його автоокиснення.

3. За результатами аналізу субстанцій адреналіну гідрохлориду, гідротартрату та 0,18% розчину для ін'єкцій адреналіну гідротартрату RSD ≤ 3,52% та 5,56% відповідно.

#### ЛІТЕРАТУРА:

1. **Машковський М.Д.** Лекарственные средства: В 2 т. Т.1./М. Д. Машковський. - 14-е изд., перераб., испр. И доп. - М.:ООО «Изд. Новая волна»: Издатель С. Б. Дивов. - 2002. - 540 с.
2. **Salah N.** Polyphenolic flavenols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants / N. Salah, N.J. Miller, G. Paganga, L. Tijburg, G.P. Bolwell, C. Rice Evans // Arch. Biochem. Biophys. - 1995. - № 322. - P. 339-346.
3. **Terao J.** Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate, and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers / J. Terao, M. Piskula, Q. Yao // Arch. Biochem. Biophys. - 1994. - № 308. - P. 278-284
4. **Pannala A.S.** Inhibition of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols / A.S. Pannala, C.A. Rice-Evans, B. Halliwell, S. Singh // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1997. - № 232. - P. 164-168.
5. **Nakayama T.** Hydrogen peroxide formation during catechin oxidation is inhibited by superoxide dismutase / T. Nakayama, Y. Enoki, K. Hashimoto // Food Sci. Technol. Int. - 1995. - № 1. - P. 65-69.
6. **Miura Y.H.** Active oxygen generation by flavonoids / Y.H. Miura, I. Tomita, T. Watanabe, T. Hirayama, S. Fukui // Biol. Pharm. Bull. - 1998. - № 21. - P. 93-96.
7. **Hayakawa F.** DNA cleavage reaction and linoleic acid peroxidation induced by tea catechins in the presence of cupric ion / F. Hayakawa, T. Kimura, T. Maeda, M. Fujita, H. Sohmiya, M. Fujii, T. Ando // Biochim. Biophys. Acta. - 1997. - № 1336. - P. 123-131.
8. **Hayakawa F.** DNA cleavage activities of (3)-epigallocatechin, (3)-epicatechin, (+)-catechin, and (3)-epigallocatechin gallate with various kind of metal ions / F. Hayakawa, T. Kimura, N. Hoshino, T. Ando // Biosci. Biotechnol. Biochem. - 1999. - № 63. - P. 1654-1656.
9. **Mochizuki M.** Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins / M. Mochizuki, Shin-ichi Yamazaki, K. Kano, T. Ikeda // Biochimica et Biophysica Acta. - 2002. - № 1569. - P. 35-44.
10. Державна фармакопея України/Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр».- 1-е вид. - Харків: PIPEГ, 2001. - Доповнення 1. - 2004. - 520 с.
11. **Карякин Ю.В.** Чистые химические вещества/ Ю. В. Карякин, И. И.Ангелов// изд. 4-е, пер. и доп. - М.: Химия, 1974. - 408 с.
12. **West G.B.** Oxidation of adrenaline in alkaline solution / G.B. West // Brit. J. Pharmacol. - 1947 - № 2. - P. 121 -130.

**Блажесвський М.С., Боровська І.М.** Визначення домішок купруму у субстанції адреналіну та 0,18% розчині для ін'єкцій // Український медичний альманах. - 2012. - Том 15, № 1. - С. 22-25.

Запропоновані кінетико-спектрофотометричні методики кількісного визначення домішок купруму у субстанціях та лікарському засобі адреналіну, які засновані на вимірюванні швидкості реакції каталітичного автоокиснення досліджуваної речовини у середовищі амоніакового буферного розчину. Показана можливість кількісного визначення домішок купруму у субстанціях адреналіну гідротартрату та гідрохлориду, а також 0,18% розчині для ін'єкцій адреналіну гідротартрату.

**Ключові слова:** субстанція адреналіну, автоокиснення, кінетичний метод, визначення домішок купруму, адренолутин.

**Блажеевский Н.Е., Боровская И.Н.** Определение примесей меди в субстанции адреналина и 0,18% растворе для инъекций // Український медичний альманах. - 2012. - Том 15, № 1. - С. 22-25.

Предложены кинетико-спектрофотометрические методики количественного определения примесей меди в субстанциях и лекарственном средстве адреналина, которые основаны на измерении скорости реакции каталитического автоокисления исследуемого вещества в среде аммиачного буферного раствора. Показана возможность количественного определения примесей меди в субстанциях адреналина гидротартрата и гидрохлорида, а также 0,18% растворе для инъекций адреналина гидротартрата.

**Ключевые слова:** субстанция адреналина, автоокисление, кинетический метод, определение примесей меди, адренолутин.

**Blazhevskiy M.Ye., Borovskaya I.N.** Determination of copper impurities in the substance and 0.18% epinephrine solution for injection // Український медичний альманах. - 2012. - Том 15, № 1. - С. 22-25.

Kinetic-spectrophotometric methods for quantitative determination of copper impurities in medicinal substances adrenaline and drug, based on measuring the rate of catalytic oxidation reaction of the substance in the medium of the ammonia buffer solution was proposed. The possibility of quantitative determination of copper impurities in substances and adrenaline hydrotartrat, hydrochloride and 0,18% solution for injection of adrenaline hydrotartrat was shown.

**Key words:** substance adrenalin (epinephrine), auto-oxidation, the kinetic method, determination of copper impurities, adrenolutin.

Надійшла 15.11.2011 р.

Рецензент: проф. Л.В.Савченкова