

A. Paustovska, PhD student, V. Sushko, student, G. Boiko, student,
L. Zinko, PhD, O. Zaporozhets, Professor,
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

THE METHODS OF MOLECULAR SPECTROSCOPY FOR OXALATE AND TARTRATE DETERMINATION

Reviews about molecular spectroscopy methods of oxalate and tartrate determination have been systematized. The special attention have been paid to the spectrophotometry techniques, which based on both competitive and redox reactions, and luminescence, including chemiluminescence. Spectrophotometric techniques earlier proposed for tartrate and oxalate determination were shown to be of low sensitivity and unsuitability for body fluids analysis. Kinetic techniques were found to be more sensitive, but the procedures are time-consuming. Luminescent techniques for the anions determination are as sensitive as the kinetic ones, and characterized with sufficient selectivity. Spectroscopic methods have been shown to be perspective for the anions above determination in blood and urine in order to diagnosis diseases and to carry out therapeutic drug monitoring. Moreover, the methods proposed were proved to be useful for quality control testing of drugs and food products, containing oxalate and tartrate.

Keywords: spectrophotometry, luminescence, oxalate, tartrate.

УДК 543.645.9+543.062

Ю. Цирульнева, інж.,
О. Запорожець, д-р хім. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

СУЧАСНІ МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ ДІУРЕТИКІВ У ФАРМАЦЕВТИЧНИХ ТА БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТАХ

Проведено аналіз даних літератури щодо сучасних методів визначення і виявлення діуретиків у фармацевтичних препаратах та біологічних рідинах. Показано, що до найбільш розповсюджених відносяться хроматографічні та спектроскопічні, зокрема люмінесцентні, методи. Складність біологічних матриць та низький вміст діуретиків передбачає проведення стадії попереднього концентрування аналітів та їх відокремлення від компонентів матриці.

Ключові слова: хроматографічні методи, спектроскопічні методи, діуретики.

Вступ. Діуретики широко використовуються у клінічній практиці для лікування гіпертензії та різних видів набряків [1], а також для корекції кислотного-лужного балансу та для лікування інтоксикацій та деяких уражень [2]. Ці речовини зазвичай збільшують об'єм сечі, що виробляється, та посилюють виведення електролітів та води разом із сечею як результат порушення транспорту іонів у нирках.

Спортсмени приймають діуретики з декількох причин: для зменшення маси тіла з метою кваліфікації у меншій ваговій категорії, для зниження концентрації інших заборонених речовин з метою уникнення допінг-позитивних результатів та для подолання утримування рідини, спричиненого використанням анаболічних стероїдів [3]. Наведені причини застосування діуретиків у спорті пов'язані з їхньою здатністю збільшувати об'єм сечі, що виділяється організмом, або збільшувати рН сечі [4] (наприклад, інгібіторами карбоангідрази), що призводить до зменшення екскреції лужних допінгових агентів, таких як мемфентермін, фентермін та амфетамін [5]. Концентрація цих речовин стає меншою за межу виявлення в рутинному аналізі. Більш того, довший період напівжиття в організмі викликає збільшення метаболізму деяких сполук. Високоєфективні діуретики типу фуросеміду та буметаніду не проявляють таких властивостей. Встановлено, що хоча деякі діуретики піддаються високому ступеню метаболізму, більшість з них виводяться із сечею у незмінному вигляді. Наприклад, не зазнають метаболізму 99% ацетазоламіда і 4-12% триамтерена [6].

Застосування діуретиків спортсменами заборонено згідно із Всесвітньою Анти-Допінговою Агенцією [7]. Регламентована Межа Детектування діуретиків складає 250 нг/мл [8]. Надмірне неконтрольоване прийняття діуретиків може призвести до серйозних проблем в організмі [9].

Діуретики належать до різних класів хімічних сполук. Вони значно різняться між собою як за молекулярною структурою, так і за фізико-хімічними властивостями. До основних діуретиків належать калійзберігаючі діуретики, наприклад, амілорид, триамтерен, до нейтральних - антагоністи альдостерону, такі як канренон, спіронолактон, до слабкокислотних - інгібітори карбоангідрази, наприклад, ацетазоламід, тіазидні похідні та ті, що належать до них, наприклад, хлорталідон, а до сильнокислотних діуретиків - петлеві діуретики типу фуросеміду

та етакринної кислоти [2]. В основу класифікації було покладено тип функціональних груп у молекулі, а також значення pK_a [10]. Основні характеристики найбільш уживаних діуретиків наведено у табл. 1.

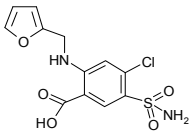
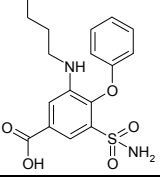
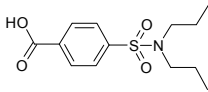
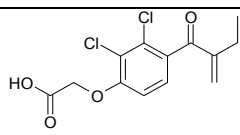
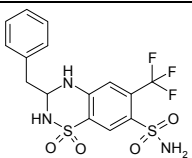
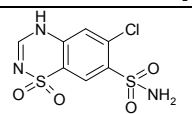
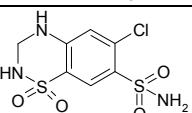
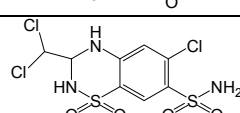
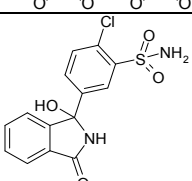
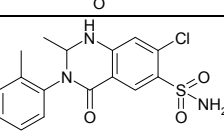
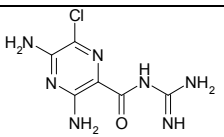
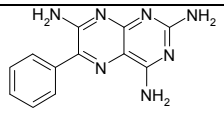
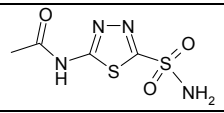
Амілорид (3,5-діаміно-6-хлоро-N-(діамінометил)-піразин-2-карбоксамід) та триамтерен (6-фенілптерідін-2,4,7-триамін) є калійзберігаючими діуретиками. Найчастіше вони застосовуються для лікування гіпертензії та хронічної серцевої недостатності, а також у комбінації з іншими діуретиками для коригування балансу електролітів. Механізм дії цих діуретиків включає блокування епітеліального натрієвого каналу та інгібування реабсорбції натрію. Амілорид та триамтерен збільшують кількість солі та води, які нирки виводять разом з сечею. Збільшуючи кількість води, що виводиться з крові, вони таким чином спричинюють зниження тиску. Ці діуретики можуть викликати гіперкалемію або ацидоз.

Буметанід (3-бутиламіно-4-фенокси-5-сульфамойл-бензойна кислота) застосовується для лікування серцевої та ниркової нездатності та набряків легень і мозку [11]. Він спричинює екскрецію натрію, калію, магнію та кальцію та подавляє транспорт хлоридів та реабсорбцію натрію у висхідній петлі Генле та проксимальному каналі. Фуросемід (5-(аміноссульфоніл)-4-хлоро-2-[(2-фуранілметил)аміно]бензойна кислота) широко використовується при лікуванні хронічної серцевої недостатності [12] та цирозу печінки [13]. Фуросемід блокує натрієво-хлоридний транспорт у висхідній петлі Генле та спричинює збільшення кількості води та виснаження електролітів. Буметанід у 40 разів ефективніший за фуросемід.

Тіазидні діуретики, такі як хлортіазид, гідрохлортіазид та бендрофлюметіазид, та ті, що до них належать (хлорталідон та метолазон), рекомендовано до застосування при лікуванні гіпертонії та хронічної серцевої недостатності [14]. Вони діють у дистальному звивистому каналці, частині нефрону у нирці, де подавляють натрієво-хлоридний транспорт. У результаті вода виділяється разом із сечею замість того, щоб абсорбуватися у кров [15]. Постійне лікування тіазидними діуретиками спричинює зменшення кров'яного тиску шляхом зниження периферійного опору (тобто розширення кровноносних судин). Механізм цього ефекту точно не відомий, проте він може включати пряму судинорозширювальну дію шляхом інгібування карбоангідрази [16] або десенсибілізації гладком'язових клітин судин внаслідок підвищення міжклітинного кальцію, спричинене норадреналіном [17].

Таблиця 1

Основні характеристики діуретиків [2]

№	Клас	Назва	Структура	pK _a	
				pK _{a1}	pK _{a2}
1	Петлеві	Фуросемід		3.9	-
2		Буметанід		1.4	3.7
3		Пробенецид		3,4	-
4		Етакринна кислота		3,5	-
5	Тіазидні	Бендрофлюметіазид		8.5	-
6		Хлортіазид		6.7	9.5
7		Гідрохлортіазид		7.9	9.2
8		Трихлорметіазид		8.6	-
9		Хлорталідон		9,4	-
10		Метолазон		9,7	-
11	Калійзберігаючі	Амілорид		8.7	-
12		Тріамтерен		6.2	-
13	Інгібітори карбоангідази	Ацетазоламід		7,4	9,1

Ацетазоламід як інгібітор карбоангідази, застосовують у хворих, що страждають на глаукому, епілепти-

чні напади, ідіопатичну внутрішньочерепну гіпертензію, висотну хворобу та періодичний параліч. Механізм дії

цього діуретику полягає у зниженні реабсорбції бікарбонату в нирках, що призводить до підлужування сечі та до зменшення можливості обміну іонів водню, які у свою чергу потрапляють до крові, спричинюючи метаболічний ацидоз [18].

Отже, надмірне споживання та неправильне припинення діуретиків може спричинити появу негативних побічних дій, тому важливо контролювати їхній прийом. Крім того, аналітичний контроль зразків сечі на вміст малих кількостей допінгу потребує застосування виключно чутливих та вибіркового методів їх визначення.

Найбільш поширеними методами визначення діуретиків є газова та вискоефективна рідинна хроматографія. Саме такі методи забезпечують проведення визначення з необхідним рівнем достовірності і селективності. Проте такий аналіз у більшості випадків можливий лише після попереднього концентрування аналітів методами твердофазної або рідинно-рідинної екстракції. Окрім того, тривалість та застосування складного та дорогого обладнання ускладнює їх систематичне використання.

Іншими високоселективними методами визначення є спектроскопічні методи, зокрема спектрофотометричні та люмінесцентні методи, які добре зарекомендували себе при визначенні біоактивних речовин у водних розчинах. Складні біологічні матриці, такі як сеча та кров, вимагають проведення попереднього відокремлення аналітів.

Для визначення фуросеміду та буметаніду в лікарських препаратах широке застосування здобули титриметрія [19]. Складність визначення діуретиків титриметричними методами полягає в їхній нерозчинності у воді. Проте було доведено доцільність використання міцелярних розчинів ПАР для титрування органічних кислот помірної гідрофобності. До того ж, криві титрування фуросеміду в ПАР мають яскраво виражені перегиби. У роботі [19] було запропоновано спосіб визначення фуросеміду методом рН-метричного титрування з використанням в якості середовища водно-міцелярного розчину додецилпіридиній хлориду. Метод характеризується задовільною правильністю та відтворюваністю. Застосування кольорових індикаторів для встановлення точки еквівалентності покращує точність аналізу. Неможливість застосування розробленої методики в сечі та для визначення малих концентрацій обмежує її використання в клінічному аналізі.

Більш чутливими методами є спектрофотометричні [20-23], спектрофлуориметричні методи [24-25] та капілярний електрофорез [26-29]. Тріамтерен, амілорид та тіазидні діуретики також визначають методами хемометрії [30], хемілюмінесцентними [31-36], потенціометричними методами [37] та методом капілярного електрофорезу [38]. Хемілюмінесцентні методи знайшли широке розповсюдження через високу селективність і чутливість та легкість автоматизації вимірювання.

Для визначення тіазидних похідних найчастіше використовують хемілюмінесцентну реакцію Ce(IV) з родаміном 6G. Наприклад, у роботі [34] запропоновано метод визначення гідрохлортіазиду в таблетках, що базується на зміні інтенсивності хемілюмінесценції у реакції діуретику з Ce(IV) та родаміном 6G у сульфатній кислоті. Визначенню не заважають інші компоненти таблетки (манітол, лактоза, стеарат магнію тощо) та амілорид і лізіноприл.

В основу хемілюмінесцентного методу визначення гідрохлортіазиду та фуросеміду у фармацевтичних препаратах [33] покладено хемілюмінесцентну реакцію діуретику з Ce(IV) та рутеній (II)-тріс(батофентролін-дисульфатом) (RuBPS). Встановлено, що хемілюмінесценція гідрохлортіазиду більш чутлива, але повільніша за фуросемід. Метод характеризується ширшим діапазоном лінійності градуовального графіку та високою чут-

ливістю, проте він є недостатньо селективним, що ускладнює визначення цих діуретиків у суміші з іншими.

Перспективним є розвиток часороздільної хемілюмінесцентний метод визначення гідрофлуметізиду у фармпрепаратах, що базується на реакції Ce(IV) з родаміном 6G у кислому середовищі. Найбільша інтенсивність випромінювання спостерігається через 1,8 с після початку реакції, потім повільно спадає. Пропонується розрахунок концентрації діуретику залежно від інтенсивності сигналу та площі його піку. Аналогічний метод для визначення гідрохлортіазиду запропоновано в роботі [35]. Найбільша інтенсивність випромінювання досягається через 1,5 с після змішування компонентів. Методика характеризується недостатньою чутливістю, вибірковістю та значним підвищенням швидкості реакції в присутності супутніх речовин у препараті (каптоприлу, тіопроніну).

У роботі [32] тіазидні діуретики (індапамід, метолазон, гідрофлуметіазид, хлорталідон, бендрофлуметіазид) визначають у таблетках методом онлайнної фотохімічної деградації у сильнокислому середовищі з наступним хемілюмінесцентним визначенням фотофрагментів за допомогою Ce(IV) з родаміном 6G. Також була розроблена методика визначення гідрохлортіазиду та фуросеміду в таблетках [33] із застосуванням хемілюмінесцентної реакції тріс-(4,7-дифеніл-1,10-фенантролін)дисульфат) рутенію (II) (RuBPS)- Ce(IV) .

Хемілюмінесцентні методи характеризуються високою чутливістю, але недостатньою вибірковістю, тому їх не застосовують для аналізу біологічних рідин. Високий вплив компонентів матриці є обмеженням, оскільки передбачає попереднє відокремлення аналітів.

Хроматографічні методи. Хроматографічні методи найчастіше використовуються при аналізі суміші діуретиків. Перевагами їх застосування є проведення багатокомпонентного аналізу, висока чутливість та специфічність аналізу. За допомогою якісного скринінгового аналізу можливо визначити всі ці групи препаратів у біологічних рідинах, оскільки умови вилучення та інструментального аналізу є компромісними для аналітів різного типу. Згідно вимог ВАДА, єдиними методами для визначення діуретиків у біологічних рідинах є газова або рідинна хроматографія з мас-спектроскопічним детектуванням. Найчастіше для визначення діуретиків як непорогових субстанцій застосовують вискоефективну рідинну хроматографію з різними типами пробопідготовки.

Так, у роботі [39] було запропоновано метод рідинної хроматографії діуретиків на неполярній колонці з тандемним мас-детектуванням. Було проведено порівняння двох типів пробопідготовки. Одна з них включала проведення рідинно-рідинної екстракції етилацетатом з випаровуванням органічного шару і розчиненням сухого залишку в рухомій фазі (метанол-вода). Невисокі ступені вилучення спостерігалися для діуретиків, що утворюють цвіттер-іони. Проте висока ефективність іонізації та відносно низьке подавлення іонів дали змогу досягти задовільної вибіркової. Введення нерозбавленого зразку спричинювало зсуви у часах утримування кислотних та основних діуретиків, лише слабкокислі та нейтральні сполуки не зазнавали змін. Розбавлення зразку не завжди сприяє уникненню зсуву, тому в якості іон-паруючого агента додавали трифтороцтову кислоту. За цих умов досягається більша відтворюваність результатів, але збільшується подавлення іонів речовин, що реєструються в режимі негативної іонізації. Зниження чутливості через подавлення іонізації біологічною матрицею виявлено також у роботах [40-41]. Розділення діуретиків на колонці ускладнюється їхньою різною полярністю. Складність інтерпретації піків на хроматограмі та їхня розмитість обмежує застосування рідинної хроматографії в рутинному аналізі.

З метою позбавлення матриці і переведення діуретиків в органічну фазу найчастіше застосовують рідинно-рідинну екстракцію. Наприклад, у роботі [42] запропоновано проводити екстракцію при рН 5 етилацетатом із застосуванням фосфатного буферу з рН 8 для очищення органічної фази. Ступінь вилучення становить 50-90%, проте кислотні діуретики майже не вилучаються. Якщо одночасно необхідно визначити кислотні, нейтральні та основні діуретики, використовують дві окремі рідинно-рідинні екстракції в лужному середовищі та в кислому з подальшим об'єднанням екстрактів.

Рідинна хроматографія в ряді випадків дає можливість досягти низьких меж виявлення при скороченні часу аналізу. У роботі [43] пробопідготовка включала доведення рН до 9,5, рідинно-рідинну екстракцію етилацетатом, випаровування розчинника та розчинення сухого залишку у рухомій фазі (вода/ацетонітрил 90/10). Високі інтенсивності сигналів, одержані в позитивному режимі іонізації для більшості аналітів, можуть бути пояснені розкладом рухомої фази та наявністю у діуретиків функціональних груп з високою спорідненістю до протону.

Через відносно високу вартість аналізу та обладнання рідинну хроматографію з мас-детектуванням для кількісного визначення діуретиків у біологічних рідинах та для скринінгу. Газова хроматографія з мас-детектуванням (ГХ-МС) застосовується для багатокомпонентного, вибіркового та чутливого виявлення діуретиків у сечі та демонструє кращі результати при проведенні процедури підтвердження. Оскільки діуретики належать до неперогових субстанцій, що вимагає встановлення лише їх присутності у пробі, то ГХ-МС є більш доцільним методом для цього. Окрім того, згідно вимог ВАДА, оптимальним методом для підтвердження наявності діуретиків є метод, відмінний від методу скринінгу.

Якісне виявлення компонентів у зразку сечі здійснюється за їхніми мас-спектрами та часами виходу. Метод дає можливість здійснювати якісний аналіз діуретиків, що не розділяються хроматографічно. Якщо дві речовини мають близький час утримування та їхні мас-спектри накладаються, то зазвичай будують мас-хроматограми за іонами, що мають найбільшу інтенсивність. Для підвищення надійності якісного аналізу мас-хроматограми будують не за одним, а за двома-трьома характеристичними для даної сполуки іонами.

Коли основною задачею аналізу є якісне виявлення ультрамікрокомпонентів, для підвищення чутливості аналізу застосовують техніку мас-фрагментографії або моніторингу за заданими іонами (SIM, Selected Ion Monitoring). У цьому випадку мас-спектрометр сканує не весь діапазон мас, а налаштовується на реєстрацію іонів із заданим співвідношенням m/z . Одночасно реєструється не більше 2-4 іонів упродовж вузького інтервалу часу, оскільки час виходу компонентів відомий. Виграш у чутливості супроводжується програвом в інформативності та надійності методу. Оскільки весь діапазон мас не сканується, то повний мас-спектр не реєструється, а саме він є унікальною характеристикою речовини. Для підвищення надійності методу застосовують мас-фрагментографію високого розділення або тандемну мас-спектрометрію [44].

ГХ-МС метод, який включає двостадійну рідинно-рідинну екстракцію та дериватизацію, було запропоновано для кількісного визначення 16 діуретиків [45]. У роботі було проаналізовано три типи пробопідготовки. Перші два типи відрізняються способом перемішування розчинів та включають двостадійну екстракцію: при рН 10,0 та при рН 3,5 з подальшою рідинно-рідинною екстракцією метиленхлоридом/ізопропанолом 85/15. Третій тип пробопідготовки сечі передбачає проведення вилу-

чення діуретиків з підкисленого до рН 5 розчину на сорбенті Varian ABS ELUT Nexus. Сорбент промивають водою, аналіти елююють метанолом. Лише перший тип пробопідготовки з перемішуванням на вортексі забезпечує вилучення всіх діуретиків, що аналізують. Тривалий час попередньої пробопідготовки обмежує застосування цього методу в рутинному аналізі. Більш того, не вдається досягти високого вилучення хлорталідону та триамтерену. Водночас ГХ-МС демонструє кращі результати для якісного визначення та для підтвердження.

Метод ГХ-МС з твердофазною екстракцією діуретиків на комерційних сорбентах запропонований для процедури підтвердження наявності діуретиків у пробі в роботі [46]. Так, для вилучення діуретиків з сечі використовували сорбент C18 Sep-Pak, попередньо кондиціонований метанолом та водою. Сорбент промивали водою та елюювали діуретики метанолом. Після проведення дериватизації їх вміст визначали методом ГХ-МС. На жаль, у роботах [46, 47] не вивчалися ступінь вилучення діуретиків та заважаючий вплив матриці сечі та інших діуретиків. Окрім того, обидва методи не було валідовано. Тривалість аналізу через довгий час утримування є недоліком ГХ методу, запропонованого в [48].

Незважаючи на велику кількість запропонованих методик, газова або рідинна хроматографія з мас-спектрометричним детектуванням не завжди забезпечує необхідну вибірковість щодо компонентів сечі [47, 49]. У випадку рідинної хроматографії застосування тандемної мас-спектрометрії дало можливість вирішити цю проблему та забезпечити задовільний результат [50-52]. Використання тандемної мас-спектрометрії для детектування 9 діуретиків різних класів при газохроматографічному розділенні на колонці середньої полярності було запропоновано в роботі [53]. Екстракцію діуретиків проводили при рН 6-7 сумішшю етилацетату з ізопропанолом (17:3). Дериватизацію проводили за стандартною процедурою [54]. Для скорочення часу розділення було оптимізовано температурну програму. Повне розділення відбувалося за 12 хв. Підбір діагностичних реакції фрагментації та оптимальних енергій зіткнення дозволив досягти високої вибіркової. Метод було валідовано для застосування в антидопінгових лабораторіях.

Висока вартість інструментального забезпечення та необхідність висококваліфікованого персоналу для проведення аналізів є суттєвими обмеженнями. Тривалий час пробопідготовки та хроматографування обмежують застосування хроматографічних методів у випадку необхідності проведення експрес-аналізу.

Спектрофотометричні методи визначення діуретиків. Методи молекулярної емісії та абсорбції широко використовуються при аналізі фармацевтичних препаратів та біологічних молекул. Їм притаманна висока чутливість та точність і швидкість аналізу. Крім того, низька вартість інструментального забезпечення сприяє широкому застосуванню цих методів при аналізі.

Метод спектрофотометричного визначення амілориду, буметаніду, фуросеміду та тіазидних діуретиків було запропоновано в роботі [55]. Метод оснований на утворенні забарвлених комплексів діуретиків з 3-метил-2-бензотіазолінгідразоном, який широко використовується в реакціях з фенолами, амінами та альдегідами, у присутності різних окисників. Так, інтенсивність поглинання комплексів амілориду вимірювали у присутності Церію (IV) при довжині хвилі 545 нм, буметаніду та фуросеміду – у присутності хлориду Феруму (III) при 660 та 630 нм, відповідно, тіазидів – у присутності метаперйодату натрію після лужного гідролізу при 550 нм. Метод характеризується низькою межею виявлення завдяки високому молярному коефіцієнту поглинання та

точністю завдяки низькому стандартному відхиленню. Натомість відсутність даних про можливість визначення одного діуретику у присутності іншого обмежує застосування методу. Окрім того, довгий час встановлення рівноваги у розчинах (2 години) є суттєвим обмеженням запропонованого методу.

Найбільш широке застосування спектрофотометричних методи знайшли для визначення фуросеміду у фармацевтичних препаратах.

Метод визначення фуросеміду, який базується на утворенні забарвленого комплексу з Паладієм (II) у лужному та з Ферумом (III) у слабкокислому середовищі, запропоновано в роботах [21, 23]. Невисока чутливість (МВ 8,4 мкг/мл), спричинена низьким молярним коефіцієнтом поглинання комплексу з Паладієм (II) ($1,86 \cdot 10^2$ л/моль·см) та складність визначення фуросеміду в присутності інших діуретиків є недоліками цих методів.

У роботі [56] запропоновано метод визначення гідрохлортиазиду та амілориду у фармацевтичних препаратах. Для аналізу розчину, одержаного внаслідок розчинення наважки препарату в суміші метанолу і соляної кислоти, застосовували метод похідної спектрофотометрії з інтервалом в 4 нм. Вузкий діапазон визначуваних концентрацій та неможливість визначення малих концентрацій зменшують можливості застосування методу в рутинному аналізі.

Застосовуючи метод мультіваріативного аналізу одержаних даних, можна визначати амілорид та тіазидні діуретики [57]. Для визначення цих діуретиків у синтетичних зразках та у фармацевтичних препаратах застосовували метод аналізу часткових найменших площ даних зі спектрів світлопоглинання. Розроблений метод є швидким та точним та не вимагає попереднього розділення суміші діуретиків. Проте, невеликий діапазон лінійності градувальних графіків та невисока чутливість унеможливають застосування запропонованого методу в розбавлених зразках.

Метод спектрофотометричного визначення індапаміду, гідрохлортиазиду та ксіпаміду у фармпрепаратах, оснований на утворенні забарвлених різнолігандних комплексів з еозином та Плюмбумом (II), було запропоновано в роботі [58]. Різнолігандний комплекс утворювався в присутності метилцелюлози, яку додавали для підвищення стійкості комплексу та запобігання утворення осаду, у кислому середовищі при рН 3, який створювали додаванням ацетатного буферу, та після нагрівання при 70 °С впродовж 20 хв. Поглинання комплексів вимірювали при 543 нм. Спектрофлуориметричне визначення діуретиків можливе за рахунок гасіння діуретиками люмінесценції комплексу еозин-Плюмбум. Метод характеризується невисокою вибірковістю визначення, оскільки система еозин-Плюмбум не є вибірковою щодо одного діуретику, що потребує попереднього розділення цих діуретиків.

Люмінесцентні методи визначення діуретиків. За останні 30 років метод сенсibilізованої люмінесценції комплексних сполук, особливо європію та тербію, з органічними лігандами широко застосовувалося в аналітичній практиці, зокрема у біологічних системах, кількісного визначення органічних сполук та хроматографічного детектування. Інтенсивна флуоресценція комплексів лантаноїдів, яка є результатом внутрішньомолекулярної передачі енергії зі збудженого триплетного рівня ліганду, що є донором, на збуджений рівень іону лантаноїду (акцептора), характеризується великим Стоксовим зсувом, відносною довготривалістю випромінювання та вузькими лініями випромінювання, що зменшує вплив біологічної матриці. У роботі [24] встановлено, що власна флуоресценція водного розчину фуросеміду при $\text{pH} \geq 4,0$ внаслідок іонізації карбоксильної групи майже відсутня. При рН

8,0 фуросемід утворює комплекс із тербієм. Ефективність переносу енергії з органічного ліганду на іон тербію підвищують, застосовуючи органічні розчинники та синергетичні агенти типу ЕДТА для виключення молекул води з координаційної сфери тербію.

Метод було застосовано для аналізу вмісту фуросеміду в сечі після попередньої пробопідготовки. Вимірювання власної флуоресценції ускладнене через високий фоновий сигнал, який у 20 разів перевищує сигнал, одержаний при вимірюванні тербієвої флуоресценції фону. Визначенню фуросеміду в сечі заважають саліцилати, дифлюнізал та салол.

Спосіб визначення амілориду та триамтерену в сечі методами ізопотенціальної флуориметрії та флуоресцентної спектрометрії з застосуванням калібрування часткових площ був запропонований групою Пабло Лопеза [59, 60]. Ізопотенціальна флуориметрія застосовується для того, щоб подавити люмінесценцію фону матриці та дозволити визначення індивідуальних сполук у комплексних зразках. Постійний фоновий сигнал може бути записаний лише у випадку, коли забезпечується незмінний склад матриці, навіть якщо інтенсивності флуоресценції змінюються. Метод калібрування часткових площ допомагає позбутися фонові люмінесценції матриці та дає можливість проводити точне визначення різних сполук у комплексних зразках. Визначення амілориду та триамтерену здійснюється у цитратному буферному розчині (рН 6,3) у присутності етанолу. З метою усунення заважаючого впливу матриці сечі зразки розбавляли дистильованою водою у 50 разів та реєстрували тримірні спектри люмінесценції. Визначенню заважали хінідин та хінін.

Запропоновані методи є швидкими та не вимагають проведення попередньої екстракції аналітів. Основним недоліком вказаного способу визначення амілориду і триамтерену є необхідність 50-кратного розбавлення сечі, що призводить до відповідної втрати чутливості. Недостатньо вивчена вибірковість запропонованого методу визначення амілориду та триамтерену щодо інших сторонніх речовин, зокрема діуретиків, обмежує можливості його застосування.

У роботі [61] було запропоновано швидкий та чутливий люмінесцентний метод визначення амілориду, бендрофлюметіазиду, буметаніду, фуросеміду та триамтерену у водних розчинах та амілориду і триамтерену у сечі. В основу методу було покладено люмінесцентні властивості різних протолітичних форм аналітів. Техніки, розроблені для визначення триамтерену в присутності інших діуретиків та фуросеміду в присутності співрозмірної кількості буметаніду, дають можливість підвищити специфічність аналізу. Уникнути впливу матриці сечі у випадку визначення амілориду та триамтерену можна за рахунок розбавлення сечі та вимірювання сигналу аналіту проти холостого розчину. Інші діуретики зв'язуються з компонентами сечі, що призводить до гасіння люмінесценції, тому їх визначення можливе лише після пробопідготовки сечі. Через високу інтенсивність випромінювання триамтерену, визначення інших діуретиків у його присутності ускладнене, що вимагає необхідності його попереднього відділення. Також було запропоновано простий метод визначення амілориду у сечі. Як індивідуальну речовину амілорид можна визначати за спектрами збудження, проте в присутності триамтерену це неможливо через перекривання спектрів збудження. У такому випадку визначення амілориду проводять спектрофотометрично, за спектрами поглинання при 360 нм.

Люмінесцентна спектрометрія є селективним та чутливим методом, який добре зарекомендував себе для визначення фармацевтичних препаратів, наркотиків та біологічних макромолекул. Широкі полоси випроміню-

вання обмежують застосування люмінесценції у комплексних біологічних матрицях та в сумішах через перекривання аналітичних сигналів. Проте модифікація техніки реєстрації люмінесценції дає можливість підвищити вибірковість визначення діуретиків.

Сорбційно-спектроскопічні методи. Низька вибірковість методів молекулярної абсорбції передбачає застосування попереднього відокремлення аналітів від матриці, а інколи і їх концентрування. Застосування в таких випадках твердофазної екстракції сприятиме суттєвому підвищенню вибірковості та чутливості аналізу.

Для визначення слідових кількостей органічних та неорганічних речовин запропоновано чутливі, вибіркові та недорогі методи, що базуються на вимірюванні твердофазної люмінесценції [62]. Використання твердофазної люмінесценції є перспективним методом рутинного аналізу та при створенні оптичних сенсорів для проточних систем [63]. В методі твердофазної люмінесценції реєструють інтенсивність випромінювання закріплених на твердій поверхні аналітів [64]. В якості матриць було запропоновано різні тверді матеріали: фільтрувальний папір, силікагелі, обмінні смоли, алюміній оксид, полівінілові спирти, ацетат натрію, мембрани С18 тощо. Останнім часом широке застосування здобув нейлон, за допомогою якого можна вимірювати як флуоресценцію, так і фосфоресценцію сполук з NH-групами [64, 65]. Залежно від обраного для сорбції матеріалу, можливе застосування різних методів закріплення люмінофору на твердій поверхні. Нарешті, вимірювання люмінесценції в безпосередньо у фазі сорбенту сприяє уникненню похибок, що пов'язані із десорбцією аналіту, та заощадженню робочого часу [66].

Так, у роботі [67] з метою розробки простого та чутливого методу, альтернативного хроматографії, було вивчено люмінесцентні властивості триамтерену, закріпленого на твердих поверхнях (диск С18 та МР1, нейлонові мембрани). Розчини діуретиків для побудови градувальних кривих на неполярному гідрофобному диску С18 та на диску МР1 зі змішаною фазою готувалися шляхом розбавлення або фосфатним буфером (до рН 7,5, при якому триамтерен перебуває в нейтральному стані), або оцтовою кислотою (до рН 4,5, при якому триамтерен знаходиться у формі катіону), відповідно. Октадецильні диски С18 склалися з С18 силікагелю, закріпленого на скляній пластині, і забезпечували гідрофобну поверхню для вилучення неполярних сполук. Диски МР1 мали у своєму складі змішану фазу (неполярну/сильний катіон), і вилучення відбувалося за рахунок оберненофазового та катіонообмінного механізму. Після нанесення аналіту мембрану висушували та записували спектр люмінесценції при довжині хвилі збудження 365 нм і випромінювання 425 та 429 нм для дисків С18 та МР1, відповідно.

Триамтерен вилучається диском С18 лише у незарядженій формі при рН = 7 ($pK_a=6,2$). Найбільш повно триамтерен вилучається диском МР1 при рН 4,5 у протонізованій формі за рахунок здійснення двох сорбційних механізмів: обернено-фазової сорбції та катіонного обміну. Вимірювання флуоресценції проводилося у твердій фазі. Фонові сигнали обох дисків незначні, що дозволяє визначати малі концентрації триамтерену. Аналітичні характеристики сорбції триамтерену на нейлонових мембранах не дозволяють застосовувати їх для визначення діуретику. Обмеженнями застосування таких мембран є також об'єм розчину аналіту, що наноситься на поверхню, та одночасне вилучення триамтерену та гідрокситриамтеренсульфату з розчину, які не можуть одночасно визначатися у фазі сорбенту через схожість спектрів люмінесценції. Запропонована мето-

дика сорбції на твердих дисках дозволяє підвищити чутливість та селективність визначення триамтерену у фармацевтичних препаратах, визначенню не заважають гідрохлортіазид, трихлорметіазид та фуросемід.

Основний метаболіт гідрокситриамтерен сульфат (ТАС) слід враховувати при проведенні аналізу біологічних рідин (сироватки або сечі) з метою уникнення помилкових результатів. Це є важливим не лише з причини власної фармакологічної активності, але й тому, що в люмінесцентних методах сигнали триамтерену та ТАС значною мірою перекриваються в робочому діапазоні рН (рН=2-12). Для одночасного визначення триамтерену та ТАС у сечі було запропоновано метод, що базується на розділенні обох аналітів на диску С18 при рН 9. За таких умов триамтерен сорбується у нейтральній формі, а аніонна форма його метаболіту залишається у розчині, де може бути визначена спектрофотометрично. Діуретики, які можуть прийматися разом з триамтереном, частково вилучаються диском, проте вони не заважають визначенню, оскільки випромінюють в іншій спектральній області. Уникнення заважаючого впливу звичайних компонентів сечі, які флуоресціюють, досягається значним розбавленням зразку.

При визначенні амілориду та фуросеміду в сечі добре зарекомендували себе нейлонові мембрани [68]. Основною перевагою нейлонових мембран як підложок у спектрофлуориметрії є відсутність фонового люмінесцентного випромінювання у спектральній ділянці, що використовується. Твердофазна екстракція включала в себе попереднє кондиціонування мембрани з наступним пропусканням сечі із рН 11 під тиском для досягнення швидкості потоку 4 мл/хв. Люмінесцентне випромінювання реєстрували при 406 нм (довжина хвилі збудження становила 365 нм). Амілорид у молекулярній формі легко вилучається неполярною мембраною при рН 11, за якого він є нейтральною молекулою. Негативно заряджений фуросемід за такого рН не вилучається, тому його визначення проводили у фільтраті. Спектри флуоресценції розчину фуросеміду при рН 2,7 записували при 415 нм при довжині хвилі збудження 237 нм.

Метод характеризується високою точністю та чутливістю і був застосований для визначення амілориду та фуросеміду у фармацевтичних препаратах. Проте не було враховано те, що ці діуретики найчастіше застосовуються у комбінованій терапії разом з тіазидними діуретиками. Неможливість визначення амілориду та фуросеміду у присутності тіазидів обмежує застосування цього методу у клінічному аналізі.

Протягом останнього десятиріччя широкого розповсюдження для специфічної екстракції фармацевтичних препаратів з біологічних рідин здобули матричні полімери. Ці синтетичні матеріали довели свою ефективність при селективній сорбції як малих молекул (ліки [69, 70], амінокислоти та протеїни [71, 72]), так і великих біомолекул (віруси [73]). Порівняно із рецепторами матричні полімери характеризуються вищою фізичною робастністю, стійкістю до дії високих температур та тисків та інертністю щодо кислот, лугів, іонів металів та органічних розчинників.

На рис.1 наведено схему синтезу матричних полімерів. Синтез включає розчинення темплату, функціонального мономеру, крос-лінкеру та ініціатору в порогенному розчиннику. Найбільшої уваги вимагає вибір функціонального мономеру, оскільки формування стійкого комплексу темплат-мономер є головним чинником для розпізнавання молекули. Молекули мономеру розміщуються у просторі навколо темплату, та їх позиція фіксується кополімеризацією із крос-лінкером. В результаті синтезу одержують сорбент з макропорами,

який має порожнини з тривимірною структурою, компліментарною до структури темплату. Видалення темплату розчинником залишає центри для зв'язування в

тому положенні, коли вони компліментарні за формою до темплату [74]. Отже, одержаний полімер розпізнає та селективно зв'язує молекулу темплату.

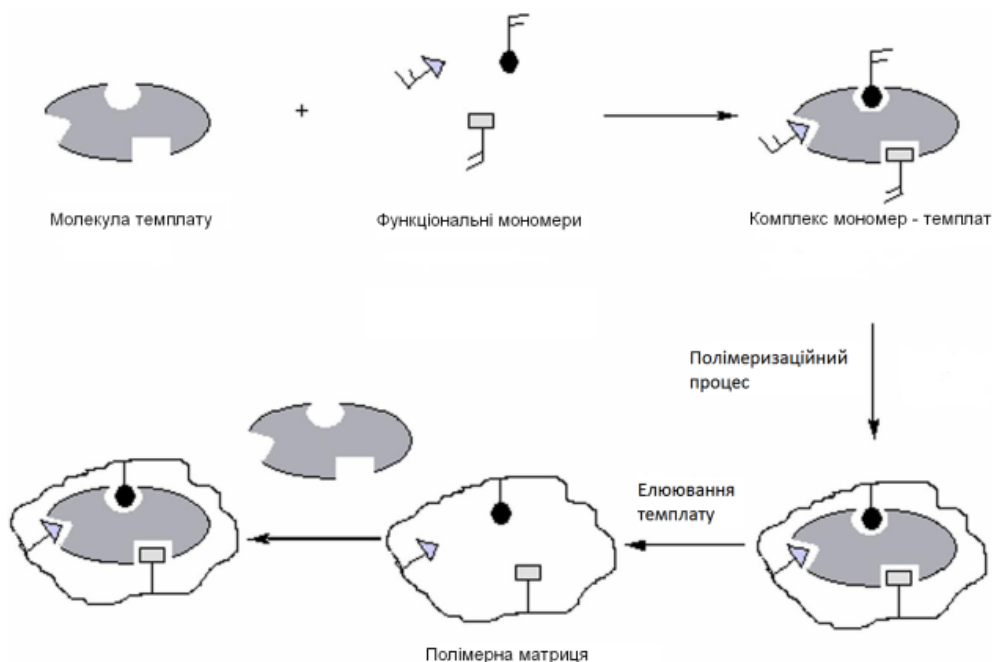


Рис.1. Схема синтезу матричного полімеру

Застосування матричних полімерів у твердофазній екстракції діуретиків має є велими перспективним, особливо в тому випадку, коли необхідно провести селективне вилучення аналіту з матриць складної природи, наприклад, з сечі. Твердофазна екстракція дає можливість не лише концентрувати аналіт, але й відокремити його від сторонніх речовин. Матричні полімери були успішно застосовані для екстракції ліків з людської та телячої сечі [75, 76]. Для усунення впливу компонентів сечі, які заважають визначенню діуретиків, достатньо багаторазового промивання водою та органічними розчинниками картриджу з полімером.

Останнім часом розробці матричних полімерів для визначення діуретиків приділялося небагато уваги. Матричний полімер для визначення фуросеміду у плазмі було синтезовано авторами [77]. Для вибору мономеру застосовували комп'ютерний підхід, який базувався на підборі найстабільнішого комплексу мономер-темплат та на розрахунку його стабілізаційної енергії, яка відноситься до ізольованих фрагментів комплексу. В якості функціонального мономеру використовували акриламід. Аналіз плазми крові здійснювали таким чином. У пробу вводили фуросемід, додавали ацетонітрил для осадження білків та центрифугували. Розчин розбавляли фосфатним буфером з рН 4,0 та пропускали через попередньо кондиціонований картридж. Картридж промивали сумішшю ацетонітрилу, буферу з рН 4,0 та метанолу. Аналіт елювали сумішшю метанолу та трифтороцтової кислоти. Одержаний полімер характеризувався середніми ступенями вилучення фуросеміду з розчинів та задовільною вибірковістю стосовно речовин зі схожою до фуросеміду формулою та речовин з відмінною структурою, проте здатних формувати водневі зв'язки з мономером. Метод характеризується високою точністю.

Для визначення гідрохлортіазиду у фармпрепаратах та в сироватці було запропоновано метакрилову кислоту [78] та 4-вінілпіридин [79] в якості функціонального полімеру. Через низьку межу виявлення та високий

ступінь розбавлення сечі полімер виявився непридатним для визначення малих кількостей діуретику.

Важливим ускладненням при застосуванні матричних полімерів в аналітичній практиці є можливість вимивання молекули-темплату з полімеру. Ця проблема може бути частково усунена шляхом імпринтингу аналогу темплату [80]. Проте це вимагає хімічного модифікування сполуки, що призводить до зниженої спорідненості та специфічності полімерного матеріалу. Більш перспективним підходом є метод "віртуального імпринтингу", коли полімер синтезують за відсутності темплатної молекули, а його структура встановлюється шляхом комп'ютерного обчислювального підходу [81]. Специфічність, у цьому випадку, походить з ретельного підбору відповідних мономерів та від створення активних центрів у полімері.

Цей підхід було застосовано у роботах [82, 83]. У результаті синтезу полімеру після комп'ютерного моделювання комплексів діуретик-мономер було одержано матричні полімери на основі ітаконової кислоти для екстракції амілориду та триамтерену і на основі діетиламіноетилметакрилату для екстракції фуросеміду та буметаніду з сечі. Застосування розроблених методик дає можливість відокремлювати визначувані аналіти від сечі шляхом поетапного промивання полімеру буферними розчинами та органічними розчинниками. Розроблені полімери дають можливість досягти 500-кратного концентрування вказаних діуретиків. Висока специфічність аналізу дає можливість визначати аналіти спектрофотометричним методом. Відсутність необхідності розбавлення сечі підвищує чутливість аналізу. Діуретики інших класів не заважають визначенню. Методики характеризуються високою точністю і чутливістю.

Висновки. Аналіз даних літератури показує, що газова та рідинна хроматографія з мас-детектуванням є найбільш широко застосовуваними методами визначення діуретиків у біологічних рідинах. До їх переваг можна віднести багатоконпонентність та чутливість. Проте застосування хроматографії в рутинному аналізі ускладнене через довгий час аналізу, який включає

проведення попередньої прободіготовки зразку та дериватизації у випадку ГХ, високу вартість обладнання та ресурсозатратність. Окрім того, хроматографія не забезпечує високої точності аналізу через залежність результату від багатьох факторів. Висока вибірковість аналізу не досягається через застосування комерційних сорбентів та проведення компромісної прободіготовки. Застосування тандемно мас-спектрометрії дає можливість значно підвищити вибірковість за рахунок додаткової фрагментації характеристичних іонів та усунути вплив компонентів матриці.

Іншими високочутливими методами є методи молекулярної абсорбції та емісії. Наявність характерних смуг поглинання та випромінювання сприяє високій вибірковості аналізу. Швидкість проведення аналізу та низька вартість приладів роблять застосування спектроскопічних методів пріоритетним при проведенні рутинних аналізів фармацевтичних препаратів.

Необхідність визначення діуретиків у біологічних рідинах вимагає попереднього відокремлення від складної матриці та концентрування. При застосуванні комерційних сорбентів не завжди досягається висока вибірковість. Серед твердих матриць найбільш перспективними вважаються матричні полімери, що обумовлено їх винятковою селективністю відносно аналіту, високою інертністю до дії кислот та лугів, іонів металів та органічних розчинників, стійкістю до підвищених тисків та температур. Низька вартість синтезу та тривалий термін використання полімеру роблять його застосування привабливим для концентрування та розділення визначуваних речовин з наступним їх детектуванням спектроскопічними або хроматографічними методами. Високі коефіцієнти концентрування та легкість елюювання аналіту з поверхні відрізняють матричні полімери з-поміж інших сорбентів.

Список використаних джерел

- Brater D. Pharmacology of diuretics / D. Brater, M.D. Craig // *Am. J. Med. Sci.* – 2000. – Vol. 319, № 1. – P. 38–47.
- Ventura R. Detection of diuretic agents in doping control / R. Ventura, J. Segura // *J. Chromatogr. B.* – 1996. – Vol. 687, № 1. – P. 127–144.
- Delbecke F. T. The influence of diuretics on the excretion and metabolism of doping agents. Part IV – Caffeine / F. T. Delbecke, M. Debackere // *Biopharm. Drug Dispos.* – 1988. – Vol. 9, № 2. – P. 137–145.
- Delbecke F. T. The influence of diuretics on the excretion and metabolism of doping agents. Part I – Mephentermine / F. T. Delbecke, M. Debackere // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 1985. – Vol. 3, № 2. – P. 141–148.
- Delbecke F. T. The influence of diuretics on the excretion and metabolism of doping agents. Part V – Dimethylamine / F. T. Delbecke, M. Debackere // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 1991. – Vol. 9, № 1. – P. 23–28.
- Effects of formulation and food on the absorption of hydrochlorothiazide and triamterene or amiloride from combination diuretic products / R.L. Williams, J. Mordenti, R. Upton et al. // *Pharm. Res.* – Vol. 4, № 4. – 1987. – P. 348–352.
- The world anti-doping code—the 2009 prohibited list: international standard. – Montreal: World Anti-Doping Agency, 2009. – 9 p.
- Minimum required performance limits for detection of prohibited substances: technical document TD2010MRPL. – Montreal: World Anti-Doping Agency, 2010. – 1 p.
- Morganti A. Should a diuretic always be the first choice in patients with essential hypertension? The case for no / A. Morganti // *J. Am. Society Nephrol.* – 2005. – Vol. 16. – P. 70–73.
- Ventura R. Fast screening method for diuretics, probenecid and other compounds of doping interest / R. Ventura, T. Nadal, P. Alcalde, et al. // *J. Chromatogr. A.* – 1993. – Vol. 655, № 2. – P. 233–242.
- O'Brien J.G. Treatment of Edema / J.G. O'Brien, S.A. Chennubhotla, R.V. Chennubhotla // *Am. Fam. Physician.* – 2005. – Vol. 71, № 11. – P. 2111–2117.
- Dikshit K. Renal and extrarenal hemodynamic effects of furosemide in congestive heart failure after acute myocardial infarction / K. Dikshit, J.K. Vyden, J.S. Forrester et al. // *N. Engl. J. Med.* – 1973. – Vol. 288, № 21. – P. 1087–1090.
- Pharmacokinetics of furosemide in patients with hepatic cirrhosis / G. Gonzalez, A. Arancibia, M.I. Rivas et al. // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* – 1982. – Vol. 22, № 4. – P. 315–320.
- The seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure (JNC 7) / A.V. Chobanian, G.L. Bakris, H.R. Black et al. // *Hypertension.* – 2003. – Vol. 42, № 6. – P. 1206–1252.

- Jackson E.K. Diuretics / L.L. Brunton, J.S. Lazo, K.L. Parker. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. – New York: McGraw-Hill, 2006. – 1808 p.
- Hughes A.D. How do thiazide and thiazide-like diuretics lower blood pressure? / A.D. Hughes // *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* – 2004. – Vol. 5, № 4. – P. 155–160.
- Thiazide-like diuretics attenuate agonist-induced vasoconstriction by calcium desensitization linked to Rho kinase / Z. Zhu, S. Zhu, D. Liu et al. // *Hypertension.* – 2005. – Vol. 45, № 2. – P. 233–239.
- Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology / [Finkel R., Clark M. A., Cubeddu L. X.]. – Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2009. – 564 p.
- Kulichenko S.A. Titrimetric determination of furosemide using aqueous-micellar solutions of surfactants / S.A. Kulichenko, S.A. Fesenko // *J. Anal. Chem.* – 2002. – Vol. 57, № 3. – P. 231–234.
- Ferraro M.C.F. A spectrophotometric-partial least squares (PLS-1) method for the simultaneous determination of furosemide and amiloride hydrochloride in pharmaceutical formulations / M.C.F. Ferraro, P.M. Castellano, T.S. Kaufman // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2001. – Vol. 26, № 3. – P. 443–451.
- Spectrophotometric determination of furosemide and its palladium(II) complex / S. Agatonovic-Kustrin, Lj. Zivanovic, D. Radulovic et al. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 1990. – Vol. 8, № 8–12. – P. 983–986.
- Flow-injection spectrophotometric determination of frusemide or sulphathiazole in pharmaceuticals / M.S. Garcia, C. Sanchez-Pedreno, M.I. Albero et al. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 1997. – Vol. 15, № 4. – P. 453–459.
- Zivanovic L. Spectrophotometric determination of furosemide as its Fe(III) complex in pharmaceutical preparations / L. Zivanovic, S. Agatonovic, D. Radulovic // *Mikrochim. Acta.* – 1990. – Vol. 100, № 1–2. – P. 49–54.
- Spectrofluorimetric determination of anthranilic acid derivatives based on terbium sensitized fluorescence / P.C. Ioannou, N.V. Rusakova, D.A. Andrikopoulou et al. // *Analyst.* – 1998. – Vol. 123, № 12. – P. 2839–2843.
- A fluorimetric method for the estimation of bumetanide / R.B. Patel, A.A. Patel, M.R. Patel et al. // *Ind. J. Pharm. Sci.* – 1987. – Vol. 49, № 4. – P. 142–143.
- Micellar electrokinetic capillary chromatography analysis of diuretics in pharmaceutical formulations / M.L. Luis, S. Corujedo, D. Blanco et al. // *Talanta.* – 2002. – Vol. 57, № 2. – P. 223–231.
- Use of capillary electrophoresis for testing the stability of a drug mixture in perfusional solution / M.G. Quaglia, E. Bossu, C. Desiderio et al. // *Farmacologia.* – 1994. – Vol. 49, № 6. – P. 403–406.
- González E. Direct determination of diuretic drugs in urine by capillary zone electrophoresis using fluorescence detection / E. González, A. Becerra, J.J. Laserna // *J. Chromatogr. B.* – 1996. – Vol. 687, № 1. – P. 145–150.
- Riekkola M.L. Capillary electrophoresis of diuretics / M.L. Riekkola, J.H. Jumppanen // *J. Chromatogr. A.* – 1996. – Vol. 735, № 1–2. – P. 151–164.
- Ferraro M.C.F. Chemometric determination of amiloride hydrochloride, atenolol, hydrochlorothiazide and timolol maleate in synthetic mixtures and pharmaceutical formulations / M.C.F. Ferraro, P.M. Castellano, T.S. Kaufman // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2004. – Vol. 34, № 2. – P. 305–314.
- Continuous-flow chemiluminometric determination of amiloride and streptomycin by oxidation with N-bromosuccinimide / S.A. Halvatzis, A.M. Mihalatos, L.P. Palilis et al. // *Anal. Chim. Acta.* – 1994. – Vol. 290, № 1–2. – P. 172–178.
- Fl-chemiluminometric study of thiazides by on-line photochemical reaction / M. Ciborowski, M.C. Icardo, J.V. Garcia Mateo et al. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2004. – Vol. 36, № 4. – P. 693–700.
- Investigation of RuBPS-Ce(IV) chemiluminescence reaction and its application in determination of two diuretics / J. Xia, X. Jia, Sh. Zhang et al. // *Anal. Chim. Acta.* – 2005. – Vol. 541, № 1–2. – P. 193–198.
- Cerium (IV)-based chemiluminescence analysis of hydrochlorothiazide / J. Ouyang, W.R.G. Baeyens, J. Delanghe et al. // *Talanta.* – 1998. – Vol. 46, № 5. – P. 961–968.
- Pulgarin J.A.M. Determination of hydrochlorothiazide in pharmaceutical preparations by time resolved chemiluminescence / J.A.M. Pulgarin, A.A. Molina, G.P. Nieto // *Anal. Chim. Acta.* – 2004. – Vol. 518, № 1–2. – P. 37–43.
- Pulgarin J.A.M. Rapid determination of hydroflumethiazide in dosage forms by time-resolved chemiluminescence / J.A.M. Pulgarin, A.A. Molina, G.P. Nieto // *Mikrochim. Acta.* – 2007. – Vol. 159, № 3–4. – P. 349–356.
- Direct determination of triamterene by potentiometry using a coated wire selective electrode / M. Arvand, M.F. Mousavi, M.A. Zanjanchi et al. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2003. – Vol. 33, № 5. – P. 975–982.
- Determination of triamterene and its main metabolite hydroxytriamterene sulfate in human urine by capillary electrophoresis using ultraviolet absorbance and laser-induced fluorescence detection / C. Horstkötter, S. Kober, H. Spahn-Langguth et al. // *J. Chromatogr. B.* – 2002. – Vol. 769, № 1. – P. 107–117.
- Qualitative detection of diuretics and acidic metabolites of other doping agents in human urine by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Comparison between liquid-liquid extraction and direct injection / K. Deventer, O.J. Pozo, P. Van Eenoo et al. // *J. Chromatogr. A.* – 2009. – Vol. 1216, № 31. – P. 5819–5827.
- Mazzarino M. A screening method for the simultaneous detection of glucocorticoids, diuretics, stimulants, anti-estrogens, beta-adrenergic drugs and anabolic steroids in human urine by LC-ESI-MS/MS / M. Mazzarino, X. de la Torre, F. Botrè // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2008. – Vol. 392, № 4. – P. 681–698.
- Development and validation of a qualitative screening method for the detection of exogenous anabolic steroids in urine by liquid chromatography-

tandem mass spectrometry / O.J. Pozo, P. Van Eenoo, K. Deventer et al. // Anal. Bioanal. Chem. – 2007. – Vol. 389, № 4. – P. 1209–1224.

42. Fullinlaw R. Liquid chromatographic screening of diuretics in urine / R. Fullinlaw, R. Bury, R. Moulds // J. Chromatogr. A. – 1987. – Vol. 415. – P. 347–356.

43. High-throughput and sensitive screening by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry of diuretics and other doping agents / R. Ventura, M. Roig, N. Monfort et al. // Eur. J. Mass Spectrom. – 2008. – Vol. 14, № 3. – P. 191–200.

44. Лебедев А.Т. Масс-спектрометрия в органической химии / Лебедев А.Т. – М.: Бинном. Лаборатория знаний, 2003. – 493 с.

45. Morra V. Fast gas chromatographic/mass spectrometric determination of diuretics and masking agents in human urine. Development and validation of a productive screening protocol for anti-doping analysis / V. Morra, P. Davit, P. Capra // J. Chromatogr. A. – 2006. – Vol. 1135, № 2. – P. 219–229.

46. Rapid determination of diuretics in human urine by gas chromatography-mass spectrometry following microwave assisted derivatization / L. Amendola, C. Colamonic, M. Mazzarino et al. // Anal. Chim. Acta. – 2003. – Vol. 475, № 1–2. – P. 125–136.

47. High-speed gas chromatography in doping control: fast-GC and fast-GC/MS determination of β -adrenoceptor ligands and diuretics / C. Brunelli, C. Bicchi, A. Di Stilo et al. // J. Sep. Sci. – 2006. – Vol. 29, № 18. – P. 2765–2771.

48. Detection of diuretics in urine during sports events in Taiwan / Y.L. Tseng, M.H. Shieh, C.T. Lin et al. // Tzu Chi Med. J. – 2004. – Vol. 16, № 2. – P. 69–77.

49. Van Eenoo P. Criteria in chromatography and mass-spectrometry—a comparison between regulations in the field of residue and doping analysis / P. Van Eenoo, F.T. Delbeke // Chromatographia. – 2004. – Vol. 59, № 1. – P. 39–44.

50. Politi L. A direct screening procedure for diuretics in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with information dependent acquisition / L. Politi, L. Morini, A. Poletti // Clin. Chim. Acta. – 2007. – Vol. 386, № 1–2. – P. 46–52.

51. Goebel C. Rapid screening method for diuretics in doping control using automated solid phase extraction and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry / C. Goebel, G. Trout, R. Kazlauskas // Anal. Chim. Acta. – 2004. – Vol. 502, № 1. – P. 65–74.

52. Screening, confirmation and quantification of diuretics in urine for doping control analysis by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometry / D. Thieme, J. Grosse, R. Lang et al. // J. Chromatogr. B. – 2001. – Vol. 757, № 1. – P. 49–57.

53. Zaporozhets O. Determination of 8 diuretics and probenecid in human urine by gas-chromatography – mass spectrometry: confirmation procedure / O. Zaporozhets, I. Tsyrlneva, M. Ischenko // Am. J. Anal. Chem. – 2012. – Vol. 3. – P. 320–327.

54. Systematic analysis of diuretic doping agents by HPLC screening and GC/MS confirmation / S.J. Park, H.S. Pyo, Y.J. Kim et al. // J. Anal. Toxicol. – 1990. – Vol. 14, No. 2. – P. 84–90.

55. Spectrophotometric methods for the determination of some diuretics using 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone / C.S.P. Sastry, T.N.V. Prasad, B.S. Sastry et al. // Analyst. – 1988. – Vol. 113, № 2. – P. 255–258.

56. Kartal M. Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and amiloride hydrochloride by ratio spectra derivative spectrophotometry and high-performance liquid chromatography / M. Kartal, N. Erk // J. Pharm. Biomed. Anal. – 1999. – Vol. 19, № 3–4. – P. 477–485.

57. Ferraro M.C. Simultaneous determination of amiloride hydrochloride and hydrochlorothiazide in synthetic samples and pharmaceutical formulations by multivariate analysis of spectrophotometric data / M.C. Ferraro, P.M. Castellano, T. S. Kaufman // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2002. – Vol. 30, № 4. – P. 1121–1131.

58. Omar M.A. Spectrophotometric and spectrofluorimetric determination of certain diuretics through ternary complex formation with eosin and Lead (II) / M.A. Omar // J. Fluoresc. – 2010. – Vol. 20, № 1. – P. 275–281.

59. Pulgarin J.A.M. Direct analysis of amiloride and triamterene mixtures by fluorescence spectrometry using partial-least squares calibration / J.A.M. Pulgarin, A.A. Molina, P.F. Lopez // Anal. Chim. Acta. – 2001. – Vol. 449, № 1–2. – P. 179–187.

60. Pulgarin J.A.M. Simultaneous direct determination of amiloride and triamterene in urine using isopotential fluorometry / J.A.M. Pulgarin, A.A. Molina, P.F. Lopez // Anal. Biochem. – 2001. – Vol. 292, № 1. – P. 59–68.

61. Tsyrlneva I. Simple and Rapid Determination of Diuretics by Luminescent Method / I. Tsyrlneva, O. Zaporozhets // Pharm. Pharm. – 2013. – Vol. 4. – P. 520–527.

62. Hurtubise R.J. Solid-matrix luminescence analysis: photophysics, physicochemical interactions and applications / R.J. Hurtubise // Anal. Chim. Acta. – 1997. – Vol. 351, № 1–3. – P. 1–22.

63. Solid-surface room temperature phosphorescence / M. Gunshel'ski, J.J. Santana, J. Stephenson et al. // Appl. Spectrosc. – 1992. – Vol. 27, № 2. – P. 143–192.

64. Escandar G.M. Phosphorescence properties of p-aminobenzoic acid immobilized on a nylon membrane / G.M. Escandar // Appl. Spectrosc. – 2004. – Vol. 58, № 7. – P. 836–842.

65. Determination of carbamazepine in serum and pharmaceutical preparations using immobilization on a nylon support and fluorescence detection / G.M. Escandar, D.G. Gomez, A.E. Mansilla et al. // Anal. Chim. Acta. – 2004. – Vol. 506, № 2. – P. 161–170.

66. Hagestuen E.D. On the improvement of solid-phase extraction room-temperature phosphorimetry for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples / E.D. Hagestuen, A.F. Arruda, A.D. Campiglia // Talanta. – 2000. – Vol. 52, № 4. – P. 727–737.

67. Determination of triamterene in pharmaceutical formulations and of triamterene and its main metabolite hydroxytriamterene sulfate in urine using solid-phase and aqueous solution luminescence / G.A. Ibanez, G.M. Escandar, A.E. Mansilla et al. // Anal. Chim. Acta. – 2005. – Vol. 538, № 2. – P. 77–84.

68. Peralta C.M. Solid phase extraction using nylon membranes with fluorescence detection as a fast and sensitive method for Amiloride and Furosemide determination in urine samples / C.M. Peralta, L.P. Fernández, A.N. Masi // Microchem. J. – 2011. – Vol. 98, № 1. – P. 39–43.

69. Molecularly imprinted solid phase extraction for the selective HPLC determination of α -tocopherol in bay leaves / F. Puoci, G. Cirillo, M. Curcio et al. // Anal. Chim. Acta. – 2007. – Vol. 593, № 2. – P. 164–170.

70. Baggiani C. Solid phase extraction of food contaminants using molecular imprinted polymers / C. Baggiani, L. Anfossi, C. Giovannoli // Anal. Chim. Acta. – 2007. – Vol. 591, № 1. – P. 29–39.

71. Molecularly imprinted polymers for the recognition of proteins: The state of the art / A. Bossi, F. Bonini, A.P.F. Turner et al. // Biosens. Bioelectron. – 2007. – Vol. 22, № 6. – P. 1131–1137.

72. Molecularly imprinted submicronospheres for applications in a novel model biosensor-film / I. Morelli, V. Chiono, G. Vozzi et al. // Sens. Actuators B. – 2010. – Vol. 150, № 1. – P. 394–401.

73. A synthetic nanomaterial for virus recognition produced by surface imprinting / A. Cumbo, B. Lorber, P. F. Corvini et al. // Nat. Commun. – 2013. – Vol. 4. – P. 1503.

74. Andersson L.I. Molecular imprinting: Developments and applications in the analytical chemistry field / L.I. Andersson // J. Chromatogr. B. – 2000. – Vol. 745, № 1. – P. 3–13.

75. Preliminary evaluation of a molecular imprinted polymer for solid-phase extraction of tamoxifen / B.A. Rashid, R.J. Briggs, J.N. Hay et al. // Anal. Commun. – 1997. – Vol. 34. – P. 303–306.

76. Novel enrofloxacin imprinted polymer applied to the solid-phase extraction of fluorinated quinolones from urine and tissue samples / E. Caro, R.M. Marcer, P.A.G. Cormack et al. // Anal. Chim. Acta. – 2006. – Vol. 562, № 2. – P. 145–151.

77. Gholivand M.B. Computer aided-molecular design and synthesis of a high selective molecularly imprinted polymer for solid-phase extraction of furosemide from human plasma / M.B. Gholivand, M. Khodadadian, F. Ahmadi // Anal. Chim. Acta. – 2010. – Vol. 658, № 2. – P. 225–232.

78. Rezaei B. Application of molecularly imprinted polymer for solid phase extraction and preconcentration of hydrochlorothiazide in pharmaceutical and serum sample analysis / B. Rezaei, S. Mallakpour, O. Rahmani // J. Iran. Chem. Soc. – 2010. – Vol. 7, № 4. – P. 1004–1011.

79. A hydrochlorothiazide-imprinted polymer / W. Chen, F. Liu, K. Li, Y. et al. // Anal. Lett. – 2000. – Vol. 33, № 5. – P. 809–818.

80. Andersson L.I. A highly selective solid phase extraction sorbent for pre-concentration of samedidine made by molecular imprinting / L.I. Andersson, A. Paprica, T. Arvidsson // Chromatographia. – 1997. – Vol. 46, № 1–2. – P. 57–62.

81. Virtual imprinting as a tool to design efficient MIPs for photosynthesis-inhibiting herbicides / F. Breton, R. Rouillon, E. V. Piletska et al. // Biosens. Bioelectron. – 2006. – Vol. 22, № 9–10. – P. 1948–1954.

82. Custom synthesis of polymeric adsorbent for extraction of furosemide and bumetanide from human urine / I. Tsyrlneva, O. Zaporozhets, E. Piletska et al. // J. Chin. Adv. Mat. Soc. – 2013. – Vol. 1, № 4. – P. 245–256.

83. Molecular modelling and synthesis of polymer for the extraction of amiloride and triamterene from human urine / I. Tsyrlneva, O. Zaporozhets, E. Piletska et al. // Anal. Meth. – 2014. – Vol. 6. – P. 3429–3435.

Надійшла до редколегії 07.08.14

Ю. Цырульнева, інженер,
О. Запорожець, д-р хим. наук,
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИУРЕТИКОВ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ

Проведен анализ данной литературы касательно современных методов определения и обнаружения диуретиков в фармацевтических препаратах и биологических жидкостях. Показано, что к наиболее распространенным относятся хроматографические и спектроскопические, в частности люминесцентные, методы. Сложность биологических матриц и низкое содержание диуретиков в спектре предусматривает проведение стадии предварительного концентрирования аналитов и их отделения от компонентов матрицы.

Ключевые слова: хроматографические методы, спектроскопические методы, диуретики.

I. Tsyrluneva, engineer,
O. Zaporozhets, Professor,
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

MODERN METHODS FOR DETERMINATION OF DIURETICS IN PHARMACEUTICALS AND BIOLOGICAL OBJECTS

The excessive abuse and wrong prescription of diuretics can lead to negative side effects. Analytical control of urine samples for doping agents demands detection of small amounts of diuretics. Thus, the use of highly sensitive and selective methods is required for the determination of diuretics.

Gas and high-performance liquid chromatography are the most widely used methods for the determination of diuretics since they provide multicomponent, reliable, selective and highly sensitive analysis. However in most cases chromatographic separation is possible only after pre-concentration of analytes by solid-phase or liquid-liquid extraction. Besides, long analysis time and demand of expensive instruments complicate systematic application of methods.

Other highly selective methods are spectroscopic, in particular spectrophotometric and luminescent, methods which were proved to be efficient for the determination of diuretics in aqueous solutions. Complex matrices such as urine and blood require preliminary separation of analytes. Recently solid-phase extraction of diuretics by molecularly imprinted polymers, octadecyl disks and nylon membranes from human urine was developed. High coefficient of pre-concentration and lightness of elution of analytes from surface make the application of imprinted polymers in the extraction of diuretics perspective.

Keywords: chromatographic methods, spectroscopic methods, diuretics.

УДК 546.65'56'41'42'817

Т. Войтенко, канд. хім. наук, С. Неділько, д-р хім. наук,
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ,
О. Головченко, асист.,
Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ,
М. Зеленько, канд. хім. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ВПЛИВ ЗАМІЩЕННЯ РЬ/ВІ НА ВЛАСТИВОСТІ СПОЛУК ТИПУ РЬ1212

Твердофазним методом синтезовано серію зразків ВТНП кераміки складу $(Pb_{1-y}Cu_y)Sr_2(Y_{1-x}Ca_x)Cu_2O_{7-δ}$, (Pb1212) $0 ≤ x ≤ 0,3$. Досліджено залежність параметрів кристалічної ґратки системи від ступеня заміщення x . Резистивні вимірювання зразків даної системи в інтервалі температур 77–300 К показали, що надпровідний перехід при температурі вище 77 К не спостерігається.

Ключові слова: високотемпературна надпровідність, Pb1212, твердофазний синтез.

Вступ. Відкриття явища високотемпературної надпровідності (ВТНП) викликало велику кількість досліджень як з метою вивчення природи ВТНП, так і їх практичного використання. Важливо, що можливість варіювання катіонного складу дозволяє змінювати як електрофізичні властивості, так і кристалографічні особливості ВТНП матеріалів. Однією з проблем на шляху створення технічних пристроїв на основі ВТНП кераміки є низька струмонесуча здатність зразків. Тому актуальним є пошук нових складів, що мають більш високу критичну густину струму.

Багатообіцяючими залишаються можливості практичного використання високотемпературних надпровідних сполук Pb1212, із-за їх більш високої стійкості до хімічних факторів [6,14], порівняно зі сполуками системи Y123, Bi2212.

Після одержання сполуки Y123 почалися пошуки різних варіантів заміщень у цій вже відомій сполуці [12,10,8,2,1]. Так при заміщенні Ba на Sr легко утворювалася сполука $YSr_2Cu_3O_y$. на наступному етапі припускалося, що при частковому заміщенні Cu на Pb можна буде одержати сполуку $YSr_2(Cu_{3-x}Pb_x)O_y$. Але Pb не заміщував Cu в шарах CuO , а утворював окрему кристалічну структуру, яку назвали $(Pb_{1-y}Cu_y)Sr_2(Y_{1-x}Ca_x)Cu_2O_{7-δ}$, (Pb1212) [11,13,7,5].

Об'єкт та мета дослідження. Метою даної роботи є синтез зразків і вивчення фазового складу, кристалографічних параметрів та надпровідних властивостей ВТНП-матеріалів, складу $(Pb_{1-y}Cu_y)Sr_2(Y_{1-x}Ca_x)Cu_2O_{7-δ}$.

Всі зразки систем виготовляли методом двостадійного твердофазного синтезу з попереднім одержанням прекурсору та наступним відпалюванням в атмосфері кисню. Як вихідні речовини використовувались оксиди купруму, плюмбуму, бісмуту, ітрію, а також карбонати барію, кальцію і стронцію.

Всі вихідні речовини були промислового виробництва і кваліфікації не нижче "х.ч.". Для синтезу зразків використовувались бісмут, купрум (II), ітрію, плюмбум оксиди, барій, стронцій, кальцій карбонати.

Всі реактиви, що використовувались для синтезу керамічних матеріалів були проаналізовані на вміст катіону відповідного металу. Вміст іонів рідкісноземельних елементів визначався прямим трилонометричним титруванням з індикатором ксиленоловим оранжевим, купруму (II) – прямим трилонометричним титруванням з індикатором мурексид, бісмуту - прямим трилонометричним титруванням з індикатором пірокатехиновим фіолетовим, Ca^{2+} , Sr^{2+} та Ba^{2+} – оберненим титруванням з індикатором еріохром чорний "Т" [3–4].

На першій стадії суміш оксидів купруму та ітрію, карбонатів барію, кальцію і стронцію, взятих у розрахованому стехіометричному співвідношенні, ретельно перетирали в агатовій ступці і відпалювали у фарфорових тиглях у муфельній печі протягом 48 годин при температурі 900°C до зникнення характеристичних смуг поглинання CO_3^{2-} в ІЧ-спектрах (з проміжним перетиранням). Далі додавали до прекурсору розраховану кількість оксидів плюмбуму і бісмуту, перетирали шихту, пресували її в таблетки, і відпалювали їх в печі з поступовим нагріванням протягом 3 год. при температурі 800°C. Далі речовину знову перетирали і пресували в таблетки, які відпалювали протягом 72 годин при температурі 850°C з проміжним перетиранням і пресуванням в таблетки, кожні 24 години, та подальшою витримкою в потоці кисню. Температура в печі контролювалася за допомогою термодари хромель-алюмель, що була під'єднана до регулятора температури (точність регулювання $± 5°C$).

Процес розкладу шихти контролювали ІЧ-спектральним методом. ІЧ-спектри поглинання продуктів термолізу реєстрували за допомогою спектрофотометра UR-10 в області 1200–1700 cm^{-1} , використовуючи пресування таблеток з KBr.

Фазовий склад і параметри кристалічних ґраток визначали рентгенографічним методом на порошках (ДРОН-3М; $Su_{Kα}$ випромінювання з Ni-фільтром).

Резистивні вимірювання проводили в інтервалі температур 300–78 К стандартним чотиризондним зондовим методом з використанням індій-галієвої евтектики.