

УДК 543.544.5.068.7, 542.61, 611.185.1

В.А. ДОРОЩУК, Н.А. ГОНТА, С.А. КУЛИЧЕНКО

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОРАСЕМИДА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ МЕТОДОМ  
ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ С  
ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫМ ФЕНОЛ-ИНДУЦИРОВАННЫМ МИЦЕЛЛЯРНО-  
ЭКСТРАКЦИОННЫМ КОНЦЕНТРИРОВАНИЕМ**

*Разработана методика определения торасемида в моче методом обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) с предварительным мицеллярно-экстракционным концентрированием. Количественное извлечение препарата достигается при использовании более гидрофобных модифицированных фенолом мицеллярных фаз неионогенного поверхностно-активного вещества (НПАВ). В оптимальных условиях, концентрирование с 80 мл пробы в присутствии  $8 \cdot 10^{-3}$  моль/л Triton X-100 и  $8 \cdot 10^{-2}$  моль/л фенола предел обнаружения торасемида составляет 1.1 мкмоль/л.*

**Ключевые слова:** мицеллярная экстракция, концентрирование, неионогенное поверхностно-активное вещество, фенол, высокоэффективная жидкостная хроматография, моча.

*Розроблена методика визначення торасеміду у сечі методом обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з попереднім міцелярно-екстракційним концентруванням. Показано, що кількісне вилучення препарату досягається при використанні більш гідрофобних модифікованих фенолом міцелярних фаз неионогенної поверхнево-активної речовини (НПАР). В оптимальних умовах, концентрування з 80 мл проби в присутності  $8 \cdot 10^{-3}$  моль/л Triton X-100 та  $8 \cdot 10^{-2}$  моль/л фенолу межа виявлення торасеміду становить 1.1 мкмоль/л.*

**Ключові слова:** міцелярна екстракція, концентрування, неионогенна поверхнево-активна речовина, фенол, високоефективна рідинна хроматографія, сеча.

*Procedure for determining torasemide in urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) with preconcentrating by micellar extraction was developed. It was shown that the quantitative recovery of the preparation was attained using hydrophobic micellar phases of non-ionic surfactant (NS) modified with phenol. Under the optimal condition, preconcentration of 80 mL of sample in the presents of  $8 \cdot 10^{-3}$  Mol L<sup>-1</sup> Triton X-100 and  $8 \cdot 10^{-2}$  Mol L<sup>-1</sup> phenol permitted the detection of 1.1  $\mu$ Mol L<sup>-1</sup> torasemide.*

**Key words:** micellar extraction, preconcentrating, non-ionic surfactant, phenol, high-performance liquid chromatography, urine.

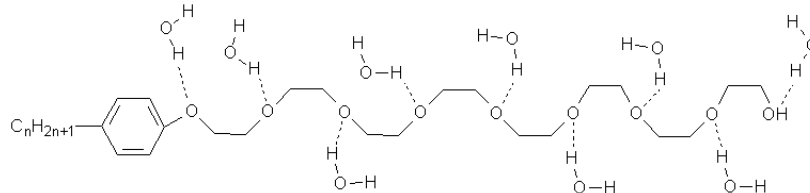
**Введение**

Торасемид - N1-(изопропил-N3-4-(3-метилфениламино)-3 - пиридил-сульфонил мочевины) сильный петлевой диуретик, использующийся в лечении отеков, связанных с застоем крови при сердечной недостаточности [1]. Диуретический эффект препарата

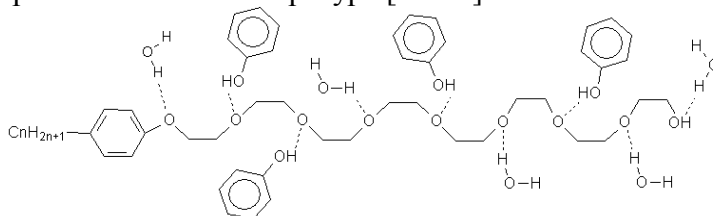
связан с угнетением реабсорбции ионов натрия и хлора в почках [1, 2]. Кроме того, торасемид часто используется для маскирования следов применения других лекарств [3]. Препарат выводится преимущественно (75%) почками в виде метаболитов и только на 25% в неизменном виде [1, 2]. Низкое содержание торасемида в моче при его использовании не позволяет определить его прямыми хроматографическими методами без предварительного концентрирования [1-3]. Поэтому актуальной задачей является разработка методики определения микроколичеств торасемида в моче для клинической, судебной и спортивной медицинской экспертизы.

Для концентрирования торасемида из биологических жидкостей наиболее часто применяют экстракцию органическими растворителями [3-5]. Однако, недостатком таких методик, в первую очередь, являются невысокие коэффициенты концентрирования, неполнота извлечения, значительная трудоемкость и недостаточная экобезопасность. Эффективным современным методом концентрирования является мицеллярная экстракция микрокомпонентов фазами неионогенных ПАВ при температуре помутнения [6-8]. Перспективность применения мицеллярно-экстракционного концентрирования обуславливается высокой селективностью, эффективностью и достижением высоких коэффициентов концентрирования при использовании небольших объемов пробы [9-11]. Кроме того, мицеллярная экстракция легко сочетается с физико-химическими и физическими методами анализа, что способствует эффективному использованию метода при разработке гибридных аналитических методик [12-14].

Растворимость неионогенных ПАВ в воде обусловлена образованием водородных связей между атомами кислорода полиоксиэтиленовой цепи НПАВ и молекулами воды [15]. При нагревании водных растворов неионогенных ПАВ выше некоторой температуры, температуры помутнения ( $T_p$ ), эти связи разрушаются, и в системе происходит фазовое расслоение.



Однако необходимость нагревания системы сужает круг анализируемых микрокомпонентов вследствие вероятности протекания гидролиза, испарения, термического разложения и т.д. [7]. Поэтому поиск рациональных гидротропных добавок, введение которых в растворы НПАВ снижает температуру помутнения, представляется целесообразным и оправданным. Одним из наиболее эффективных гидротропов является фенол [10-12]. Фенол способен образовывать конкурентные водородные связи с оксиэтиленовой цепью НПАВ, что уменьшает растворимость НПАВ и способствует фазообразованию при комнатной температуре [16-18].



Перспективность применения фенол-индуцированной мицеллярной экстракции обуславливается не только снижением  $T_p$ , но и возможностью концентрировать легко-гидролизующиеся катионы металлов, летучие органические соединения, лекарственные вещества с биологических проб. Кроме того, введение фенола позволяет регулировать лиофильность мицеллярных фаз.

## Экспериментальная часть

**Аппаратура и условия хроматографирования.** В работе использовали хроматограф Shimadzu CBM-20A с УФ-детектором SPD-20A. Хроматографическая колонка (4.6×150 мм) была наполнена обращено-фазным сорбентом YMC-Pack Pro C<sub>18</sub> с размером частиц 5 мкм. В качестве элюента использовали смесь ацетонитрила для хроматографии (Sigma-Aldrich) и воды (удельное сопротивление 18.2 МОм×см, деионизированная на установке EASYpure II, Barnstead). Элюирование проводили в режиме линейного градиента:

t, мин	Вода, % (об.)	Ацетонитрил, % (об.)
0.01	100	0
6.00	0	100
11.00	0	100

Скорость потока элюента - 2 мл/мин. Объем вводимой пробы (инжектор Rheodyne, петля) – 20 мкл. УФ-детектирование проводили при длине волны 285 нм. В качестве аналитического сигнала использовали высоту пика (mV).

Кислотность растворов измеряли с помощью рН-метра “pH-340” со стеклянным электродом ЭСЛ-43-07.

**Реагенты и растворы.** В качестве неионогенного ПАВ использовали препарат Triton X-100 (“Merck”) – 4-(1,1,3,3-тетраметилбутил) фенил - полиэтиленгликоль (4-(C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>)C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>OH). Растворы Triton X-100 готовили растворением навески препарата в дистиллированной воде. Использовали препарат торасемида с содержанием основного вещества 99.9% (ЗАО «Борщаговский фармацевтический завод»). Растворы торасемида готовили растворением навески препарата в мицеллярном растворе НПАВ. Использовали фенол квалификации ч.д.а, ацетонитрил для хроматографии производства Sigma-Aldrich, дистиллированную воду для приготовления растворов и воду с удельным сопротивлением 18.2 МОм×см, деионизированную на установке EASYpure II, Barnstead для приготовления элюента.

**Методика.** 80 мл мочи центрифугировали, переносили в стакан объемом 150 мл, добавляли 400 мг препарата Triton X-100, 600 мг фенола и перемешивали до полного растворения реагентов. С помощью HCl устанавливали рН раствора 5.0. Полученный раствор нагревали на водяной бане до температуры помутнения (≈22°C). Температуру раствора контролировали термометром, погруженным в стакан. При достижении T<sub>п</sub> наблюдали характерную опалесценцию растворов и выдерживали систему при этой температуре 15 мин до полного расслоения фаз. Плотность мицеллярной фазы несколько выше плотности воды, поэтому мицеллярная фаза НПАВ собиралась на дне цилиндра. После охлаждения растворов водную фазу отделяли декантацией. Мицеллярную фазу (V<sub>мф</sub> ≈ 0.8 мл) разбавляли дистиллированной водой до 1 мл и проводили определение торасемида методом ВЭЖХ. Содержание торасемида в пробе находили по градуировочному графику.

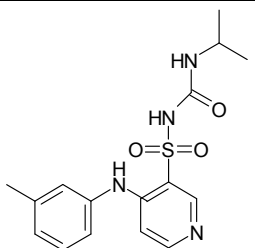
## Результаты и их обсуждение

**Свойства и возможность хроматографического определения торасемида.** Структурная формула торасемида, а так же параметр его гидрофобности, выраженный как коэффициент распределения в системе 1 - октанол-вода (logP<sub>ow</sub>) и показатели констант диссоциации (pK<sub>a</sub>), рассчитанные при помощи программы ACD Labs 4.0, представлены в табл. 1. В соответствии с представленными в таблице данными в диапазоне 3 < рН < 5 в

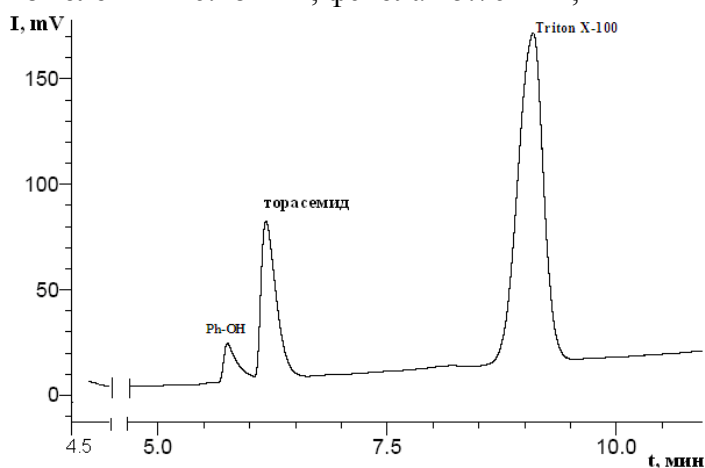
растворе преобладает молекулярная форма торасемида. При рН меньше 3, препарат находится в протонированной форме, а при рН больше 5 в диссоциированной форме.

Таблица 1

### Структурная формула и свойства торасемида

<p><b>Торасемид</b>  <math>\log P_{ow} = 2.30</math>  <math>pK_a^1 = 3.13 \pm 0.50</math> (расч.)  <math>pK_a^2 = 4.89 \pm 0.38</math> (расч.)</p>	
--	--

В работе оценили возможность совместимость использованной системы НПАВ – фенол с методом ВЭЖХ определения торасемида. Хроматограмма торасемида в присутствии фенола и Triton X-100 характеризуется тремя симметричными пиками: время выхода торасемида из колонки – 6.18 мин; фенола - 5.76 мин; НПАВ – 9.09 мин, рис. 1.



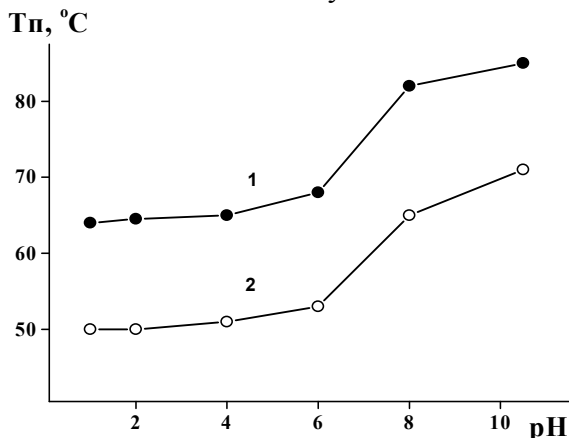
**Рис. 1.** Фрагмент хроматограммы раствора торасемида в Triton X-100 в присутствии фенола.  $C_{TХ-100} = 3 \cdot 10^{-2}$  моль/л,  $C_{Ph-OH} = 5 \cdot 10^{-2}$  моль/л,  $C_{ТОР} = 2 \cdot 10^{-3}$  моль/л.

Существенное отличие времён выходов компонентов системы в условиях хроматографирования дало возможность качественного разделения пиков и определения торасемида в фенол-индуцированной мицеллярно-экстракционной системе.

**Фазовое расслоение в растворах неионогенного ПАВ Triton X-100 в присутствии торасемида.** Потенциально, каждый из распределяемых в мицеллярно-экстракционной системе субстратов способен изменять температуру помутнения растворов НПАВ. Введение в  $3 \cdot 10^{-2}$  моль/л раствор Triton X-100  $5 \cdot 10^{-2}$  моль/л фенола снижает температуру помутнения с  $66^\circ\text{C}$  до  $45^\circ\text{C}$ . При этом, объем формирующейся с 10 мл  $3 \cdot 10^{-2}$  моль/л раствора НПАВ мицеллярной фазы составляет  $\sim 0.8$  мл, а в присутствии фенола 0.6 мл.

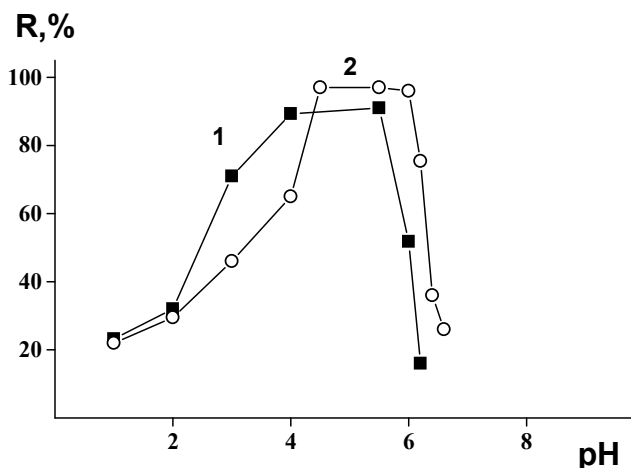
Введение в  $3 \cdot 10^{-2}$  моль/л раствор Triton X-100  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л торасемида в интервале  $2 < \text{pH} < 6$  практически не влияет на значение  $T_p$  (рис.2, кривая 1). Однако при  $\text{pH} > 6$  наблюдается увеличение температуры помутнения растворов НПАВ, что вызвано диссоциацией торасемида и образованием более гидрофильной анионной формы субстрата. Солюбилизация анионной формы торасемида приводит к увеличению значения  $T_p$ . Введение в систему  $5 \cdot 10^{-2}$  моль/л фенола способствует уменьшению температуры помутнения, однако характер зависимости  $T_p = f(\text{pH})$  остается неизменным (рис. 2,

кривая 2). Примечательно, что добавки торасемида при концентрации  $\leq 1 \cdot 10^{-3}$  моль/л на объем мицеллярных фаз Triton X-100 в обеих изученных системах не влияют.



**Рис. 2.** Зависимость температуры помутнения растворов Triton X100 в присутствии торасемида (1); фенола и торасемида (2) от pH.  $C_{\text{TX-100}}=3 \cdot 10^{-2}$  моль/л,  $C_{\text{Ph-OH}}=5 \cdot 10^{-2}$  моль/л,  $C_{\text{ТОР}}=1 \cdot 10^{-3}$  моль/л.

**Мицеллярно-экстракционное извлечение торасемида.** Степень извлечения торасемида в мицеллярную фазу с индивидуальных 2%-ных растворов Triton X-100 в интервале  $4 < \text{pH} < 6$  составляет  $\approx 89\%$  (рис. 3, кривая 1). С другой стороны, в присутствии  $5 \cdot 10^{-2}$  моль/л фенола наблюдается практически полное ( $\approx 98\%$ ) мицеллярно-экстракционное извлечение вещества (рис. 3, кривая 2). Большая эффективность извлечения гидрофобного субстрата при введении фенола объясняется разными лиофильными свойствами образующихся мицеллярных фаз [16]. Ранее установлено, что фенол-индуцированные мицеллярные фазы характеризуются более гидрофобными свойствами по сравнению с фазами, формирующимися из растворов НПAB без фенола [17]. Торасемид является гидрофобным субстратом ( $\log P_{\text{ow}} = 2.30$ ) и поэтому более эффективно переходит в гидрофобную фенол-индуцированную мицеллярную фазу.



**Рис. 3.** Зависимость степени извлечения торасемида в мицеллярную фазу Triton X-100 от pH в отсутствие (1) и в присутствии фенола (2).  $C_{\text{TX-100}}=3 \cdot 10^{-2}$  моль/л,  $C_{\text{Ph-OH}}=5 \cdot 10^{-2}$  моль/л,  $C_{\text{ТОР}}=1 \cdot 10^{-3}$  моль/л,  $V_0=10$  мл.

Уменьшение эффективности извлечения торасемида при  $\text{pH} < 4$  обусловлено увеличением доли гидрофильной протонированной формы субстрата, что слабо экстрагируется (рис. 3). С другой стороны, уменьшение эффективности экстракции торасемида при  $\text{pH} > 6$  обусловлено диссоциацией лекарственного вещества с образованием анионной формы.

При изучении влияния концентрации НПАВ в исходном растворе установлено, что  $\approx 97\%$ -ное извлечение торасемида в фенол-индуцированные мицеллярные фазы Triton X-100 наблюдается при содержании НПАВ в интервале  $2 \cdot 10^{-2}$  -  $8 \cdot 10^{-2}$  моль/л. Уменьшение содержания Triton X-100 в растворе при постоянной концентрации торасемида несколько снижает эффективность мицеллярно-экстракционного извлечения субстрата, что можно объяснить недостаточной солюбилизационной емкостью разбавленных растворов НПАВ.

Следует отметить, что величина отношения объемов исходного раствора и объема фазы НПАВ ( $K=V_0/V_{\text{МФ}}$ ), которая определяет возможность абсолютного концентрирования в методе мицеллярной экстракции, является максимальной именно для разбавленных растворов [18, 19]. В работе изменяли объем исходного раствора (объем пробы) в интервале 10-80 мл, а также варьировали концентрацию Triton X-100 в исходном растворе в диапазоне  $8 \cdot 10^{-3}$  -  $3 \cdot 10^{-2}$  моль/л. Установлено, что увеличение объема исходного раствора при соответственном пропорциональном уменьшении концентрации НПАВ обеспечивает увеличение коэффициента концентрирования (K). Максимальное значение K наблюдается для  $8 \cdot 10^{-3}$  моль/л растворов НПАВ при объеме исходного раствора 80 мл. Из 80 мл  $8 \cdot 10^{-3}$  моль/л растворов Triton X-100 в присутствии  $8 \cdot 10^{-2}$  моль/л фенола выделяется 0.6 мл мицеллярной фазы. После разбавления фазы до 1 мл такая система обеспечивает 80-кратное концентрирование определяемого компонента. При этом, фазообразование в растворах наблюдается при комнатной температуре ( $22^\circ\text{C}$ ), что обеспечивает дополнительные преимущества при работе с лабильными объектами анализа (моча, плазма крови и т.п.).

Установлено, что в оптимальных условиях концентрация торасемида не влияет на мицеллярно-экстракционное извлечение препарата в фазу НПАВ. На основе полученных данных были разработаны условия определения торасемида в моче методом обращено-фазной ВЭЖХ с предварительным фенол-индуцированным мицеллярно-экстракционным концентрированием.

Методика была проверена методом “введено-найдено” при определении содержания торасемида в модельных растворах и апробирована при определении добавок торасемида в моче, табл. 2.

**Таблица 2**

**Результаты определения торасемида в модельных растворах и добавок препарата в моче по разработанной методике ( $P=0.95$ ,  $n=4$ )**

Проба	Введено, мкмоль/л	Найдено, мкмоль/л	$S_r^*$
Модельные растворы	5,7	$5,7 \pm 0,4$	0,049
	14,4	$14,3 \pm 0,9$	0,041
Моча	5,7	$5,7 \pm 0,4$	0,049
	22,9	$22,9 \pm 1,6$	0,045

\* - относительное стандартное отклонение

**Выводы**

Таким образом, в работе показано, что количественное извлечение торасемида достигается при использовании гидрофобных фенол-индуцированных мицеллярных фаз неионогенного ПАВ Triton X-100. На основе полученных результатов разработана методика обращеннофазного ВЭЖХ определения торасемида в моче с предварительным мицеллярно-экстракционным концентрированием в присутствии фенола. Методика была проверена методом “введено-найдено” при анализе модельных растворов и апробирована при определении добавок торасемида в моче

## ЛИТЕРАТУРА

1. **Lohrmann E., Burhoff I., Greger R.** Tubular effects of the diuretic Torasemide. // *Cardiology*. – 1994. - № 84. - P. 135-142.
2. **Vormfelde S.V., Burckhardt G., Zirk A., Wojnowski L., Brockmoller J.** Pharmacogenomics of diuretic drugs: data on rare monogenic disorders and on polymorphisms and requirements for further research. // *Pharmacogenomics* – 2003. - № 4. – P. 701–734.
3. **Deventer K., Delbeke F.T., Roels K., Van Eenoo P.** Screening for 18 diuretics and probenecid in doping analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. // *Biomedical Chromatography*. – 2002. - № 16. – P. 529–535.
4. **Guchelaar H. J., Chandi L., Schouten O.** A high performance liquid chromatographic method for the screening of 17 diuretics in human urine // *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. – 1999. – V. 363, - № 7. – P. 700–705.
5. **Barroso M. B., Meiring H. D., De Jong A.** Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of the loop diuretic torasemide in human urine // *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*. – 1997. – V. 690, - № 1–2. – P. 105–113.
6. **Штыков С. Н.** Химический анализ в нанореакторах: основные понятия и применение // *Журнал аналитической химии*. – 2002. – Т. 57, - № 10. – С. 1018–1028.
7. **Quina F.H., Hinze W.L.** Surfactant-mediated cloud point extractions: an environmentally benign alternative separation approach. // *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 1999. - № 38. – P. 4150-4168.
8. **Hinze W.L., Pramauro E.A.** Critical review of surfactant-mediated phase separations (cloud point extractions): theory and applications. // *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. – 1993. - № 24. – P. 133-177.
9. **Дорошук В. А.** Концентрирование кадмия фазами неионного ПАВ ОП-10 при температуре помутнения / В. А. Дорошук, С. А. Куличенко // *Журнал аналитической химии*. – 2005. – Т. 60, - № 5. – С. 458–463.
10. **Doroschuk V.O., Lelyushok S.O., Ishchenko V.B., Kulichenko S.A.** Flame atomic absorption determination of manganese (II) in natural water after cloud point extraction. // *Talanta*. – 2007. - № 64. – P. 853-856.
11. **Shariati S., Yamini Y.** Cloud point extraction and simultaneous determination of zirconium and hafnium using ICP-OES. // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2006. - № 298. – P. 419-425.
12. **Briganti G., Puvvada S., Blankschtein D.** Effect of Urea on Micellar Properties of Aqueous Solutions of Nonionic Surfactants. // *Journal of Physical Chemistry*. - 1991. - № 95. – P. 8989-8995.
13. **Zhao G., Chen S.B.** Clouding and phase behavior of nonionic surfactants in hydrophobically modified hydroxyethyl cellulose solutions. // *Langmuir*. – 2006. - № 22. – P. 9129-9134.
14. **Wang Zh., Zhao F., Li D.** Determination of solubilization of phenol at coacervate phase of cloud point extraction. // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2003. - № 216. – P. 207-214.
15. **Inoue T.** Cloud point temperature of polyoxyethylene-type nonionic surfactants and their mixtures / T. Inoue, H. Ohuma, D. Murata // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2003. – V. 258. – P. 374–382.
16. **Mata J. P., Majhi P. R., Kubota O., Khanal A., Nakashima K., Bahadur P.** Effect of phenol on the aggregation characteristics of an ethylene oxide-propylene oxide triblock copolymer P65 in aqueous solution. // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2008. - № 320. – P. 275–282.

17. **Kulichenko S.A., Doroschuk V.O., Gonta N.A.** Phase separation in non-ionic surfactant Triton X-100 solutions at the presence of phenol. // *Chemical Papers*. – 2010. - № 64. – P. 91-97.
18. **Дорошук В.О., Гонта Н.А., Дроздова М.В., Куліченко С.А.** ВЭЖХ определение фуросемида в биологических жидкостях с предварительным мицеллярно-экстракционным концентрированием // *Журнал аналитической химии*. – 2009. - № 10. - С. 1082-1087.
19. **Doroschuk V.A., Lelyushok S.O., Rakhilchuk O.O., Kulichenko S.A.** Lyophilic properties of surfactant-rich phases of polyethoxylated alkylphenols formed at cloud point temperature. // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2006. - № 299. – P. 403-409.

*Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко*

*Надійшло до редакції 26.12.2011*