

Винахід відноситься до аналітичної хімії, зокрема аналізу біологічних рідин на вміст в них діуретичного засобу - фуросеміду (ФР).

Відомо визначення фуросеміду по сенсibiliзованій люмінесценції іонів Tb в етанольних розчинах (див. Кравченко Т.Б. и др. Способ количественного определения фуросемида. АС. СССР №1603258, 1990г.) Вказаний спосіб передбачає взаємодію фуросеміду з хлоридом тербію при $pH=6,3-6,8$ і реєстрацію інтенсивності люмінесценції в етанольних розчинах. Але, комплекс, який утворюється, недостатньо стійкий в розчинах, а тому визначення ФР в плазмі крові неможливе. Крім того, багато компонентів плазми крові гасять люмінесценцію комплексу.

Відомий також спосіб визначення фуросеміду по люмінесценції іонів Tb(III) в присутності донорно-активної добавки-триоктилфосфіноксиду (ТОФО) і нейтральної поверхнево-активної речовини тритону X-100 (див. Arnaud N., Georges J., Analytica Chim. Acta, 2003 (476), p.149-157). Цей спосіб призначений для післяколонного виявлення ФР в плазмі крові після його відокремлення методом вискоефективної колоночної хроматографії. Це вимагає дорогого обладнання.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб, що передбачає визначення ФР в плазмі крові після попереднього вилучення білків (див. P.C.Joannon, N.V.Rusakova, D.A.Andrikopoulon, K.M.Geynon, G.M.Tzompanaki. Analyst. 1998. p.2839-2843). Визначення здійснюють таким чином. До 0,25мл плазми крові додають 0,06мл 8,5моль/л оцтової кислоти, струшують, додають 2,0мл етилацетату. Розчин витримують 20 хвилин і центрифугують 15 хвилин при частоті обертів 1500. Далі 1,7мл органічної фази відбирають у скляну посудину і випаровують в потоку азоту при $40^{\circ}C$. До проби додають 2,0мл $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л розчину хлориду тербію в метанолі в присутності триетиламіну і записують інтенсивність люмінесценції при $\lambda = 550nm$ при $\lambda_{вод} = 350nm$ проти розчину холостого досліді.

Даний спосіб обрано прототипом.

Прототип співпадає з винаходом, що заявляється, в наявності спільних операцій:

- відбір проби;
- виділення фуросеміду;
- взаємодія фуросеміду з розчином хлориду тербію;
- вимірювання інтенсивності флуоресценції розчину.

Але спосіб за прототипом вимагає попереднього відокремлення білків з використанням концентрованої оцтової кислоти (8,5моль/л). Крім того, спосіб передбачає випаровування в потоку азоту. Перелічене ускладнює спосіб. Окрім того у способі застосовується метанольний розчин хлориду тербію. Метанол є токсичною речовиною і виконання робіт з метанолом в лабораторії є небажаним.

В основу винаходу поставлено задачу розробити спосіб, в якому шляхом більш ефективного метода виділення фуросеміду забезпечити спрощення способу, скорочення тривалості аналізу та зниження межі виявлення.

Поставлена задача вирішена в визначення фуросеміду в плазмі крові, що включає відбір проби, виділення фуросеміду, взаємодію його з розчином хлориду тербію і вимірювання інтенсивності флуоресценції розчину тим, що фуросемід виділяють шляхом тонкошарової хроматографії, а взаємодію його з розчином хлориду тербію здійснюють в присутності цетілтриметиламоній хлориду при $pH=6,3-6,7$.

Новим у винаході, що заявляється, є використання метода тонкошарової хроматографії для відокремлювання фуросеміду від основи та проявлення хроматограми розчином хлориду тербію в присутності цетілтриметиламоній хлориду.

Це дозволило спростити спосіб, виключити токсичний розчинник - метанол, знизити межу виявлення фуросеміду та скоротити час аналізу.

Спрощення і скорочення часу виконання аналізу стало можливим завдяки таких причин. Застосування метода тонкошарової хроматографії дозволило виключити стадію попереднього виділення білків з проби, а також виключити наступну обробку проби в потоку азоту. Використання розчину хлориду тербію як проявляючого реагента в присутності цетілтриметиламоній хлориду зумовлює появу на хроматографічній люмінесценції іону тербію Tb(III) в присутності фуросеміду, яка з'являється на твердій матриці внаслідок внутрішньомолекулярної передачі енергії збудження від фуросеміда до іона Tb(III). Цетілтриметиламоній хлорид дозволяє підсилити $I_{\text{люм. Tb(III)}}$ в 6,5 разів.

Іони Tb(III) в розчинах простих солей проявляють люмінесценцію, яка зумовлена переходом електронів 4f-оболонки. Але інтенсивність їх люмінесценції невелика через те, що сили осциляторів цих переходів малі. Органічні ліганди, поглинаючи енергію збудження, можуть передавати її на іони лантанідів, підсилюючи її на 3-4 порядки величини.

Фуросемід має в УФ-області спектру смуги поглинання з максимумами при 280 і 350nm, що зумовлює ефективне поглинання енергії збудження. Ця енергія передається з триплетного рівня ліганда ($E=21598cm^{-1}$) на енергетичний рівень Tb ($E=20500cm^{-1}$), що призводить до значного зростання $I_{\text{люм. Tb}}$. Передача енергії здійснюється і в твердій фазі, тому на хроматографічній пластинці виявляється інтенсивна люмінесценція Tb(III) в присутності фуросеміду.

Використання катіонної поверхнево-активної речовини - цетілтриметиламоній хлориду сприяє дегідратації комплексу, який утворюється і, за рахунок цього, зниженню втрат енергії збудження. Це призводить до збільшення інтенсивності люмінесценції іону Tb(III).

Вибір поверхнево-активної речовини (ПАР) проведено експериментально. Дослідження впливу різних ПАР і ТОФО на інтенсивність люмінесценції Tb(III) на хроматографічній пластині показало, що найбільша $I_{\text{люм. Tb(III)}}$ проявляється в присутності ЦТА. Дані наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Вплив ПАР і ТОФО на $I_{\text{люм. Tb(III)}}$ в присутності

фуросеміду на хроматограмі

| ПАР, ТОФО | I _{люм.} відн. од. |
|----------------------------|-----------------------------|
| Цетілтриметиламонію хлорид | 100 |
| Цетілпірідінію хлорид | 95 |
| Додецилсульфат натрію | 15 |
| Цетілсульфат натрію | 40 |
| Твін-80 | 16 |
| Тритон X-100 | 24 |
| ТОФО | 52 |
| При відсутності добавки | 15 |

Комплексна сполука Tb(III) з фуросемідом утворюється в слабкокислому середовищі при pH=6,3-6,7. Слабкокислое середовище створюють 4%-вим розчином уротропіну.

Приклад

Визначення фуросеміду проводили на модельному розчині шляхом введення в плазму крові заданої кількості фуросеміду.

1мкл. аналізованої плазми крові наносять мікрошприцем на лінію старта пластинки розміром 25x80мм. Паралельно на пластинку наносять стандартний розчин фуросеміду з концентрацією 5-10⁻⁴ моль/л. Пластинку підсушують і вміщують в хроматографічну камеру в рухому фазу (суміш толуол: ацетонітрил: метанол: мурашина кислота при їх співвідношенні рівному 15:5:1:1 відповідно). Коли фронт розчинника досягає висоти 70мм пластинку дістають з камери і відмічають фронт розчинника. Отриману хроматограму висушують і рівномірно обробляють проявляючим розчином. Проявляючий розчин готують шляхом змішування 1мл розчину хлориду тербію з концентрацією 0,01моль/л, 0,2мл 4%-го уротропіну і 0,5 ЦТМА з концентрацією 0,01моль/л і розбавлення дистильованою водою до об'єму 10мл.

Після цього пластинку знову висушують. Ідентифікацію фуросеміду на пластинці проводять по появі зеленої люмінесценції Tb(III) під люмінесцентною лампою, візуально зрівнюючи I_{люм.} проби і стандарту.

Кількісне визначення фуросеміду проводять по калібровочному графіку. Калібровочний графік будують таким чином: на пластинку наносять різні кількості стандартного розчину фуросеміду і проводять хроматографування і проявлення хроматограми, як це описано вище. Після цього з пластинки вирізають плями з фуросемідом, вміщують в кювету для твердих зразків і виміряють інтенсивність люмінесценції при $\lambda = 545\text{nm}$. За отриманими даними I_{люм.} Tb(III) - концентрація фуросеміду будують калібровочний графік, по котрому визначають вміст фуросеміду в аналізуючій пробі.

Чутливість визначення фуросеміду в плазмі крові визначена на модельних розчинах з використанням стандартних розчинів фуросеміду. Вона складає 0,03мкг/мл. Точність і достовірність визначення фуросеміда в плазмі крові перевірена методом статистичної обробки результатів аналізу.

При n=5, p=0,95 величина відносного стандартного відхилення Sr складає 0,01-0,05.

Результати визначення фуросеміду в плазмі крові були перевірені також методом "введено-знайдено", який підтвердив хороше відтворювання способу.

Дані наведені в Таблиці 2.

Таблиця 2

Результати визначення фуросеміду методом
"введено-знайдено"

| Введено | Знайдено | Sr |
|---------|-------------|------|
| 10 | 9,98±40,60 | 0,05 |
| 20 | 20,03±10,50 | 0,03 |
| 30 | 30,97±0,40 | 0,01 |