

Received: 2005.01.27
Accepted: 2005.11.04
Published: 2005.11.24

Potencjometryczna detekcja leków β -adrenolitycznych oraz β -adrenergicznych w układach HPLC

Potentiometric detection of β -adrenolytic and β -adrenergic drugs in HPLC systems

Grzegorz Bazylak¹, Luc J. Nagels²

¹ Katedra i Zakład Bromatologii, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

² Department of Chemistry, University of Antwerpen, Antwerpia, Belgia

Streszczenie

W artykule przedstawiono dotychczasowy stan wiedzy i wyniki badań własnych na temat wykorzystania efektu inkluzyjnego, wykazywanego przez związki makrocycliczne, w detekcji potencjometrycznej niektórych podstawowych leków hipotensyjnych, przeciwartymicznych i bronchodilatatorów rozdzielanych metodą wysoko sprawnej chromatografii cieczowej HPLC. Badając właściwości tzw. elektrody z „ciekłą membraną” zawierającą jeden z wybranych związków makrocyclicznych (heksaoctanowy ester kaliksarenu, dibenzenowy eter koronowy lub oktylowaną α -cyklodekstrynę) stwierdzono, że granica wykrywalności uzyskanego w ten sposób detektora może być przewidywana na podstawie parametrów molekularnych charakteryzujących hydrofobowość i polaryzowalność badanych leków. Wykorzystując metody wieloparametrowej regresji statystycznej wyznaczono równania korelacyjne umożliwiające optymalizację doboru makrocyclicznego jonoforu w elektrodzie ciekłomembranowej oraz przewidywanie granicy detekcji takiej elektrody w zależności od struktury cząsteczkowej kationowego leku β -adrenolitycznego lub β -adrenergicznego. W szczególności wykazano, że detektor potencjometryczny z elektrodą ciekłomembranową zawierającą oktylowaną α -cyklodekstrynę umożliwia oznaczanie w warunkach HPLC śladowych ilości ($<10^{-8}$ M), takich leków jak np. klenbuterol, bufuralol, propranolol, odznaczających się wysoką hydrofobowością ($\log P > 2,5$ wg Parhama-Halla-Kiera). Wynik taki wskazuje, że opracowana metoda detekcji może stanowić korzystną alternatywę wobec metod immunoenzymatycznych (ELISA), dotychczas stosowanych w analizie toksykologicznej pozostałości takich leków w płynach biologicznych. Wykazano także, iż zbiór wartości odpowiadających granicy detekcji badanych leków w układzie jonowymiennej HPLC może być przydatny w opracowaniu szybkiej analizy przesiewowej oraz klasyfikacji farmakologicznej tych leków. Analizując zebrane dane metodą wielowymiarowych czynników głównych (PCA) stwierdzono, że możliwe jest na tej podstawie rozróżnienie kardioselektywnych i niekardioselektywnych β -blokerów stosowanych jako leki hipotensyjne. Wynika z tego, że opracowany nowy sposób detekcji potencjometrycznej w układzie HPLC, może być zastosowany do efektywnego przeszukiwania nowo syntetyzowanych bibliotek kombinatorycznych leków hipotensyjnych. Zwiększałoby to możliwość identyfikacji tzw. związków wiodących (lead compounds) kierowanych do dalszych wyspecjalizowanych testów biologicznych celem opracowania nowych generacji takich leków.

Słowa kluczowe:

elektrody ciekłomembranowe • potencjometria • skrining • związki makrocycliczne • QSAR • leki β -adrenergiczne • β -adrenolityki

Summary

This paper presents a comprehensive review of reference literature and the principal results of our own studies on the use of inclusion effects of macrocyclic compounds in the potentiometric

detection of hypotensive and antiarrhythmic drugs as well as bronchodilators following their separation in HPLC systems. It was found that the properties of the liquid membrane electrodes embodying some macrocyclic compounds (i.e. trioctylated α -cyclodextrin, dibenzo-18-crown-6 or calix[6]arene hexaethylester) enabled reasonable prediction of their sensitivity in terms of the computed hydrophobicity and polarizability parameters of the analyzed drugs. The statistically significant equations enabling the optimization of the composition of liquid membrane electrodes and the prediction of their detection limits in relation to the molecular structures of cationic drugs were established by applying multiparameter regression procedures. In particular it was indicated that the use of a liquid membrane electrode with trioctylated α -cyclodextrin enables sensitive detection ($<10^{-8}$ M) of highly hydrophobic drugs ($\log P > 2.5$ on the Parham-Hall-Kier scale) such as clenbuterol, bufuralol, and propranolol under HPLC conditions. These results indicate that the developed potentiometric detection method of hypotensive drugs can be considered as a promising alternative to the immunoassay procedures (ELISA) currently recommended for the toxicological determination of trace amounts of the drugs in biological samples. It was also shown that the set of experimentally determined detection limits characterizing the sensitivity of the four different liquid membrane electrodes used in the cation-exchange HPLC system enabled reliable screening and proper pharmacological classification of the β -adrenergic and β -adrenolytic drugs analyzed. Using principal component analysis (PCA) of the potentiometric data, it was stated that a differentiation of cardioselective from non-cardioselective β_1 -blockers commonly administered as the hypotensive drugs was possible. This result indicates that the new method of potentiometric detection in HPLC systems can be applied as an effective high-throughput screening (HTS) procedure of large combinatorial libraries of newly synthesized drug-like candidates. This may increase the possibilities of identifying the lead compounds to be directed to further specialized biological tests, thus enabling the successful design and formulation of a new generation of more selective and pharmacogenome-oriented hypotensive drugs with reduced side-effects.

Key words: liquid membrane electrodes • potentiometry • HPLC • macrocycles • QSAR • screening • β -adrenoceptor binding drugs

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_59/8472.pdf

Word count: 5926

Tables: –

Figures: 6

References: 167

Adres autora: Dr hab. n. farm. Grzegorz Bazylak, prof. UMK, Katedra i Zakład Bromatologii, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Jagiellońska, 13, 85-067 Bydgoszcz, e-mail: gbazylak@cm.umk.pl

1. WPROWADZENIE

Metody potencjometryczne wykorzystujące elektrody jonoselektywne (ion selective electrodes – ISE) należą do najbardziej rozpowszechnionych metod analitycznych wykonywanych w warunkach statycznych lub analizy przepływowej (flow-injection – FIA) [10,139,160]. Ocenia się, że obecnie w ciągu roku na całym świecie wykonuje się co najmniej miliard analiz tego typu, uwzględniając także pomiary pH-metryczne [10]. Od prawie 10 lat podejmowane są próby zastosowania potencjometrii jako niezwykle prostej i stosunkowo czulej metody detekcji w dynamicznych warunkach wysoko sprawnej chromatografii cieczowej HPLC i rozmaitych odmianach elektroforezy kapilarnej (capillary electrophoresis – CE) [26]. Sygnał analityczny uzyskiwany z takiego detektora, w przeciwieństwie do detektora amperometrycznego, zależy tylko od stężenia analitu w eluencie, nie zależy natomiast od rozmiarów elektrody wskaźnikowej i od objętościowej szybkości przepływu eluenta. Z tego względu możliwe jest zwiększenie selektywności,

a ponadto miniaturyzacja elektrod stosowanych w detekcji potencjometrycznej jest stosunkowo łatwa [161]. Elektrody membranowe wytwarza się w wyniku procesów np. elektropolimeryzacji [130] lub odparowania lotnego rozpuszczalnika [124]. W ten sposób elektroda z odpowiednio dobraną lub zmodyfikowaną membraną, np. polimerową, staje się sensorem potencjometrycznym umożliwiającym zbieranie i przetwarzanie informacji chemicznej, jaką przenoszą cząsteczki analitów rozpuszczonych w eluencie.

W wyniku złożonych procesów dystrybucji i podziału międzyfazowego, a także selektywnych oddziaływań molekularnych zachodzących między cząsteczką-selektorem (tzw. jonoforem) umieszczonym w membranie elektrody wskaźnikowej a oznaczanym analitem, następuje generowanie potencjału tej elektrody. Szczególne znaczenie mają wynalezione przez Simona [99] elektrody bezpośredniego kontaktu (coated wire electrodes – CWE), w których półprzepuszczalna membrana polimerowa (szklana lub krystaliczna) jest nakładana bezpośrednio na element

przewodzący, np. pręt platynowy, miedziowy lub węglowy. Postępowanie takie umożliwia uproszczenie konstrukcji elektrod wskaźnikowych, a przede wszystkim eliminację konieczności stosowania tzw. wewnętrznego roztworu standardowego o stałym składzie. W elektrodach wskaźnikowych z „ciekłą membraną” najczęściej wykorzystuje się membranę utworzoną z wysoko molekularnego polichlorku winylu (PCV) [110] z dodatkiem lipofilowego plastifikatora, np. dioktylosebacynianu (DOS) lub eteru *o*-nitrofenylooktylowego (NPOE). Odpowiednia selektywność takiej elektrody, np. wobec związków anionowych, może być uzyskana przez rozpuszczenie w membranie lipofilowej czwartorzędowej soli amoniowej lub przez umieszczenie zjonizowanego związku chelatowego, np. metaloporfiryny [7,98,138], lub protonowanej aminy makrocyklicznej [109,157,167]. Selektywność takiej elektrody z membraną PCV wobec kationów można uzyskać wprowadzając do niej lipofilowy jonofor w postaci surfaktanta anionowego, np. tetrachlorofenylboranu potasowego (TCPB).

Od wielu lat w celu poprawienia selektywności elektrod „z ciekłą membraną”, stosuje się powszechnie tzw. jonofory obojętne, w postaci związków makrocyklicznych. Naturalne (walinomycyna, nonaktyna) i syntetyczne (eter koronowe, kaliksareny) nośniki kryptandowe stanowią najczęściej wykorzystywane związki makrocykliczne do konstrukcji takich elektrod selektywnych wobec kationu amonowego i kationów nieorganicznych, zwłaszcza metali alkalicznych i ziem alkalicznych [9]. Według Lehna [87] selektywna przepuszczalność membrany może być indukowana przez procesy, w których są zaangażowane cząsteczki obojętne jonoforu lub kanały w membranie. Transport analitu w membranie za pomocą takiego jonoforu składa się z czterech elementarnych procesów:

- 1° utworzenia asocjatu jonofor–analit przy powierzchni membrany,
- 2° dyfuzji utworzonego asocjatu przez membranę,
- 3° uwolnienia analitu przy drugiej powierzchni membrany,
- 4° dyfuzji wolnego jonoforu do położenia początkowego [87].

Jonofor jest zatem katalizatorem transportu membranowego, zwiększającym szybkość przenikania analitu przez membranę w porównaniu ze zwykłą dyfuzją. Stwarza to możliwość kontrolowania transportu określonego analitu przez odpowiednie modyfikowanie struktury cząsteczki jonoforu, co zostało wykorzystane m.in. do opracowania nowej postaci leków, tzw. leków solubilizowanych [148].

Do wad membran wykonanych z PCV zaliczyć należy przede wszystkim to, że w czasie ich dłuższego stosowania następuje stopniowe wymywanie wprowadzonych do nich celowo składników elektroaktywnych (np. jonoforu) [26,110], co prowadzi do obniżania się selektywności i zwiększenia szumów własnych elektrody [10,26,99,110,124,130,160,161]. Z tego względu poszukuje się ciągle nowych związków mogących stanowić jonofory, plastifikatory lub addendy regulujące przepuszczalność membrany PCV. A przy tym dąży się do opracowania nowych materiałów polimerowych, takich jak polimery jonowe [133], poliuretany [164], sieciowane polisiloksany [107] czy też nowych sposobów nakładania membrany na elektrodę, np. z wykorzystaniem metody „zol-żel” [82], technik fotolitograficznych [158], fotopolimeryzacji [8] czy elektropolimeryzacji [130].

2. PRZYKŁADY ZASTOSOWAŃ DETEKCYJ POTENCJOMETRYCZNEJ W HPLC I CE

Metoda potencjometryczna może być szczególnie użyteczna do bezpośredniego oznaczania związków niezawierających grup chromoforowych pochłaniających promieniowanie UV, co wyklucza zastosowanie spektrofotometrii oraz związków, których derywatyżacja jest uciążliwa i nie przebiega w sposób ilościowy. Egashira [39], stosując szklaną elektrodę wskaźnikową, zapoczątkował wykorzystanie metody potencjometrycznej do detekcji kwasów organicznych rozdzielonych w warunkach HPLC. Elektrody krystaliczne odznaczające się dużą czułością, wysoką selektywnością, trwałością i małą bezwładnością stosowano także w detekcji potencjometrycznej związków rozdzielanych metodą kolumnowej chromatografii cieczowej (LC) i HPLC [66]. Na przykład metaliczna elektroda srebrowa pokryta trudno rozpuszczalnymi solami srebra była wykorzystywana w detekcji potencjometrycznej anionów tiocyananowych i tiocyjanianowych w warunkach chromatografii jonowej [155]. Szczególnie interesujące rezultaty osiągnięto przy zastosowaniu miedziowych elektrod metalicznych [2–4,27,29,31,44,45,51–55,93] w detekcji potencjometrycznej rozdzielonych metodą HPLC kwasów organicznych, anionów organicznych oraz amin alifatycznych [29]. Podobnie, wolframowe elektrody metaliczne były stosowane w warunkach HPLC jako elektrody wskaźnikowe do detekcji kationów metali i anionów kwasów organicznych [30]. Elektrody „z ciekłą membraną” charakteryzują się mniejszą selektywnością i większą bezwładnością w porównaniu z elektrodami krystalicznymi, jednak nie stanowi to przeszkody w ich stosowaniu jako elementu detektora potencjometrycznego w HPLC. Początkowo tego typu elektrody stosowano do selektywnej detekcji pojedynczych jonów, np. azotanowych [142], chlorkowych [41,104] lub wapniowych [83] w warunkach jonowymiennej HPLC. Haddad i Alexander [50] przedstawili różne warianty zastosowania omawianej metody detekcji potencjometrycznej do oznaczania jednowartościowych kationów i anionów rozdzielanych metodą jonowymiennej HPLC. Suzuki i wsp. [162] wykorzystali obojętne jonofory kryptandowe (walinomycynę, nonaktinę, tetranaktinę, benzo-15-koronę-5) do konstrukcji elektrod ciekłomembranowych stosowanych w detekcji kationów metali ziem alkalicznych i kationu amonowego w chromatografii cieczowej. Kationowe i obojętne jonofory makrocykliczne niedawno zastosowano w elektrodach ciekłomembranowych do oznaczania odpowiednio, niskocząsteczkowych amin alifatycznych [129], aminoalkoholi [16], leków β -adrenolitycznych oraz β -adrenergicznych [17,18,19,21] w warunkach HPLC z odwróconymi fazami, par jonowych i jonowymiennej HPLC. Natomiast jonofory w postaci amin makrocyklicznych okazały się przydatne do konstrukcji elektrod ciekłomembranowych wykazujących selektywność względem anionów kwasów organicznych i nukleotydów [109,124,167].

W celu zwiększenia czułości oznaczania kationów metali i kationu amonowego, Cha i wsp. [56] zastosowali *quasi*-bibliotekę jonoforów jako składników elektrody ciekłomembranowej. Natomiast Chen i wsp. [44] opracowały matrycową elektrodę ciekłomembranową, składającą się z ośmiu oddzielnych elektrod, która została zastosowana w detekcji potencjometrycznej w warunkach jonowymiennej HPLC.

Miniaturyzacja elektrod umożliwia ich zastosowanie jako detektorów potencjometrycznych w analizie chromatograficznej metodą elektroforezy kapilarnej (CE). W warunkach CE stosowanie konwencjonalnej elektrody odniesienia nie jest konieczne, gdyż jej rolę spełnia elektroda podstawowa elektroforetycznego układu pomiarowego. Można prowadzić taką detekcję w układzie „na kolumnie” oraz w układzie „na końcu kolumny”, który jest łatwiejszy do zastosowania [97]. Niewielka liczba publikacji opisuje zastosowanie detekcji potencjometrycznej w układzie CE, po raz pierwszy opracowanej przez Habera i wsp. [48], a następnie udoskonalanej przez Nanna i wsp. [111–113] oraz Hausera i wsp. [58]. Początkowo stosowano elektrody mikropipetowe, znane z badań elektrofizjologicznych, jednak ich nietrwałość i niestabilność spowodowała, że zaczęto konstruować odpowiednie elektrody ciekłomembranowe [35,76,77,141]. Doprowadziło to do opracowania przenośnego, kompaktowego systemu CE z detektorem potencjometrycznym [75,78]. Miedziane elektrody metaliczne okazały się szczególnie użyteczne w detekcji potencjometrycznej aminokwasów [74], kwasów sulfonowych [97] i różnych jonów nieorganicznych [97]. Oligomery i polimery przewodzące zostały zastosowane jako materiały do konstrukcji zmminiaturyzowanych elektrod membranowych umożliwiających detekcję potencjometryczną kwasów karboksylowych w warunkach CE [128,152]. Ostatnio daje się zauważyć wzrost zainteresowania potencjometryczną metodą detekcji, jako możliwą do zastosowania w analizie jonów organicznych, np. acetylocholino i neuroprzekazników metodą CE [79].

3. ZWIĄZKI MAKROCYKLICZNE JAKO SKŁADNIKI ELEKTROD

Wykorzystanie międzycząsteczkowych oddziaływań supramolekularnych, a zwłaszcza efektu kryptandowego, oddziaływań inkluzyjnych i samoorganizujących się systemów dyskretnych do modyfikacji selektywności i zwiększenia czułości elektrod ciekłomembranowych od dawna skupiało uwagę wielu grup badawczych [69]. Niepodstawione i derywatyzowane etery koronowe, stanowiące wygodny model kanałów jonowych w membranach fosfolipidowych [159], okazały się szczególnie użyteczne jako jonofory (nośniki) w membranach elektrod selektywnych w stosunku do kationów metali alkalicznych, kationu amonowego oraz kationów niskocząsteczkowych amin alifatycznych (kationy oniowe) [69,135,159]. Do selektywnego oznaczania enancjomerów amin wykorzystano chiralne etery koronowe; obserwowany proces enancjodyskryminacji wyjaśniono zwiększonym udziałem oddziaływań sterycznych i stosowych (π - π) w kompleksie supramolekularnym typu „gość-gospodarz” [37]. Natomiast w przypadku amin i eterów koronowych często dochodzi do utworzenia centrosymetrycznych kompleksów o stechiometrii 1:2 z udziałem wiązań wodorowych [134]. Niedawno przedstawiono ilościowe zależności między strukturą makrocyklicznych eterów azokoronowych lub azooksykoronowych a wykazywaną przez nie selektywnością jonoforową w stosunku do jonów metali [95]. Podjęto także badania nad znaczeniem rodzaju funkcjonalizacji i rozmiarów pierścienia makrocyklicznego w eterach azotiaoronowych w rozpoznawaniu jonów metali podczas procesów transportu w membranach PCV [163].

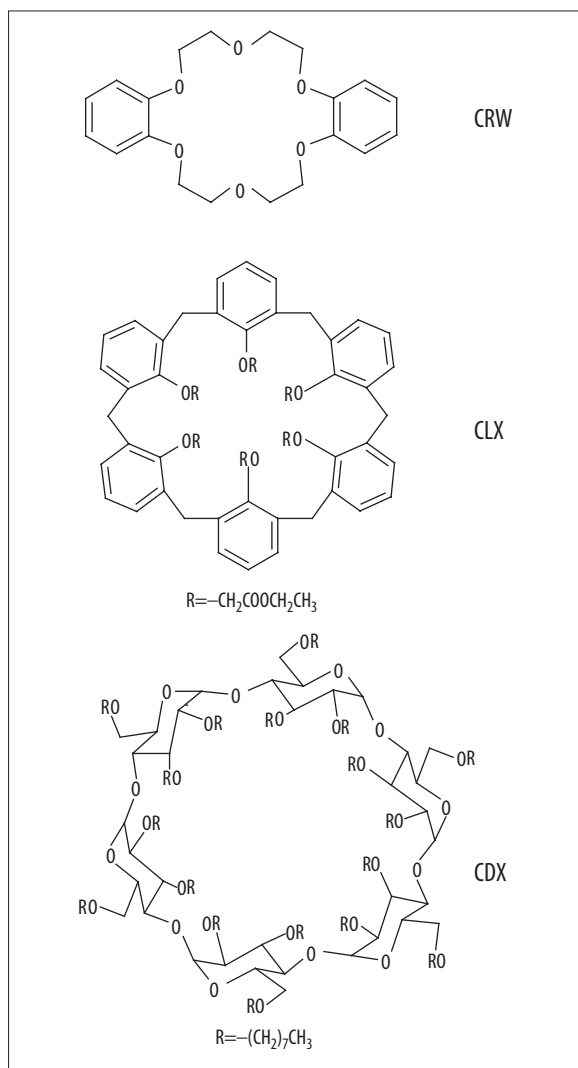
Najnowsze osiągnięcia w zastosowaniach makrocyklicznych kaliksarenów w różnych dziedzinach chemii anali-

tycznej omówiono w obszernym artykule przeglądowym Ludwiga [96]. Ustalono np, że estryfikacja grup hydroksylowych na dolnej obręczy kaliksarenu za pomocą kwasu octowego, propionowego lub heksaetylooctowego oraz wprowadzenie do niego podstawnika *tert*-butyloвого lub adamantylowego na górnej obręczy, umożliwia uzyskanie większej selektywności jonoforowej elektrod ISE w stosunku do amin pierwszorzędowych [86,88,108], dopaminy [118] oraz estrów fenylalaniny i leucyny [145]. Natomiast modyfikacja wnętrza kaliksarenu za pomocą grupy amidowej, jako dodatkowego centrum protonowoakceptorowego, zwiększa selektywność jonoforową tego makrocyklu w elektrodach ISE wobec kationów guanidynowych [36]. Obecność grupy tiokarbonylodiaminowej na dolnej obręczy kaliksarenu powoduje efektywną dyskryminację izomerów trójkarbonylobenzenu przez elektrodę ISE [63,139]. Warto wspomnieć, że niemodyfikowane cząsteczki kaliksarenu, a także jego heksaetyloestry, zastosowano do syntezy kowalencyjnie unieruchomionych na żelu krzemionkowym faz stacjonarnych do HPLC, co pozwoliło na uzyskanie selektywnych rozdzieleni mieszanin węglowodorów aromatycznych, ksantyn i barbituranów [25,61,88,147].

Natywne oraz selektywnie lub całkowicie derywatyzowane α -, β - i γ -cyklodekstryny od dawna są obiektem zainteresowania w różnych dziedzinach chemii analitycznej [140,165], a także chemii farmaceutycznej [60,148,150,151]. Cyklodekstryny jako związki makrocykliczne tworzą kompleksy inkluzyjne z obojętnymi i jonowymi cząsteczkami różnych klas związków organicznych. Pozwala to na ich szerokie zastosowanie do zwiększania selektywności różnych układów separacyjnych, np. w mikrodyalizie [140], w technikach membranowych [140], w chiralnej chromatografii cieczowej [165], w elektroforezie kapilarnej [5,43], czy też detekcyjnych, np. jako jonoforów w elektrodach ISE [42,81,122]. W szczególności wysokolipofilowe monoi polifunkcjonalizowane cyklodekstryny zawierające grupy oktylowe, decylowe, didodecylowe, oktadecylowe, cholesterolowe lub dipalmitoiloglicerynowe są wykorzystywane jako składniki monowarstw w chemosensorach [67]. Ponadto, modyfikowane cyklodekstryny stosowane były jako jonofory zwiększające selektywność elektrod ciekłomembranowych wobec kationów alkiloaminowych, aryloaminowych, acetylocholino, anestetyków, trójcyklicznych środków antydepresyjnych, efedryny i propranololu w statycznych pomiarach potencjometrycznych [81,122]. Wzory strukturalne związków makrocyklicznych zastosowanych jako jonofory w przeprowadzonych badaniach własnych [17,18,19] z użyciem skonstruowanych elektrod ciekłomembranowych przedstawia ryc. 1.

4. ZNACZENIE POTENCJOMETRII W BADANIACH LEKÓW

Astma oskrzelowa i nadciśnienie tętnicze zaliczane są do najbardziej rozpowszechnionych chorób w krajach wysoko uprzemysłowionych [24,38,103]. W leczeniu astmy wykorzystuje się bronchodilatory, stanowiące pochodne fenyletyloaminy i będące agonistami receptorów β_2 -adrenergicznych. W farmakoterapii nadciśnienia tętniczego stosowane są szeroko m.in. aryloetanoloaminowe i aryloksypropanoaminowe leki blokujące receptory β -adrenergiczne. Większość tych leków β -adrenergicznych i β -adrenolitycznych jest wydalana z ustroju w postaci skoniugowanych metabolitów i/lub w postaci niezmienionej, przy czym tylko



Ryc. 1. Wzory strukturalne związków makrocyklicznych wykorzystywanych jako jonofory w konstrukcji elektrod cieklomembranowych: dibenzenowy eter koronowy (CRW), heksaoctanowy ester kaliks[6]arenu (CLX), oktylowana α -cyklodekstryra (CDX)

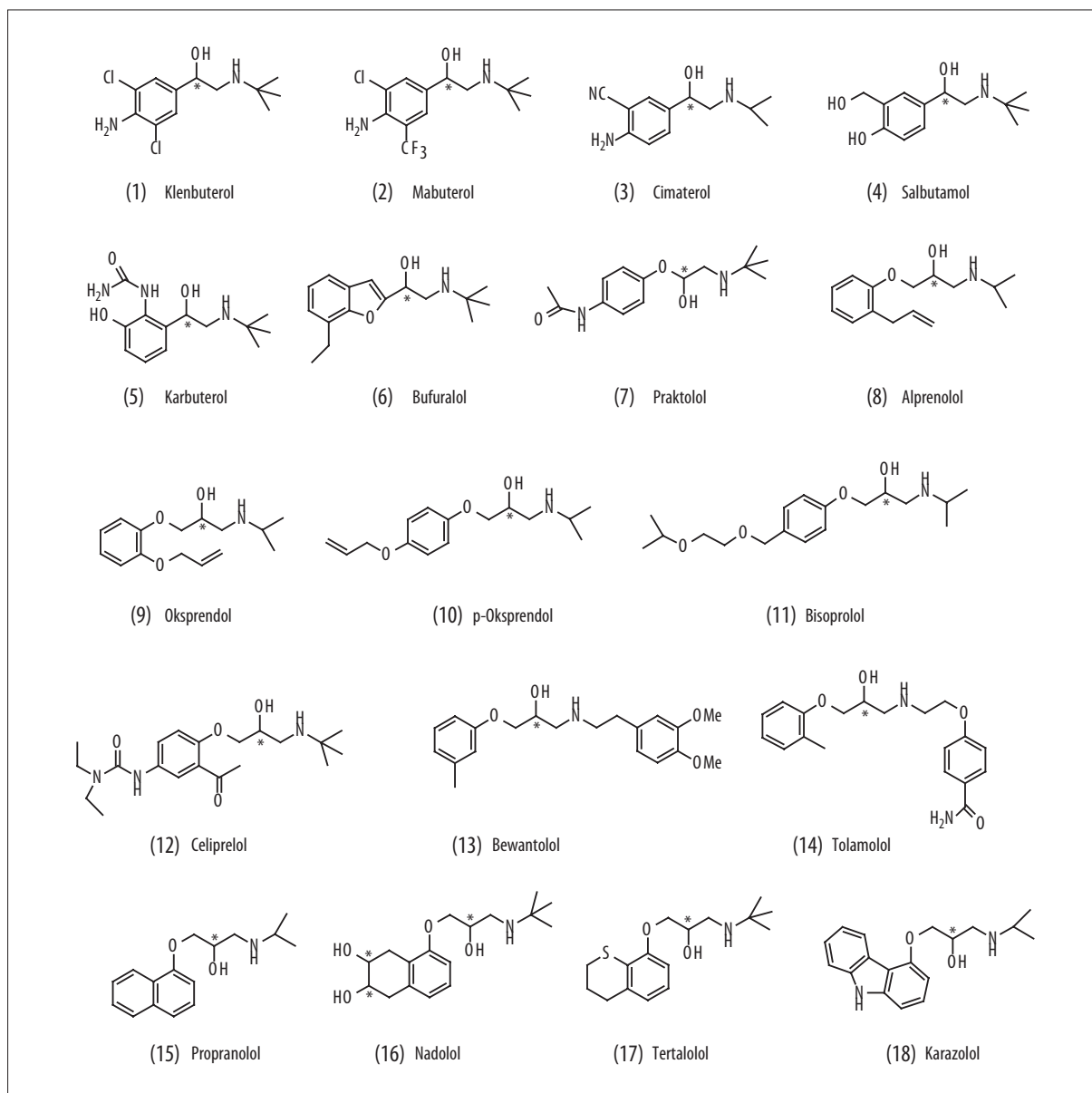
niewielka część dawki terapeutycznej jest dawką efektywną [24,103,146]. Ponadto, znaczne rozpowszechnienie stosowania tego typu leków w ostatnich latach doprowadziło do tego, że stały się one „niebezpiecznymi” ksenobiotykami, których obecność można stwierdzić w ściekach komunalnych [153], a nawet w wodach gruntowych [68] wokół dużych aglomeracji miejskich. Mimo umieszczenia wielu z omawianych grup leków na listach niedozwolonych środków dopingujących i anabolicznych, w krajach UE i USA obserwuje się zwiększanie ilości wykrywanych przypadków ich nielegalnego stosowania w różnych dyscyplinach sportu i rekreacji, a także jako niedozwolonego składnika mieszanek paszowych [33]. Ostatnio stwierdzono [33], że oferowane są przez nielegalnych wytwórców specjalnie modyfikowane pochodne takich leków, np. klenbuterol o zwiększonej lipofilności, co umożliwi ominięcie istniejących i powszechnie aprobowanych procedur kontroli i analizy ich pozostałości w tkankach, płynach ustrojowych czy też matrycach środowiska naturalnego. Fakty

takie wskazują na konieczność ciągłego rozwijania i udoskonalania istniejących metod analitycznych, a także opracowywania nowych, które pozwalałyby na szybkie i tanie oznaczanie pozostałości omawianych leków β -adrenolitycznych i β -adrenergicznych oraz ich metabolitów w różnorodnych matrycach.

Obecnie, do najbardziej rozpowszechnionych technik analitycznych stosowanych do oznaczania pozostałości fenylaminoalkoholowych leków β -adrenergicznych w próbkach biologicznych, zaliczyć można metody immunoenzymatyczne (ELISA) [47], chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią masową (GC-MS) [101], HPLC sprzężonej ze spektrometrią masową [33,68] oraz HPLC z matrycowym detektorem diodowym (diode array detektor – DAD) [103]. Stosunkowo nieliczne są przypadki zastosowania detekcji elektrochemicznej takich leków w warunkach analizy HPLC. Przykładem może być zastosowanie detekcji amperometrycznej [84,91] i kulometrycznej [102,131]. W warunkach statycznej analizy objętościowej do detekcji potencjometrycznej kilku β -blokerów (np. propranololu) i leków β -adrenergicznych (np. klenbuterolu i jego analogów) stosowano pulsacyjną voltamperometrię różnicową [105,106,126] i potencjometrię [123,149]. Jako selektywne elektrody wskaźnikowe w pomiarach tych stosowano elektrody wykonane z węgla porowatego [84,131], polianiliny [149], pasty węglowej modyfikowanej nafionem [105,106], elektrody cieklomembranowe z PCV zawierające undecylowaną β -cyklodekstrynę [123] oraz elektrody kompozytowe z imprintowaną molekularnie matrycą polimerową [126]. Granica detekcji takich elektrod (wg definicji wynikającej z krzywej Nernsta [64]) w warunkach statycznych oznaczeń potencjometrycznych wynosiła zwykle w przypadku klenbuterolu około $5,0 \times 10^{-6}$ M.

Badania zachowania się elektrod cieklomembranowych podczas detekcji potencjometrycznej β -blokerów i leków β -adrenergicznych rozdzielanych metodą HPLC, mogą także się przyczynić do lepszego poznania procesów transportu membranowego takich leków. Procesy dyfuzji, w której biorą udział cząsteczki np. leku β -adrenolitycznego w fosfolipidowej membranie komórkowej mogą stanowić czynnik zmieniający jego właściwości farmakokinetyczne. Dlatego wykorzystuje się także badania w układach modelowych (biomimetycznych), np. liposomach [85], zawierających fazę wodną i uporządkowaną warstwę organiczną, do ustalenia przebiegu takich procesów. Szczególnie interesującym było stwierdzenie, że retencja β -blokerów oraz leków β -adrenergicznych na kolumnach HPLC z immobilizowaną sztuczną błoną biologiczną (IAM) opracowaną przez Pidgeona [119] jest dobrym modelem do przewidywania zachowania się tych leków w postaci obojętnej i zjonizowanej podczas transportu w naturalnej błonie lipidowej [71,72,116,123].

W porównaniu z wynikami uzyskiwanymi z użyciem parametrów hydrofobowości ($\log P$) wyznaczonych metodą statyczną [59,115], sumowania – rozmaicie definiowanych – stałych fragmentarycznych [65,115] lub rozmaitymi metodami chromatograficznymi [73], hydrofobowość β -blokerów oraz leków β -adrenergicznych oznaczona metodami IAM-HPLC [115,116,120], z użyciem liposomów [85] i ostatnio voltamperometrii cyklicznej [28] stanowi częściej lepszą miarę charakteryzowania oraz przewidywa-



Ryc. 2. Wzory strukturalne badanych leków

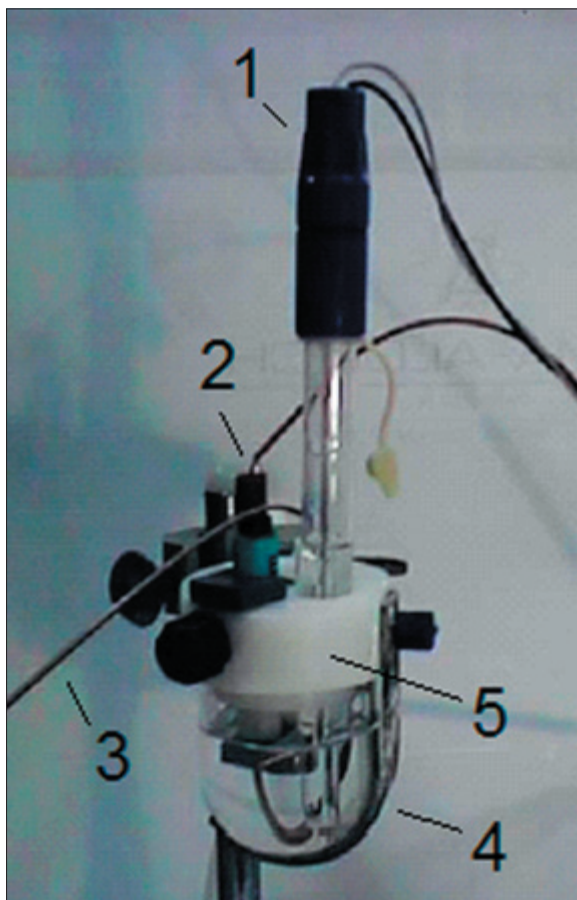
nia ich właściwości podziałowych w naturalnie zachodzących procesach membranowych.

Detekcja potencjometryczna β -blokerów oraz leków β -adrenergicznych z użyciem elektrod ciekłomembranowych w dynamicznych warunkach HPLC przynosi szczególnie interesujące wyniki, gdyż odnoszą się one do leków w postaci kationowej, spowodowanej głównie przez protonizację grup aminowych w ich cząsteczkach. Wpływ zmian jonizacji cząsteczki, a także przemieszczania się wewnątrzcząsteczkowego ładunku elektrostatycznego, na właściwości podziałowe i sposób transportu membranowego różnych grup leków nie są jeszcze dostatecznie poznane [72,85]. Dlatego podjęte przez nas badania na temat detekcji potencjometrycznej leków β -adrenolitycznych oraz β -adrenergicznych w układach HPLC, oprócz aspektu ściśle analitycznego, umożliwiają poznanie właściwości nowego układu biomimetycznego jaki może stanowić syntetyczna

membrana elektrody wskaźnikowej. Rezultaty takich badań, przedstawiające skutki zastosowania obojętnych jonoforów jako składnika membrany PCV i wpływu zjawiska supramolekularnej inkluzji na transport membranowy β -blokerów oraz leków β -adrenergicznych, mogą być wykorzystane w opracowaniu nowych mikrofabrykowanych, wysokoselektywnych i czułych sensorów potencjometrycznych do biomonitoringu takich leków oraz ich metabolitów [26,160,161]. Szczegółowe wyniki przeprowadzonych badań własnych w tym zakresie zawarte są w cyklu publikacji oryginalnych [16–22,109].

5. PRZYKŁAD BADAŃ POTENCJOMETRYCZNYCH W UKŁADACH HPLC

W przeprowadzonych badaniach własnych na temat detekcji potencjometrycznej w układzie jonowymiennej HPLC i RP-HPLC wykorzystano leki, które obejmowały grupę pięciu β -adrenomimetyków i trzynastu β -blokerów w po-



Ryc. 3. Konstrukcja detektora potencjometrycznego (tzw. układ „wall-jet”) stosowanego w pomiarach HPLC: 1 – elektroda odniesienia; 2 – ciekłomembranowa elektroda wskaźnikowa; 3 – rurka kapilarna PEEK łącząca wylot kolumny HPLC z detektorem; 4 – naczynie szklane z wylotem przelewowym; 5 – pokrywa teflonowa

staci racemicznej; ich wzory strukturalne przedstawia ryc. 2. Każdy z tych związków scharakteryzowano za pomocą 15 parametrów molekularnych, wyznaczonych z użyciem programów do modelowania molekularnego HyperChem, Pallas i LogP-Predictor [17,18,19].

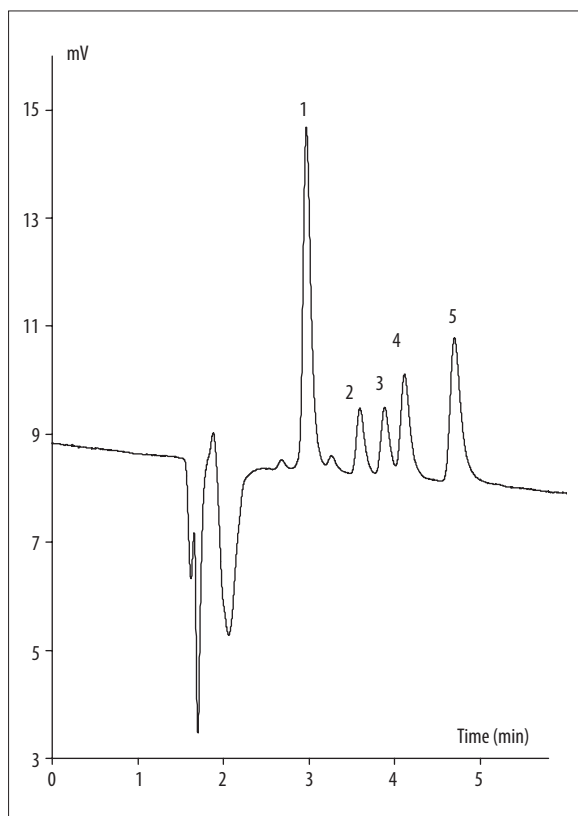
Odpowiedź detektora potencjometrycznego w warunkach HPLC badano stosując specjalnie skonstruowane układy pomiarowe przedstawione na ryc. 3. W badaniach tych stosowano cztery różne elektrody ciekłomembranowe wykonane z PCV, zawierające dioktylosebacynian (DOS), tetra-chlorofenyloboran potasowy (TCPB) oraz jeden z trzech makrocykli (por. ryc. 1): octan heksaetylokaliks[6]arenu (CLX), dibenzo-18-koronę-6 (CRW) lub oktylowaną α -cyklodekstrynę (CDX). Istotnym parametrem wpływającym na czułość oraz granicę detekcji danej elektrody ciekłomembranowej był stosunek liczby moli TCPB, czyli związku zwiększającego przewodnictwo membrany PCV, do liczby moli makrocyklicznego jonoforu w membranie. Optymalna wartość tego parametru wynosiła 1:1 w przypadku elektrody zawierającej jonofor CDX, 13,3:100 w przypadku jonoforu CRW oraz 8,31:100 w przypadku elektrody CLX. Składniki membrany po odważeniu były rozpuszczone w elektrochemicznie czystym tetrahydrofuranie.

Ciekłą membranę uzyskiwano po nałożeniu około 120 μ l tego roztworu na końcówkę elektrody platynowej i całkowitym odparowaniu rozpuszczalnika w temperaturze pokojowej. Przed rozpoczęciem właściwych pomiarów w układzie HPLC uzyskane elektrody ciekłomembranowe kondycjonowano w ciągu 24 h w wodzie destylowanej. Średnia masa membrany w takiej elektrodzie wynosiła 12,93 mg, a średnia grubość 228 μ m. Pomiarów w izokratycznym układzie jonowymiennej HPLC wykonano z użyciem kolumny wypełnionej adsorbentem w postaci kopolimeru polibutadienu z kwasem maleinowym. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina acetonitryl – 40 mM kwas fosforowy (15:85, o/o), pH 2,35.

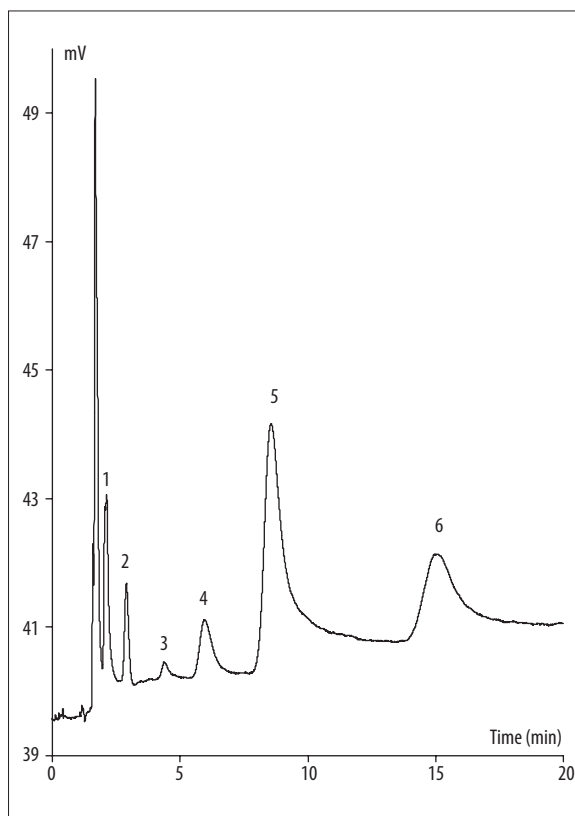
Pomiary w układzie izokratycznej RP-HPLC wykonano stosując kolumnę XTerra RP18 zawierającą chemicznie związaną fazę stacjonarną w postaci 3-(chlorodimetylosilano)-propylo-N-dodecylokarbaminianu unieruchomionego na sferycznym silikożelu oraz kolumnę Hypersil BDS C18ec zawierającą fazę oktadecylosilanową z wysokim stopniem wtórnej silanizacji. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina acetonitryl – 20 mM kwas fosforowy (25:75, o/o), pH 2,60, lub acetonitryl – 40 mM kwas fosforowy (52:48, v/v), pH^{*}=2,7. Objętościowa szybkość przepływu eluenta wynosiła w obu przypadkach 1 ml/min. Detekcję rozdzielonych związków prowadzono również z użyciem detektora UV przy długości fali 230 nm. Ryciny 4 i 5 przedstawiają odpowiednio, reprezentatywne przykłady sygnału detektora potencjometrycznego zarejestrowane podczas rozdzielania mieszanin badanych leków we wspomnianych wyżej układach HPLC.

Mimo to, że retencja badanych β -blokerów oraz leków β -adrenergicznych w układzie jonowymiennej HPLC jest stosunkowo długa (nawet do 58 min, jak w przypadku be-wantololu), to jego zastosowanie umożliwiło ocenę wpływu efektu tzw. rozcieńczenia w kolumnie [143] na wartość granicy detekcji poszczególnych elektrod ciekłomembranowych. Długa retencja w kolumnie zwiększa rozcieńczenie analitu [143], pomimo to dla wielu analizowanych leków β -adrenolitycznych oraz β -adrenergicznych granica detekcji zastosowanych elektrod ciekłomembranowych była kilkakrotnie niższa od granicy detekcji obserwowanej z użyciem detektora UV. Retencja badanych leków (por. ryc. 2) w obydwu izokratycznych układach HPLC zwiększała się wraz ze wzrostem ich hydrofobowości, jakkolwiek wyznaczone równania regresji w układzie $\log k$ – $\log P$ charakteryzowały się niskimi współczynnikami korelacji (<0,8) [17].

Charakterystyki badanych elektrod ciekłomembranowych dokonano, wyznaczając wartości ich granic detekcji (LOD) względem poszczególnych badanych 18 adrenolityków i adrenomimetyków. Wykorzystano chromatograficzną definicję tego pojęcia, według której, w danym układzie chromatograficznym granica detekcji równa się minimalnemu stężeniu molowemu (M) analitu w roztworze nastrzykiwanym do kolumny HPLC, a któremu odpowiada wartość zarejestrowanego sygnału S (wysokość pik) przekraczająca trzykrotnie wartość szumu własnego N linii podstawowej [143]. W przeprowadzonych badaniach wielkość szumu linii podstawowej wynosiła 8 μ V. Potencjał elektrody ciekłomembranowej zależy przede wszystkim od przebiegu procesów podziału analitu w układzie niemieszających się dwóch faz: eluenta i stałej membrany [69,109,110]. Obniżenie war-



Ryc. 4. Chromatogram mieszaniny leków β -adrenergicznych i β -blokerów zarejestrowany w warunkach izokratycznej RP-HPLC z detektorem potencjometrycznym typu „wall-jet” przy zastosowaniu elektrody PCV bez dodatku jonoforu makrocyklicznego (tzw. elektroda BOR, ϕ 3 mm/węgiel szklany). Kolejność pików: (1) klenbuterol; (2) karbuterol; (3) cimaterol, (4) celiprolol; (5) bisoprolol. Stężenie nastrzykiwanych leków: $2,0 \times 10^{-5}$ M. Kolumna: Hypersil BDS C18ec, $125 \times 4,6$ mm i.d. ($dp=3,5$ μ m). Faza ruchoma: acetonitryl – 40 mM kwas fosforowy (52:48, v/v), $pH^*=2,7$. Objętość nastrzyku: 10 μ l z użyciem zaworu dozującego typu Valco. Pompa HPLC typu SP8810 (Spectra Physics, San Jose, CA, USA); objętościowa szybkość przepływu fazy ruchomej: 0,5 ml/min

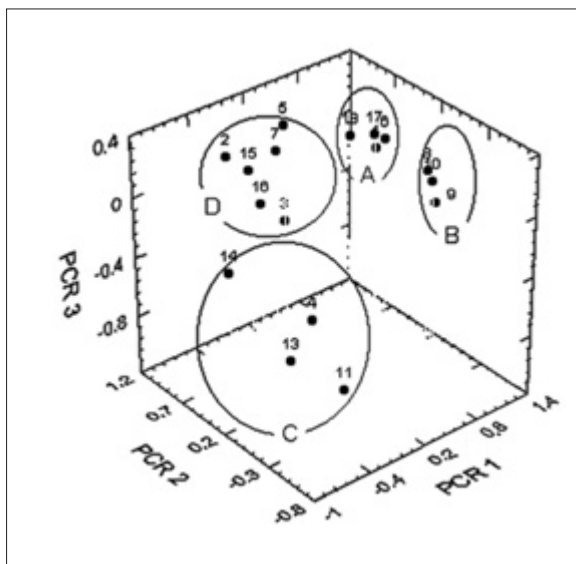


Ryc. 5. Chromatogram mieszaniny sześciu leków β -adrenergicznych zarejestrowany w warunkach izokratycznej jonowymiennej HPLC z detektorem potencjometrycznym typu „wall-jet” z zastosowaniem elektrody PCV zawierającej dibenzenowy eter koronowy (tzw. elektroda CRW, ϕ 3 mm/węgiel szklany). Kolejność pików (stężenie w próbce): (1) salbutamol ($2,70 \times 10^{-4}$ M); (2) terbutalina ($4,71 \times 10^{-4}$ M); (3) karbuterol ($5,58 \times 10^{-4}$ M); (4) cimaterol ($2,15 \times 10^{-4}$ M); (5) tulobuterol ($0,98 \times 10^{-4}$ M); (6) mabuterol ($1,44 \times 10^{-4}$ M). Objętość nastrzyku: 20 μ l z użyciem autosamplera. Kolumna: Alltech universal cation-exchange, $100 \times 4,6$ mm i.d. ($dp=7$ μ m) z prekolumną. Faza ruchoma: acetonitryl – 40 mM kwas fosforowy (15:85, v/v), $pH^*=2,35$. Pompa HPLC typu P200 (tsp, Riviera Beach, FL, USA). Objętościowa szybkość przepływu fazy ruchomej: 1,0 ml/min

tości potencjału chemicznego analitu w membranach wskutek jego oddziaływań supramolekularnych z obojętnym jonoforem powoduje wzrost szybkości dyfuzji wewnątrz membrany, a to zwiększa odpowiedź elektrody [69,87]. Istotnie, w przypadku bewantololu i bisoprololu – w porównaniu z wartościami granic detekcji wyznaczonych z użyciem elektrody ciekłomembranowej bez dodatku jonoforu makrocyklicznego (tzw. elektroda BOR) – obserwowano zwiększenie odpowiedzi elektrody po wprowadzeniu któregośkolwiek z trzech wymienionych uprzednio jonoforów makrocyklicznych. Natomiast zastosowanie jonoforu CDX prowadziło do polepszenia odpowiedzi elektrody w przypadku 14 badanych leków β -adrenolitycznych oraz β -adrenergicznych w warunkach jonowymiennej HPLC, przy czym niższe wartości granicy detekcji obserwowano w przypadku leków o wyższej hydrofobowości, np. klenbuterolu, propranololu czy bufuralolu. Wynik taki można wyjaśnić preferencją oddziaływań hydrofobowych podczas supramolekularnej inkluzji takich związków do wnęki cyklodekstrynowego jonoforu CDX [5, 42,43,60,67,81,92,122,141,148,150,151,165].

W przypadku elektrody zawierającej jonofor kaliksarenowy CLX lepszą odpowiedź w stosunku do elektrody BOR (bez jonoforu) obserwowano dla sześciu leków β -adrenolitycznych lub β -adrenergicznych, a tylko dla czterech takich leków, gdy zastosowano elektrodę z jonoforem polieterowym CRW. Taki rezultat może być wyjaśniony wzrostem roli procesu dehydratacji jonoforu – odpowiednio CLX lub CRW – i procesem tworzenia wiązań wodorowych podczas oddziaływań supramolekularnych w układzie jonofor-analit. Reasumując, z analitycznego punktu widzenia osiągnięcie najniższych granic detekcji skonstruowanego detektora potencjometrycznego dla leków β -adrenolitycznych i β -adrenergicznych jest możliwe w warunkach jonowymiennej HPLC po zastosowaniu elektrod ciekłomembranowych z jonoforem cyklodekstrynowym CDX.

Warto zauważyć, że elektroda ciekłomembranowa z jonoforem CDX pozwala na detekcję klenbuterolu w warun-



Ryc. 6. Wyodrębnione podzbiory (klaster) testowych leków β -adrenergicznych i β -adrenolitycznych utworzone w przestrzeni czynników głównych PCR1, PCR2, PCR3 obliczonych metodą PCA z użyciem danych potencjometrycznych odpowiadających granicy detekcji tych leków za pomocą czterech różnych elektrod ciekłomembranowych PCV w układzie jonowymiennej HPLC [46–48]. Oznaczenia podzbiorów (klasterów): A – niekardioselektywne β -adrenolityki; B – niekardioselektywne β -blokery; C – kardioselektywne β -blokery; D – selektywne β_2 -adrenomimetyki i niekardioselektywne β_1 -adrenolityki oraz kardioselektywne β -blokery. Numery punktów odpowiadają numeracji badanych leków na ryc. 1

kach RP-HPLC z kolumną chromatograficzną o zmniejszonej średnicy (narrow-bore) z granicą oznaczalności LOQ (dwukrotna wartość granicy detekcji LOD) równą 0,80 ng/ml, co odpowiada $2,9 \times 10^{-9}$ M i błędem oznaczenia poniżej 7% [20,22]. Daje to możliwość aplikacji takiego detektora potencjometrycznego do oznaczania pozostałości nielegalnie stosowanego klenbuterolu w osoczu młodych cieląt. Według propozycji Dave'a i wsp. [34] stężenie klenbuterolu w osoczu cieląt przekraczające 1,63 ng/ml może być wskaźnikiem stosowania tego leku jako niedozwolonego środka anabolicznego w hodowli tych zwierząt. Dla porównania wyspecjalizowane testy immunoenzymatyczne ELISA pozwalają na oznaczanie klenbuterolu w osoczu z granicą oznaczalności 0,12 ng/ml [34], optyczne immunobiosensory – 0,12 ng/ml [57], metoda HPLC z TOF-kwadropolową spektrometrią masową – 0,27 ng/ml [46], a metoda CE z podwójnie kwadropolową spektrometrią masową – 12,5 pg/ml [154].

6. ZASTOSOWANIE WIELOWYMIAROWEJ ANALIZY STATYSTYCZNEJ

Analiza czynników głównych (PCA) jest jedną z najczęściej stosowanych multiwariacyjnych metod chemometrycznych umożliwiających wyodrębnienie systematycznej informacji z dużej ilości zgromadzonych danych eksperymentalnych, ich macierzy korelacyjnej lub macierzy kowariancji [11,12,13,15,21,23,114]. Obliczone tą metodą składniki główne (principal components – PC) zawierają większość rozproszonej w pierwotnych danych informacji w taki spo-

sób, że jest możliwe wyjaśnienie całości obserwowanej zmienności (wariancji) tych danych. Czynniki główne PC (dwa lub trzy) mogą stanowić podstawę nowego rodzaju skali przedstawiającej podobieństwa i różnice, w tym fizykochemiczne, wszystkich obiektów objętych eksperymentem. Ponadto, mogą one być pomocne w określeniu podstawowych oddziaływań supramolekularnych wpływających na właściwości omawianych elektrod. Z tego względu metodą PCA dokonano analizy uzyskanych danych potencjometrycznych, tj. wszystkich wartości LOD wyznaczonych dla poszczególnych 18 leków β -adrenolitycznych oraz β -adrenergicznych z użyciem czterech elektrod ciekłomembranowych w tym samym układzie jonowymiennej HPLC. Wyniki analizy PCA przedstawiono na ryc. 6. Wyodrębnione cztery podzbiory (klaster) odpowiadają w przybliżeniu udziałom zastosowanych jonoforów makrocyclicznych w obniżeniu granicy detekcji elektrod ciekłomembranowych w porównaniu z granicą detekcji wykazywaną przez elektrodę BOR, nieposiadającą takiego jonoforu w swojej membranie. Na przykład zbiory A i B grupują leki β -adrenergiczne i β -adrenolityczne o najwyższej hydrofobowości jak klenbuterol (1), karazolol (18), tertatolol (17), bufuralol (6), alprenolol (8) i oksprenolol (9), a jednocześnie wykazujące najniższe wartości granicy detekcji w zakresie od $7,7 \times 10^{-7}$ do $2,2 \times 10^{-8}$ M przy zastosowaniu elektrody CDX [17,18,19].

Z kolei w zbiorze D zostały zgrupowane leki o dużej hydrofilności, takie jak karbuterol (5), cimaterol (3), nadolol (16) i celiprolol (12), dla których granice detekcji z użyciem elektrody CDX są dużo mniejsze i wynoszą od $7,7 \times 10^{-5}$ do $4,8 \times 10^{-6}$ M. Taki wynik analizy PCA wskazuje, że obliczonym czynnikiem głównym można nadać pewien określony sens fizyczny. Czynnikiem pierwszym PCR1 obejmujący 55% wariancji danych potencjometrycznych może być związany z wpływem hydrofobowości analizowanych leków na proces transportu membranowego i potencjał elektrod ciekłomembranowych. Drugi czynnik PCR2, obejmujący 30% wariancji, odzwierciedla wpływ wielkości powierzchni polarnej TPSA [40] badanych leków na proces generacji potencjałów omawianych elektrod. Natomiast czynnik trzeci PCR3, obejmujący 11% wariancji analizowanych danych, charakteryzuje wkład procesów dehydratacji (lub desolvatacji) cząsteczek badanych leków podczas ich wnikańia do membrany i tworzenia kompleksów inkluzyjnych z cząsteczkami jonoforów makrocyclicznych. Biorąc pod uwagę procent wariancji zgromadzonych danych, przypadający na każdy z wymienionych trzech czynników głównych, można wnioskować, że oddziaływania hydrofobowe, tworzenie wiązań wodorowych i dehydratacja są podstawowymi oddziaływaniami molekularnymi, które wpływają na przebieg transportu membranowego i proces powstawania potencjału elektrod.

7. ZALEŻNOŚCI MIĘDZY STRUKTURA A AKTYWNOŚCIĄ FARMAKOLOGICZNA

Ilościowe zależności między aktywnością farmakologiczną a parametrami struktury cząsteczkowej związków chemicznych (quantitative structure-activity relationships – QSAR) stanowią podstawę projektowania leków i przewidywania toksyczności ksenobiotyków [127]. Wzrasta zainteresowanie wykorzystaniem metodyki QSAR do przewidywania właściwości permeacyjnych różnych grup leków i ich kandy-

datów w błonach biologicznych ponieważ właściwości te modyfikują w znacznym stopniu farmakokinetyczne procesy wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu i eliminacji (absorption, distribution, metabolism, elimination – ADME), jakim podlegają cząsteczki leku w żywym organizmie [1]. Według Clarka [32] tylko jeden procent tzw. „leków-kandydatów”, poprawnie zaprojektowanych z punktu widzenia efektywności oddziaływań farmakoforowych, wykazuje odpowiednie właściwości permeacyjne przez błonę fosfolipidową komórek tkankowych. Dlatego problem szybkiej ewaluacji takich właściwości, dla dużych bibliotek nowo syntetyzowanych związków o potencjalnej aktywności farmakologicznej, stanowi istotne zagadnienie we współczesnych wysoko wydajnych procedurach skriningowych (high throughput screening – HTS) [32,144]. Jako układy modelowe w takich badaniach wykorzystuje się często hodowle tkankowe [32], kultury komórkowe [121], zwierzęta laboratoryjne [117], a także sztuczne układy membranowe [166].

Fenyloaminoalkoholowe leki β -adrenergiczne w procesach transportu biomembranowego zachowują się na ogół zgodnie z dobrze poznaną regułą mówiącą o tym, że procesy farmakokinetyczne, jakim podlega cząsteczka leku są przede wszystkim zależne od jej hydrofobowości [132]. Stwierdzono, że takie wielkości jak wielkość depolaryzacji błony fosfolipidowej w komórkach naczyń tętniczych [136], wartość współczynnika ekstrakcji do hepatocytów [62] czy wzrost działania miejscowo znieczulającego [136] zależą od hydrofobowości leków β -adrenergicznych. Wyznaczono wiele korelacji o dużej istotności statystycznej między efektem stabilizacji membranowej wywołanym przez β -adrenolityki a wartościami ich współczynnika podziału międzyfazowego i stałymi dysocjacji kwasowej pK_a [49]. Ostatnio stwierdzono, że istnieje sigmoidalna zależność między wielkością powierzchni polarnej leków β -adrenergicznych i β -adrenolitycznych a ich stopniem permeacji w błonach komórkowych modelowych roztworów komórek Caco-2 [32] lub TR146 [166].

Można przyjąć założenie, że zjawisko powstawania potencjału elektrycznego elektrody ciekłomembranowej jest odzwierciedleniem zmian energii swobodnej analitu podczas jego kontaktu z membraną, wnikania do membrany i transportu membranowego [69,109]. Membrana elektrody jest zatem swoistym przetwornikiem energii swobodnej, za pomocą którego różnice potencjałów chemicznych analitów, powodowane przez różnice w ich strukturze cząsteczkowej, zostają ilościowo przekształcone w różnice potencjału elektrycznego. Stężenie analitu odpowiadające granicy detekcji takiej elektrody może być potraktowane jako wielkość charakteryzująca zmiany jego energii swobodnej w procesach membranowych w elektrodzie. Umożliwia to zatem zastosowanie procedury QSAR do badania wpływu struktury cząsteczkowej leków β -adrenolitycznych oraz β -adrenergicznych na uzyskiwaną wykrywalność detektora potencjometrycznego zawierającego elektrodę ciekłomembranową z obojętnym jonoforem makrocyklicznym. W tym celu wartości logarytmów granic detekcji ($\log LOD$) wymienionych 18 leków β -adrenolitycznych oraz β -adrenergicznych, wyznaczonych z użyciem poszczególnych elektrod w warunkach jonowymiennej HPLC, zostały skorelowane z wartościami 14 deskryptorów molekularnych opisujących właściwości strukturalne i fizykochemiczne tych leków. Dobrano taki zestaw deskryptorów, który jest zbliżony do

najczęściej spotykanych w badaniach procesów wchłaniania jelitowego i transportu leków przez barierę krew-mózg [1,32]. Analiza interkorelacji we wspomnianej tablicy deskryptorów wykazała [17,18,19], że jedynymi wzajemnie skorelowanymi wielkościami ($r=0,99$) są polaryzowalność (POL) i refrakcja molowa (R), a częściowo skorelowanymi parametrami ($r=0,88$) są logarytm współczynnika podziału w układzie n -oktanol-woda ($\log P$) i logarytm współczynnika podziału międzyfazowego ($\log D$).

Dla elektrody ciekłomembranowej BOR, niezawierającej obojętnego jonoforu makrocyklicznego, uzyskano następujące dwuparametrowe równanie regresji:

$$\log LOD = -6,4594 - 0,6657 \log P + 0,0703 POL \quad (1)$$

$$n=18; r=0,9023; r^2=0,8142; S.E.=0,4207; F=32,87$$

Zależność ta wskazuje, że obniżenia granicy detekcji leków β -adrenolitycznych oraz β -adrenergicznych z użyciem tej elektrody można spodziewać się przede wszystkim wtedy, gdy wzrasta ich hydrofobowość ($\log P$). Natomiast dla leków hydrofilowych zwiększenie granicy detekcji można uzyskać, gdy ich cząsteczki wykazują dużą polaryzowalność (POL). Równanie to można także interpretować w ten sposób, iż przede wszystkim procesy podziałowe i słabe oddziaływania jonowe są czynnikami wpływającymi na detekcję kationowych β -blokerów i leków β -adrenergicznych. Wpływ subtelnych czynników elektrostatycznych, związanych z alokacją intermolekularnego ładunku w cząsteczkach wspomnianych leków, na przebieg procesów podziału międzyfazowego w układzie woda-niepolarny rozpuszczalnik, jest ostatnio sugerowany także na podstawie wyników badań voltamperometrycznych i modelowania molekularnego [28,85].

Podobne równanie regresji uzyskano dla elektrody ciekłomembranowej zawierającej jonofor cyklodekstrynowy CDX:

$$\log LOD = -7,0190 - 0,7967 \log P + 0,0815 POL \quad (2)$$

$$n=18; r=0,9249; r^2=0,8555; S.E.=0,4331; F=44,42$$

W porównaniu z poprzednią zależnością, wyższa wartość współczynnika przy ($\log P$) wskazuje, iż znaczenie oddziaływań hydrofobowych podczas detekcji β -blokerów oraz leków β -adrenergicznych za pomocą elektrody CDX istotnie się zwiększa. Wyznaczone granice detekcji w przypadku tej elektrody były najniższe dla leków o najwyższej hydrofobowości ($\log P > 2,5$), takich jak klenbuterol, propranolol, bufuralol, tertatolol i karazolol. Przyczyną zwiększonej wykrywalności elektrody CDX może być tworzenie się uporządkowanej monowarstwy molekuł oktylowanej α -cyklodekstryny, czyli jonoforu, w pobliżu powierzchni międzyfazowej eluent-membrana PCV oraz w samej membranie [67,80]. Wyjaśnienie takie jest o tyle prawdopodobne, że wewnątrz membrany PCV formują się klastery i mikrokrople wody o średnicy dochodzącej do około 16 nm [89]. Hydrofobowe oddziaływania inkluzyjne takiej uporządkowanej monowarstwy cząsteczek cyklodekstryn obniżają rezystywność powierzchni międzyfazowej, co prowadzi do zwiększenia powierzchniowej gęstości ładunku elektrostatycznego [67].

Dla elektrody ciekłomembranowej zawierającej jonofor polieterowy CRW, uzyskano trójparametrowe równanie regresji:

$$\log LOD = -5,7398 - 0,2597 \log D - 0,0262 H_c + 0,1558 \mu \quad (3)$$

$$n=18; r=0,8524; r^2=0,7265; S.E.=0,4176; F=12,40$$

Zależność ta wskazuje, że proces dehydratacji (parametr H_c charakteryzujący energię hydratacji cząsteczek badanych leków) oraz oddziaływania dipolowe (moment dipolowy μ) są prawdopodobnie dominującymi czynnikami kontrolującymi procesy podziału i procesy supramolekularnej asocjacji w układzie jonofor-analit w tej elektrodzie. W przeciwieństwie do cyklodekstryn, wnęka jonoforu polieterowego jest silnie endo-hydrofilowa i endo-polarofilowa [135,159], co powoduje, że jest łatwo wypełniana przez cząsteczki wody. Cząsteczki hydrofilowych leków β -adrenergicznych lub β -adrenolitycznych zawierających większą liczbę podstawników protonodonorowych lub protonoakceptorowych (salbutamol, bisoprolol) tworzą prawdopodobnie bardziej trwałe asocjaty z cząsteczkami jonoforu polieterowego CRW, dzięki czemu obserwowane granice detekcji dla takich związków są niższe niż w przypadku elektrody BOR bez dodatku jonoforu. Powstawanie asocjatyw o stechiometrii 1:2 – stabilizowanych przez sieć liniowych i bifurkacyjnych wiązań wodorowych – między jonoforami polieterowymi i różnymi kationami amoniowymi było obserwowane przez Rudigera i wsp. [135]. Można przypuszczać, że podobne oddziaływania supramolekularne zachodzą z udziałem badanych leków β -adrenolitycznych oraz β -adrenergicznych, a w szczególności z ich fragmentem etanoloaminowym lub oksypropanoloaminowym.

Dla elektrody ciekłomembranowej zawierającej jonofor kaliksarenowy CLX, uzyskano następujące czteroparametrowe równanie regresji:

$$\log LOD = -7,5563 - 0,1415 \log P + 0,1211 \mu - 0,4943 HBD + 0,2039 HBA \quad (4)$$

$$n=18; r=0,9081; r^2=0,8247; S.E.=0,4540; F=15,29$$

Obecność w tym równaniu parametrów *HBD* i *HBA* (odpowiednio liczba podstawników protonodonorowych oraz protonoakceptorowych w cząsteczce badanego leku), a także momentu dipolowego μ , nie jest zaskakująca, ponieważ cząsteczki jonoforu CLX mają zwiększoną liczbę grup estrowych mogących stanowić centra protonowoakceptorowe w procesie tworzenia wiązań wodorowych z grupami hydroksylowymi i aminowymi cząsteczek badanych β -blokerów lub β -adrenomimetyków. Prawdopodobnie ułatwia to powstawanie ich *egzo*-asocjatyw (asocjatyw zewnętrznych) z cząsteczkami jonoforu CLX. Możliwe jest jednak także powstawanie inkluzyjnych *endo*-asocjatyw (np. w przypadku alprenololu i oksprenololu), w których następuje wypełnienie wnęki kaliksarenu przez podstawnik fenylowy zawarty w cząsteczce leku β -adrenolitycznego. Zwiększenie symetrii takich supramolekularnych oddziaływań inkluzyjnych, jak w przypadku bewantololu lub tolamololu, prowadzi do zwiększenia trwałości asocjatu jonofor-analit i do obniżenia granicy detekcji elektrody dla tych leków [17,18,19,21]. Duży podstawnik naftalenowy w cząsteczce propanololu nie pasuje do wnęki jonoforu

CLX, dlatego nie obserwujemy dla tego związku polepszenia detekcji elektrody. Natomiast chlorofobowy charakter wnęki kaliksarenu [156] mógłby stanowić wyjaśnienie braku polepszenia wykrywalności elektrody CLX w stosunku do klenbuterolu, zawierającego dwa atomy chloru w pierścieniu fenylowym [18].

8. IMPLIKACJE FARMAKOLOGICZNE

Uzyskany wynik analizy metodą PCA (por. ryc. 6) zebranych danych potencjometrycznych [17,18,19], w tym przypadku wartości granic detekcji poszczególnych elektrod ciekłomembranowych, w warunkach jonowymiennej HPLC, może być także wykorzystany do opracowania klasyfikacji farmakologicznej leków β -adrenolitycznych oraz β -adrenergicznych. W zbiorze *A* zgrupowane zostały leki β -adrenolityczne o najwyższej hydrofobowości: bufuralol (**6**), tertatolol (**17**) i karazolol (**18**), które zaliczane są do niekardioselektywnych antagonistów (blokerów) receptorów β_1 -adrenergicznych. W tym samym klasterze znajduje się także wysokohydrofobowy klenbuterol (**1**), zaliczany co prawda do agonistów receptorów β_2 -adrenergicznych, ale wykazujący także pewną aktywność antagonistyczną wobec innych podtypów funkcjonalnych receptora adrenergicznego [14,90]. Ponadto w zbiorze *A* zostały zgrupowane leki β -adrenolityczne mogące znaleźć zastosowanie w farmakoterapii otyłości czyli tertatolol (**17**) i karazolol (**18**), będące jednakże agonistami receptora β_3 -adrenergicznego, którego stymulacja odgrywa decydującą rolę w zwiększaniu efektywności procesów termogenezy i lipolizy [94,100,125]. Klenbuterol (**1**) pobudzający receptory β_2 -adrenergiczne wywołuje podobny efekt w powiązaniu z repartycją (przemieszczeniem) tkanki tłuszczowej i przyrostem masy włókien mięśniowych [146].

W podzbiorze *B* zostały umieszczone alprenolol (**8**), oksprenolol (**9**) i p-oksprenolol (**10**) mające podstawnik alilowy i zaliczane do niekardioselektywnych antagonistów (blokerów) receptora β_1 -adrenergicznego. Leki te wykazują tzw. wewnętrzną aktywność sympatykomimetyczną, dzięki czemu w mniejszym stopniu niż inne β -blokery upośledzają kurczliwość mięśnia sercowego [38]. Podzbiory *B* i *A* są dobrze oddzielone w przestrzeni czynników głównych od zbioru *C* zawierającego bisoprolol (**11**), bewantolol (**13**) i tolamolol (**14**) zaliczanych do kardioselektywnych antagonistów (blokerów) receptora β_1 -adrenergicznego. W tym samym zbiorze *C* znalazł się także salbutamol (**4**) nominalnie zaliczany do agonistów receptora β_2 -adrenergicznego, jednak wiadomo, iż enancjomer (*S*)-salbutamolu wykazuje częściowe właściwości antagonistyczne w stosunku do receptorów β_1 -adrenergicznych [137].

Do zbioru *D* zostały zaklasyfikowane przede wszystkim leki o dużej hydrofilności, takie jak mabuterol (**2**), cimaterol (**3**) i karbuterol (**5**), czyli selektywni agonści receptora β_2 -adrenergicznego, oraz propanolol (**15**) i nadolol (**16**), niekardioselektywne blokery receptora β_1 -adrenergicznego, a także praktolol (**7**) i celiprolol (**12**) będące kardioselektywnymi blokerami receptorów β_2 -adrenergicznych. Mimo pewnej niejednoznaczności, zaliczenie wymienionych leków do wspólnego zbioru *D* nie jest jednak pozbawiona podstaw. (*S*)-Mabuterol i (*S*)-celiprolol w dużych dawkach działają antagonistycznie względem receptora β -adrenergicznego [133]. Także praktolol i celiprolol

mogą wywierać *in vivo* efekt zarówno agonistyczny jak i antagonistyczny w stosunku do receptorów β_1 -adrenerygicznych umiejscowionych w sercu oraz receptorów β_2 -adrenerygicznych w tętnicach szczurów [6].

Reasumując, analiza PCA danych zebranych przy zastosowaniu czterech elektrod ciekłomembranowych z obojętnymi jonoforami o zróżnicowanych właściwościach inkluzyjnych może stanowić dobrą podstawę do rozróżnienia kardioselektywnych agonistów receptora β_1 -adrenerygicznego od niekardioselektywnych β -blokerów. Ponadto, umożliwia rozróżnienie kardioselektywnych blokerów receptora β_1 od agonistów receptora β_3 - i β_2 -adrenerygicznego. Pozycja pseudohybrydowego leku bewantololu (**13**) w zbiorze *C* sugeruje, że możliwe jest odróżnienie – na podstawie omawianej analizy PCA – także agonistów receptorów α -adrenerygicznych i agonistów receptorów β_3 -adrenerygicznych oraz agonistów receptorów α -adrenerygicznych i agonistów receptora β_2 -adrenerygicznego. Omawiana metoda nie prowadzi do odróżnienia niekardioselektywnych β -blokerów od agonistów receptora β_2 -adrenerygicznego.

9. PODSUMOWANIE

W przeprowadzonych badaniach własnych [17–22,109] wykazano, że inkluzyjne oddziaływania supramolekularne typu „gość-gospodarz” (host-guest) mogą być wykorzystane w detekcji potencjometrycznej leków blokujących i leków pobudzających receptory α - i/lub β -adrenerygiczne. Opracowany sposób detekcji potencjometrycznej tej grupy leków w układach HPLC polega na zastosowaniu tzw. elektrod z „ciekłą membraną” (ECM). W tym przypadku do membrany polimerowej wykonanej z wysoko molekularnego polichlorku winylu (PCV), plastifikatora i hydrofobowej soli boru, wprowadzono niewielką ilość (3–30 μ M) jednego ze związków makrocyclicznych, takich jak heksaoctanowy ester kaliksarenu, dibenzenowy eter koronowy lub oktylowana α -cyklodekstryna. Wartości potencjałów

odpowiadające wykrywalności 18 badanych leków, zmierzone w układzie jonowymiennej HPLC z użyciem tak skonstruowanych elektrod ECM, zostały użyte jako macryca sygnałowa umożliwiająca klasyfikację farmakologiczną tych leków. W tym celu zebrane dane poddano wielowymiarowej analizie statystycznej metodą analizy czynników głównych (PCA). Wynikiem tej analizy jest pogrupowanie leków w odrębne podzbiory, co pozwala na odróżnienie kardioselektywnych i niekardioselektywnych leków adrenolitycznych blokujących receptory β_1 -adrenerygiczne. Metoda ta umożliwia odróżnianie leków pobudzających receptory β_3 - i β_2 -adrenerygiczne od kardioselektywnych leków blokujących receptory β_1 -adrenerygiczne. Wobec tego, analiza chemometryczna danych potencjometrycznych wyznaczonych w dynamicznych warunkach HPLC, może być metodą klasyfikacji leków β -adrenolitycznych oraz β -adrenerygicznych komplementarną, w stosunku do proponowanej wcześniej metody PCA, wykorzystującej dane retencyjne tych leków zarejestrowane w ortogonalnym zestawie kilku układów HPLC [70,72,114]. Procedury tego rodzaju mają szczególne znaczenie dla rozwoju nowoczesnych metod skринingowych wspomagających tradycyjne metody projektowania nowych leków [14]. Istotnym osiągnięciem omawianych badań własnych jest wyznaczenie równań korelacyjnych wiążących granicę detekcji poszczególnych elektrod membranowych zaimplementowanych jonoforem makrocyclicznym, z deskryptorami molekularnymi 18 badanych β -blokerów i leków β -adrenerygicznych. Założono, że energia swobodna analitu zmienia się liniowo w procesie powstawania potencjału elektrod ciekłomembranowych (ECM). Równania korelacyjne mogą mieć znaczenie dla konstrukcji elektrod ECM, gdyż umożliwiają dokonanie racjonalnego doboru jonoforu makrocyclicznego w zależności od typu oznaczanych leków β -adrenoreceptorowych. Zapewni to uzyskanie wysokiej jakości takich elektrod, szczególnie przydatnych do oznaczania śladowych ilości leków hydrofobowych (klenbuterolu, bufuralolu, propranololu), a nawet ich pojedynczych cząsteczek.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Abraham M.H., Zhao Y.H., Le J., Hersey A., Luscombe C.N., Reynolds D.P., Beck G., Sherborne B., Cooper I.: On the mechanism of human intestinal absorption. *Eur. J. Med. Chem.*, 2002; 37: 595–605
- [2] Alexander P.W., Głód B.K., Haddad P.R.: Mixed potential response at metallic electrodes in potentiometric detection for ion chromatography. *J. Chromatogr.*, 1992; 589: 201–207
- [3] Alexander P.W., Haddad P.R., Low G.K.C., Maitra C.: Application of a copper tubular electrode as a potentiometric detector in the determination of amino acids by high-performance liquid chromatograph. *J. Chromatogr.*, 1981; 209: 29–39
- [4] Alexander P.W., Haddad P.R., Trojanowicz M.: Potentiometric detection in ion chromatography using metallic copper indicator electrode. *Chromatographia*, 1985; 20: 179–184
- [5] Altria K.D., Harden R.C., Hart M., Hevizi J., Hailey P.A., Makwana J.V., Portsmouth M.J.: Inter-company cross-validation exercise on capillary electrophoresis: I. Chiral analysis of clenbuterol. *J. Chromatogr.*, 1993; 641: 147–156
- [6] Alvarez-Guerra M., Alda O., Garay R.P.: Celiprolol: agonist and antagonist effects at cardiac beta 1- and vascular beta 2-adrenoceptors determined under *in vivo* conditions in the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 1997; 355: 689–698
- [7] Amman D., Huser M., Krautler B., Rusterholz B., Schulthess P., Lindemann B., Halderr E., Simon W.: Anion selectivity of metalloporphyrins in membrane. *Helv. Chim. Acta*, 1986; 69: 849–852
- [8] Antonisse M.M.G., Lugtenberg R.J.W., Egberink R.J.M., Engbersen J.F.J., Reinhoudt D.N.: Durable nitrate-selective chemically modified field effect transistors based on new polysiloxane membranes. *Anal. Chim. Acta*, 1996; 332: 123–129
- [9] Bakker E., Bühlmann P., Pretsch E.: The phase-boundary potential model. *Talanta*, 2004; 62: 843–860
- [10] Bakker E., Pretsch E.: The new wave of ion-selective. *Anal. Chem.*, 2002; 74: 420A–426A
- [11] Bazylak G.: Chemometric characterization of alkanolamines using molecular descriptors and planar chromatography data. *J. Planar Chromatogr. – Modern TLC*, 1994; 7: 202–210
- [12] Bazylak G.: Chemometrically aided description of iminodiethanols retention on hydrocarbonaceous silica and cellulose layers. *J. Planar Chromatogr. – Modern TLC*, 1994; 7: 428–434
- [13] Bazylak G.: Differentiation of alkanolamines properties by multivariate analysis of database founded by their molecular parameters and chromatographic measurements results. *Chem. Anal. (Warsaw)*, 1994; 39: 295–308
- [14] Bazylak G.: Pharmacogenomic aspects of adrenergic receptors polymorphism in ethiology and therapy of some cardiovascular diseases. *Ann. Acad. Med. Bydostiensis*, 2004; 18: 61–71
- [15] Bazylak G., Aboul-Enein H.Y.: Chemometric account for retention of lysosomotropic alkanolamines in planar chromatography systems. *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.*, 1997; 20: 2327–2355

- [16] Bazylak G., Nagels L.J.: Potentiometric detection of N,N'-diethylaminoethanol and lysosomotropic aminoalcohols in cation exchange high-performance liquid chromatography systems. *Anal. Chim. Acta*, 2002; 472: 11–26
- [17] Bazylak G., Nagels L.J.: Integrated acquisition of analytical and biopharmaceutical screening data for beta-adrenergic drugs employing diversified macrocycle supported potentiometric detection in HPLC systems. *Curr. Med. Chem.*, 2002; 9: 1547–1566
- [18] Bazylak G., Nagels L.J.: Potentiometric detection of exogenic beta-adrenergic substances in liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2002; 973: 85–96
- [19] Bazylak G., Nagels L.J.: A novel potentiometric approach for detection of beta-adrenergics and beta-adrenolytics in high-performance liquid chromatography. *Farmaco*, 2003; 58: 591–603
- [20] Bazylak G., Nagels L.J.: Simultaneous high-throughput determination of clenbuterol, ambroxol and bromhexine in pharmaceutical formulations by HPLC with potentiometric detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2003; 32: 887–903
- [21] Bazylak G., Nagels L.J., Geise H.J.: Potentiometric quasi-array employing calixarene derivatives for the high-throughput similarity/diversity screening of beta-adrenergic and beta-blocking chiral drugs by HPLC. *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, 2004; 7: 345–359
- [22] Bazylak G., Nagels L.J., Monge M.E.: Macrocycle versus podant-type neutral ionophore in potentiometric detection of mucolytic agents following separation by various HPLC modes. *Chromatographia*, 2003; 57: 757–765
- [23] Bazylak G., Rosiak A., Shi C.Y.: Systematic analysis of glucoiridoids from *Penstemon serrulatus* Menz. by high-performance liquid chromatography with pre-column solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A*, 1996; 725: 177–188
- [24] Borchard U.: Pharmacological properties of beta-adrenoceptor blocking drugs. *J. Clin. Bas. Cardiol.*, 1998; 1: 5–9
- [25] Brindle R., Albert K., Harris S.J., Troltsch C., Horne E., Glennon J.D.: Silica-bonded calixarenes in chromatography I. Synthesis and characterization by solid-state NMR spectroscopy. *J. Chromatogr. A*, 1996; 731: 41–46
- [26] Buchberger W.: Electrochemical detectors – tailor-made techniques for liquid chromatography and capillary electrophoresis? *Anal. Bioanal. Chem.*, 1996; 354: 797–802
- [27] Buchberger W., Haddad P.R., Alexander P.W.: Separation of metal complexes of ethylenediaminetetraacetic acid in environmental water samples by ion chromatography with UV and potentiometric detection. *J. Chromatogr.*, 1991; 558: 181–186
- [28] Caron G., Steyaert G., Pagliara A., Reymond F., Crivori P., Gaillard P., Carrupt P.-A., Avdeef A., Comer J., Box K.J., Girault H.H., Testa B.: Structure-lipophilicity relationships of neutral and protonated β -blockers. Part I. Intra- and intermolecular effects in isotropic solvent system. *Helv. Chim. Acta*, 1999; 82: 1211–1222
- [29] Chen Z.-L., Alexander P.W.: Potentiometric detection of aliphatic amines by flow injection analysis and ion-interaction chromatography with a metallic copper electrode. *J. Chromatogr. A*, 1997; 758: 227–233
- [30] Chen Z.-L., Alexander P.W., Haddad P.R.: Liquid chromatography of carboxylic acids using potentiometric detection with a tungsten oxide electrode. *Anal. Chim. Acta* 1997; 338: 41–49
- [31] Chen Z.-L., Hibbert D.B.: Simultaneous amperometric and potentiometric detection of sugars, polyols and carboxylic acids in flow systems using copper wire electrodes. *J. Chromatogr. A*, 1997; 766: 27–33
- [32] Clark D.E. Prediction of intestinal absorption and blood-brain barrier penetration by computational methods. *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, 2001; 4: 477–496
- [33] Courtheyn D., Le Bizet B., Brambilla G., De Brabander H.F., Cobbaert E., Van de Wiele J., De Wasch K.: Recent developments in the use and abuse of growth promoters. *Anal. Chim. Acta*, 2002; 473: 71–82
- [34] Dave M., Sauer M.J., Fallon R.J.: Clenbuterol plasma pharmacokinetics in cattle. *Analyst* 1998; 123: 2697–2699
- [35] De Backer B.L., Nagels L.J.: Potentiometric detection for capillary electrophoresis: determination of organic acids. *Anal. Chem.*, 1996; 68: 4441–4445
- [36] Dei L., Casnati A., Lo-Ostro P., Pochini A., Ungaro R., Baglioni P.: Complexation properties of p-tert-butylcalix[6]arene hexamide in monolayers at the water-air interface. *Langmuir*, 1996; 12: 1589–1593
- [37] Drouin H.R.: A neutral carrier-based liquid membrane microelectrode for divalent putrescine cations. *Eur. Biophys. J.*, 1999; 28: 600–604
- [38] Drzewoski J. (red.): Wybrane zagadnienia z farmakologii klinicznej i farmakoterapii, FASZ, Łódź 1994, s. 105, 117, 157
- [39] Egashira S.: Gas chromatography with a vapour mobile phase at the finite concentration of sorbate: I. The sorption effect. *J. Chromatogr.*, 1980; 202: 37–45
- [40] Ertl P., Rohde B., Selzer P.: Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. *J. Med. Chem.*, 2000; 43: 3714–3717
- [41] Frenzel W., Rauterberg-Wulff A., Schepers D.: Serial potentiometric and conductometric detection in fast non-suppressed ion chromatography applied to the analysis of filter collected airborne particulates. *Anal. Bioanal. Chem.*, 1995; 353: 123–127
- [42] Gafni A., Cohen Y., Katakly R., Palmer S., Parker D.: Enantiomer discrimination using lipophilic cyclodextrins studied by electrode response, pulsed-gradient spin echo (PGSE) NMR and relaxation rate measurements. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1998; 19–23
- [43] Gausepohl C., Blaschke G.: Stereoselective determination of clenbuterol in human urine by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 1998; 713: 443–446
- [44] Glód B.K., Alexander P.W., Haddad P.R., Chen Z.-L.: Potentiometric detection using a metallic copper electrode in reversed-phase and ion-exclusion chromatography with eluents containing ion-interaction reagents. *J. Chromatogr. A*, 1995; 699: 31–37
- [45] Glód B.K., Haddad P.R., Alexander P.W.: Potentiometric detection of carboxylic acids and inorganic anions in ion-exclusion chromatography using camphorsulphonic acid as eluent. *J. Chromatogr.*, 1992; 589: 209–214
- [46] Guan F., Uboh C.E., Soma L.R., Luo Y., Li R., Birks E.K., Teleis D., Rudy J.A., Tsang D.S.: Quantification of clenbuterol in equine plasma, urine and tissue by liquid chromatography coupled on-line with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2002; 16: 1642–1651
- [47] Haasnoot W., Kemmers-Voncken A., Samson D.: Immunofiltration as sample cleanup for the immunochemical detection of β -agonists in urine. *Analyst*, 2002; 127: 87–92
- [48] Haber C., Silvestrim I., Roosli S., Simon W: Potentiometric detector for capillary electrophoresis. *Chimia*, 1991; 45: 117–121
- [49] Hachisu M., Koeda T.: Study on the pharmacological actions of beta-adrenoceptor blockers with reference to their physico-chemical properties. *J. Pharmacobiodyn.*, 1980; 3: 183–190
- [50] Haddad P.R., Alexander P.W.: Potentiometric detection in ion chromatography. W: *Advances in Ion Chromatography*, Vol. 2, red. P. Jandik, R.M. Cassidy. Vol. 2. Century International, Boston, MA, USA, 1990, s. 91
- [51] Haddad P.R., Alexander P.W., Croft M.Y., Hilton D.F.: Approaches to the liquid chromatographic determination of carboxylic acids using potentiometric detection with a metallic copper indicator electrode. *Chromatographia*, 1987; 24: 487–491
- [52] Haddad P.R., Alexander P.W., Trojanowicz M.: High-performance liquid chromatography of organic acids with potentiometric detection using a metallic copper electrode. *J. Chromatogr.*, 1984; 315: 261–270
- [53] Haddad P.R., Alexander P.W., Trojanowicz M.: Application of indirect potentiometric detection with a metallic copper electrode to ion chromatography of transition metal ions. *J. Chromatogr.*, 1985; 324: 319–332
- [54] Haddad P.R., Alexander P.W., Trojanowicz M.: Ion chromatography of inorganic anions with potentiometric detection using a metallic copper electrode. *J. Chromatogr.*, 1985; 321: 363–374
- [55] Haddad P.R., Alexander P.W., Trojanowicz M.: The application of a metallic copper electrode to potentiometric detection. *J. Liq. Chromatogr.*, 1986; 9: 777–789
- [56] Han S.H., Lee K.S., Cha G.S.: Potentiometric detection in ion chromatography using multi-ionophore membrane electrodes. *J. Chromatogr.*, 1993; 648: 283–289
- [57] Haughey S.A., Baxter G.A., Elliott C.T., Persson B., Jonson C., Bjurling P.: Determination of clenbuterol residues in bovine urine by optical immunobiosensor assay. *J. AOAC Int.*, 2001; 84: 1025–1030
- [58] Hauser P.C., Rennerm N.D., Hong A.P.C.: Anion detection in capillary electrophoresis with ion-selective microelectrodes. *Anal. Chim. Acta*, 1994; 295: 181–187
- [59] Hinderling P.H., Schmidlin O., Seydel J.K.: Quantitative relationships between structure and pharmacokinetics of beta-adrenoceptor blocking agents in man. *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, 1984; 12: 263–287
- [60] Hładoń T., Pawlaczek J., Szafran B.: Stability of ibuprofen in its inclusion complex with β -cyclodextrin. *J. Incl. Phenom. Macromol. Recognit.* 2000; 36: 1–8

- [61] Huai Q.Y., Zhao B., Zuo Y.M.: Preparation and evaluation of end-capped p-tert-butyl-calix[4]arene-bonded silica stationary phase for reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Chromatographia*, 2004; 59: 637–645
- [62] Hung D.Y., Chang P., Weiss M., Roberts M.S.: Structure-hepatic disposition relationships for cationic drugs in isolated perfused rat livers: transmembrane exchange and cytoplasmic binding process. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001; 297: 780–789
- [63] Ikeda A., Yoshimura M., Shinkai S.: Solution complexes formed from C60 and calixarenes. On the importance of the preorganized structure for cooperative interactions. *Tetrahedron Lett.* 1997; 38: 2107–2110
- [64] Inczedy J., Lengyel T., Ure A.M.: IUPAC compendium of analytical nomenclature. Definitive rules. Blackwell, Oxford, UK, 1998, rozdz. 5–8
- [65] Interactive Analysis. <http://www.logp.com> (15.12.2004)
- [66] Jandik P., Haddad P.R., Sturrock P.E.: Electrochemical detectors for ion chromatographic analysis: a critical review. *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.* 1988; 20: 1–74
- [67] Janshoff A., Steinem C., Michalke A., Henke C., Galla H.-J.: Monofunctionalized β -cyclodextrins as sensor elements for the detection of small molecules. *Sens. Actuators B* 2000; 70: 243–253
- [68] Jones O.A.H., Voulvoulis N., Lester J.N.: Potential ecological and human health risks associated with the presence of pharmaceutically active compounds in the aquatic environment. *Crit. Rev. Toxicol.* 2004; 34: 335–350
- [69] Kaifer A.H., Gomez-Kaifer M.: *Supramolecular electrochemistry*, Wiley-VCH, Weinheim 1999
- [70] Kaliszán R.: Chromatography and capillary electrophoresis in modeling the basic process of drug action. *Trends Anal. Chem.*, 1999; 18: 400–410
- [71] Kaliszán R., Kaliszán A., Wainer I.W.: Deactivated hydrocarbonaceous silica and immobilized artificial membrane stationary phases in high-performance liquid chromatographic determination of hydrophobicities of organic bases: relationship to log P and CLOGP. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1993; 11: 505–511
- [72] Kaliszán R., Nasal A., Bucinski A.: Chromatographic hydrophobicity parameter determined on an immobilized artificial membrane column: relationships to standard measures of hydrophobicity and bioactivity. *Eur. J. Med. Chem.*, 1994; 29: 163–172
- [73] Kaliszán R., Nasal A., Markuszewski M.J.: New approaches to chromatographic determination of lipophilicity of xenobiotics. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003; 377: 803–811
- [74] Kappes T., Hauser P.C.: Potentiometric detection in capillary electrophoresis with a metallic copper electrode. *Anal. Chim. Acta*, 1997; 354: 129–134
- [75] Kappes T., Hauser P.C.: Portable capillary electrophoresis instrument with potentiometric detection. *Anal. Commun.* 1998; 35: 325–327
- [76] Kappes T., Hauser P.C.: Potentiometric detection of alkali and alkaline earth metal cations in capillary electrophoresis with simplified electrode alignment and enhanced separation and sensitivity. *Anal. Chem.*, 1998; 70: 2487–2492
- [77] Kappes T., Schnierle P., Hauser P.C.: Potentiometric detection of inorganic anions and cations in capillary electrophoresis with coated-wire ion-selective electrodes. *Anal. Chim. Acta*, 1997; 350: 141–147
- [78] Kappes T., Schnierle P., Hauser P.C.: Field-portable capillary electrophoresis instrument with potentiometric and amperometric detection. *Anal. Chim. Acta*, 1999; 393: 77–82
- [79] Kappes T., Schnierle P., Hauser P.C.: Evaluation of the potentiometric detection of acetylcholine and other neurotransmitters in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 2000; 21: 1390–1394
- [80] Kataký R., Palmer S.: Local anaesthetics measured by lipophilic β -cyclodextrin based ion-selective electrodes. *Electroanalysis* 1996; 8: 585–590
- [81] Kataký R., Toth K., Palmer S., Feler Z.: A study of the effect of proteins and endogenous cations on a lipophilic β -cyclodextrin-based potentiometric lidocaine sensor using discrete solution and flow-injection analysis. *Talanta*, 1999; 50: 939–946
- [82] Kimura K., Sunagawa T., Yokoyama M.: Applications of sol-gel-derived membranes to neutral carrier-type ion-sensitive field-effect transistors. *Anal. Chem.*, 1997; 69: 2379–2383
- [83] Kolycheva N., Muller H.: Flow-through calcium-selective electrode: application in flow-injection analysis and ion chromatography. *Anal. Chim. Acta*, 1991; 242: 65–73
- [84] Koole A., Bosman J., Franke J.P., de Zeeuw R.A.: Multiresidue analysis of beta-2-agonist in human and calf urine using multimodal solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 1999; 726: 149–156
- [85] Kramer S.D., W.: *Pharmacokinetic optimization in drug research: biological, physicochemical and computational strategies*, red. B. Testa, T. van de Waterbeemd, G. Folkers, R. Guy. Wiley-VCH, Weinheim 2001, s. 402
- [86] Lee A.W.H., Chan W.H., Lam Y.S.: Ion-selective electrodes in organic analysis: determination of carboxylic acids via in situ conversion into amines. *Analyst* 1995; 120: 2841–2844
- [87] Lehn J.-M.: *Chemia supramolekularna* (tłum. pod red. J. Lipkowskiego), IChF PAN, Warszawa 1993
- [88] Li L.-S., Da S.L., Feng Y.-Q., Liu M.: Preparation and characterization of a new p-tert-butyl-calix[8]arene-bonded stationary phase for HPLC. *Anal. Sci.*, 2004; 20: 561–564
- [89] Li Z., Li X., Rothmaier M., Harrison D.: Comparison of numerical modeling of water uptake in poly(vinylchloride)-based ion-selective membranes with experiment. *Anal. Chem.*, 1996; 68: 1726–1734
- [90] Liang W., Mills S.: Profile of ligand binding to the porcine beta2-adrenergic receptor. *J. Anim. Sci.*, 2001; 79: 877–883
- [91] Lin L.A., Tomlinson J.A., Satzger R.D.: Detection of clenbuterol in bovine retinal tissue by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. A*, 1997; 762: 275–280
- [92] Liu L., Guo Q.-X.: The driving forces in the inclusion complexation of cyclodextrins. *J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem.*, 2002; 42: 1–14
- [93] Loscombe C.R., Cox G.B., Dalziel J.A.W.: Application of a copper electrode as a detector for high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 1978; 166: 403–410
- [94] Louis S.N., Jackman G.P., Nero T.L., Iakovidis D., Louis W.J.: Role of beta-adrenergic receptor subtypes in lipolysis. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 2000; 14: 565–577
- [95] Luboch E., Biernat J.F., Simonov Yu.A., Kratsov V.Ch., Bel'skii V.K.: Structures of Nal complexes of 16-membered azo- and azoxycrown ethers. Correlation of crystal structure and carrier-doped membrane electrode selectivity. *Supramol. Chem.* 1999; 11: 109–115
- [96] Ludwig R.: Calixarenes in analytical and separation chemistry. *Fresenius J. Anal. Chem.* 2000; 367: 103–128
- [97] Macka M., Gerhardt G., Andersson P., Bogan D., Cassidy R.M., Haddad P.R.: Capillary electrophoresis with end-capillary potentiometric detection using a copper electrode. *Electrophoresis*, 1999; 20: 2539–2546
- [98] Malinowska E., Meyerhoff M.E.: Role of axial ligation on potentiometric response of Co(III) tetraphenylporphyrin-doped polymeric membranes to nitrite ions. *Anal. Chim. Acta*, 1995; 300: 33–43
- [99] Manz A., Simon W.: Potentiometric detector for fast high-performance open-tubular column liquid chromatography. *Anal. Chem.*, 1987; 59: 74–79
- [100] Margareto J., Larrarte E., Marti A., Martinez J.A.: Up-regulation of a thermogenesis-related gene (UCP1) and down-regulation of PPARgamma and aP2 genes in adipose tissue: possible features of the antiobesity effects of a beta3-adrenergic agonist. *Biochem. Pharmacol.* 2001; 61: 1471–1478
- [101] Maurer H.: Screening procedures for simultaneous detection of several drug classes used for high throughput toxicological analyses and doping control. *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, 2000; 3: 467–480
- [102] McGrath G.J., O'Kane E., Smyth W.F., Tagliaro F.: Investigation of the electrochemical oxidation of clenbuterol at a porous carbon electrode, and its application to the determination of this β -agonist in bovine hair by liquid chromatography with coulometric detection. *Anal. Chim. Acta*, 1996; 322: 159–166
- [103] Mehvar R., Brocks D.R.: Stereospecific pharmacokinetics and pharmacodynamics of beta-adrenergic blockers in humans. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2001; 4: 185–200
- [104] Miro M., Frenzel W.: A novel flow-through microdialysis separation unit with integrated differential potentiometric detection for the determination of chloride in soil samples. *Analyst*, 2003; 128: 1291–1297
- [105] Moane S., Barreira Rodriguez J.R., Miranda Ordieres A.J., Tunon Blanco P., Smyth M.R.: Electrochemical behaviour of clenbuterol at Nafion-modified carbon -paste electrodes. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1995; 14: 57–63
- [106] Moane S., Smyth M.R., O'Keefe M.: Differential-pulse voltammetric determination of clenbuterol in bovine urine using a Nafion-modified carbon-paste electrode. *Analyst*, 1996; 121: 779–784
- [107] Nagels L.J.: Electroanalytical tools for (bio)sensors. <http://www.pg.gda.pl/chem/CEEAM/guests.htm> (06.09.2004)
- [108] Nagels L. J.: Potentiometric detection for high-performance liquid chromatography is a reality: which classes of organic substances are the targets. *Pure Appl. Chem.*, 2004; 76: 839–845

- [109] Nagels L.J., Bazyłak G., Zielinska D.: Designing potentiometric sensor materials for the determination of organic ionizable substances in HPLC. *Electroanalysis*, 2003; 15: 533–538
- [110] Nagels L.J., Poels I.: Solid state potentiometric detection systems for LC, CE and μ TAS methods. *Trends Anal. Chem.*, 2000; 19: 410–417
- [111] Nann A., Pretsch E.: Potentiometric detection of anions separated by capillary electrophoresis using an ion-selective microelectrode. *J. Chromatogr. A*, 1994; 676: 437–448
- [112] Nann A., Silvestrim I., Simon W.: Quantitative analysis in capillary zone electrophoresis using ion-selective microelectrodes as on-column detectors. *Anal. Chem.*, 1993; 65: 1662–1667
- [113] Nann A., Simon W.: On-column detection in capillary zone electrophoresis with ion-selective microelectrodes in conical capillary apertures. *J. Chromatogr.*, 1993; 633: 207–214
- [114] Nasal A., Buciniński A., Bober L., Kaliszczan R.: Prediction of pharmacological classification by means of chromatographic parameters processed by principal component analysis. *Int. J. Pharm.* 1997; 159: 43–55
- [115] Nasal A., Siluk D., Kaliszczan R.: Chromatographic retention parameters in medicinal chemistry and molecular pharmacology. *Curr. Med. Chem.*, 2003; 10: 381–426
- [116] Nasal A., Sznitowska M., Bucinski A., Kaliszczan R.: Hydrophobicity parameter from high-performance liquid chromatography on an immobilized artificial membrane column and its relationship to bioactivity. *J. Chromatogr. A*, 1995; 692: 83–89
- [117] Nielsen H.M., Rassing M.R.: TR146 cells grown on filters as a model of human buccal epithelium: IV. Permeability of water, mannitol, testosterone and β -adrenoceptor antagonists. Comparison to human, monkey and porcine buccal mucosa. *Int. J. Pharm.*, 2000; 194: 155–167
- [118] Odashima K., Yagi K., Tohda K., Umezawa Y.: Potentiometric discrimination of organic amines by a liquid membrane electrode based on a lipophilic hexaester of calix[6]arene. *Anal. Chem.*, 1993; 65: 1074–1079
- [119] Ong S., Pidgeon C.: Thermodynamics of solute partitioning into immobilized artificial membranes. *Anal. Chem.*, 1995; 67: 2119–2128
- [120] Ottiger C., Wunderli-Allenspach H.: Immobilized artificial membrane (IAM)-HPLC for partition studies of neutral and ionized acids and bases in comparison with the liposomal partition system. *Pharm. Res.*, 1999; 16: 643–650
- [121] Palm K., Luthman K., Ungell A.L., Strandlund G., Artursson P.: Correlation of drug absorption with molecular surface properties. *J. Pharm. Sci.*, 1996; 85: 32–39
- [122] Parker D., Katakay R.: Selective complexation and sensitive analysis of charge diffuse cationic species using lipophilic cyclodextrins. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1997; 141–145
- [123] Parker D., Katakay R., Kelly P.M., Palmer S.: Selectivity in the binding and detection of charge diffuse ions. *Pure Appl. Chem.* 1996; 68: 1218–1223
- [124] Picioreanu S., Poels I., Frank J., van Dam J.C., van Dedem G.W., Nagels L.J.: Potentiometric detection of carboxylic acids, phosphate esters, and nucleotides in liquid chromatography using anion-selective coated-wire electrodes. *Anal. Chem.*, 2000; 72: 2029–2034
- [125] Pietri-Rouxel F., Strosberg A.D.: Pharmacological characteristics and species-related variations of beta3-adrenergic receptors. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 1995; 9: 211–218
- [126] Pizzariello A., Stredanski M., Stredanska S., Miertus S.: A solid binding matrix/molecularly imprinted polymer-based sensor system for the determination of clenbuterol in bovine liver using differential-pulse voltammetry. *Sens. Actuators B*, 2001; 76: 286–294
- [127] Platts J.A., Abraham M.H., Butina D., Hersey A.: Estimation of molecular linear free energy relationship descriptors by a group contribution approach. 2. Prediction of partition coefficients. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 2000; 40: 71–80
- [128] Poels I., Nagels L.J.: Potentiometric detection in capillary electrophoresis with a conducting oligomer electrode. *Anal. Chim. Acta*, 1999; 385: 417–422
- [129] Poels I., Nagels L.J.: Potentiometric detection of amines in ion chromatography using macrocycle-based liquid membrane electrodes. *Anal. Chim. Acta*, 2001; 440: 89–98
- [130] Poels I., Nagels L.J., Verreyt G., Geise H.J.: Conducting polymer based potentiometric detection applied to the determination of organic acids with narrow-bore LC systems. *Biomed. Chromatogr.* 1998; 12: 124–125
- [131] Qureshi G.A., Eriksson A.: Determination of clenbuterol and mabuterol in equine plasma by ion-pair liquid chromatography with electrochemical detection. *Chromatographic and electrochemical characteristics.* *J. Chromatogr.*, 1988; 441: 197–205
- [132] Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M.: *Pharmacology*, 4th Edition, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1999
- [133] Rocheleau M.-J., Purdy W.C.: Ion-selective electrode with fixed quaternary phosphonium ion-sensing species. *Analyst* 1992; 117: 177–181
- [134] Rudiger V., Schneider H.J., Solov'ev V.P., Kazachenko V.P., Rayevsky O.A.: Crown ether-ammonium complexes: binding mechanisms and solvent effects. *Eur. J. Org. Chem.*, 1999, 1847–1856
- [135] Sada H., Ban T.: Effects of acebutolol and other structurally related beta-adrenergic blockers on transmembrane action potential in guinea-pig papillary muscles. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1980; 215: 507–514
- [136] Sada H., Ban T.: Frequency-dependent block of nerve conduction by beta-adrenergic blocking agents. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 1981; 254: 134–144
- [137] Salbutamol. http://www.ch.ic.ac.uk/local/projects/j_hettich/salbutamol/project/start.html (10.10.2004)
- [138] Santos E.M., Araujo A.N., Couto C.M., Montenegro M.C., Kejzlarova A., Solich P.: Ion selective electrodes for penicillin-G based on Mn(III)TPP-Cl and their application in pharmaceutical formulations control by sequential injection analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2004, 36: 701–709
- [139] Scheerder J., Engbersen J.F.J., Casnati A., Ungaro R., Reinhoudt D.N.: Complexation of halide anions and tricarboxylate anions by neutral urea-derivatized p-tert-butylcalix[6]arenes. *J. Org. Chem.*, 1995; 60: 6448–6454
- [140] Schneiderman E., Stalcup A.M.: Cyclodextrins: a versatile tool in separation science. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 2000; 745: 83–102
- [141] Schnierle P., Kappes T., Hauser P.C.: Capillary electrophoretic determination of different classes of organic ions by potentiometric detection with coated-wire ion-selective electrodes. *Anal. Chem.*, 1998; 70: 3585–3589
- [142] Schultz F.A., Mathis D.E.: Ion-selective electrode detector for ion-exchange liquid chromatography. *Anal. Chem.*, 1974; 46: 2253–2258
- [143] Scott R.P.W.: *Liquid chromatography detectors*. Elsevier, Amsterdam 1977, s. 15
- [144] Seethala R., Fernandes P.B. (eds.), *Handbook of drug screening*, Marcel Dekker, New York 2001
- [145] Shvedene N.V., Nemilova M.Y., Kovalev V.V., Shokova E.A., Rozov A.K., Pletnev I.V.: Ion-selective electrodes based on p-1-adamantylcalix[8]arene ionophores for the determination of amino compounds. *Sens. Actuators B* 1995; 27: 372–376
- [146] Smith D.J.: The pharmacokinetics, metabolism, and tissue residues of beta-adrenergic agonists in livestock. *J. Anim. Sci.*, 1998; 76: 173–194
- [147] Sokolies T., Menyés U., Roth U., Jira T.: New calixarene-bonded stationary phases in high-performance liquid chromatography: comparative studies on the retention behavior and on influences of the eluent. *J. Chromatogr. A*, 2000; 898: 35–52
- [148] Stella V.J., Rajewski R.A.: Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery. *Pharm. Res.* 1997; 14: 556–567
- [149] Sun X.X., Aboul-Enein H.Y.: Internal solid contact electrode for the determination of clenbuterol in pharmaceuticals and human urine. *Anal. Lett.*, 1999; 32: 1143–1156
- [150] Szafran B., Pawlaczyk J.: Interaction between sulfaproxylone and β -cyclodextrin in the solution and solid states. *J. Incl. Phenom. Macromol. Recognit.*, 1999; 34: 133–141
- [151] Szafran B., Pawlaczyk J.: Spectroscopic study of inclusion complexes of β -cyclodextrin with sulfonamides. *Pol. J. Chem.*, 1998; 72: 480–485
- [152] Tanyanyiwa J., Leuthardt S., Hauser P.C.: Conductimetric and potentiometric detection in conventional and microchip capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 2002; 23: 3659–3666
- [153] Ternes T.A.: Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *Trends Anal. Chem.*, 2001; 20: 419–434
- [154] Toussaint B., Palmer M., Chiap P., Hubert P., Crommen J.: On-line coupling of partial filling-capillary zone electrophoresis with mass spectrometry for the separation of clenbuterol enantiomers. *Electrophoresis*, 2001; 22: 1363–1372
- [155] Trojanowicz M., Poboży E., Meyerhoff M.E.: Direct and replacement ion chromatography with potentiometric detection using a silver/silver bromide electrode. *Anal. Chim. Acta*, 1989; 222: 109–116

- [156] Udachin K.A., Enright G.D., Brouwer E.B., Ripmeester J.A.: *t*-Butylcalix[4]arene compounds with long chain guests: structures and host-guest interactions. *J. Supramolecular. Chem.*, 2000; 1: 97–100
- [157] Umezawa Y., Katanaka M., Takami W., Kimura E., Koike T., Nada H.: Potentiometric adenosine-triphosphate polyanion sensor using a lipophilic macrocyclic polyamine liquid membrane. *Anal. Chem.*, 1988; 60: 2392–2396
- [158] Van der Wal P.D., van den Berg A., De Rooij N.F.: Universal approach for the fabrication of Ca^{2+} -, K^{+} - and NO_3^{-} -sensitive membrane ISFETs. *Sens. Actuators B*, 1994; 18–19: 200–205
- [159] Vogtle F., Sieger H., Mueller W.M.: Crown ethers as artificial receptors. *W: Topics in current chemistry*, vol. 98, red. F. Boschke, Springer Verlag, Berlin 1981, s.108
- [160] Wang J.: Electroanalysis and biosensors. *Anal. Chem.*, 1999; 71: 328R–332R
- [161] Wang J.: Electrochemical detection for microscale analytical systems: a review. *Talanta*, 2002; 56: 223–331
- [162] Watanabe K., Tohda K., Sugimoto H., Eitoku F., Inoue H., Suzuki K., Nakamura S.: Ion-sensitive field effect transistor as a monovalent cation detector for ion chromatography and its application to the measurement of Na^{+} and K^{+} concentrations in serum. *J. Chromatogr. B*, 1991; 566: 109–116
- [163] Wyglądacz K., Malinowska E., Szczygielska-Tao J., Biernat J.F.: Azothia- and azoxythiacrown ethers as ion carriers. Part II. Anionic response of membrane electrodes. *J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem.*, 2001; 39: 309–314
- [164] Yun S.Y., Hong Y.K., Oh B.K., Cha G.S., Nam H., Lee S.B., Jin J.-I.: Potentiometric properties of ion-selective electrode membranes based on segmented polyether urethane matrices. *Anal. Chem.*, 1997; 69: 868–873
- [165] Zarzycki P.K., Lamparczyk H.: The equilibrium constant of β -cyclodextrin–phenolphthalein complex: influence of temperature and tetrahydrofuran addition. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1998; 18: 165–170
- [166] Zhu C., Jiang L., Chen T.M., Hwang K.K.: A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential. *Eur. J. Med. Chem.*, 2002; 37: 399–407
- [167] Zielinska D., Gil A., Pietraszkiewicz M., Pietraszkiewicz O., Van de Vijver D., Nagels L.J.: Podand and macrocyclic amine receptors with urea functionalities for potentiometric detection of organic acids in HPLC. *Anal. Chim. Acta*, 2004; 523: 177–184