

# Zastosowanie chromatografii cienkowarstwowej do identyfikacji spironolaktonu w wybranych preparatach farmaceutycznych

Małgorzata Dołowy

Zakład Chemii Analitycznej, Katedra Chemii Ogólnej i Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny

Adres do korespondencji: Małgorzata Dołowy, Zakład Chemii Analitycznej, Katedra Chemii Ogólnej i Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec, e-mail: mdolowy@wp.pl

## Wstęp

Spironolakton to syntetyczny steroid (**rycina 1**) [1] z grupy diuretyków, czyli środków moczopędnych, których działanie związane jest ze zwiększeniem objętości wydalanego moczu, poprzez wpływ na procesy warunkujące jego wytwarzanie. Spironolakton wchłaniany jest z przewodu pokarmowego, gdzie ulega przekształceniu do czynnego metabolitu – kanrenonu. Na skutek konkurencyjnego antagonizmu wobec aldosteronu, w umiarkowany sposób nasila ilość wydalanego moczu, jednocześnie zmniejszając usuwanie potasu, w konsekwencji czego może obniżyć tętno i ciśnienie tętnicze krwi [2]. Jego działanie narasta powoli, po 2–4 godzinach od podania leku, a szczyt osiąga po 2–3 dobach [3]. Wydalany jest pod postacią metabolitów wraz z moczem i kałem [2].

Spironolakton stosuje się w przypadku pierwotnego i wtórnego hiperaldosteronizmu. Wskazaniem jest także samoistne nadciśnienie tętnicze oraz obrzęki w przewlekłej niewydolności krążenia oraz marskości wątroby, w przypadku braku skuteczności innych środków [2, 3]. Ponadto związek ten stosowany jest w terapii skojarzonej, jako lek uzupełniający w farmakoterapii miastenii i nadciśnienia złośliwego [2]. Może być też połączony z innymi diuretykami, przy współistniejącym hiperaldosteronizmie powodującym nieskuteczność działania tych leków [3].

Z uwagi na szerokie zastosowanie spironolaktonu nie tylko u ludzi dorosłych, ale też i u dzieci istotne jest opracowanie skutecznych i szybkich metod analitycznych, pozwalających na jakościowe i ilościowe oznaczanie spironolaktonu jako substancji czynnej w preparatach farmaceutycznych oraz w próbkach

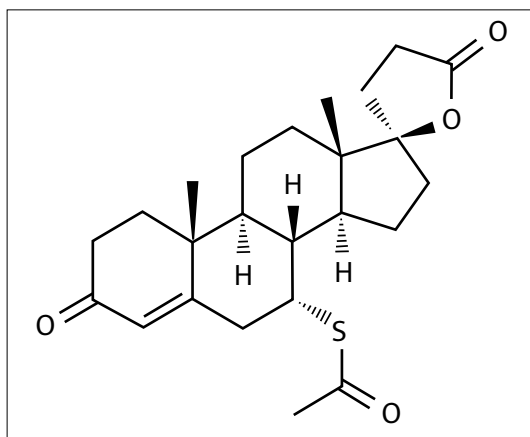
## Application of thin-layer chromatography to identify spironolactone in selected pharmaceutical formulations

Spironolactone is a synthetic steroid of diuretics group used in treatment of arterial hypertension and in oedemas connected with circulatory insufficiency in form of selected pharmaceuticals. One of the methods applied in determination of spironolactone identity and recommended by Polish Pharmacopoeia is thin-layer chromatography in normal phase (NP-TLC). In this work, the optimal chromatographic conditions such as: kind of stationary phase, volume composition of mobile phase and visualization of spironolactone spots as bioactive substance in selected commercial preparations using TLC method in normal and reversed system (NP-TLC and RP-TLC) were determined. On the basis of obtained results it was concluded that, the developed TLC method is effective and can be used in qualitative analysis of pharmaceutical preparations containing spironolactone as bioactive substance.

**Keywords:** spironolactone, thin-layer chromatography, pharmaceutical analysis.

© Farm Pol, 2010, 66(5): 313–317

biologicznych. Chemiczna struktura spironolaktonu, w której obecne są grupy chromoforowe absorbujące promieniowanie w zakresie UV ( $\lambda_{\max}=238$  nm) [1] sprawia, że jedną z metod stosowanych do identyfikacji i ilościowego oznaczania spironolaktonu w materiale biologicznym i preparatach farmaceutycznych jest spektrofotometria UV-VIS. Ponadto metodami analitycznymi stosowanymi do oznaczania spironolaktonu są metody elektrochemiczne, takie jak: polarografia i woltametria [4, 5]. Natomiast największe znaczenie w jakościowym i ilościowym oznaczaniu spironolaktonu w preparatach farmaceutycznych i materiale



Rycina 1. Wzór strukturalny spironolaktonu [1]

biologicznym odgrywają techniki chromatograficzne, w tym przede wszystkim chromatografia cieczowa (TLC i HPLC) [6–9]. Według FP VI [1] chromatografia cienkowarstwowa (TLC) z zastosowaniem mieszaniny chloroform + aceton w stosunku objętościowym (4:1) – jako fazy ruchomej, żelu krzemionkowego GF<sub>254</sub> – jako fazy stacjonarnej z detekcją UV ( $\lambda=254$  nm), lub przy użyciu odczynników wywołujących, takich jak: roztwór siarczanu ceru w kwasie siarkowym (VI) lub mieszanina kwas siarkowy (VI) + etanol, może posłużyć do identyfikacji spironolaktonu jako substancji czystej. Natomiast w Farmakopei VIII [10] podana została procedura badania tożsamości spironolaktonu techniką TLC, z zastosowaniem jako fazy ruchomej mieszaniny: woda + cykloheksan + octan etylu w stosunku objętościowym 1:24:75 (v/v) oraz płytek pokrytych żelem krzemionkowym GF<sub>254</sub>. Wizualizacji plamek spironolaktonu dokonuje się podobnie jak wg FP VI w nadfiolecie, przy długości fali  $\lambda=254$  nm. Obok chromatografii cienkowarstwowej techniką przydatną nie tylko do identyfikacji i ilościowego oznaczania spironolaktonu w preparatach farmaceutycznych, ale także do badania jego stabilności jest wysokosprawną chromatografią cieczową (HPLC) [6–9]. Ponadto literatura naukowa podaje również przykłady oznaczania spironolaktonu i jego metabolitów w moczu, po uprzedniej ich derywatywacji w lotne pochodne (estry) na drodze metylacji techniką chromatografii gazowej z detekcją za pomocą spektrometru masowego (GC-MS) [11]. Metoda ta jest wykorzystywana w rutynowej kontroli dopingowej sportowców.

Celem powyższej pracy była optymalizacja warunków chromatograficznego oznaczania jakościowego spironolaktonu jako substancji czynnej w wybranych preparatach handlowych, takich jak: Spironol (tabl. powł. 100 mg) i Verospiron (kaps. 100 mg) techniką TLC. Badania chromatograficzne przeprowadzono w normalnym i odwróconym układzie faz z zastosowaniem żelu krzemionkowego 60F<sub>254</sub>, mieszaniny żelu krzemionkowego 60 z ziemią okrzemkową F<sub>254</sub> oraz fazy RP-18F<sub>254</sub>, jako adsorbenta. Natomiast fazę

ruchomą stanowiła mieszanina: chloroform + aceton oraz odpowiednio chloroform + kwas octowy, w różnych stosunkach objętościowych. Wizualizację plamek analizowanego spironolaktonu dokonywano zarówno przy użyciu lampy UV ( $\lambda=254$  nm), jak i dla porównania przy użyciu 10% wodnego roztworu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Opracowane na podstawie przeprowadzonych w pracy eksperymentów optymalne warunki chromatograficzne do identyfikacji spironolaktonu w jego preparatach farmaceutycznych techniką TLC, w normalnym i odwróconym układzie faz, mogą w przyszłości umożliwić szybką i efektywną kontrolę jakości preparatów spironolaktonu.

### Materiały i odczynniki

W pracy zastosowano spironolakton min. 97%, numer katalogowy S3378-1G (Sigma –Aldrich, St. Louis, MO, USA). Preparatami farmaceutycznymi wykorzystanymi w badaniach, zawierającymi spironolakton jako substancję czynną w postaci, odpowiednio, kapsulek i tabletek były: Verospiron, 100mg/kapsułkę (Gedeon Richter Ltd. Budapeszt, Węgry) oraz Spironol, 100 mg/tabletkę (Grodziskie Zakłady Farmaceutyczne Polfa Sp. z o. o, Grodzisk Mazowiecki, Polska). Metanol (POCh, Gliwice, Polska) użyto do sporządzenia roztworu standardowego spironolaktonu. Składnikami faz ruchomych były: chloroform, aceton oraz kwas octowy min. 99,5% (POCh, Gliwice, Polska).

### Metodyka badań

#### Stosowane fazy stacjonarne

W celu ustalenia optymalnych warunków jakościowego oznaczania spironolaktonu, jako substancji czynnej, w preparatach farmaceutycznych w postaci tabletek i kapsulek techniką NP- TLC zastosowano płytki chromatograficzne do NP-TLC (E. Merck, Germany) aluminiowe i szklane pokryte żelem krzemionkowym 60F<sub>254</sub> (Art. 1.05554 i Art. 1.05715) oraz płytki aluminiowe pokryte mieszaniną żelu krzemionkowego 60 i ziemi okrzemkowej F<sub>254</sub> (Art. 1.05567). Natomiast do badań techniką RP- TLC użyto płytki aluminiowe RP-18F<sub>254</sub> (Art. 1.05559).

#### Stosowane fazy ruchome

Do analizy spironolaktonu na płytkach aluminiowych do NP-TLC pokrytych żelem krzemionkowym 60F<sub>254</sub> (Art. 1.05554, Art. 1.05715) oraz mieszaniną żelu krzemionkowego 60 i ziemi okrzemkowej F<sub>254</sub> (Art. 1.05567), zastosowano fazę ruchomą: chloroform + aceton, w następujących stosunkach objętościowych: 50:0, 45:5, 40:10, 30:20, 25:25, 20:30, 10:40 i 0:50.

Z kolei w analizie spironolaktonu na płytkach do RP-TLC tj. RP-18F<sub>254</sub> (Art. 1.05559) użyto mieszaninę: chloroform + kwas octowy, o składzie objętościowym: 50:0, 45:5, 40:10, 30:20, 25:25, 20:30, 10:40 oraz 0:50.

### Przygotowanie roztworu wzorcowego spironolaktonu

10 mg spironolaktonu rozpuszczono w 10 ml metanolu uzyskując roztwór standardowy o stężeniu 1 mg/ml.

### Warunki ekstrakcji spironolaktonu z badanych preparatów farmaceutycznych

Preparaty farmaceutyczne spironolaktonu w postaci tabletek i kapsułek poddawano ekstrakcji za pomocą 20 ml metanolu na 1 tabletkę preparatu lub odpowiednio kapsułkę. Ekstrakty obu preparatów stosowano do analizy po ich rozcieńczeniu metanolem do stężenia 1 mg/ml.

### Warunki analizy jakościowej spironolaktonu techniką NP-TLC i RP-TLC

Wszystkie stosowane płytki chromatograficzne do NP-TLC o wymiarach 10 cm×10 cm (E. Merck, Art. 1.05715, Art. 1.05567, Art. 1.05554) przed użyciem były aktywowane w temp. 120°C przez 30 minut. Natomiast płytki aluminiowe do RP-TLC (Art. 1.05559) nie poddawano aktywacji. Zarówno roztwór wzorcowy spironolaktonu, jak i ekstrakty metanolowe preparatów farmaceutycznych spironolaktonu наносono na płytki chromatograficzne w ilości 3 μl. Chromatogramy rozwijano na wysokość 8 cm w komorze chromatograficznej firmy Camag, w temperaturze 18±1°C. Każdorazowo do komory wlewano

50 ml fazy ruchomej i wysycano ją parami rozpuszczalnika przez 30 minut. Po rozwinięciu i wysuszeniu płytek, położenie plamek ustalano przy użyciu lampy UV (λ=254 nm) oraz dla porównania z zastosowaniem odczynnika wywołującego, czyli 10% wodnego roztworu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Na podstawie otrzymanych chromatogramów obliczano współczynnik retencji chromatograficznej R<sub>F</sub> dla spironolaktonu i jego ekstraktów wg wzoru [1]:

$$R_F = \frac{a}{b}$$

*a* – odległość środka plamki od linii startu [cm]

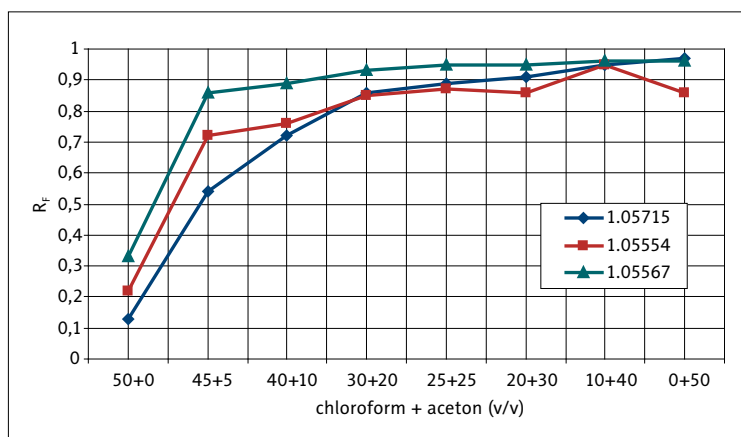
*b* – odległość czoła rozpuszczalnika od linii startu [cm]

### Wyniki i omówienie wyników

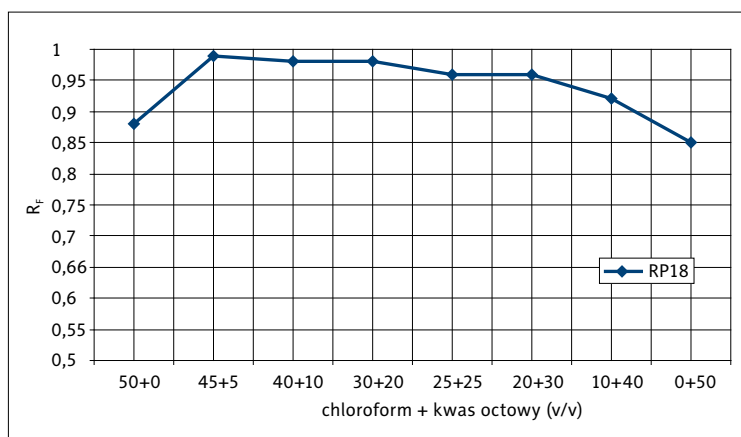
W pierwszym etapie badań nad opracowaniem optymalnych warunków chromatograficznych, pozwalających na identyfikację spironolaktonu jako substancji czynnej w jego preparatach handlowych w postaci tabletek (Spironol) i kapsułek (Verospiron) techniką NP-TLC, posłużono się danymi literaturowymi zamieszczonymi w Farmakopei Polskiej VI. Do analizy chromatograficznej ekstraktów spironolaktonu z preparatów farmaceutycznych zastosowano m.in. płytki pokryte żelem krzemionkowym 60F<sub>254</sub>

**Tabela 1.** Wartości R<sub>F</sub> metanolowego roztworu spironolaktonu oraz metanolowych ekstraktów jego preparatów (Spironol, Verospiron) badanych techniką NP-TLC na płytkach: Art. 1.05715, Art. 1.05554 oraz Art. 1.05567 przy użyciu fazy ruchomej: chloroform + aceton w różnych stosunkach objętościowych w temperaturze 18°C

Płytki chromatograficzne szklane pokryte żelem krzemionkowym 60F <sub>254</sub> (Art. 1.05715)								
Nazwa preparatu	chloroform + aceton (v/v)							
	50:0	45:5	40:10	30:20	25:25	20:30	10:40	0:50
Spironolakton (standard)	0,13	0,54	0,72	0,86	0,89	0,91	0,95	0,97
Spironol	0,13	0,54	0,72	0,86	0,89	0,91	0,95	0,97
Verospiron	0,13	0,54	0,72	0,86	0,89	0,91	0,95	0,97
Płytki chromatograficzne aluminiowe pokryte żelem krzemionkowym 60F <sub>254</sub> (Art. 1.05554)								
Nazwa preparatu	chloroform + aceton (v/v)							
	50:0	45:5	40:10	30:20	25:25	20:30	10:40	0:50
Spironolakton (standard)	0,22	0,72	0,76	0,85	0,87	0,86	0,95	0,86
Spironol	0,22	0,72	0,76	0,85	0,87	0,86	0,95	0,86
Verospiron	0,22	0,72	0,76	0,85	0,87	0,86	0,95	0,86
Płytki chromatograficzne aluminiowe pokryte mieszaniną żelu krzemionkowego 60 i ziemi okrzemkowej F <sub>254</sub> (Art. 1.05567)								
Nazwa preparatu	chloroform + aceton (v/v)							
	50:0	45:5	40:10	30:20	25:25	20:30	10:40	0:50
Spironolakton (standard)	0,33	0,86	0,89	0,93	0,95	0,95	0,96	0,96
Spironol	0,33	0,86	0,89	0,93	0,95	0,95	0,96	0,96
Verospiron	0,33	0,86	0,89	0,93	0,95	0,95	0,96	0,96



Rycina 2. Zależność  $R_f$  spironolaktonu od składu objętościowego fazy ruchomej chloroform + aceton (v/v)



Rycina 3. Zależność  $R_f$  spironolaktonu od składu objętościowego fazy ruchomej chloroform + kwas octowy (v/v)

(Art. 1.05554, Art. 1.05715) oraz zmodyfikowane, tj. pokryte mieszaniną żelu krzemionkowego 60 i ziemi okrzemkowej  $F_{254}$  (Art. 1.05567). Natomiast mieszaninę chloroform + aceton, w ośmiu różnych stosunkach objętościowych: 50:0, 45:5, 40:10, 30:20, 25:25, 20:30, 10:40 i 0:50 (v/v), użyto jako fazy ruchome.

Średnie wartości  $R_f$  z trzech pomiarów, uzyskane dla standardowego roztworu spironolaktonu oraz metanolowych ekstraktów jego preparatów farmaceutycznych (Spironol, Verospiron), analizowanych techniką NP-TLC na płytkach szklanych i aluminiowych w temp. 18°C, przedstawiono w tabeli 1.

Stwierdzono, że bez względu na zastosowane warunki chromatograficzne wartości  $R_f$  standardowego roztworu spironolaktonu i ekstraktów jego preparatów są takie same (tabela 1). Na chromatogramach brak jest również dodatkowych plamek, oprócz plamki pochodzącej od spironolaktonu, co potwierdza fakt, że substancje pomocnicze wchodzące w skład obu preparatów handlowych nie wpływają na jakościową analizę spironolaktonu techniką NP-TLC.

W celu doboru optymalnych warunków chromatograficznych w normalnym układzie faz (NP –TLC), niezbędnych do identyfikacji spironolaktonu jako substancji czynnej w ekstraktach wybranych preparatów farmaceutycznych (Spironol i Verospiron), tj. rodzaju płytek chromatograficznych oraz składu objętościowego fazy ruchomej: chloroform+ aceton, sporządzono graficzną zależność wartości  $R_f$  spironolaktonu, uzyskanych na stosowanych płytkach do NP-TLC tj. Art. 1.05715, Art. 1.05554 oraz Art. 1.05567, od składu objętościowego fazy ruchomej chloroform +aceton (rycina 2).

Z przedstawionego wykresu wynika, że warunkami chromatograficznymi najbardziej korzystnymi do identyfikacji spironolaktonu w preparatach farmaceutycznych są płytki szklane pokryte żelem krzemionkowym  $60F_{254}$  (Art. 1.05715) i mieszanina chloroform + aceton, w stosunku objętościowym 45:5 (v/v). Dla tych warunków chromatograficznych otrzymano optymalne wartości  $R_f$  spironolaktonu, tj. w zakresie 0,3–0,6 zalecanym do identyfikacji związków techniką TLC [1].

W celu wyznaczenia optymalnych warunków chromatograficznych, służących do analizy jakościowej spironolaktonu w wybranych preparatach farmaceutycznych techniką RP-TLC, w drugim etapie badań zastosowano płytki chromatograficzne z odwróconym układem faz, czyli RP-18 $F_{254}$  (Art. 1.05559) i mieszaninę chloroform + kwas octowy, w ośmiu różnych stosunkach objętościowych: 50:0, 45:5, 40:10, 30:20, 25:25, 20:30, 10:40 i 0:50, jako fazy ruchome.

Otrzymane wartości  $R_f$  zestawiono w tabeli 2. Wskazują one, podobnie jak w przypadku badań techniką NP-TLC, na podobieństwo w wartościach  $R_f$  spironolaktonu i ekstraktów jego preparatów. Na chromatogramach otrzymanych techniką RP-TLC nie obserwuje się dodatkowych plamek, co świadczy o braku wpływu substancji pomocniczych na

Tabela 2. Wartości  $R_f$  metanolowego roztworu spironolaktonu oraz metanolowych ekstraktów jego preparatów (Spironol, Verospiron) badanych techniką RP-TLC na płytkach aluminiowych RP-18 $F_{254}$  (Art. 1.05559) rozwijanych przy użyciu fazy ruchomej: chloroform + kwas octowy w różnych stosunkach objętościowych w temperaturze 18°C

Nazwa preparatu	Stosunek objętościowy fazy ruchomej chloroform + kwas octowy (v/v)							
	50:0	45:5	40:10	30:20	25:25	20:30	10:40	0:50
Spironolakton (standard)	0,88	0,99	0,98	0,98	0,96	0,96	0,92	0,85
Spironol	0,88	0,99	0,98	0,98	0,96	0,96	0,92	0,85
Verospiron	0,88	0,99	0,98	0,98	0,96	0,96	0,92	0,85

identyfikację spironolaktonu w badanych preparatach farmaceutycznych.

Graficzny obraz zależności wartości  $R_f$  spironolaktonu od składu objętościowego fazy ruchomej chloroform + kwas octowy (**rycina 3**) wskazuje na to, że, bez względu na zastosowany skład objętościowy fazy ruchomej chloroform + kwas octowy, nie uzyskano w żadnym przypadku optymalnych wartości  $R_f$ , tj. w zakresie 0,3–0,6.

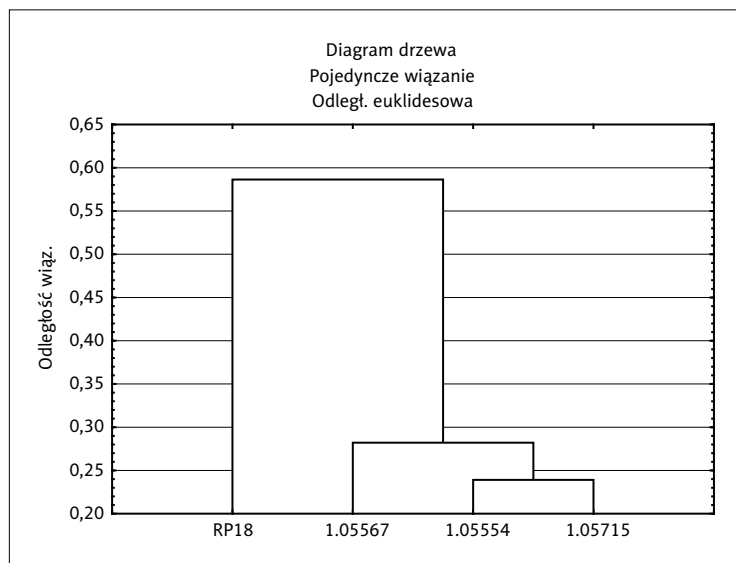
Stosując tylko czysty aceton, czy kwas octowy jako fazę ruchomą, czy ich mieszaninę w odpowiednich stosunkach objętościowych, otrzymuje się wartości  $R_f$  w zakresie 0,85–0,99, czyli znacznie wyższe niż zalecane przez Farmakopeę Polską do oznaczeń substancji w preparatach farmaceutycznych.

Analiza podobieństwa (klasterowa) otrzymanych wartości  $R_f$  spironolaktonu, badanego na trzech stosowanych płytkach chromatograficznych do NP-TLC (Art. 1.05554, Art. 1.05715, Art. 1.05567) oraz płytkach RP-18F<sub>254</sub> (Art. 1.05559) przeznaczonych do RP-TLC, przy użyciu odpowiedniej fazy ruchomej chloroform + aceton oraz chloroform + kwas octowy, której rezultatem jest dendrogram na **rycynie 4** wskazuje na to, że największe podobieństwo w wartościach  $R_f$  uzyskuje się na płytkach pokrytych żelem krzemionkowym 60F<sub>254</sub> do NP-TLC tj. Art. 1.05715 (szklanych) i Art. 1.05554 (aluminiowych).

## Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań chromatograficznych spironolaktonu i ekstraktów jego preparatów farmaceutycznych (Spironol i Verospiron) stwierdzono, że:

- chromatografia cienkowarstwowa, w normalnym układzie faz (NP –TLC), pozwala na identyfikację spironolaktonu, jako substancji czynnej, w wybranych preparatach farmaceutycznych w postaci tabletek i kapsułek,
- optymalnymi warunkami chromatograficznymi, pozwalającymi na identyfikację spironolaktonu techniką NP-TLC w ekstraktach jego preparatów farmaceutycznych, są: płytki szklane pokryte żelem krzemionkowym 60F<sub>254</sub> (Art. 1.05715) oraz mieszanina: chloroform + aceton w stosunku objętościowym 45:5 (v/v). Dla tych warunków chromatograficznych otrzymuje się optymalne wartości  $R_f$  spironolaktonu, tj. w przedziale 0,3–0,6,
- analiza jakościowa spironolaktonu w preparatach farmaceutycznych techniką RP-TLC, z użyciem mieszaniny chloroform + kwas octowy w różnych stosunkach objętościowych, nie jest efektywna w identyfikacji spironolaktonu w preparatach farmaceutycznych. Bez względu na zastosowany skład fazy ruchomej uzyskuje się wartości  $R_f$  znacznie wyższe niż zalecane przez FP, tj. w przedziale 0,85–0,99,



**Rycina 4.** Dendrogram podobieństwa wartości  $R_f$  spironolaktonu otrzymanych na różnych płytkach chromatograficznych

- substancje pomocnicze wchodzące w skład badanych preparatów farmaceutycznych (Spironol i Verospiron) nie wpływają na analizę chromatograficzną spironolaktonu w badanych preparatach farmaceutycznych, zarówno techniką NP-TLC, jak i RP-TLC.

Otrzymano: 2009.11.24 · Zaakceptowano: 2009.12.20

## Piśmiennictwo

1. Farmakopea Polska. Wyd. VI. Warszawa: Wydawnictwo PTFarm, 2002.
2. Podlewski J. K., Chwalibogowska- Podlewska A.: Leki współczesnej terapii. Wyd. XVII. Warszawa: Split Trading Sp. z o. o., 2005.
3. Kostowski W.: Farmakologia: Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2001.
4. Belal F.: Polarographic behaviour and determination of spironolactone. *Microch. Act.* 1992, 107, nr 1–2, 11–17.
5. Al- Chamdi A. H., Al- Ghamdi A. F., Al-Omar M.A.: Electrochemical studies and square-wave adsorptive stripping voltammetry of spironolactone drug. *Anal. Lett.* 2008, 41(1): 90–103.
6. Sandall J.M., Millership J.S., Collier P.S., Mc Elnay J.C.: Development and validation of an HPLC method for the determination of spironolactone and its metabolites in paediatric plasma samples. *J. Chromatogr. B.* 2006, 839(1–2): 36–44.
7. Overdiek J.W., Hermenes W.A., Merkus F.W.: Determination of the serum concentration of spironolactone and its metabolites by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1985, 341(2): 279–285.
8. Jankowski A., Skorek-Jankowska A., Lamparczyk H.: Simultaneous determination of spironolactone and its metabolites in human plasma. *J. Pharm. Biomed Anal.* 1996, 14(8–10): 1359–1365.
9. Chen H., Wang X. Y., Yang Z. D., Li Y. Ch.: Novel spironolactone – analogs as impurities in spironolactone. *Steroids.* 2004, 69(10): 647–652.
10. Farmakopea Polska. Wyd. VIII. Warszawa: Wydawnictwo PTFarm, 2008.
11. Brunelli C., Bicchi C., Di Stilo A., Salomone A., Vincenti M.: High-speed gas chromatography in doping control: fast GC and fast GC-MS determination of beta- adrenoceptor ligands and diuretics. *J. Sep. Sci.* 2006, 29(18): 2765–2771.

*Badania finansowane przez Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach z umowy KNW-2-023/09*