

УДК 543.426; 546.661; 541.49

С. В. Бельтюкова¹, О. І. Теслюк², О. О. Лівенцова¹¹Одеська національна академія харчових технологій, кафедра харчової хімії та експертизи, 65039, м.Одеса, Канатна, 112, e-mail: liventsova.helen@gmail.com²Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України, відділ аналітичної хімії та фізико-хімії координаційних сполук, 65080, м. Одеса, Люстдорфська дорога, 86, e-mail: olgateslyuk@rambler.ru

СОРБЦІЙНО-ЛЮМІНЕСЦЕНТНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ОРОТОВОЇ КИСЛОТИ В ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТАХ

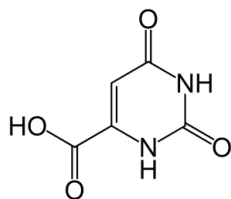
Вивчено люмінесцентні властивості оротової кислоти (ОК), вітаміна В₁₃, що є біологічно активною речовиною. Показано, що в комплексній сполуці оротової кислоти з іонами Tb (III) здійснюється внутрішньомолекулярне перенесення енергії збудження від ліганда до іона лантаніди, в результаті чого спостерігається сенсibilізована люмінесценція іона Tb (III). У середовищі неіонних і катіонних ПАР інтенсивність люмінесценції (I_{люм}) Tb (III) зростає. Встановлено, що в шарі твердої фази внаслідок закріплення аналіта на полімерній матриці сорбента і збільшенням жорсткості його молекули, спостерігається більш ефективно перенесення енергії збудження і зростання I_{люм} комплексу. Вивчено інтенсивність люмінесценції сорбата комплексу Tb (III) з оротовою кислотою на сорбентах різного типу. Оптимальний результат, досягнутий при використанні в якості твердої матриці силікагеля Merk. Повнота вилучення комплексу з розчину при цьому досягає 97 %. Знайдено оптимальні умови виділення ОК. На підставі проведених досліджень розроблена методика твердофазного люмінесцентного визначення оротової кислоти та її солей в лікарських препаратах.

Ключові слова: твердофазна люмінесценція, тербій, оротова кислота.

Оротова кислота (ОК) (2,6-дігідроскіпіримідин-4-карбонова кислота), вітамін В₁₃ відноситься до піримідинових похідних і є біологічно активною речовиною. Утворюється як один з проміжних продуктів синтезу піримідинових основ нуклеїнових кислот в живих організмах. Лікарські препарати на основі калієвої і магнієвої солей оротової кислоти використовуються в медичній практиці в якості стимуляторів обмінних процесів в організмі.

Для визначення оротової кислоти використовують полярографічний [1], методи високоефективної рідинної [2] і йонообмінної [3] хроматографії, ферментативні [4,5]. Сенсibilізована люмінесценція Tb (III) в комплексі з оротовою кислотою запропонована для визначення останньої в роботах [6–9].

Метою даної роботи була розробка методики сорбційно-люмінесцентного визначення оротової кислоти в лікарських препаратах з використанням твердофазної сенсibilізованої люмінесценції іона Tb (III).



АПАРАТУРА І ТЕХНІКА ЕКСПЕРИМЕНТУ

Розчин оротата калія (0,01 моль/л) і поверхнево-активних речовин (ПАР) (етонія, неонол 9–12, Тритона X-10) готували розчиненням точних наважок речовин в дистильованій воді. У роботі використовували стандартний розчин хлориду тербія (1 × 10⁻² моль/л), який готували з відповідного оксиду марки «ОСЧ», шляхом

розчинення його в хлористоводневій кислоті (1: 1), з подальшим видаленням її надлишку упарюванням. Концентрацію тербія (III) контролювали комплексонометричним титруванням розчином комплексона III з індикатором арсеназо I в присутності уротропіну [10]. Люмінесценцію іонів тербія (III) реєстрували в області 470–640 нм за допомогою спектрометра ІСП-51 з фотоелектричною приставкою ФЕП-1, спектрофлуориметра «Fluorolog FL 3–22», «Horiba Jobin Yvon» (безозону Хе-лампа 450-W). Для вивчення кінетики загасання люмінесценції застосовували осциллографічну рестрацію. Люмінесценцію при цьому збуджували імпульсним азотним лазером з довжиною хвилі випромінювання 337 нм. Значення рН розчинів вимірювали рН-метром ОР-211/1 (Radelkis). Вимірювання проводили при температурі 20 ± 2 °С.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Раніше [6] нами було показано, що в комплексній сполуці іонів Тб (III) з оротовою кислотою здійснюється внутрішньомолекулярне перенесення енергії збудження від ліганда до іона лантаніда, завдяки чому спостерігається сенсibilізована люмінесценція іона Тб (III). Встановлено, що в присутності неіонних і катіонних ПАР інтенсивність люмінесценції Тб (III) зростає. В спектрі люмінесценції іона Тб (III) при цьому спостерігаються смуги, відповідні енергетичним переходам $^5D_4 \rightarrow ^7F_6$ ($\lambda = 487,5$ нм), $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$ ($\lambda = 544,3$ нм), $^5D_4 \rightarrow ^7F_4$ ($\lambda = 585$ нм) і $^5D_4 \rightarrow ^7F_3$ ($\lambda = 620$ нм), найбільш інтенсивною є смуга, що відповідає електродипольному переходу $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$ з максимумом люмінесценції при $\lambda = 545$ нм. У присутності катіонного ПАР етонія (1,2-етилен-біс-(N-децилоксикарбонілметіл-N, N-диметіламоній) дихлорид) в концентрації $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л $I_{\text{люм}}$ цієї смуги зростає в 2 рази (рис. 1).

В спектрі збудження Тб (III) в комплексі з оротовою кислотою є одна смуга з максимумом при 324 нм (рис. 2).

У присутності ПАР характер спектра не змінюється, проте збільшується інтенсивність смуги. Зростання $I_{\text{люм}}$ спектрів збудження і люмінесценції відбувається в результаті витіснення молекул води з внутрішньої координаційної сфери комплексу, в результаті чого зменшується безвипромінювальна дезактивація енергії збудження і відбувається більш ефективно перенесення її на іон лантаніда. Підтвердженням цього факту також є збільшення часу життя збудженого стану комплексу Тб (III) з оротовою кислотою в присутності етонію $\tau = 1233$ мс (за відсутністю ПАР $\tau = 965$ мс).

Інтенсивність люмінесценції оротата тербія значно зростає на сорбентах. Переваги сорбційного метода пов'язані не тільки з суміщенням концентрування і отриманням придатної для тестування форми аналіта, а й зі збільшенням кінетичної стійкості сполуки в середовищі сорбента в порівнянні з стійкістю в розчині [11]. Прямим наслідком цього є збільшення жорсткості молекули аналіта внаслідок його закріплення на твердій матриці сорбента, що призводить до більш ефективного переносу енергії збудження і, відповідно, до збільшення $I_{\text{люм}}$. Вивчення $I_{\text{люм}}$ оротата калія на сорбентах різної природи показало, що найбільша інтенсивність люмінесценції спостерігається на силікагелі Merk (табл. 1). Повнота вилучення комплексу з розчину при цьому досягає 97%.

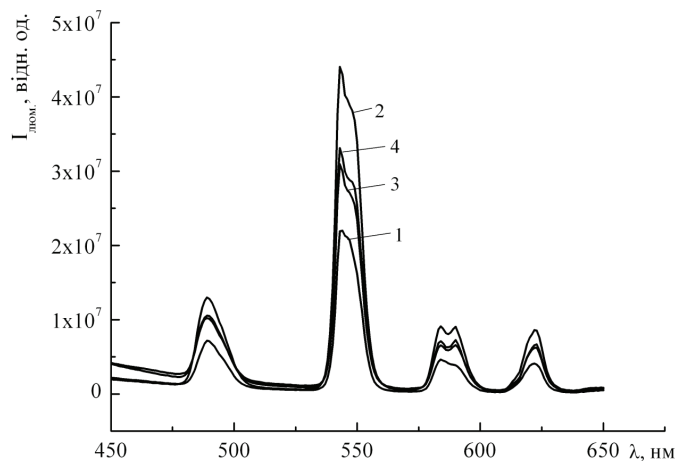


Рис. 1. Спектри люмінесценції Tb(III) в комплексі з оротовою кислотою (1) в присутності Етонія (2), Неонол 9–12 (3), Тритон X-100 (4); ($C_{Tb(III)} = 1 \cdot 10^{-2}$ моль/л; $C_{ПАР} = 5 \cdot 10^{-5}$ моль/л; рН 7,0; $\lambda_{збуд} = 365$ нм)

Fig. 1. The luminescence emission spectra of Tb (III) complex with orotic acid (1) in the presence of Etonium (2), Neonol 9–12 (3), Triton X-100 (4); ($C_{Tb(III)} = 1 \cdot 10^{-2}$ mol/L, $C_{surf} = 5 \cdot 10^{-5}$ mol/L, $\lambda_{ex} = 365$ nm)

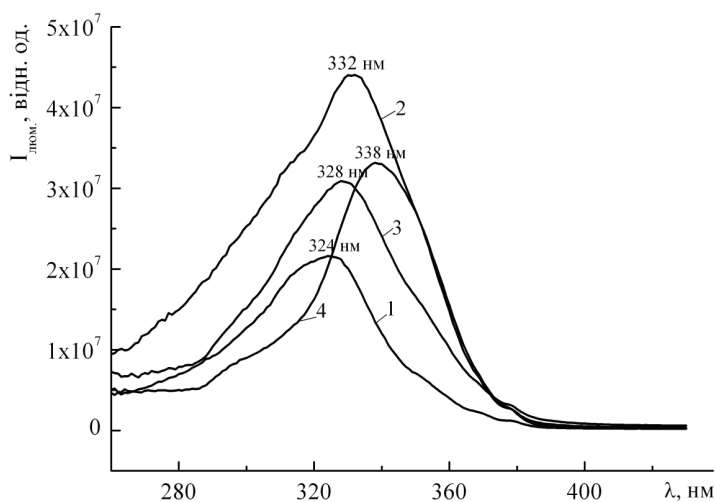


Рис. 2. Спектри збудження люмінесценції Tb(III) в комплексі з оротовою кислотою (1) в присутності Етонія (2), Неонол 9–12 (3), Тритон X-100 (4); ($C_{Tb(III)} = 1 \cdot 10^{-2}$ моль/л; $C_{ПАР} = 5 \cdot 10^{-5}$ моль/л; $\lambda_{збуд} = 365$ нм)

Fig. 2. Luminescence excitation spectra of Tb (III) in complex with orotic acid (1) in the presence of Etonium (2), Neonol 9–12 (3), Triton X-100 (4); ($C_{Tb(III)} = 1 \cdot 10^{-2}$ mol/L, $C_{surf} = 5 \cdot 10^{-5}$ mol/L, рН 7,0; $\lambda_{ex} = 365$ nm)

Таблиця 1

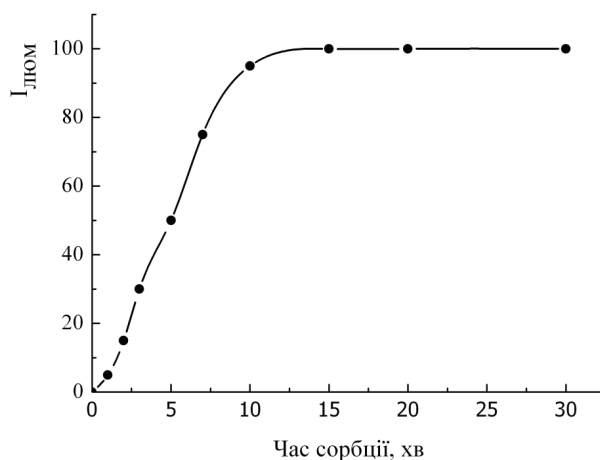
**Інтенсивність люмінесценції сорбата комплексу Tb(III)
з оротовою кислотою на сорбентах різного типу**

Table 1

**The luminescence intensity of the Tb (III) sorbate complex
with orotic acid on sorbents of various types**

Сорбент	$I_{\text{люм.}}$, відн.од.	$I_{\text{люм.}}$, %
Фосфологель	10	16
Софадекс Sf G-75	13	21
Calflo E	22	35
Целіт 545	18	29
Силікагель Merk	62	100

Встановлено, що максимальне значення інтенсивності люмінесценції досягається при проведенні сорбції з 5 мл розчину з використанням 100 мг сорбенту. Дослідження кінетики сорбції оротата тербія з розчину показало, що максимальне значення люмінесцентного сигналу сорбата досягається за 10–15 хвилин струшування. При більш тривалому струшуванні $I_{\text{люм}}$ комплексу на сорбенті залишається практично незмінною (рис. 3).

Рис. 3. Вплив часу сорбції на $I_{\text{люм}}$ сорбату комплексу Tb(III) з оротовою кислотою.Fig. 3. The effect of sorption time on I_{lum} of the Tb (III) sorbate complex with orotic acid.

Сорбція комплексу оротата тербія (III) на поверхні силікагелю відбувається в області рН від 4,5 до 9, максимальна $I_{\text{люм}}$ сорбата спостерігається при рН 7,0. Оптимальне значення рН при сорбції створювали за допомогою уротропіна. $I_{\text{люм}}$ сорбата зростає зі збільшенням концентрації іонів металу в розчині, з якого ве-

деться сорбція. Для подальших досліджень була обрана концентрація тербія (III) $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л, при якій спостерігається максимальна $I_{\text{люм}}$. Встановлено, що найбільше значення інтенсивності аналітичного сигналу сорбата Tb(III) з оротовою кислотою досягається при висушуванні протягом 10–15 хвилин при температурі 60 °С. Інтенсивність люмінесценції сорбата комплексу не змінюється протягом кількох місяців і залишається постійною протягом 15 хв опромінювання УФ-світлом, що свідчить про фотостабільність.

Знайдено, що інтенсивність люмінесценції сорбата комплексу максимальна при сорбції з водних розчинів (табл. 2). Введення таких органічних розчинників як ацетонітрил, диметилформамід, диметилсульфоксид викликає значне зниження аналітичного сигналу. В присутності цих розчинників зростає ступінь безвипромінювальних витрат енергії збудження. Крім того, завдяки наявності донорних атомів кисню в ДМСО і азоту в ДМФА, з якими координуються іони лантанідів, ці розчинники проявляють властивості лігандів і витісняють молекули ліганда з внутрішньої координаційної сфери іона Tb (III), в результаті чого $I_{\text{люм}}$ зменшується.

Таблиця 2

Вплив розчинників на $I_{\text{люм}}$ сорбатів комплексу Tb(III) з оротовою кислотою

Table 2

The effect of solvents on I_{lum} sorbates of the Tb (III) complex with orotic acid

Розчинник	вода	етанол	метанол	ацетонітрил	ДМСО	ДМФА
$I_{\text{люм}}, \%$	100	45	30	35	60	55

Так само як і в розчинах, при сорбції інтенсивність люмінесценції сорбата комплексу зростає в присутності катіонного димерного ПАР етонія. Зменшення $I_{\text{люм}}$ сорбатів комплексів, отриманих з розчинів в присутності ПАР, які мають іншу природу, може бути пов'язано з солубілізацією комплексів в розчинах і зменшенням за рахунок цього ступеня їх сорбції.

На підставі отриманих результатів розроблена методика сорбційно-люмінесцентного визначення діючої речовини в лікарських препаратах оротатах калія і магнія.

Методика кількісного визначення оротової кислоти та її солей

Побудова градууювального графіка

В ряд склянок поміщають по 100 мг силікагеля, вносять 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 мл робочого розчину оротової кислоти (100 мкг/мл). У кожен додають по 1 мл розчину хлориду тербія (0,01 моль/л), 0,4 мл розчину етонію (0,01 моль/л), 0,2 мл 4% -ного водного розчину уротропіна. Обсяг розчинів доводять до 5 мл дистильованою водою і при перемішуванні проводять сорбцію протягом 10 хв. Потім фільтрують і висушують протягом 15 хв при температурі 60 °С в сушильній шафі. Паралельно готують розчин «холостої» проби, яка містить всі компоненти крім оротової кислоти. Інтенсивність люмінесценції сорбата Tb (III) вимірюють при $\lambda_{\text{люм}} = 545$ нм ($\lambda_{\text{збудж}} = 365$ нм). Будують градууювальний графік залежності інтенсивності люмінесценції сорбата від концентрації оротата тербія (рис. 4).

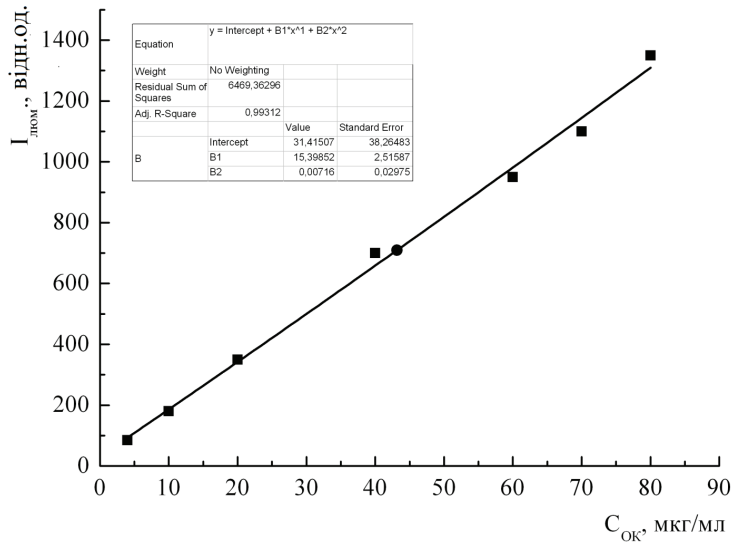


Рис. 4. Градувальний графік для визначення оротової кислоти;
($C_{\text{Тб (III)}} = 1 \cdot 10^{-2}$ моль/л; pH 7,0; $\lambda_{\text{збуд}} = 365\text{nm}$)

Fig. 4. Calibration curve for determination of orotic acid;
($C_{\text{Тб (III)}} = 1 \cdot 10^{-2}$ mol /l; pH 7,0; $\lambda_{\text{ex}} = 365$ nm)

Методика визначення солей оротової кислоти в лікарських формах «таблетки»
Визначення солей оротової кислоти проводили в лікарських препаратах «Магнерот» і «Калію оротат». 2 таблетки препарату розтирали в ступці до порошкоподібного стану. Наважку 100 мг порошку переносили в мірну колбу об'ємом 500 мл, розчиняли в 250 мл дистильованої води, перемішували, доводили до мітки дистильованою водою і фільтрували. З отриманого розчину для аналізу брали 1 мл фільтрату, поміщали в склянку і далі робили так само, як і при побудові градувального графіка. Вміст оротату визначали по градувальним графіком, вміст діючої речовини в одній таблетці в грамах розраховували за формулою:

$$C_x = \frac{C \cdot V_0 \cdot V_1 \cdot b}{10^6 \cdot V \cdot a}$$

C – концентрація ОК знайдена за градувальним графіком, мкг/мл;
 V_0 – об'єм приготовленого розчину (500 мл), мл;
 V_1 – розведення, мл;
 b – середня маса таблетки, г; 10^6 – перерахунок у грами;
 a – наважка препарату, г.

У табл. 3 представлені результати аналізу лікарських препаратах «Магнерот» і «Калію оротат» у перерахуванні на солі оротової кислоти.

Таблиця 3

Результати визначення солей оротової кислоти в дозованих лікарських формах
«таблетки» (n = 5, P = 0,95)

Table 3

Results of determination of orotic acid salts in dosage forms of “tablets”
(n = 5, P = 0,95)

Лікарська форма	Знайдено, X_i	Знайдено, $X_{cp} \pm \Delta X$	S_r
Магнерот 500 мг таблетки № 50 (Woerwag Pharma, Німеччина)	0,5023	0,4999±0,0110	0,036
	0,4972		
	0,4961		
	0,5014		
	0,5028		
Калія оротат 500 мг таблетки № 10 (ПАО НПЦ «Борщагівський ХФЗ» (Україна, Київ))	0,5008	0,5003±0,0142	0,043
	0,4998		
	0,5012		
	0,5010		
	0,4989		

Запропонована методика характеризується задовільними метрологічними характеристиками і досить проста у виконанні.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Palecek O., Jelen F., Manousek O.* Reaction of based of nuclear acid with mercuri electrode. *Collect // Czech. Chem. Commun.* – 1980. – Vol. 45, N 12. – P. 3460-3461. <https://doi.org/10.1135/cccc19803460>
2. *Evans J.E., Tieckelmann H.* Measurement of urinary pyrimidine bases and nucleosides by high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. - Diomed app.* – 1979. – Vol. 163, N 1. – P. 29-36. [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(00\)81165-2](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(00)81165-2)
3. *Backmann C., Colombo J.* Determination of orotic acid in children's urinae // *Z. Klin. Chem. Und Klin. Biochem.* – 1980. – Vol. 18, N 5. – P. 293-295. <https://doi.org/10.1515/cclm.1980.18.5.293>
4. *Tax W., Veerkamp J.* The urinary excretion of orotic acid and orotidine, measured by an isotope dilution assay // *Clin. Chem. Acts.* – 1978. – Vol. 90, N 3. – P. 217-223. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(78\)90260-7](https://doi.org/10.1016/0009-8981(78)90260-7)
5. *Anastasi G., Antonelli M., Biordi A., Vinci G.* Orotic acid: a milk constituent: Enzymatic determination by means of a new microcalorimetric method. // *Talanta.* – 2000. – Vol. 52, N 5. – P. 947-952. [https://doi.org/10.1016/s0039-9140\(00\)00433-1](https://doi.org/10.1016/s0039-9140(00)00433-1)
6. *Кравченко Т.Б., Бельтюкова С.В., Грицай Т.Л.* Люмінесцентні свойства оротата тербія и использование его в анализе // *Укр. хим. журн.* – 1982. – Т. 48. № 9. – С. 972-975.
7. *Arnaud N., Georges J.* Effect of surfactants in the determination of orotic acid in aqueous solutions by sensitized terbium fluorescence // *Analyst.* – 1994. – Vol. 119. – P. 2453–2456. <https://doi.org/10.1039/AN9941902453>
8. *Schreurs M., Vissers J., Gooijer C., Velthorst N.* Determination of orotate by liquid chromatography with sensitized lanthanide ion luminescence detection // *Anal. Chim. Acta.* – 1992. – Vol. 262. – P. 201–208. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(92\)80056-D](https://doi.org/10.1016/0003-2670(92)80056-D)
9. *Milofsky R., Spaeth S.* Determination of orotic acid in aqueous solutions by micellar electrokinetic capillary chromatography using sensitized lanthanide, ion luminescence detection // *Chromatogr.* – 1996. – Vol. 4, N 2. – P. 12–16. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(93\)e0409-j](https://doi.org/10.1016/0378-4347(93)e0409-j)
10. *Бусев А.И., Туцова В.Г., Иванов В.М.* Руководство по аналитической химии редких элементов. М.: Химия. – 1978, 432 с.
11. *Золотов Ю.А., Иванов В.А., Амелин В.Г.* Химические Тест-методы анализа. М.: Едиториал УРСС. – 2002, 304 с.

Стаття надійшла до редакції 01.12.2020

С. В. Бельтюкова¹, О. И. Теслюк², Е. О. Ливенцова¹

¹Одесская национальная академия пищевых технологий, кафедра пищевой химии и экспертизы, 65039, г.Одесса, Канатная, 112, e-mail: liventsova.helen@gmail.com

²Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины, отдел аналитической химии и физико-химии координационных соединений, 65080, г. Одесса, Люстдорфская дорога, 86, e-mail: olgateslyuk@rambler.ru

**СОРБЦИОННО-ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ
ОРОТОВОЙ КИСЛОТЫ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ
ПРЕПАРАТАХ**

Изучены люминесцентные свойства оротовой кислоты (ОК), витамина В₁₃, являющейся биологически активным веществом. Показано, что в комплексном соединении оротовой кислоты с ионами Tb(III) осуществляется внутримолекулярный перенос энергии возбуждения от лиганда к иону лантанида, в результате чего наблюдается сенсibilizированная люминесценция иона Tb(III). В среде неионных и катионных ПАВ интенсивность люминесценции (I_{люм}) Tb(III) возрастает. Установлено, что в слое твердой фазы вследствие закрепления аналита на полимерной матрице сорбента и увеличения жесткости его молекулы, наблюдается более эффективный перенос энергии возбуждения и увеличение I_{люм} комплекса. Изучена интенсивность люминесценции сорбата комплекса Tb(III) с оротовой кислотой на сорбентах различного типа. Оптимальный результат достигнут при использовании в качестве твердой матрицы силикагеля Merk. Полнота извлечения комплекса из раствора при этом достигает 97%. Найдены оптимальные условия выделения ОК. На основании проведенных исследований разработана методика твердофазного люминесцентного определения оротовой кислоты и ее солей в лекарственных препаратах.

Ключевые слова: твердофазная люминесценция, тербий, оротовая кислота.

S. V. Beltyukova¹, O. I. Teslyuk², E. O. Liventsova¹

¹Odessa National Academy of Food Technologies, Department of Food Chemistry and Expertise, 65039, Odessa, Kanatnaya str, 112, Ukraine, e-mail: liventsova.helen@gmail.com

²A. V. Bogatsky Physico-Chemical Institute, National Academy of Sciences of Ukraine, Department of Analytical Chemistry and Physical Chemistry of Coordination Compounds, Lustdorfskaya road, 86, Odessa, 65080, Ukraine, e-mail: olgateslyuk@rambler.ru

**SORPTION-LUMINESCENT DETERMINATION
OF OROTIC ACID IN MEDICINAL DRUGS**

Luminescent properties of orotic acid (vitamin B₁₃), known bioactive substance, have been evaluated in this research. It has been shown that inside a coordination complex of orotic acid with terbium (III) an intermolecular excitation energy transfer from a ligand to a lanthanide ion occurs which causes sensitization of terbium (III) ion luminescence. Intensity of the terbium (III) ion luminescence (I_{lum}) increases in the presence of anionic and cationic surface-active agents as a result of displacement of water molecules from coordination sphere of the complex.

As a consequence of this process, a non-radiative deactivation of excitation energy decreases and more efficient excitation energy transfer from a ligand to a lanthanide ion occurs. It has been established that after absorption of analyte of interest onto a polymer matrix of a solid phase extraction sorbent with subsequent increasing of its molecular rigidity more efficient

excitation energy transfer is observed followed by elevation of luminescence (I_{lum}) intensity of the coordination complex being studied. Intensity of luminescence of coordination complex of orotic acid with terbium (III) in the form of a sorbate salt has been estimated involving different types of sorbents (Phosphalugel, SFG-75, Calflo E, Celite 545, Silicagel Merck). Most suitable results have been achieved by the use of Silica gel Merck as a solid-phase matrix (sorbent). The removal rate of the complex from the solution in this case reaches to 97%. The most effective conditions for determination of orotic acid have been specified. The highest values of luminescence intensity is obtained by conducting of sorption using 5 mL of solution and 100 mg of sorbent. Luminescence intensity of the complex in the form of a sorbate salt, during a sorption process, increases in presence of ethonium, cationic dimeric surface-active agent. Decrease in luminescence intensity of the complexes in the form of a sorbate salt in presence of other surface-active agents may be caused by solubilization of the complex in the solution and thereby reduced level of its sorption.

On the basis of presented research work a new analytical procedure has been developed for the solid-phase luminescence determination of orotic acid and orotic acid salts in pharmaceutical drugs. Determination of orotic acid salts has been performed in pharmaceutical drugs 'Magnerot' (magnesium orotate) and 'Potassium orotate'. The proposed analytical procedure for determination of orotic acid salts is remarkable by good metrological characteristics and relative simplicity of performance. The relative standard deviation, Sr, is 3,6 - 4,3%.

Key words: solid-phase luminescence, terbium, orotic acid.

REFERENCES

1. Palecek O., Jelen F., Manousek O. *Reaction of based of nuclear acid with mercuri electrode*. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1980, vol. 45, no 12, pp. 3460-3461. <https://doi.org/10.1135/cccc19803460>
2. Evans J.E., Tieckelmann H. *Measurement of urinary pyrimidine bases and nucleosides by high-performance liquid chromatography*. *J. Chromatogr. - Diomed app.*, 1979, vol. 163, no 1, pp. 29-36. [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(00\)81165-2](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(00)81165-2)
3. Backmann C., Colombo J. *Determination of orotic acid in children's urinae*. *Z. Klin. Chem. Und Klin. Biochem.*, 1980, vol. 18, no 5, pp. 293-295. <https://doi.org/10.1515/cclm.1980.18.5.293>
4. Tax W., Veerkamp J. *The urinary excretion of orotic acid and orotidine, measured by an isotope dilution assay*. *Clin. Chem. Acts.*, 1978, vol. 90, no 3, pp. 217-223. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(78\)90260-7](https://doi.org/10.1016/0009-8981(78)90260-7)
5. Anastasi G., Antonelli M., Biordi A., Vinci G. *Orotic acid: a milk constituent: Enzymatic determination by means of a new microcalorimetric method*. *Talanta*, 2000, vol. 52, no 5, pp. 947-952. [https://doi.org/10.1016/s0039-9140\(00\)00433-1](https://doi.org/10.1016/s0039-9140(00)00433-1)
6. Kravchenko T.B., Bel'tyukova S.V., Gritsay T.L. *Lyuminestsentnyye svoystva orotata terbiya i ispol'zovaniye yego v analize*. *Ukr. khim. zhurn.*, 1982, vol. 48, no 9, pp. 972-975. (in Russian)
7. Arnaud N., Georges J. *Effect of surfactants in the determination of orotic acid in aqueous solutions by sensitized terbium fluorescence*. *Analyst*, 1994, vol. 119, pp. 2453-2456. <https://doi.org/10.1039/AN9941902453>
8. Schreurs M., Vissers J., Gooijer C., Velthorst N. *Determination of orotate by liquid chromatography with sensitized lanthanide ion luminescence detection*. *Anal. Chim. Acta*, 1992, vol. 262, pp. 201-208. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(92\)80056-D](https://doi.org/10.1016/0003-2670(92)80056-D)
9. Milofsky R., Spaeth S. *Determination of orotic acid in aqueous solutions by micellar electrokinetic capillary chromatography using sensitized lanthanide, ion luminescence detection*. *Chromatogr.*, 1996, vol. 4, no 2, pp. 12-16. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(93\)e0409-j](https://doi.org/10.1016/0378-4347(93)e0409-j)
10. Busev A.I., Tiptsova V.G., Ivanov V.M. *Rukovodstvo po analiticheskoy khimii redkikh elementov*. Moscow, Khimiya, 1978, 432 p. (in Russian)
11. Zolotov Yu.A., Ivanov V.A., Amelin V.G. *Khimicheskiye Test-metody analiza*. Moscow, Yeditorial URSS, 2002, 304 p. (in Russian)