



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 108407

(13) C2

(51) МПК

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 21/62 (2006.01)

G01J 3/42 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2013 07850

(22) Дата подання заявки: 20.06.2013

(24) Дата, з якої є чинними
права на винахід: 27.04.2015

(41) Публікація відомостей
про заявку: 25.11.2013, Бюл.№ 22

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: 27.04.2015, Бюл.№ 8

(72) Винахідник(и):

Запорожець Ольга Антонівна (UA),
Цирульнева Юна Володимирівна (UA)

(73) Власник(и):

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА
ШЕВЧЕНКА,

вул. Володимирська, 64, м. Київ, 01061,
Україна (UA)

(56) Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:

Murillo J.A. Simultaneous fluorimetric
determination of amiloride and triamterene in
urine using partial least-squares calibration /
J.A. Murillo, A.Alanon, P.Fernandez
//Abstracts and extendedabstracts of the 9th
ISLS Luminescence Symposium, Montpellier,
15-17 May 2000. Luminescence. - 2000. - 15. -
P. 100-101

Pulgarin Jose A. Direct analysis of amiloride
and triamterene mixtures by fluorescence
spectrometry using partial-least squares
calibration / Jose A. Murillo Pulgarin, Aurelia
Alanon Molina, Pablo Fernandez Lopez //
Anal. chim. acta.- 2001. - 449.- P. 179-187
SU 1076833 A, 28.02.1984
SU 1533491 A1, 07.08.1992

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ АМІЛОРИДУ ТА ТРІАМТЕРЕНУ В СЕЧІ

(57) Реферат:

Винахід належить до галузі аналітичної хімії і може бути використаний при аналізі сечі в клінічній медицині. Визначення амilorиду та триамтерену в сечі здійснюють методом молекулярної спектроскопії після розбавлення зразка. Амilorид визначають за власним світлопоглинанням при $\lambda=360$ нм, триамтерен - за власною люмінесценцією при $\lambda_{\text{люм}}=440$ нм ($\lambda_{36}=360$ нм), а кратність розбавлення сечі становить 2-20 разів. Застосування способу порівняно з прототипом дозволяє підвищити чутливість визначення амilorиду та триамтерену (межа виявлення з урахуванням 10-кратного розбавлення сечі становить 0,10 та 0,06 мг/л, відповідно) і вибірковість відносно інших діуретиків та розширити діапазон лінійності градуального графіка до 0,05-2,0 мг/л та 0,02-1,0 мг/л для амilorиду та триамтерену, відповідно.

UA 108407 C2

Запропонований спосіб належить до аналітичної хімії, зокрема до спектроскопічних методів визначення амілориду та тріамтерену, і може бути використаний при аналізі сечі.

В цій галузі прийнято використовувати такі терміни і скорочення:

ЛМ - люмінесцентний метод,

5 ГГ - градувальний графік.

Відомі способи люмінесцентного визначення амілориду [1] та тріамтерену [2], які включають попередню твердофазну екстракцію на нейлоновій мембрані та на дисках зі змішаною фазою, відповідно.

10 Основними недоліками цих методів є довготривалість аналізу, яка зумовлена необхідністю попереднього вилучення та концентрування аналіту шляхом твердофазної екстракції, та недостатня вибірковість через неможливість розділення амілориду та тріамтерену запропонованими способами.

Найбільш близьким до запропонованого способу є люмінесцентний спосіб, який полягає у застосуванні ізопотенціальної синхронної флуоресценції для уникнення заважаючого впливу матриці сечі та для окремого детектування амілориду та тріамтерену у суміші [3].

15 Визначення амілориду та тріамтерену здійснюється у цитратному буферному розчині (рН 6,3) у присутності етанолу. З метою усунення заважаючого впливу матриці сечі зразки розбавляють дистильованою водою у 50 разів та реєстрували тримірні спектри люмінесценції у діапазоні від 310,4 до 502,4 нм при довжинах хвиль збудження 220-412 нм.

20 Градувальний графік для визначення амілориду та тріамтерену з урахуванням 50-кратного розбавлення зразка сечі був лінійний в інтервалі 1,5-16 та 0,125-5 мг/л, відповідно. Межа виявлення в сечі амілориду та тріамтерену з урахуванням 50-кратного розбавлення, розрахована за 3s критерієм, становить 0,925 та 0,075 мг/л, відповідно.

25 Основним недоліком вказаного способу визначення амілориду і тріамтерену є необхідність 50-кратного розбавлення сечі, що призводить до відповідної втрати чутливості. Недостатньо вивчена вибірковість запропонованого методу визначення амілориду та тріамтерену щодо інших сторонніх речовин, зокрема діуретиків, обмежує можливості його застосування.

В основу винаходу поставлено задачу підвищення чутливості і вибірковості та розширення інтервалу лінійності градувального графіка для визначення амілориду і тріамтерену.

30 Поставлена задача підвищення чутливості визначення тріамтерену та амілориду вирішується за рахунок меншого ступеня розбавлення проби сечі: кратність розбавлення складає 10 замість 50 за прототипом. Межа виявлення амілориду та тріамтерену з урахуванням 10-кратного розбавлення становить 0,10 і 0,06 мг/л, відповідно.

35 Використання способу, що заявляється, дає змогу підвищити вибірковість за рахунок того, що амілорид у сечі не проявляє люмінесцентних властивостей на відміну від тріамтерену, що дає змогу визначати тріамтерен в присутності амілориду. Натомість тріамтерен у сечі не поглинає у видимому діапазоні світла на відміну від амілориду, що дає змогу визначати амілорид у присутності тріамтерену спектрофотометричним методом. Підвищення вибірковості запропонованого способу визначення амілориду та тріамтерену стосовно інших діуретиків

40 досягається за рахунок різниці їхніх люмінесцентних властивостей у сечі. Градувальний графік, що використовують для спектрофотометричного визначення амілориду в розбавленій в 10 разів сечі, лінійний у діапазоні концентрацій 0,05-2,0 мг/л, для люмінесцентного визначення тріамтерену - 0,02-1,0 мг/л. Рівняння градувальних графіків (ГГ) для визначення цих діуретиків у сечі мають вигляд:

$$45 \quad A_{360} = (0,245 \pm 0,001) C_{\text{амілориду}} \text{ (мг/л)},$$

$$I_{440} = (-7 \pm 5) + (2,36 \pm 0,05) 10^3 C_{\text{тріамтерену}} \text{ (мг/л)}.$$

Застосування люмінесцентного та спектрофотометричного способів у їхній комбінації, що базуються на різниці люмінесцентних та спектрофотометричних властивостей амілориду та тріамтерену в сечі, для визначення цих діуретиків у літературі не відомо, що дозволяє вважати запропонований спосіб таким, що відповідає критеріям "новизна" та "винахідницький рівень". Винахід ілюструється наступними прикладами, які не обмежують обсяг правової охорони:

Приклад 1

Побудова ГГ для визначення амілориду у водному розчині спектрофотометричним та люмінесцентним методом.

55 В колби ємністю 10,0 мл вводять стандартний розчин амілориду (0,1 мг/мл) об'ємом 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5 мл, додають по 0,01 мл 0,001 моль/л розчину HCl та дистильовану воду до мітки. Розчини переносять у кювету товщиною 1,0 см та вимірюють інтенсивність випромінювання при довжині хвилі 420 нм ($\lambda_{36} = 285$ нм) та світлопоглинання при довжині хвилі 360 нм проти розчину порівняння, що містить усі компоненти, окрім амілориду. Рівняння

градувальних графіків, побудованих у координатах $A_{360}=f(C_{\text{амілориду}})$ та $I_{420}=f(C_{\text{амілориду}})$ і мають вигляд:

$$A_{360}=(0,14\pm0,01)+(2,18\pm0,08) C_{\text{амілориду}} \text{ (мг/л)}, R^2=0,998,$$

$$I_{420}=(16\pm6)+(413\pm6) C_{\text{амілориду}} \text{ (мг/л)}, R^2=0,999.$$

- 5 Діапазон лінійності ГГ для визначення амілориду за спектром випромінювання зберігається у межах 0,001-0,500 мг/л, за спектром світлопоглинання 0,025-1,00 мг/л.

Приклад 2

Побудова ГГ для визначення тріамтерену у водному розчині спектрофотометричним та люмінесцентним методом.

- 10 В колби ємністю 10,0 мл вводять мікродозатором стандартний розчин тріамтерену (0,1 мг/мл) об'ємом 0,002, 0,005, 0,01, 0,02, 0,05 мл, вносять по 0,01 мл 0,001 моль/л розчину HCl та дистильовану воду до мітки. Розчини переносять в кювету товщиною 1,0 см та вимірюють інтенсивність випромінювання при довжині хвилі 440 нм ($\lambda_{36}=360$ нм) та світлопоглинання при довжині хвилі 370 нм проти розчину порівняння, що містить усі компоненти, окрім тріамтерену.
- 15 Рівняння градувальних графіків, побудованих у координатах $A_{370}=f(C_{\text{тріамтерену}})$, $I_{440}=f(C_{\text{тріамтерену}})$, має вигляд:

$$A_{370}=(0,005\pm0,001)+(0,131\pm0,002) C_{\text{тріамтерену}} \text{ (мг/л)}, R^2=0,999,$$

$$I_{440}=(2\pm1)+(3,80\pm0,03)\cdot 10^3 C_{\text{тріамтерену}} \text{ (мг/л)}, R^2=0,999.$$

- 20 Діапазон лінійності ГГ для визначення тріамтерену за спектром люмінесцентного випромінювання зберігається в межах 0,001-1,00 мг/л, за спектром світлопоглинання - 0,05-1,00 мг/л.

Приклад 3

Обґрунтування оптимальної довжини хвилі реєстрації аналітичного сигналу.

- 25 Для вибору оптимальної довжини хвилі в колбу ємністю 10,0 мл вносять аліквоту стандартного (0,1 мг/мл) розчину амілориду або тріамтерену, додають 0,01 мл 0,001 моль/л розчину HCl та дистильовану воду до загального об'єму 10 мл. Аліквоту приготовленого розчину переносять у кювету та вимірюють спектри поглинання, збудження та випромінювання у діапазоні довжин хвиль 190-500 нм. Максимуми випромінювання амілориду та тріамтерену спостерігаються при довжині хвиль 420 та 440 нм, а максимуми світлопоглинання при довжині хвиль 360 та 370 нм, відповідно.

Приклад 4

Вибір ступеню розбавлення сечі.

- 35 В дві пробірки для центрифугування вносять по 10 мл сечі, центрифугують 5 хв при 3000 об/хв. В п'ять колб на 10,0 мл вносять по 0,01 мл 0,1 мг/мл розчину амілориду або тріамтерену, по 0,01 мл 0,001 моль/л розчину HCl, по 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 5,0 мл сечі, що відповідає кратності розбавлення 2, 10, 20, 50 та 100 разів, та дистильовану воду до загального об'єму 10 мл. Розчини перемішують та вимірюють інтенсивність випромінювання амілориду та тріамтерену при довжині хвилі 420 та 440 нм, відповідно, та світлопоглинання при довжині хвилі 360 та 370 нм, відповідно, проти розчину порівняння, що містить усі компоненти, окрім амілориду та тріамтерену.

- 40 При 10-кратному розбавленні сечі амілорид не випромінює світло при 420 нм, а тріамтерен не поглинає світла при 370 нм.

Таблиця 1

Обґрунтування ступеня розбавлення сечі. Концентрація амілориду та тріамтерену 0,1 мг/л

Кратність розбавлення сечі, разів	Інтенсивність випромінювання тріамтерену, I_{440}	Інтенсивність поглинання амілориду, A_{360}
Водний розчин	382	0,35
Без розбавлення	25	0,005
2	100	0,020
10	230	0,024
20	230	0,024

- 45 Приклад 5

Обґрунтування оптимальної кислотності розчинів амілориду та тріамтерену.

В чотири колби ємністю 10,0 мл вносять по 0,01 мл розчину амілориду або тріамтерену (0,1 мг/мл), створюють рН 4, 6, 8, 10 додаванням 10^{-3} М HCl або NaOH, контролюючи скляним електродом за допомогою рН-метра, додають 1,0 мл сечі та доводять дистильованою водою до

мітки. Розчини переносять в кювету товщиною 1,0 см та вимірюють інтенсивність світлопоглинання амілориду при довжині хвилі 360 нм та інтенсивність випромінювання тріамтерену при довжині хвилі 440 нм проти розчину порівняння, що містить усі компоненти, окрім амілориду та тріамтерену. Найбільш інтенсивний сигнал спостерігається при pH 5,0-6,5.

5 Приклад 6

Визначення амілориду в сечі.

В колби ємністю 10,0 мл вводять стандартний розчин амілориду (0,1 мг/мл) об'ємом 0,02, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5 мл, вносять по 0,01 мл 0,001 моль/л розчину HCl, по 1,0 мл сечі та дистильовану воду до мітки (ступінь розбавлення сечі складає 10 разів). Розчини переносять в кювету товщиною 1,0 см та вимірюють інтенсивність світлопоглинання при довжині хвилі 360 нм проти розчину порівняння, що містить усі компоненти, окрім амілориду. Рівняння градувального графіка, побудованого у координатах $A_{360}=f(C_{\text{амілориду}})$ і має вигляд:

$$A_{360}=(0,245\pm0,001)C_{\text{амілориду}} \text{ (мг/л)}, R^2=0,999.$$

Діапазон лінійності ГГ в межах 0,05-2,0 мг/л амілориду.

15 Приклад 7

Визначення тріамтерену в сечі.

В колби ємністю 10,0 мл вводять мікродозатором стандартний розчин тріамтерену (0,1 мг/мл) об'ємом 0,002, 0,005, 0,01, 0,02, 0,05 мл, вносять по 0,01 мл 0,001 моль/л розчину HCl, по 1,0 мл сечі та дистильовану воду до мітки (ступінь розбавлення сечі складає 10 разів). Розчини переносять в кювету товщиною 1,0 см та записують спектри люмінесценції при 440 нм при довжині хвилі збудження 360 нм проти розчину порівняння, що містить усі компоненти, окрім тріамтерену. Рівняння градувального графіка, побудованого у координатах $I=f(C_{\text{тріамтерену}})$ і має вигляд:

$$I_{440}=(-7\pm5)+(2,36\pm0,05)\cdot 10^3 C_{\text{тріамтерену}} \text{ (мг/л)}, R^2=0,998.$$

25 Діапазон лінійності ГГ в межах 0,02-1,0 мг/л тріамтерену.

Приклад 8-13

Вплив інших діуретиків на результати визначення амілориду в сечі.

В 5 колб ємністю 10 мл вносять по 0,1 мл розчину амілориду (0,1 мг/мл), по 0,01-0,1 мл розчинів інших діуретиків, концентрація яких у межах 0,01-0,1 мг/л (Таблиця 2), та проводять всі операції, як у прикладі 6.

Концентрацію амілориду в розчині визначають за градувальним графіком, як у прикладі 6. Допустимим вважають такий вміст іншого діуретику, при якому відносна похибка не перевищує 5 %.

35 З таблиці 2 видно, що визначенню амілориду в сечі не заважають тріамтерен у 50-кратній та інші діуретики у стократній кількості.

Таблиця 2

Допустимі кількості інших діуретиків при визначенні 1 мг/л амілориду в сечі

Приклад №	Інші діуретики, X	Допустиме співвідношення Амілорид: X
8	Тріамтерен	1:50
9	Фуросемід	1:100
10	Буметанід	1:100
11	Бендрофлюметазид	1:100
12	Гідрохлортіазид	1: 100
13	Хлортіазид	1:100

Приклад 14-19

Вплив інших діуретиків на результати визначення тріамтерену в сечі.

40 В 5 колб ємністю 10 мл вносять по 0,01 мл розчину тріамтерену (0,1 мг/мл), по 0,01-0,5 мл розчинів інших діуретиків, концентрація яких у межах 0,01-0,1 мг/л (Табл. 3), та проводять всі операції, як у прикладі 7.

Концентрацію тріамтерену в розчині визначають за градувальним графіком, як у прикладі 7. Допустимим вважають такий вміст іншого діуретику, при якому відносна похибка не перевищує 5 %.

45 З табл. 3 видно, що визначенню тріамтерену в сечі не заважають фуросемід та буметанід у 50-кратній та інші діуретики у стократній кількості.

Таблиця 3

Допустимі кількості інших діуретиків при визначенні 0,1 мг/л тріамтерену в сечі

Приклад №	Інші діуретики, X	Допустиме співвідношення Тріамтерен: X
14	Амilorид	1:100
15	Фуросемід	1:50
16	Буметанід	1:50
17	Бендрофлюметіазид	1:100
18	Гідрохлортіазид	1:100
19	Хлортіазид	1:100

Приклад 20

Визначення амilorиду та тріамтерену в сечі.

- 5 Для визначення амilorиду та тріамтерену в сечі за наведеним способом у 5 здорових добровольців, які гарантовано не вживали діуретики, відбирали проби сечі. Зразки сечі зберігали в поліпропіленових пляшках при температурі -20 °С. Перед проведенням аналізу зразки розморожували та центрифугували при 3000 об/хв. У колби ємністю 10 мл вносять розчини амilorиду та тріамтерену (0,1 мг/мл), концентрація яких у межах 0,4-1,5 мг/л для
- 10 амilorиду та 0,09-0,4 мг/л для тріамтерену (Таблиця 4), та проводять всі операції, як у прикладі 6 або 7, відповідно. Записують спектри випромінювання при довжині хвилі 440 нм при довжині хвилі збудження 360 нм та спектри поглинання при довжині хвилі 360 нм.

Концентрацію амilorиду та тріамтерену визначають за ГГ, як у прикладах 6-7. Результати визначення амilorиду та тріамтерену у сечі наведено у таблиці 4.

15

Таблиця 4

Результати визначення добавок амilorиду та тріамтерену в сечі за розробленою методикою методом "введено-знайдено" (P=0,95, n=3)

Амilorид		Тріамтерен	
Введено, мг/л	Знайдено, мг/л	Введено, мг/л	Знайдено, мг/л
0,40	0,40±0,01	0,090	0,088±0,007
1,00	1,00±0,01	0,250	0,252±0,004
1,50	1,51±0,04	0,400	0,40±0,01

З таблиці видно, що дана методика характеризується задовільною точністю та відтворюваністю (відносне стандартне відхилення не перевищує 10 %). Даний спосіб придатний для визначення амilorиду та тріамтерену в сечі.

- 20 Таким чином, запропонований спосіб характеризується задовільними точністю, відтворюваністю та вибірковістю та дає змогу, порівняно з прототипом, підвищити чутливість визначення амilorиду в 9 разів, а тріамтерену в 1,3 разу, а також розширити діапазон лінійності грабуювального графіка для амilorиду з 3,2-16 мг/л у прототипі до 0,05-2,0 мг/л та для тріамтерену з 1-5 мг/л у прототипі до 0,02-1,0 мг/л.

25 Джерела інформації:

1. C.M. Peralta, L.P. Fernandez, A.N. Masi. Solid phase extraction using nylon membranes with fluorescence detection as a fast and sensitive method for Amiloride and Furosemide determination in urine samples. Microchemical Journal, 2011, 98, 39-43.

- 30 2. G.A. Ibanez, G.M. Escandar, A. Espinosa Mansilla, A. Munoz de la Pena. Determination of triamterene in pharmaceutical formulations and of triamterene and its main metabolite hydroxytriamterene sulfate in urine using solid-phase and aqueous solution luminescence. Analytica Chimica Acta, 2005, 538, 77-84.

3. J.A. Murillo Pulgarin, A.A. Molina, P.F. Lopez. Simultaneous Direct Determination of Amiloride and Triamterene in Urine Using Isopotential Fluorometry. Analytical Biochemistry, 2001, 292, 59-68.

35

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб визначення амілориду та тріамтерену в сечі методом молекулярної спектроскопії після розбавлення зразка, який **відрізняється** тим, що амілорид визначають за власним світлопоглинанням при $\lambda=360$ нм, тріамтерен - за власною люмінесценцією при $\lambda_{\text{люм}}=440$ нм, при $\lambda_{\text{аб}}=360$ нм, а кратність розбавлення сечі становить 2-20 разів.

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601