

Разработка методики определения амфотерицина В спектрофотометрическим методом в биологических средах

Л.В. Пашкова, Е.А. Ивановская, А.В. Лигостаев

ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия

АННОТАЦИЯ

Введение. Разработка методов определения концентрации применяемых противомикробных препаратов при различных патологических состояниях организма представляет большой интерес.

Цель. Разработка методики количественного определения амфотерицина В в сыворотке крови.

Материалы и методы. Использовали лекарственный препарат амфотерицина В для приготовления растворов. Оптическую плотность растворов определяли спектрофотометрическим методом.

Результаты. Апробирована методика количественного определения амфотерицина В в растворе натрия хлорида, наиболее близком по составу к биологическим жидкостям. Статистический анализ показал, что ошибка метода определения концентрации амфотерицина В не превышает 10 %.

Заключение. Разработана унифицированная методика спектрофотометрического определения амфотерицина В в сыворотке крови. Найдены оптимальные условия определения амфотерицина в биологических жидкостях: растворитель – 0.9% раствор натрия хлорида, длины волн – 363, 383 и 406 нм, t – 3–6 °С, определяемые концентрации – от $1.0 \cdot 10^{-2}$ до $1.0 \cdot 10^{-5}$ мг/л.

Ключевые слова: амфотерицин В, сыворотка крови, количественное определение, спектрофотометрия.

Образец цитирования: Пашкова Л.В., Ивановская Е.А., Лигостаев А.В. Разработка методики определения амфотерицина В спектрофотометрическим методом в биологических средах // Journal of Siberian Medical Sciences. 2022;6(2):122–130. DOI: 10.31549/2542-1174-2022-6-2-122-130

Development of a technique for amphotericin B determination by spectrophotometric method in biological fluids

L.V. Pashkova, E.A. Ivanovskaya, A.V. Ligostaev

Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

ABSTRACT

Introduction. The development of methods for determining the concentration of antimicrobial drugs used in various pathological conditions of the body is of great interest.

Aim. Development of a technique for quantitative determination of amphotericin B in blood serum.

Materials and methods. The drug amphotericin B was used for the preparation of solutions. The optical density of the solutions was determined by the spectrophotometric method.

Results. The method of quantitative determination of amphotericin B in sodium chloride solution, which is the closest in composition to biological fluids, has been tested. Statistical analysis showed that the error of the method for determining the concentration of amphotericin B does not exceed 10%.

Поступила в редакцию 10.06.2021
Прошла рецензирование 22.04.2022
Принята к публикации 11.05.2022

Автор, ответственный за переписку
Пашкова Леся Владимировна: ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. 630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52.
E-mail: pashkova.80@mail.ru

Received 10.06.2021
Revised 22.04.2022
Accepted 11.05.2022

Corresponding author
Lesya V. Pashkova: Novosibirsk State Medical University, 52, Krasnyy prospekt, Novosibirsk, 630091, Russia.
E-mail: pashkova.80@mail.ru

Conclusion. A unified method of spectrophotometric determination of amphotericin B in blood serum has been developed. The optimal conditions for the determination of amphotericin in biological fluids were found: the solvent – 0.9% sodium chloride solution, wavelengths – 363, 383 and 406 nm, t – 3–6°C, detectable concentrations – from $1.0 \cdot 10^{-2}$ to $1.0 \cdot 10^{-5}$ mg/l.

Keywords: amphotericin B, blood serum, quantitative determination, spectrophotometry.

Citation example: Pashkova L.V., Ivanovskaya E.A., Ligostaev A.V. Development of a technique for amphotericin B determination by spectrophotometric method in biological fluids. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2022;6(2):122–130. DOI: 10.31549/2542-1174-2022-6-2-122-130

ВВЕДЕНИЕ

Самым частым видом микоза является кандидоз [1]. В списке возбудителей кандидоза лидирующее место занимает *Candida (C.) albicans*. Этим видом грибов вызывается более 80 % кандидозов. Однако инфекция может быть вызвана и другими видами: *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*.

Когда терапия системных микозов такими антибиотиками, как флуконазол, не дает эффекта, следует предположить, что кандидоз вызван природно-резистентными видами кандид, например *C. krusei*. В этих случаях рекомендуется противогрибковая терапия эффективным, но потенциально токсичным препаратом амфотерицином В [2].

Амфотерицин В (фунгизон) оказывает фунгицидное действие широкого спектра, высоко эффективен при системных и глубоких микозах: кандидозе, аспергиллезе, криптококкозе, легочных микозах и др. Препарат довольно токсичен, но в ряде случаев его применяют в связи с его большой эффективностью [1].

Для контроля токсичности и эффективности проводимого лечения, изучения фармакокинетических параметров необходима адекватная и достоверная информация о концентрации препарата в крови, получаемая благодаря использованию в анализе высокочувствительных методов, к которым относятся физико-химические, в том числе спектрофотометрический метод [3–5], широко используемый в фармакологии, токсикологии и фармации для анализа лекарственных средств [6].

В настоящее время метод спектрофотометрии применяется и развивается в силу целого ряда принципиальных достоинств, а именно: относительной простоты и дешевизны аппаратуры, большого разнообразия определяемых веществ в широком диапазоне их концентраций, достаточной чувствительности, селективности и экспрессности, высокой автоматизации измерительного процесса [3–5].

INTRODUCTION

The most common type of mycosis is candidiasis [1]. *Candida (C.) albicans* occupies a leading place in the list of pathogens of candidiasis. This type of fungi causes more than 80% of candidiasis. However, the infection can also be caused by other species: *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*.

When therapy of systemic mycoses with antibiotics such as fluconazole has no effect, it should be assumed that candidiasis is caused by naturally resistant *Candida* species, for example *C. krusei*. In these cases, antifungal therapy with the effective but potentially toxic drug, amphotericin B is recommended [2].

Amphotericin B (Fungizone) is a broad-spectrum fungicidal agent, and is highly effective in systemic and deep mycoses: candidiasis, aspergillosis, cryptococcosis, pulmonary mycoses, etc. The drug is quite toxic, but in some cases it is used due to its great effectiveness [1].

To control the toxicity and effectiveness of the treatment, to study the pharmacokinetic parameters, the adequate and reliable information on the concentration of the drug in the blood is necessary, which can be obtained through the use of highly sensitive analytical methods, which include physicochemical, and among them the spectrophotometric method [3–5], widely used in pharmacology, toxicology and pharmacy for analysis of drugs [6].

Currently, the spectrophotometry method is used and developed due to a number of fundamental advantages, namely: relative simplicity and affordability of the equipment, a wide variety of determined substances in a wide range of their concentrations, sufficient sensitivity, selectivity and rapidity, high automation of the measuring process [3–5].

In this regard, it is of interest to study the possibility of using spectrophotometry for pharmacokinetic studies, in drug quality control and for the purposes of therapeutic monitoring of amphotericin B [6].

В связи с этим представляет интерес изучение возможности использования спектрофотометрии для фармакокинетических исследований, в контроле качества лекарственных средств и для целей терапевтического мониторинга амфотерицина В [6].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка простой, точной и недорогой методики количественного определения амфотерицина В в сыворотке крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования был использован препарат амфотерицина В для приготовления раствора, произведенный ОАО «Акционерное Курганское общество медицинских препаратов и изделий «Синтез» (г. Курган, Россия), растворитель – диметилсульфоксид и 0.9% раствор натрия хлорида, осадитель – спирт этиловый 95.6%.

Оптическую плотность растворов измеряли на спектрофотометре СФ-56 (Россия) в кюветах 10 мм относительно растворителя. Величину рН определяли с помощью универсального ионмера «Анион 4100» (Россия) [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для приготовления исходного раствора амфотерицина В брали 0.0250 г препарата и помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в 15 мл диметилсульфоксида и доводили объем раствора диметилсульфоксидом до метки. Из полученного раствора одновременно готовили два раствора: первый – 5 мл исходного раствора вносили в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили объем раствора спиртом метиловым до метки (раствор 1); второй – 1 мл исходного раствора вносили в мерную колбу вместимостью 200 мл и доводили объем раствора спиртом метиловым до метки (раствор 2).

Регистрировали спектры поглощения растворов 1 и 2 в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве растворов сравнения диметилсульфоксид – спирт метиловый (1:9) – для раствора 1 и спирт метиловый – для раствора 2.

Спектр поглощения для стандартного образца раствора 1 в диапазоне длин волн 260–300 нм имел максимумы поглощения при 273 и 283 нм; спектр поглощения для стандартного образца раствора 2 в диапазоне длин волн 350–420 нм имел максимумы поглощения при 363, 383 и 406 нм.

AIM OF THE RESEARCH

Development of a simple, correct and inexpensive method for the quantitative determination of amphotericin B in blood serum.

MATERIALS AND METHODS

As the object of the study, amphotericin B produced by JSC Sintez (Kurgan, Russia) was used for the preparation of a solution, dimethyl sulfoxide and 0.9% sodium chloride solution were used as solvents, 95.6% ethanol – as a precipitator.

The optical density of the solutions was measured on a SF-56 spectrophotometer (Russia) in 10 mm cells relative to the solvent. The pH value was determined using a universal Anion 4100 ion meter (Russia) [7].

RESULTS AND DISCUSSION

To prepare a stock solution of amphotericin B, 0.0250 g of the drug was taken and placed in a 25 ml flask, dissolved in 15 ml of dimethyl sulfoxide, and with the latter, the volume of the solution was brought to the mark. Two solutions were simultaneously prepared from the resulting stock solution: the first – 5 ml of the stock solution was placed into a 50 ml flask, and with methyl alcohol the volume of the solution was made to the mark (solution 1); the second – 1 ml of the stock solution was placed into a 200 ml flask, and with methyl alcohol the volume of the solution was made to the mark (solution 2).

Absorption spectra of solutions 1 and 2 were recorded in a cell with a layer thickness of 10 mm, using dimethyl sulfoxide and methanol (1:9) – for solution 1, and methanol – for solution 2, as blank solutions.

The absorption spectrum for the standard sample of solution 1 in the wavelength range of 260–300 nm had absorption peaks at 273 and 283 nm; the absorption spectrum for the standard sample of solution 2 in the wavelength range of 350–420 nm had absorption peaks at 363, 383 and 406 nm.

To select optimal conditions for sample preparation, 3 ml of venous blood was taken, in the fasted state, without the addition of any reagents. The obtained blood samples were centrifuged for 10 minutes, and the serum was analyzed. According to the literature data, quantitative analysis of medicines is carried out, as a rule, in a protein-free blood filtrate, i.e. after protein precipitation in one way or another. Precipitation is carried out using three groups of methods [3, 8, 9]:

1) addition of water-miscible organic solvents (ethanol, methanol, acetone, etc.): typically

Для подбора оптимальных условий пробоподготовки забирали 3 мл венозной крови, натощак, без добавления каких-либо реагентов. Полученные образцы крови подвергали центрифугированию в течение 10 мин и исследовали сыворотку. Согласно литературным данным количественный анализ лекарственных средств проводится, как правило, в безбелковом фильтрате крови, т.е. после осаждения белков тем или иным способом. Осаждение проводится с использованием трех групп методов [3, 8, 9]:

1) добавление смешивающихся с водой органических растворителей (этанол, метанол, ацетон и т.д.): как правило, используется 5–10-кратное количество растворителя по сравнению с объемом пробы;

2) добавление химических агентов для коагуляции белков: кислоты (трихлоруксусной, хлорной), ионов тяжелых металлов (например, бария) и т.д.;

3) термическая обработка.

Из выше описанных методов осаждения белков наиболее приемлемым оказался первый: в качестве осадителя использовался органический реагент – этанол 95.6%, благодаря которому достигалось полное осаждение белков из модельного раствора (сыворотка и амфотерецин В), что позволило использовать данный способ пробоподготовки для количественного определения концентрации препарата в биологическом объекте (рН = 5–6).

Методика осаждения: к 1.6 мл сыворотки добавляли 8.4 мл 95.6% этанола, чтобы конечная концентрация составила 75–80 %; смесь нагревали до кипения в течение 1–2 мин, охлаждали, центрифугировали в течение 10 мин и отделяли надосадочную жидкость. Затем готовили разведения на 0.9% растворе натрия хлорида (методом разбавления), температура натрия хлорида была не выше 6 °С.

В качестве фонового раствора был использован раствор 0.9% натрия хлорида, так как методу необходимо было адаптировать для сыворотки крови (рис. 1).

Спектр натрия хлорида подтверждает чистоту фонового раствора. Натрия хлорид при разбавлении амфотерицина В не влияет на спектр полученного амфотерицина В и его аналитического сигнала.

Для приготовления исходного раствора с концентрацией $1.0 \cdot 10^{-2}$ мг/л в мерный стаканчик на 10 мл помещали 0.1 мг стандартного

5–10 times the amount of solvent compared to the sample volume is used;

2) addition of chemical agents for protein coagulation: acid (trichloroacetic, perchloric), heavy metal ions (for example, barium), etc.;

3) baking.

Of the above described methods of protein precipitation, the first one turned out to be the most acceptable: an organic reagent, 95.6% ethanol, was used as a precipitator, thanks to which complete precipitation of proteins from the model solution (serum and amphoterecin В) was achieved, which allowed using this method of sample preparation for quantifying the concentration of the drug in a biological object (pH = 5–6).

Precipitation method: 8.4 ml of 95.6% ethanol was added to 1.6 ml of serum to make the final concentration 75–80%; the mixture was heated to a boil for 1–2 min, cooled, centrifuged for 10 min, and the supernatant was separated. Then dilutions were prepared using a 0.9% sodium chloride solution (by dilution), the temperature of sodium chloride was no higher than 6 °C.

A 0.9% sodium chloride solution was used as the blank solution, since the technique had to be adapted for blood serum (Fig. 1).

The spectrum of sodium chloride confirms the purity of the blank solution. Sodium chloride when diluting amphotericin В does not affect the spectrum of the resulting amphotericin В and its analytical signal.

To prepare the stock solution with a concentration of $1.0 \cdot 10^{-2}$ mg/l, 0.1 mg of a standard substance (dissolved substance according to Technical Specifications) was placed in a 10 ml dosing cup and a 0.9% sodium chloride solution was added to the mark. Preparation of a standard sample solution with a lower concentration was carried out by serial dilution of the stock solution. So, to prepare a standard solution with a concentration of $1.0 \cdot 10^{-3}$ mg/l, 1 ml of the stock solution was placed in a 10 ml dosing cup, and the volume of the solution was adjusted with 0.9% sodium chloride to the mark. Thus, solutions with a lower concentration were obtained by serial dilution. Then 0.5 ml of 0.9% sodium chloride, 0.5 ml of precipitated serum, 0.1 ml of the drug solution in sodium chloride with a concentration of $1.0 \cdot 10^{-3}$ mg/l were placed into a 10 mm cell – thus a dilution of $1.0 \cdot 10^{-4}$ mg/l was obtained. 0.9% sodium chloride was used as a blank solution.

The spectrum had absorption peaks at wavelengths of 363, 383 and 406 nm (Fig. 2).

From Fig. 2 it can be seen that the substances contained in the serum did not interfere with the

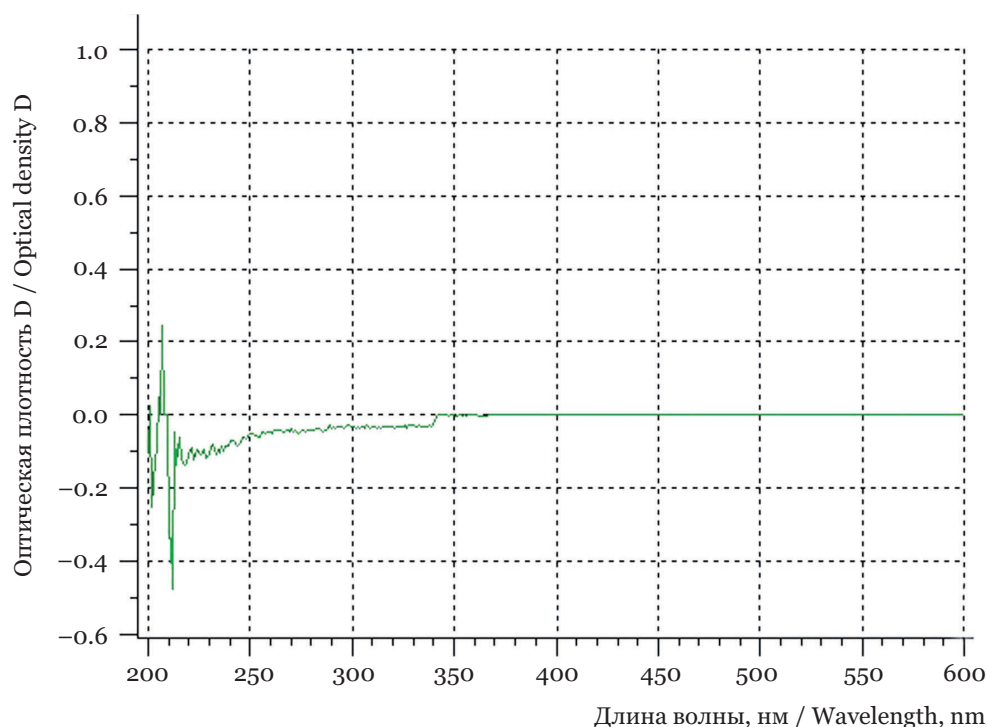


Рис. 1. Спектр 0.9% раствора натрия хлорида относительно воды
Fig. 1. Spectrum of a 0.9% sodium chloride solution relative to water

вещества (растворенного вещества по Техническим условиям (ТУ)) и добавляли 0.9% раствор натрия хлорида до метки. Приготовление раствора стандартного образца с меньшей концентрацией проводили путем последовательного разведения исходного раствора. Так, для приготовления стандартного раствора с концентрацией $1.0 \cdot 10^{-3}$ мг/л 1 мл исходного раствора помещали в мерный стаканчик на 10 мл и объем раствора доводили 0.9% натрием хлоридом до метки. Таким образом, путем последовательного разведения получали растворы с меньшей концентрацией.

Далее в кювету толщиной 10 мм наливали 0.5 мл 0.9% натрия хлорида, 0.5 мл осажденной сыворотки, 0.1 мл раствора препарата в натрия хлориде с концентрацией $1.0 \cdot 10^{-3}$ мг/л – таким образом получалось разведение $1.0 \cdot 10^{-4}$ мг/л. В качестве раствора сравнения использовали 0.9% натрия хлорид.

Спектр имел пики поглощения при длинах волн 363, 383 и 406 нм (рис. 2).

Из рис. 2 видно, что вещества, содержащиеся в сыворотке, не мешали определению амфотерицина В, так как в спектре поглощения амфотерицина В, зарегистрированном в диапазоне 240–600 нм, наблюдались характерные для него максимумы – 363, 383 и 406 нм, как и в ТУ для стандартного образца.

determination of amphotericin B, since in the absorption spectrum of amphotericin B in the range of 240–600 nm its characteristic peaks were observed – 363, 383 and 406 nm, as in the Technical Specifications for the standard sample.

To confirm the correctness of the developed method, spike recovery experiments were carried out (Tables 1–4). For the quantitative determination of amphotericin B, the standard addition method was used, according to which the concentration of the substance being determined was calculated by the formula

$$C_x = [(C_{st} \cdot V_{add}) / (V_c + V_{add}) \cdot I_x / (I_{sum} - I_x)],$$

where C_x – the concentration of the substance being determined, g/ml;

C_{st} – the concentration of the standard substance, g/ml;

V_{add} – the volume of the addition of the standard solution, ml;

V_c – the volume of the solution in the cell, ml;

I_x – signal value of the analyte, μA ;

$I_{sum} = I_{add} + I_x$, μA (I_{add} – the analytical signal value of the standard solution addition, μA).

Analyzing Table 1, it can be concluded that with an amphotericin B concentration of $1.0 \cdot 10^{-5}$ mg/l, the error did not exceed 10%, and the limit of quantitative determination was 0.00001 mg/l.

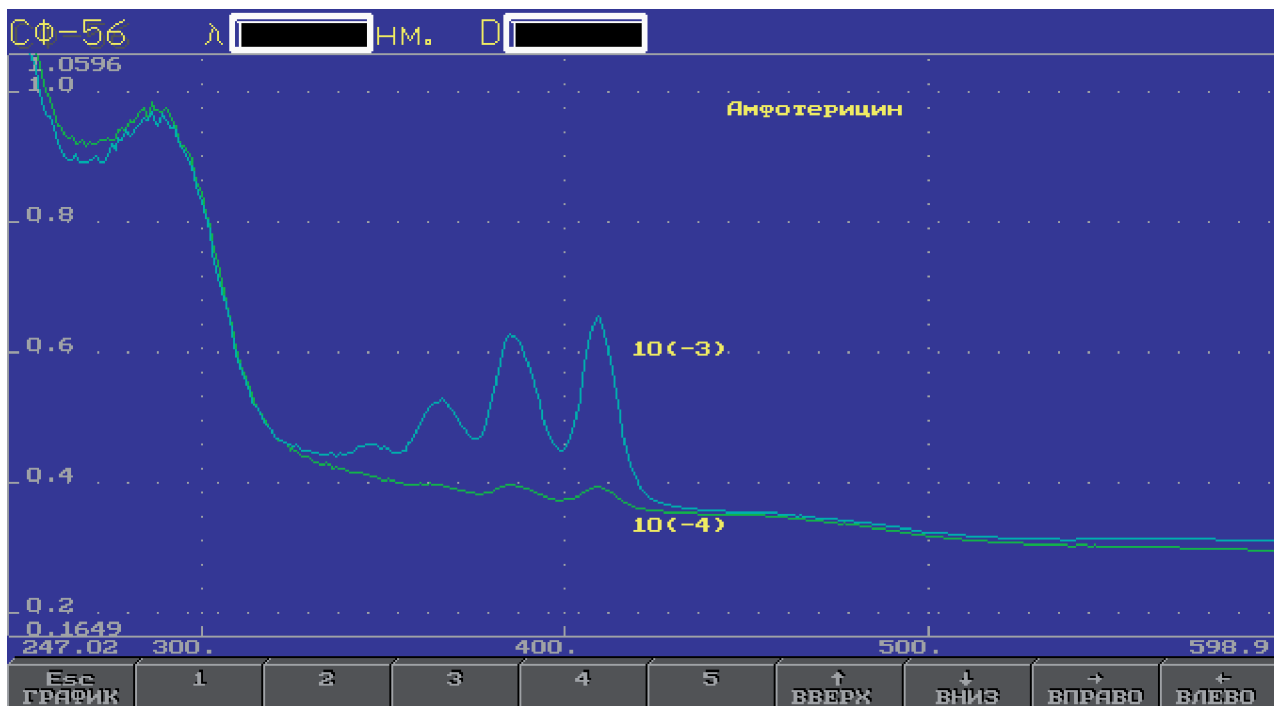


Рис. 2. Спектр амфотерицина В в сыворотке с концентрациями $1.0 \cdot 10^{-3}$ и $1.0 \cdot 10^{-4}$ мг/л, разбавленной 0.9% раствором натрия хлорида

Fig. 2. Spectrum of amphotericin B in serum with concentrations of $1.0 \cdot 10^{-3}$ and $1.0 \cdot 10^{-4}$ mg/l diluted with a 0.9% sodium chloride solution

Для подтверждения правильности разработанной методики провели эксперимент по методу «введено-найдено» (табл. 1–4). Для количественного определения амфотерицина В был использован метод стандартных добавок, согласно которому концентрацию определяемого вещества рассчитывали по формуле

$$C_x = [(C_{\text{ст}} \cdot V_{\text{доб}}) / (V_{\text{я}} + V_{\text{доб}})] \cdot I_x / (I_{\text{sum}} - I_x),$$

где C_x – концентрация определяемого вещества, г/мл;

$C_{\text{ст}}$ – концентрация стандартного вещества, г/мл;

$V_{\text{доб}}$ – объем добавки стандартного раствора, мл;

$V_{\text{я}}$ – объем раствора в ячейке, мл;

The advantage of the proposed method was rapidity – the time of a single analysis was 1 min (with the sample preparation – 15 min, including preparation of samples from 2 to 10 biological objects simultaneously).

CONCLUSION

For the first time, the optimal conditions (wavelength, precipitator, temperature regime, range of detectable concentrations) of the method for determining amphotericin B by spectrophotometric method in blood serum were determined: $\lambda = 363, 383$ and 406 nm; the solvent – a 0.9% sodium chlo-

Таблица 1. Результаты теста «введено-найдено» при определении концентрации амфотерицина В в сыворотке крови

Table 1. The results of the spike recovery experiment in determining the concentration of amphotericin B in blood serum

№ п/п No.	Истинное значение измеряемой величины μ , мг/л The true value of the measured parameter μ , mg/l	Средняя выборка X_{cp} Average sample X_{av}	Стандартное отклонение Standard deviation $S \cdot 10^{-6}$	Полуширина довери- тельного интервала ($X - X_{\text{cp}}$) $\cdot 10^{-6}$ Confidence interval half-width ($X - X_{\text{av}}$) $\cdot 10^{-6}$	Относительный процент ошибки Relative error percentage ε , %
1	0.01	$1.186 \cdot 10^{-2}$	1234.4	1143.0	9.64
2	0.001	$1.229 \cdot 10^{-3}$	136.2	126.0	10.27
3	0.0001	$1.400 \cdot 10^{-4}$	0.153	0.141	10.10
4	0.00001	$1.443 \cdot 10^{-5}$	1.573	1.457	10.10

Таблица 2. Результаты оценки повторяемости разработанной методики определения концентрации амфотерицина В в сыворотке крови**Table 2.** The results of the repeatability assessment of the developed method for determining the concentration of amphotericin B in blood serum

Номер измерения Measurement number	Концентрация амфотерицина В в сыворотке крови, мг/л Amphotericin B concentration in blood serum, mg/l
1	0.01186
2	0.01188
3	0.01179
4	0.01188
5	0.01183
6	0.01145
7	0.01226
8	0.00985
9	0.01388
10	0.01186

Примечание. Метрологические характеристики: $X_{cp} = 0.01186$; $S = 1.234 \cdot 10^{-3}$; $\varepsilon = 9.64\%$.Note. Metrological characteristics: $X_{av} = 0.01186$; $S = 1.234 \cdot 10^{-3}$; $\varepsilon = 9.64\%$.

I_x – величина сигнала определяемого вещества, мкА;

$I_{sum} = I_{доб} + I_x$, мкА ($I_{доб}$ – величина аналитического сигнала добавки стандартного раствора, мкА).

Анализируя табл. 1, можно сделать вывод, что при концентрации амфотерицина В $1.0 \cdot 10^{-5}$ мг/л ошибка не превышала 10 %, а предел количественного определения составил 0.00001 мг/л.

Преимуществом предложенной методики была экспрессность – время единичного анализа составляло 1 мин (с проведением пробоподготовки – 15 мин, включая пробоподготовку от 2 до 10 биологических объектов одновременно).

ride solution; t – from 3 to 6°C; range of detectable concentrations – from $1.0 \cdot 10^{-2}$ to $1.0 \cdot 10^{-5}$ mg/l.

Optimal conditions for the preparation of blood serum sample for the determination of amphotericin B were selected, while the volume of analyzed samples ranged from 0.5 to 1.0 ml, which will allow for pharmacokinetic studies of patients to be conducted in a sparing mode. The optimal protein precipitator has also been established, at which the precipitation of proteins in the biological sample under study (blood serum) occurs most completely.

The technique can be used to monitor concentrations with the selection of individual doses of the

Таблица 3. Статистическая обработка результатов внутрилабораторной прецизионности (число степеней свободы $F = 10$, доверительная вероятность $p = 95\%$, критическое значение t -критерия Стьюдента = 2.28)**Table 3.** Statistical processing of the results of intra-laboratory precision (number of freedom degrees $F = 10$, confidence probability $p = 95\%$, critical value of the Student's t -test = 2.28)

Номер измерения Measurement number	Метрологическая характеристика Metrological characteristics	Аналитик I Analyst I	Аналитик II Analyst II
1	Среднее значение амфотерицина В, мг/л Average value of amphotericin B, mg/l	0.01186	0.01172
2	Дисперсия S^2 Dispersion S^2	$2.1769 \cdot 10^{-7}$	$2.0054 \cdot 10^{-7}$
3	Стандартное отклонение S Standard deviation S	$1.234 \cdot 10^{-3}$	$0.934 \cdot 10^{-3}$
4	Относительная ошибка ε , % Relative error ε , %	9.64	9.05

Примечание. Критерий Фишера ($F = 1.21$); значение t -критерия Стьюдента = 0.01; значения статистически не значимы ($p = 0.994841$).Note. The Fisher's criterion ($F = 1.21$); the Student's t -test value = 0.01; values are not statistically significant ($p = 0.994841$).

Таблица 4. Результаты определения внутрилабораторной прецизионности
Table 4. Results of determination of intra-laboratory precision

Исполнитель Executor	Номер измерения Measurement number	Содержание амфотерицина В, мг/л Amphotericin B content, mg/l	Метрологические характеристики Metrological characteristics
Аналитик I Analyst I	1	0.01186	$X_{cp} (n = 10) = 0.01186$ $S = 1.234 \cdot 10^{-3}$ $\varepsilon = 9.64 \%$
	2	0.01188	
	3	0.01179	
	4	0.01188	
	5	0.01183	
	6	0.01145	
	7	0.01226	
	8	0.00985	
	9	0.01389	
	10	0.01186	
Аналитик II Analyst II	1	0.01082	$X_{cp} (n = 10) = 0.01172$ $S = 0.9342 \cdot 10^{-3}$ $\varepsilon = 9.05 \%$
	2	0.01262	
	3	0.01193	
	4	0.01152	
	5	0.01182	
	6	0.01162	
	7	0.01083	
	8	0.01261	
	9	0.01261	
	10	0.01084	

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые определены оптимальные условия (длина волны, осадитель, температурный режим, диапазон определяемых концентраций) методики определения амфотерицина В спектрофотометрическим методом в сыворотке крови: $\lambda = 363, 383$ и 406 нм; растворитель – 0.9% раствор натрия хлорида; t – от 3 до 6 °С; диапазон определяемых концентраций – от $1.0 \cdot 10^{-2}$ до $1.0 \cdot 10^{-5}$ мг/л.

Подобраны оптимальные условия пробоподготовки сыворотки крови для определения амфотерицина В, при этом объем анализируемых образцов составил от 0.5 до 1.0 мл, что позволит проводить фармакокинетические исследования пациентов в щадящем режиме. Также установлен оптимальный осадитель белков, при котором

drug, and the detection of the drug in biological samples.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

наиболее полно происходит осаждение белков в исследуемой биологической пробе (сыворотке крови).

Методика может быть использована для мониторинга концентраций с подбором индивидуальных доз лекарственного средства и обнаружения препарата в биологических образцах.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пашкова Л.В. Адаптация методики количественного определения амфотерицина В на биологических объектах // Авиценна – 2009: материалы ежегодной конкурс-конференции студентов и молодых ученых. Новосибирск, 2009. С. 360 – 361.
2. Падейская Е.Н., Бакланова О.В. Синтетические химиотерапевтические препараты для лече-

REFERENCES

1. Pashkova L.V. (2009). *Adaptation of the method for the quantitative determination of amphotericin B on biological objects*. Avicenna – 2009: Proceedings of the annual competition-conference of students and young scientists. Novosibirsk. P. 360–361. (In Russ.)
2. Padeyskaya E.N., Baklanova O.V. Synthetic chemotherapeutic drugs for the treatment of mycoses (review).

- ния микозов (обзор) // Хим.-фармацевт. журн. 1993;4:12–21.
3. Лигостаев А.В., Ивановская Е.А. Фармакокинетическое исследование онкопрепаратов в биологических объектах // Актуальные вопросы фармакологии и фармации: сб. тр. межвузовской науч. конф., посвящ. памяти проф. В.В. Пичугина и 75-летию КГМУ. Курск, 2009. С. 362–363.
 4. Belal S., Issa N. Spectrophotometric determination of methyl phenobarbitone using orthogonal polynomial // *Pharmazie*. 1982;37(4):297–298.
 5. Gavilán R.E., Nebot C., Veiga-Gómez M. et al. A confirmatory method based on HPLC-MS/MS for the detection and quantification of residue of tetracyclines in nonmedicated feed // *J. Anal. Methods Chem.* 2016;2016:1–8. DOI: 10.1155/2016/1202954.
 6. Moffat A.C., Jackson J.V., Moss M.S., Widdop B., Greenfield E.S. *Clarke's Isolation and Identification of Drugs*. London: The Pharmaceutical Press, 1986. P. 503.
 7. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2018. Т. 3. 1927 с.
 8. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика: пер. с англ. М.: Мир, 1991. С. 472.
 9. Шорманов В.К., Андреева Ю.В., Омельченко В.А. Экстракция флутамида из водных растворов // Судебно-медицинская экспертиза. 2014;5:18–20.
 10. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 1993;4:12–21. (In Russ.)
 3. Ligostaev A.V., Ivanovskaya E.A. (2009). *Pharmacokinetic study of oncology drugs in biological objects*. Topical Issues of Pharmacology and Pharmacy: collection of papers of the Interuniversity scientific conference, dedicated memory of prof. V.V. Pichugin and the 75th anniversary of KSMU. Kursk. P. 362–363. (In Russ.)
 4. Belal S., Issa N. Spectrophotometric determination of methyl phenobarbitone using orthogonal polynomial. *Pharmazie*. 1982;37(4):297–298.
 5. Gavilán R.E., Nebot C., Veiga-Gómez M. et al. A confirmatory method based on HPLC-MS/MS for the detection and quantification of residue of tetracyclines in nonmedicated feed. *J. Anal. Methods Chem.* 2016;2016:1–8. DOI: 10.1155/2016/1202954.
 6. Moffat A.C., Jackson J.V., Moss M.S., Widdop B., Greenfield E.S. (1986). *Clarke's Isolation and Identification of Drugs*. London: The Pharmaceutical Press. P. 503.
 7. *State Pharmacopoeia of the Russian Federation*. XIV edition (2018). Moscow. Vol. 3. 1927 p. (In Russ.)
 8. Doson R., Elliot D., Elliot W., Jones C. (1991). *Data for Biochemical Research* (Transl. from English). Moscow: Mir. P. 472.
 9. Shormanov V.K., Andreeva Yu.V., Omel'chenko V.A. Extraction of flutamide from aqueous solutions. *Sudebno-Meditsinskaya Ekspertiza*. 2014;5:18–20. (In Russ.)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Пашкова Леся Владимировна — старший преподаватель кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия.

Ивановская Елена Алексеевна — д-р фармацевт. наук, профессор кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия.

Лигостаев Александр Валерьевич — канд. фармацевт. наук, доцент кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия.

ABOUT THE AUTHORS

Lesya V. Pashkova – Senior Lecturer, Department of Pharmaceutical Chemistry, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia.

Elena A. Ivanovskaya – Dr. Sci. (Pharmaceut.), Professor, Department of Pharmaceutical Chemistry, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia.

Alexandr V. Ligostaev – Cand. Sci. (Pharmaceut.), Associate Professor, Department of Pharmaceutical Chemistry, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia.