

МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМФОТЕРИЦИНА В

Л. В. Пашкова, Е. А. Ивановская

*ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава
России (г. Новосибирск)*

Цель данной работы — разработка методики количественного определения Амфотерицина В с помощью инверсионной вольтамперометрии. Для этого исследовали рабочие условия вольтамперометрического поведения Амфотерицина В, а именно оценили влияние различных факторов (потенциал накопления, время накопления, скорость развертки, природа фонового электролита) на потенциал и величину тока восстановления Амфотерицина В. Объект исследования — Амфотерицин В (порошок лиофилизированный для приготовления раствора для инфузий 50000 ЕД). В результате выполнения работы определены рабочие характеристики количественного определения Амфотерицина В.

Ключевые слова: вольтамперометрия, Амфотерицин В.

Пашкова Леся Владимировна — старший преподаватель кафедры фармацевтической химии фармацевтического факультета ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», рабочий телефон: 8 (383) 226-98-11, e-mail: pashkova.80@mail.ru

Ивановская Елена Алексеевна — доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармацевтической химии фармацевтического факультета ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», рабочий телефон: 8 (383) 226-98-11, e-mail: el-ivanovskaja@yandex.ru

Введение. Серьезные экологические изменения, происходящие на планете в последние десятилетия, не могли не сказаться на состоянии микроэкологии и иммунореактивности современного человека. В этом — одна из глобальных причин роста числа грибковых заболеваний, которыми сегодня, по данным Всемирной организации здравоохранения, страдает каждый пятый житель планеты. Чаще проявлениями грибковых заболеваний являются различные локальные поражения кожи, ногтей, слизистых оболочек полости рта, кишечника, уретры и влагалища, однако при серьезных нарушениях иммунореактивности организма может наступить генерализация процесса, и тогда грибковые заболевания приобретают жизнеугрожающий характер.

Самым частым видом микоза является кандидоз [1]. В списке возбудителей кандидоза

лидирующее место занимает *Candida albicans*. Этим видом грибов вызывается более 80 % кандидозов. Однако инфекция может быть вызвана и другими видами: *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitanae*.

Кандидоз в зависимости от степени поражения может быть классифицирован как поверхностный и глубокий. Поверхностный кандидоз включает кожный, орофарингеальный, мочеполовой и характеризуется поражением соответствующих слизистых. Наиболее опасен глубокий кандидоз, составляющий основной спектр кандидозных инфекций у иммунокомпрометированных больных, который может быть классифицирован как фунгемия, диссеминированный кандидоз и кандидоз отдельных органов.

Когда терапия системных микозов такими антибиотиками, как флуконазол, не дает эффекта, следует думать о кандидозе, вызванном природно-резистентными видами кандид, например *C. krusei*. В этих случаях рекомендуется противогрибковая терапия эффективным, но потенциально токсичным препаратом Амфотерицином В.

Амфотерицин В (фунгизон) оказывает фунгицидное действие широкого спектра, высоко эффективен при системных и глубоких микозах: кандидозе, аспергиллезе, криптококкозе, легочных микозах и др.

Амфотерицин В — эффективен в отношении многих грибов. Характерной особенностью Амфотерицина В по сравнению с другими современными противогрибковыми препаратами является его эффективность при глубоких и системных микозах. Он эффективен при ряде грибковых заболеваний, не поддающихся лечению другими средствами: бластомикозе, криптококкозе, кокцидиоидозе, гистоплазмозе, плесневых микозах и др., а также при хронических гранулематозных диссеминированных формах кандидоза. Препарат довольно токсичен, но в ряде случаев его применяют в связи с его большой эффективностью [1].

Для контроля эффективности проводимого лечения, изучения фармакокинетических параметров необходима адекватная и достоверная информация о концентрации препарата в крови за счет использования в анализе высокочувствительных методов, к которым относятся электрохимические (вольтамперометрический метод).

Цель данной работы — разработка экспресс-методики количественного определения Амфотерицина В.

Материалы и методы. Объект исследования — Амфотерицин В, имеет следующую структуру: [1R-(1R*, 3S*, 5R*, 6R*, 9R*, 11R*, 15S*, 16R*, 17R*, 18S*, 19E, 21E, 23E, 25E, 27E, 29E, 31E, 33R*, 37S*)]-33-[(3-амино-3,6-дидезокси-бета-D-манопиранозил)окси]-1,3,5,6,9,11,17,37-октагидрокси-15,16,18-триметил-13-оксо-14,39-диоксабицикло[33,3,1]нонтриаконта-19,21,23,25,27,29,31-гептен-36-карбоновая кислота.

Использовали вольтамперометрический анализатор ТА-4. В двухэлектродной ячейке индикаторным электродом служил ртутно-плёночный, электродом сравнения — хлорид-серебряный. Раствор 500 мг/л готовили из лекарственного препарата «Порошок лиофилизированный для приготовления раствора для инфузий 50000 ЕД» растворением точной навески в дистиллированной воде. Стандартные растворы меньшей концентрации получали последовательным разбавлением исходного раствора.

Статистическую обработку результатов исследования проводили в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи (ГФ) [3].

Результаты и их обсуждение. Начальным этапом в разработке методики количественного определения Амфотерицина В являлся выбор оптимальных условий обнаружения аналитического сигнала.

Фоновый электролит — это один из важных параметров методики, выполняющий несколько функций: уменьшение сопротивления раствора, как проводник 2-го рода; образование комплексов с определяемыми или мешающими ионами; создание буфера для постоянства pH раствора; предотвращение гидролиза многовалентных ионов и образование комплексов (кислоты хлоро-, бромоводородная или фосфорная) [4].

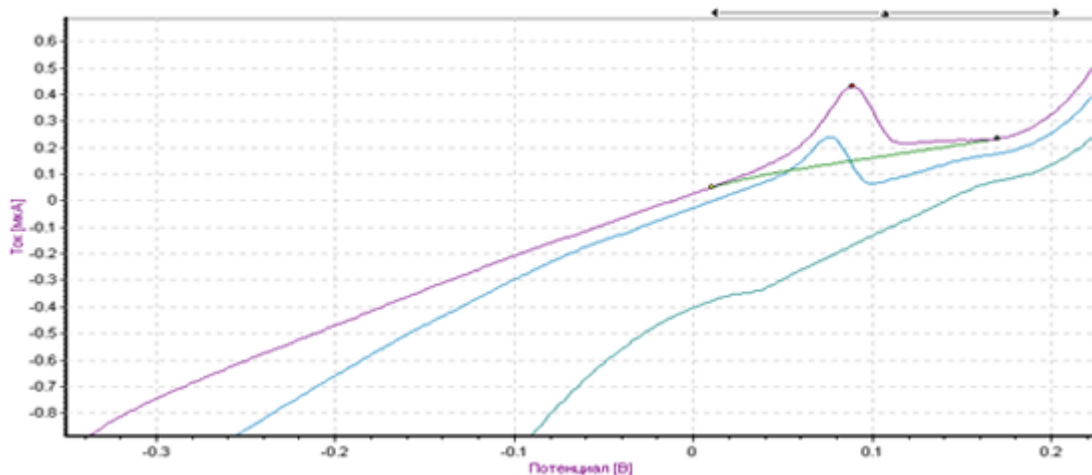


Рис. 1. Вид полярографических кривых для стандартного образца Амфотерицина В в концентрации 0,05 мг/мл при подобранных условиях

В качестве фоновых электролитов были исследованы растворы Бриттона-Робинсона; хлоридов натрия, кальция; сульфатов и нитратов натрия, калия, аммония и ряда других квалификации ос.ч. и х.ч. Однако аналитические сигналы Амфотерицина В на данных фоновых электролитах были нечеткими и плохо воспроизводимыми либо вообще отсутствовали. Тогда как раствор алюминия нитрата обеспечивал широкую область, хорошую электропроводность и необходимую площадь для обработки сигнала, был прост в приготовлении, так как является однокомпонентным, кроме того, характеризовался продолжительным сроком годности. Оптимальная концентрация фона составила 0,1 моль/л.

Определяющим фактором методики является потенциал накопления, который должен способствовать максимально полному выделению определяемого вещества без мешающего влияния других ионов. Экспериментальным путём было установлено оптимальное значение данного параметра, составляющее 0,220 В (рис. 2). Смещение потенциала накопления в более положительную или более отрицательную область приводило к уменьшению величины регистрируемого тока.

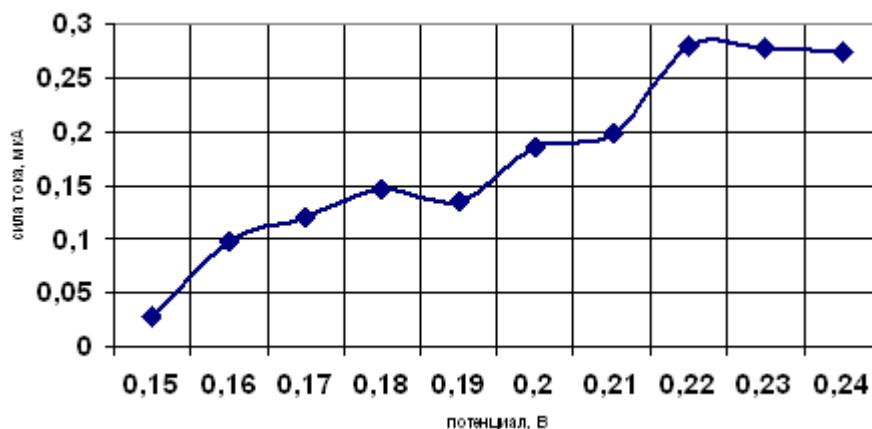


Рис. 2. Зависимость силы тока от потенциала накопления

Для определения оптимального времени электролиза с целью получения более выраженного сигнала была апробирована область значений данного показателя от 1 до 110 с. Высота сигнала возрастала пропорционально времени пропускания до 20 с, при этом достигалось максимальное значение величины тока растворения накопленных осадков с поверхности ртутно-пленочного электрода и хорошая воспроизводимость результатов. При времени накопления менее 20 с величина тока растворения не достигала максимального значения, что снижало чувствительность определения исследуемого вещества. При увеличении времени накопления более 20 с происходило насыщение осадка на электроде, аналитический сигнал Амфотерицина В искажался, и затруднялась обработка полярограмм (рис. 3).

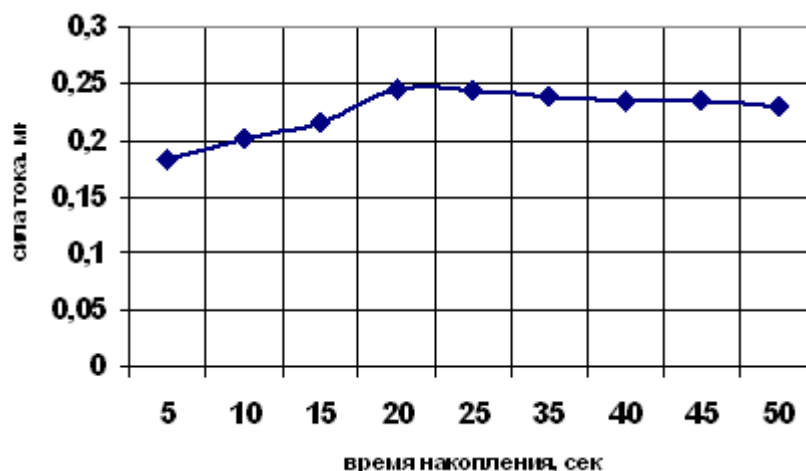


Рис. 3. Зависимость высоты силы тока от времени накопления

Наряду с имеющимися параметрами экспериментальным путем была определена рациональная скорость развёртки потенциала, равная 60 мВ/с, при замедлении или ускорении которой границы аналитического сигнала становились нечёткими, что затрудняло обработку поляризационных кривых (рис. 4).



Рис. 4. Зависимость силы тока от скорости развертки

Важным этапом в подборе условий электролиза является определение границ развёртки. Данный параметр был установлен при постоянстве конечного потенциала 0,220 В, соответствующего потенциалу электролиза. Оптимальное значение нижней границы развертки потенциала составило — (—0,350 В). Изменение данного значения в более положительную область приводило к размыванию пика, расширение же области приводило к увеличению предельного тока, что затрудняло обработку сигнала. Таким образом, оптимальная область развёртки потенциала соответствовала значениям: от —0,350 до 0,220 В.

Таким образом, в результате проведённых исследований была установлена способность и подобраны рациональные условия концентрирования Амфотерицина В на поверхности ртутно-пленочного электрода, сопровождающиеся регистрацией сигнала вещества на вольтамперограмме.

Наиболее важным показателем правильности разработанной методики является наличие прямолинейной зависимости силы тока в цепи от концентрации Амфотерицина В в датчике, что и было установлено в нашем исследовании. Однако сила тока возрастала до определённого момента, а затем резко уменьшалась. Подобная зависимость характерна для веществ органической природы и связана с тем, что их крупные молекулы постепенно занимают активные центры электрода, уменьшая тем самым его рабочую поверхность (рис. 5).

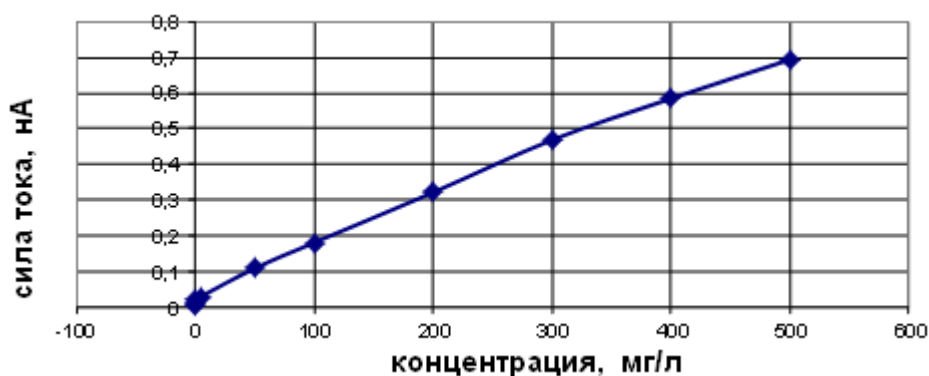


Рис. 5. Результаты установления зависимости силы тока в цепи от концентрации стандартного образца Амфотерицина В в электролитической ячейке

С целью проверки воспроизводимости результатов определения Амфотерицина В по разработанной методике был проведен тест «введено — найдено» для 120-ти проб с концентрацией 500; 50; 5; 0,5; 0,05 и 0,005 мг/л, по 12 проб для каждой.

Полученные результаты подвергли статистической обработке (табл. 1) [5]. Как видно из табл. 1, погрешность методики составляет не более 10 %, что соответствует погрешности вольтамперометрического метода, тогда как определение Амфотерицина В в концентрации 0,005 мг/л отягощено систематической ошибкой в 6,98 %.

Таблица 1

Метрологические характеристики разработанной методики (f, число степеней свободы = 19; P, доверительная вероятность = 95 %; $t_{(P,f)}$, критерий Стьюдента (табл.) = 2,09)

№ п/п	μ	θ	s^2	s	$\Delta\theta$	ε
1	0,005	$4,96 \times 10^{-3}$	$1,41 \times 10^{-7}$	$3,75 \times 10^{-4}$	$3,47 \times 10^{-4}$	6,98
2	0,05	$4,99 \times 10^{-2}$	$1,25 \times 10^{-5}$	$3,53 \times 10^{-3}$	$3,27 \times 10^{-3}$	6,44
3	0,5	$4,997 \times 10^{-1}$	$4,26 \times 10^{-4}$	$2,06 \times 10^{-2}$	$1,91 \times 10^{-2}$	3,82
4	5	4,999	$1,98 \times 10^{-2}$	$1,41 \times 10^{-1}$	$1,13 \times 10^{-1}$	2,06
5	50	49,904	$2,5 \times 10^{-1}$	$5,01 \times 10^{-1}$	$4,64 \times 10^{-1}$	0,93
6	500	499,14	1,87	1,37	1,27	0,25

Примечание: μ — истинное значение, θ — среднее значение, s^2 — дисперсия, s — стандартное отклонение, $\Delta\theta$ — доверительный интервал, ε — ошибка

Разработанную вольтамперометрическую методику определения Амфотерицина В можно подтвердить спектрофотометрией.

Точную навеску препарата — 0,0250 г помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 15 мл диметилсульфоксида ч. по ТУ 6-09-3818-77 и доводят объем раствора диметилсульфоксидом до метки (исходный раствор). Из полученного раствора одновременно готовят два следующих раствора: первый — 5 мл исходного раствора вносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора спиртом метиловым до метки (раствор 1); второй — 1 мл исходного раствора вносят в мерную колбу вместимостью 200 мл и доводят объем раствора спиртом метиловым до метки (раствор 2).

Далее провели модернизацию методики, заменив спирт метиловый на этиловый, в связи с тем, что, во-первых, спирт метиловый относится к сильнодействующим и ядовитым веществам [6], во-вторых, спектры раствора Амфотерицина В в спирте метиловом и в спирте этиловом совпадают [7, 8]. Спектры имели пики при длинах волн 273, 283, 363, 383, 406 нм.

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

УФ-спектр поглощения раствора 1 в области длин волн 260–300 нм должен иметь максимумы поглощения при 273 ± 2 и 283 ± 2 нм.

Спектр поглощения раствора 2 в области длин волн 350–420 нм должен иметь максимумы поглощения при 363 ± 2 , 383 ± 2 , 406 ± 2 нм.

Отношение оптической плотности при длине волны 406 нм к оптической плотности при длине волны 383 нм должно быть от 1,00 до 1,15.

Отношение оптической плотности при длине волны 363 нм к оптической плотности при

длине волны 383 нм должно быть от 0,50 до 0,65 [8].

Установленные параметры анализа дают возможность с достаточно высокой чувствительностью и экспрессностью определять содержание Амфотерицина В в модельных растворах методом анодной вольтамперометрии, что в дальнейшем позволяет перенести разработанную методику на биологические среды.

Важным этапом при перенесении электрохимической методики, адаптированной для модельного раствора, на биологические объекты является выявление сигнала вещества в присутствии сыворотки крови. В дальнейшей работе использовали сыворотку (от крыс), полученную путем центрифугирования крови в течение 10 мин. Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 N 755).

Для перенесения методики на сыворотку крови были засняты следующие зависимости: силы тока от потенциала накопления, силы тока от времени накопления, силы тока от скорости развертки. Из полученных зависимостей были выбраны оптимальные значения потенциала накопления, времени накопления и скорости развертки.

Воспроизводимость результатов методики проверяли методом «введено-найдено» для 48-ми проб с концентрацией 500; 50; 5; 0,5 мг/л по 12 проб для каждой.

Таблица 2

Метрологические характеристики разработанной методики (f, число степеней свободы = 11; P, доверительная вероятность = 95 %; $t_{(P,D)}$, критерий Стьюдента (табл.) = 2,20)

№ п/п	μ	θ	s^2	s	$\Delta\theta$	ϵ
1	0,5	0,494	0,0008	0,02828	0,0180	3,64
2	5	4,79	0,011	0,105	0,0667	1,39
3	50	48,16	1,143	1,07	0,679	1,41
4	500	477,25	422,57	20,556	13,055	2,74

Примечание: μ — истинное значение, θ — среднее значение, s^2 — дисперсия, s — стандартное отклонение, $\Delta\theta$ — доверительный интервал, ϵ — ошибка

По данным табл. 2 можно сделать вывод: относительная погрешность измерений не превышает ошибки вольтамперометрического метода, которая составляет не более 10 % [5].

Аналогично, для подтверждения результатов адаптированной методики провели сравнение с методикой спектрофотометрического анализа.

Таблица 3

Метрологические характеристики методики количественного определения Амфотерицина В на сыворотке крови

№ п/п	μ	θ	s^2	s	$\Delta\theta$	ϵ
1	5	4,852	5,61E-5	7,49E-3	5,4E-3	0,11

Примечание: μ — истинное значение, θ — среднее значение, s^2 — дисперсия, s —

стандартное отклонение, $\Delta\theta$ — доверительный интервал, ε — ошибка

По данным табл. 3 можно сделать вывод, что спектрофотометрический метод анализа подтверждает точность разработанной методики количественного определения Амфотерицина В [5].

Методика в дальнейшем может быть использована для расчетов основных фармакокинетических параметров (начальная и поддерживающая дозы, период полувыведения, константа скорости элиминации, константа скорости всасывания, токсическая и эффективная концентрации) Амфотерицина В, что позволит осуществлять своевременную коррекцию фармакотерапии, подбирая дозы препарата для конкретного больного.

Также данную методику планируется использовать в клинических исследованиях комплексной композиции Амфотерицина В для регулирования его концентрации в крови.

Список литературы

1. Ветлугина Л. А. Противогрибковые полиеновые антибиотики / Л. А. Ветлугина, Е. Т. Никитина. — Алма-Ата : Наука КазССР, 1980. — С. 67-71.
2. Вяселев М. Р. Развитие аппаратных методов вольтамперометрии. Электрохимические методы анализа / М. Р. Вяселев, Л. М. Урманчеев // ЭМА-99 : 5-я Всероссийская конф. с участием стран СНГ, Москва, 1973, 6-8 декабря. — М., 1973.
3. Государственная фармакопея СССР. Вып. I. Общие методы анализа. — XI изд. — М. : Медицина, 1987. — 337 с.
4. Мискиджян С. П. Полярография лекарственных препаратов / С. П. Мискиджян, Л. П. Кравченко. — Киев : Вища школа, 1976. — С. 232.
5. Лекарственные формы амфотерицина В / Г. Н. Наумчик [и др.] // Министерство медицинской промышленности всесоюзный научно-исследовательский институт антибиотиков. Тр. институтов. — 1967. — С. 68-70.
6. Падейская Е. Н. Синтетические химиотерапевтические препараты для лечения микозов (обзор) / Е. Н. Падейская, О. В. Бакланова // Хим.-фармацевт. журн. — 1993. — № 4. — С. 12-21.
7. Список сильнодействующих и ядовитых веществ. Утверждены на заседании ПККН 25 декабря 2002 г., протокол № 3/86-2002 [Электронный ресурс]. — Режим доступа : (http://www.lawrussia.ru/texts/legal_490/doc490a316x225.htm). — Дата обращения : 16.04.2015.
8. ФС 42-1373-98 Амфотерицин В. Сроки годности лекарственных средств : справочник [Электронный ресурс]. — Режим доступа : (<http://www.recipe.ru/docs/nd/document.php?id=1549>). — Дата обращения : 16.04.2015.
9. Харитонов Ю. А. Аналитическая химия (аналитика). В 2-х т. Количественный анализ. Физико-химические (инструментальные) методы анализа : учебник для вузов / Ю. А. Харитонов. — М. : Высш. шк., 2001. — Т. 2. — 559 с.

THE TECHNIQUE OF QUANTITATIVE DEFINITION OF AMPHOTERICIN B

[L. V. Pashkova, E. A. Ivanovskaya](#)

SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health» (Novosibirsk)

The objective of the research is development of a technique of quantitative definition of Amphotericin B by means of inversion voltammetry. For this purpose the operating conditions of voltammetric behavior of Amphotericin B was investigated, namely influence of various factors (accumulation potential, accumulation time, display rate, nature of background electrolyte) on the potential and size of current of Amphotericin B restoration was estimated. The object of research is Amphotericin B (the powder lyophilized for preparation of solution for infusions of 50000 ea). The performance data of quantitative definition of Amphotericin B are defined as a result of the work.

Keywords: voltammetry, Amphotericin B.

About authors:

Pashkova Lesya Vladimirovna — senior teacher of pharmaceutical chemistry chair of pharmaceutical faculty at SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health», office phone: 8 (383) 226-98-11, e-mail: pashkova.80@mail.ru

Ivanovskaya Elena Alekseevna — doctor of pharmaceutical science, professor, head of pharmaceutical chemistry chair of pharmaceutical faculty at SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health», office phone: 8 (383) 226-98-11, e-mail: el-ivanovskaja@yandex.ru

List of the Literature:

1. Vetlugina L. A. Antimicotic polyenes antibiotics / L. A. Vetlugina, E. T. Nikitin. — Alma-Ata : Science of KazSSR, 1980. — P. 67-71.
2. Vyaselev M. R. Development of hardware methods of voltammetry. Electrochemical methods of analysis / M. R. Vyaselev, L. M. Urmancheev // EMA-99 : the 5th All-Russian conf. with participation of the CIS countries, Moscow, 1973, on December 6-8. — M., 1973.
3. State pharmacopeia of the USSR. Iss. I. General methods of the analysis. — XI prod. — M. : Medicine, 1987. — 337 p.
4. Miskidzhyan S. P. Polarography of medicines / S. P. Miskidzhyan, L. P. Kravchenyuk. — Kiev : High school, 1976. — P. 232.
5. Dosage forms of Amphotericin B / G. N. Naumchik [et al.] // Ministry of the medical industry, All-Union SRI of antibiotics. Tr. Institute. — 1967. — P. 68-70.
6. Padeyskaya E. N. Synthetic chemotherapeutic medicines for treatment of mycoses (review) / E. N. Padeyskaya, O. V. Baklanova // Chemical and pharmaceutical journal. — 1993. — N 4. — P. 12-21.
7. The list strong and toxicants. Approved at PCNDC meeting on December 25, 2002, protocol N 3/86-2002 [electron resource]. — Access mode : (http://www.lawrussia.ru/texts/legal_490/doc490a316x225.htm). — Date of the address :

16.04.2015.

8. FS 42-1373-98 Amphotericin B. Periods of validity of medicines : reference book [electron resource]. — Access mode : (<http://www.recipe.ru/docs/nd/document.php?id=1549>). — Date of the address : 16.04.2015.
9. Kharitonov Y. A. Analytical chemistry (analytics). In 2 Vol. Quantitative analysis. Physical and chemical methods of the analysis : textbook for higher education institutions / Y. A. Kharitonov. — M. : High school, 2001. — Vol. 2. — 559 P.