

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
направление химия

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА**

**ВЭЖХ определение меропенема в биологических жидкостях**

Студент 4-го курса  
Лебединец Софья Андреевна  
Уровень/ступень образования:  
бакалавриат

И.о. заведующего кафедрой:  
д.х.н., проф. Ермаков С.С.

Научный руководитель:  
к.х.н., доцент Вах К.

Санкт-Петербург  
2018

## Содержание

Перечень условных обозначений.....	4
<b>Введение</b> .....	5
<b>Глава 1. Обзор литературы</b> .....	6
1.1 Применение гомогенной жидкостной микроэкстракции для анализа биологических жидкостей .....	6
1.1.1 Гомогенная жидкостная микроэкстракция с высаливанием экстрагента .....	9
1.1.2 Гомогенная жидкостная микроэкстракция с высахариванием экстрагента.....	14
1.1.3 Гомогенная жидкостная микроэкстракция с применением растворителей с переключаемой гидрофильностью .....	16
1.2 Карбапенемы и их применение в медицинской практике.....	17
1.3 Методы определения меропенема .....	21
<b>Заключение</b> .....	30
<b>Глава 2. Методика экспериментальных исследований</b> .....	31
2.1 Оборудование .....	31
2.2 Реактивы и материалы .....	32
2.3 Приготовление растворов.....	32
2.4 Отбор и подготовка проб .....	33
<b>Глава 3. ВЭЖХ-УФ определение меропенема с предварительным микроэкстракционным концентрированием</b> .....	34
3.1 Теоретические аспекты и предполагаемый механизм гомогенной жидкостной микроэкстракции меропенема с разделением фаз полярным растворителем.....	34
3.2 Иллюстрация аналитических возможностей предложенного метода .....	35
3.3 Оптимизация параметров, влияющих на эффективность микроэкстракции .....	36
3.3.1 Выбор метода анализа .....	36
3.3.2 Выбор оптимальной подвижной фазы .....	40
3.3.3 Выбор оптимального экстрагента.....	40
3.3.4 Выбор оптимального объема экстрагента .....	41
3.3.5 Выбор оптимального полярного растворителя .....	42
3.3.6 Выбор оптимального объема полярного растворителя .....	42
3.3.7 Выбор оптимального времени образования изотропного раствора.....	43

3.4	Определение физико-химических характеристик системы: $H_2O$ –1-октиламин–ацетонитрил.....	44
3.4.1	Определение содержания ацетонитрила в фазе 1-октиламина.....	44
3.4.2	Исследование фаз методом динамического рассеяния света .....	45
3.5	Изучение мешающего влияния компонентов биологических жидкостей.....	48
3.6	Аналитические характеристики методики.....	49
3.7	Проверка правильности методики референтным методом .....	50
	<b>Выводы</b> .....	<b>54</b>
	<b>Благодарности</b> .....	<b>55</b>
	<b>Список литературы</b> .....	<b>56</b>

## Перечень условных обозначений

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография с фотометрическим детектированием в ультрафиолетовой области

ГЖМЭ – гомогенная жидкостная микроэкстракция

ДИВ – дифференциально-импульсная вольтамперометрия

ДОК – диапазон определяемых концентраций

ЖМЭ – жидкостная микроэкстракция

КЭ – капиллярный электрофорез

МЭ ДЭ – микроэкстракция с диспергированием экстрагента

МЭКХ – мицеллярная электро-кинетическая хроматография

ПАВ – поверхностно-активное вещество

ПИА – проточно-инжекционный анализ

ПО – предел обнаружения

РПГ – растворитель с переключаемой гидрофильностью

СКО – среднее квадратичное отклонение

## Введение

В настоящее время в биохимической и клинической медицине существует большой интерес, связанный с разработкой надежных методов исследования качественных и количественных характеристик биологических жидкостей с целью получения достоверной информации о здоровье пациента.

Среди большого спектра лекарственных препаратов, применяемых в медицинской практике, важное место занимают антибактериальные средства, действие которых направлено на борьбу с инфекционными заболеваниями. При этом особое внимание в последнее время уделяется антибиотикам группы карбапенемов, которые обладают высокой противомикробной активностью и широко используются в медицине при лечении тяжелых форм заболеваний. Антимикробная терапия требует постоянного контроля режимов дозирования лекарственных препаратов, что приводит к необходимости определения содержания антибиотиков в биологических жидкостях пациентов (моча, плазма крови). Учитывая то, что матрица пробы может оказывать негативное влияние на определение аналитов, эффективные методы предварительного разделения компонентов матрицы пробы являются неотъемлемой частью химического анализа.

Среди разработанных методов разделения и концентрирования перспективным для анализа биологических жидкостей является гомогенная жидкостная микроэкстракция.

Целью данной работы явилась разработка методики определения меропенема в биологических жидкостях с предварительным микроэкстракционным выделением аналита на принципах гомогенной жидкостной микроэкстракции и последующим ВЭЖХ определением с фотометрическим детектированием в ультрафиолетовой области.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1 Применение гомогенной жидкостной микроэкстракции для анализа биологических жидкостей

Предварительная пробоподготовка образца является неотъемлемой частью любого химического анализа. Пробоподготовка – наиболее трудоемкий и длительный этап химического анализа, оказывающий большое влияние на надежность и точность результатов определения содержания аналитов.

Традиционная жидкостно-жидкостная экстракция (ЖЖЭ) является одним из самых первых методов пробоподготовки для анализа биологических жидкостей; однако она имеет существенные ограничения, а именно – необходимость использования большого количества исследуемой пробы и токсичных органических растворителей. Более того, традиционная ЖЖЭ ограничивает возможность извлечения многих гидрофильных веществ из водных растворов. В полярных органических растворителях, таких как этанол, ацетон, ацетонитрил, растворимость полярных соединений выше, чем в воде, но так как эти растворители хорошо смешиваются с водой в любых пропорциях, они не могут быть использованы в традиционной ЖЖЭ.

Современная аналитическая практика уделяет значительное внимание вопросам развития методов пробоподготовки, в том числе для анализа биологических жидкостей, выдвигая требования к их миниатюризации и автоматизации, с целью обеспечения простоты выполнения анализа и его сочетания с любыми инструментальными приборами.

В настоящее время в аналитической практике широко используются микроэкстракционные методы разделения и концентрирования веществ, которые полностью отвечают основным положениям Зеленой аналитической химии, направленной на экологическую безопасность химического анализа, [1] и предполагают использование микрообъемов экстрагентов (0,5-50 мкл). Жидкостную микроэкстракцию широко применяют для анализа объектов окружающей среды [2], пищевых продуктов [3], лекарственных препаратов [4], биологических жидкостей [5]. Среди основных направлений жидкостной микроэкстракции можно выделить следующие: капельная [6], мембранная [7], мицеллярная [8], дисперсионная [9], гомогенная микроэкстракции [10].

Капельная микроэкстракция предполагает использование крайне малых объемов экстрагента (1-3 мкл), что позволяет достигать высоких коэффициентов концентрирования. Капля при этом находится на конце иглы микрошприца и зачастую погружается в анализируемую среду. По окончании экстракции микрокапля вытягивается обратно в шприц и подвергается дальнейшему анализу. Несмотря на простоту и дешевизну исполнения, для достижения стабильности капли метод требует осторожности и ловкости рук химика-аналитика, а также использования экстрагентов с достаточно большим поверхностным натяжением [11].

Мембранная микроэкстракция основана на применении пористых полипропиленовых мембран, импрегнированных органическими экстрагентами. Техника проведения мембранной микроэкстракции основана на погружении импрегнированной мембраны в водную донорную фазу, где происходит извлечение аналитов в экстрагент, который находится в порах мембраны. Далее мембрану помещают в акцепторную фазу для извлечения аналитов и дальнейшего анализа. К недостаткам мембранной микроэкстракции можно отнести длительность процесса подготовки мембран и невозможность их многократного использования из-за эффекта памяти мембран [12].

В дисперсионной жидкостной микроэкстракции используется трехкомпонентная система: экстрагент, диспергирующий растворитель и водный раствор пробы. При этом в качестве диспергатора используются полярные органические растворители, которые хорошо растворимы как в водной, так и в органической фазе. При введении смеси экстрагента и диспергатора в пробу наблюдается диспергирование экстрагента и образование эмульсии, которую разрушают центрифугированием. Следует отметить, что применение полярных растворителей зачастую отрицательно сказывается на эффективности экстракции, поскольку приводит к дополнительному растворению аналита в водной фазе.

В мицеллярной микроэкстракции аналит переходит из водной фазы в мицеллярную, образованную поверхностно-активными веществами при достижении точки помутнения. Зачастую необходимо разбавлять фазу, насыщенную поверхностно-активными веществами, невязкими растворителями для последующего определения аналитов инструментальными методами.

Гомогенная жидкостная микроэкстракция (ГЖМЭ) основана на фазовом разделении из гомогенного раствора и одновременном экстрагировании целевых аналитов в органическую фазу. Обычно в ГЖМЭ применяют полярные растворители, такие как метанол, ацетонитрил, изопропанол, этанол. Фазовое разделение можно инициировать за счет высаливания/высахаривания, добавления воды, изменения температуры или pH раствора. Метод ГЖМЭ является простым и универсальным методом концентрирования, позволяющим снизить расход реагентов и дорогостоящих растворителей, продолжительность экстракции и стоимость анализа [13].

Известно, что полярные органические растворители, в частности ацетонитрил и метанол, обычно используются в клинических и биохимических лабораториях для осаждения белков в биологических матрицах, поскольку большое содержание белковых тел в матрице пробы затрудняет определение целевых аналитов. Растворимость белков в водных растворах зависит от распределения гидрофильных и гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности белка [14]. Белки, имеющие высокое содержание гидрофобных аминокислотных остатков на своей поверхности, характеризуются низкой растворимостью в водных растворах. Полярные и заряженные аминокислотные остатки на поверхности белка взаимодействуют с ионными группами полярного растворителя и повышают его растворимость. Зная аминокислотный состав белка, можно выбрать наиболее подходящий метод осаждения. При использовании в качестве осаждающих агентов органические растворители с более низкой диэлектрической постоянной (метанол, ацетонитрил, изопропанол) по сравнению с раствором плазмы повышается взаимодействие между заряженными молекулами, способствуя электростатическим взаимодействиям белков. Органический растворитель также замещает молекулы воды, окружающие гидрофобные аминокислотные остатки на поверхности белка. В связи с этим гидрофобные взаимодействия между белками ослабевают, в то время как начинают преобладать электростатические взаимодействия, что приводит к агрегации белков и их осаждению [15].

Обычно процесс осаждения белков полярными растворителями сопровождается одновременным экстрагированием аналитов. Однако в растворе остается достаточно много компонентов матрицы пробы, которые могут оказывать



негативное влияние на анализ. ГЖМЭ с последующим разделением фаз любым из описанных выше методов, совмещает осаждение белков и последующее извлечение аналитов в органический растворитель, что позволяет получать экстракты, очищенные от мешающих компонентов и готовые к последующему прямому инструментальному анализу [16].

### **1.1.1 Гомогенная жидкостная микроэкстракция с высаливанием экстрагента**

ГЖМЭ с высаливанием экстрагента основана на добавлении высаливающего агента к гомогенному раствору, содержащему хорошо смешиваемый с водной фазой полярный органический растворитель.

Высаливание – это процесс, который включает в себя добавление органической или неорганической соли к водному раствору, который способствует ослабеванию сольватационных сил и увеличению коэффициента распределения определенных растворенных веществ, в частности гидрофобных [17]. При достаточной концентрации высаливающего агента происходит разделение фаз и одновременное насыщение выделяющейся фазы полярного растворителя аналитом. Следует уделять достаточное внимание выбору соли, так как высаливающий агент выполняет следующие функции:

- способствует осаждению белков и других макромолекулярных компонентов матрицы биологической жидкости [18];
- уменьшает растворимость полярных органических соединений в водной фазе [19];
- инициирует выделение смешивающегося с водой органического растворителя в отдельную фазу [20];
- способствует применению полярных растворителей в качестве экстрагентов для извлечения полярных соединений из водных растворов [21].

Для того чтобы использовать соль в качестве высаливающего агента, необходимо выполнение нескольких условий. В частности, растворимость соли в органическом растворителе должна быть незначительна, а в воде – максимальна, это способствует увеличению электростатического взаимодействия между ионами соли и молекулами воды. В водном растворе происходит диссоциация соли на ионы, при определенной концентрации соли ионы связывают большинство молекул воды из-за

больших энергий гидратации, что снижает число молекул воды, доступных для взаимодействия с заряженными молекулами. Также соль должна обладать высокой способностью осаждать или вытеснять из водного раствора гидрофильные компоненты. Лиотропный ряд для катионов выглядит следующим образом:  $Mg^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+} > Ba^{2+} > K^+ > Na^+ > NH_4^+ > Li^+$ ; для анионов:  $SO_4^{2-} > CH_3COO^- > Cl^- > NO_3^- > Br^- > I^- > CNS^-$ . Чем большим радиусом и зарядом обладает ион, тем выше его энергия гидратации и сильнее способность вытеснять компоненты из водных растворов.

Химическая структура аналита, сложность матрицы пробы и применяемая аналитическая инструментальная схема также могут оказывать влияние на выбор оптимальной соли. Сульфат магния ( $MgSO_4$ ) [22], ацетат аммония ( $(NH_4) CH_3COO$ ) [23], хлорид натрия ( $NaCl$ ) [24], сульфат цинка ( $ZnSO_4$ ) [25] – наиболее часто используемые соли в качестве высаливающих агентов в анализе биологических жидкостей.

В ГЖМЭ с высаливанием экстрагента необходимо исследовать параметры, влияющие на эффективность экстракции: тип и количество экстрагирующего растворителя и высаливающего агента. Изопропиловый спирт, ацетонитрил, метанол наиболее часто используются в качестве экстрагентов, однако, ацетонитрил наиболее предпочтителен для исследования биологических образцов. Этот факт объясняется тем, что меньшие объемы ацетонитрила требуются для осуществления фазового разделения в сравнении с другими растворителями. Более того, ацетонитрил быстрее осаждает белки и обеспечивает воспроизводимость результатов процесса экстракции как гидрофильных, так и гидрофобных соединений и необходимую чувствительность методики.

Первые упоминания о фазовом разделении, вызванном добавлением соли к гомогенному раствору, относятся к началу 20 века, однако применение ГЖМЭ с высаливанием экстрагента в аналитических целях было осуществлено только в 1970 году. Одной из первых работ, сообщающей об использовании ГЖМЭ с высаливанием экстрагента для анализа биологических образцов, была работа по определению содержания циклофосамида в крови и плазме крови [26]. К пробам крови и плазмы крови добавляли ацетонитрил. Для выделения собственной фазы экстрагента к полученной смеси добавляли сульфат цинка. Выделявшуюся фазу ацетонитрила,

насыщенную аналитом, вводили в ВЭЖХ-УФ систему. Предел обнаружения методики составил 0,3 мг/л.

Изучение возможности применения ГЖМЭ с высаливанием экстрагента для пробоподготовки биологических жидкостей (сыворотки крови, плазмы крови, мочи) стало актуальной задачей в 2004 году после опубликования результатов работы по определению тиамилала в сыворотке крови для жидкостно-хроматографического анализа [27]. В качестве пробоподготовки проб сыворотки крови использовали ГЖМЭ с высаливанием экстрагента, что позволило устранить зависимость проведения анализа от кислотности среды биологической жидкости. Ацетонитрил был использован как экстрагент, хлорид натрия – как высаливающий агент. Предел обнаружения методики составил 0,2 мг/л. Авторы работы отметили, что метод ГЖМЭ с высаливанием экстрагента является простым и удобным методом для определения содержания различных лекарственных веществ в биологических образцах.

В работе [28] для определения содержания гомологов витамина К в плазме крови использовали ГЖМЭ с высаливанием экстрагента и последующим ВЭЖХ определением с флуоресцентным детектированием. Было изучено влияние на эффективность экстракции следующих высаливающих агентов: хлорида магния, хлорида алюминия, хлорида кальция, хлорида натрия и хлорида аммония. Наибольшая эффективность экстракции была достигнута при применении хлорида магния. Пробу плазмы крови смешивали с ацетонитрилом и добавляли хлорид магния, перемешивали для инициирования разделения фаз, центрифугировали в течение 5 минут. Далее надосадочную жидкость отбирали и анализировали с помощью жидкостного хроматографа. Пределы обнаружения данной методики лежали в диапазоне 0,1-0,17 нг/мл. В работе [29], посвященной выделению микотоксинов (афлатоксина В1, дезоксиниваленола, фумонизина В1, охратоксина А, зеараленона и Т-2 токсина) из мочи с последующим их определением методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием, было исследовано влияние  $MgSO_4$ ,  $(NH_4)_2SO_4$  и  $CH_3COONH_4$  как высаливающих агентов. Было отмечено, что воспроизводимость результатов анализа была наилучшая при использовании  $MgSO_4$ . К пробе мочи добавляли  $MgSO_4$  (2 моль/л). В качестве экстрагента использовали смесь этилацетата и формиата аммония. После добавления экстрагента к моче полученную смесь центрифугировали в течение 15 минут. Выделявшуюся

органическую фазу отбирали и помещали в новую экстракционную емкость. Далее к оставшейся водной фазе добавляли смесь ацетонитрила и формиата аммония, проводили процедуру экстракции, описанную выше. После выделявшуюся фазу ацетонитрила смешивали с полученной ранее фазой этилацетата, испаряли при 60 °С в потоке азота. Далее полученный остаток растворяли в растворе подвижной фазы и инжесктировали в ВЭЖХ систему. Нижняя граница определяемых концентраций лежала в диапазоне от 0,07 нг/л для охратоксина А до 3,3 нг/л для дезоксиниваленола. Авторы статьи [30] разработали метод определения содержания амфетамина и метамфетамина в крови с помощью ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием. В основе данного метода лежит ГЖМЭ с высаливанием экстрагента. Безводные сульфат магния и хлорид натрия смешивали в соотношении 2:1, к смеси прибавляли раствор ацетонитрила, содержащего 0,2% уксусную кислоту, перемешивали и вводили пробу плазмы, снова перемешивали и центрифугировали в течение 2 минут. Выделявшуюся органическую фазу, насыщенную аналитами, анализировали. Линейный диапазон определяемых концентраций для амфетамина и метамфетанина составил 0,05-2 мг/л. Предел обнаружения данной методики для определения амфетамина – 0,003 мг/л; для метамфетамина – 0,008 мг/л. Было установлено, что сульфат магния снижает уровень холестерина в экстракте ацетонитрила, полученного после применения ГЖМЭ с высаливанием экстрагента для анализа образцов крови по сравнению с проведением того же экстракционного процесса, но с сульфатом натрия ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ).

Следует отметить, что некоторые соли не могут быть применимы при использовании ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием. Большие количества нелетучих солей, таких как  $\text{K}_2\text{CO}_3$  или  $\text{NaCl}$ , могут вызвать как подавление или завышение аналитического сигнала при масс-спектрометрическом детектировании, так и повреждение хроматографической колонки и детектора. Большое внимание ученых направлено на изучение солей аммония, так как они удобны при масс-спектрометрическом детектировании аналитического сигнала. Авторы данной работы [23] изучали, как соли аммония влияют на анализ. Ими была разработана методика ГЖМЭ с использованием ацетата аммония в качестве высаливающего агента для определения содержания линифаниба в плазме крови с последующим ВЭЖХ-МС детектированием. Раствор ацетата аммония добавляли к

плазме, далее смешивали с ацетонитрилом, перемешивали, центрифугировали в течение 3 минут. Надосадочную жидкость отбирали и анализировали. Nanita and Padivitage [31] представили детальное изучение пяти солей аммония, применяемых в качестве высаливающих агентов для экстрагирования пестицидов (хлорантранилипрола, циантранилилпрола) из мочи и плазмы крови, основываясь на следующих критериях: химическая устойчивость, способность индуцировать разделение в системе ацетонитрил-водная фаза, извлечение аналитов, чувствительность, содержание воды в экстракте и стоимость. Хлорид аммония наилучшим образом удовлетворил всем перечисленным критериям. В качестве экстрагента использовали ацетонитрил. Предел обнаружения данной методики составил 0,001-0,01 мг/кг. Было обнаружено, что насыщенный раствор  $\text{NH}_4\text{Cl}$  имеет кислый pH (~4) среды, что способствует повышению стабильности и извлечению многих аналитов, например, таких как пестициды, не требуя дополнительного реагента для достижения определенного pH. Также эндотермический процесс смешения ацетонитрила, воды и хлорида аммония может повысить термическую устойчивость аналитов в процессе экстракции благодаря охлаждающему эффекту. Авторами статьи [32] был разработан метод для определения лекарственных веществ бета-блокаторов (метопролола, пропранолола, карведилола) и их метаболитов в моче. Для пробоподготовки образцов была использована жидкостная микроэкстракция с высаливанием экстрагента. К пробе мочи добавляли сульфат аммония в качестве высаливающего агента, далее смесь перемешивали для образования гомогенного раствора. На следующей стадии к раствору добавляли ацетонитрил (экстрагент). Для разделения фаз центрифугирование не требовалось; разделение фаз происходило самопроизвольно в течение 2 минут. Верхняя фаза ацетонитрила направлялась на анализ с помощью ВЭЖХ-УФ. Линейный диапазон данной методики составил 0,1-8,0 мг/л. Нижняя граница определяемых концентраций лежала в диапазоне 0,1-0,2 мг/л.

Из литературных данных известно, что высаливающий эффект могут оказывать насыщенные растворы щелочей. Авторы статьи [33] предложили метод пробоподготовки образцов, основанный на гомогенной жидкостной экстракции с высаливанием экстрагента, для определения полярных противодиабетических препаратов гуанидов в плазме крови и моче. Пробы биологических жидкостей смешивались с ацетонитрилом и гидроксидом натрия, использовавшимся для

разделения фаз. Линейный диапазон концентраций для плазмы составил 20-2000 мкг/л и для мочи – 5-2000 мкг/л. Предел обнаружения лежал в диапазоне 3,8-5,6 мкг/л и 0,8-1,5 мкг/л для плазмы и мочи, соответственно. В статье [34] описана полностью автоматизированная процедура ГЖМЭ с высаливанием экстрагента щелочью для *in-line* спектрофотометрического определения диклофенака в слюне (рис. 1). Данный метод основан на окислении диклофенака гексацианоферратом натрия в щелочной среде с последующей стадией выделения фазы ацетонитрила из гомогенного раствора и одновременной экстракцией аналита. Гидроксид натрия использовался как агент для дериватизации, так и высаливающий агент для формирования органической фазы. Аналитический сигнал измеряли непосредственно в фазе ацетонитрила в режиме *in-line*, используя оптический зонд. Для устранения мешающего влияния матрицы слюны, пробу слюны разбавляли водой в 50 раз. Линейный диапазон определяемых концентраций данной методики лежал в диапазоне 2,5-60 мкмоль/л; предел обнаружения – 0,8 мкмоль/л.

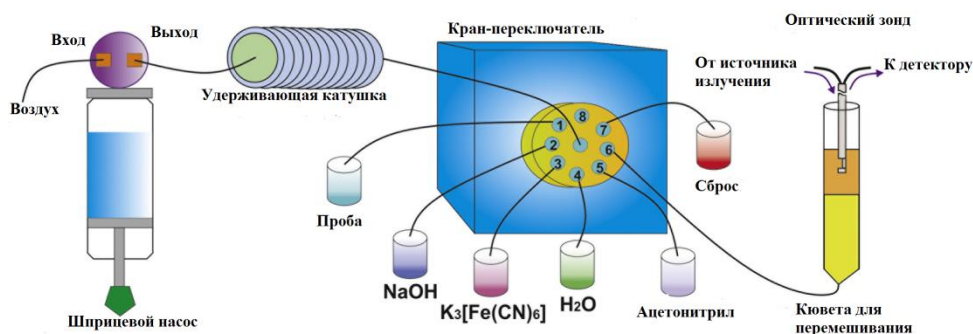


Рис.1 Схема определения диклофенака в пробах слюны [34]

### 1.1.2 Гомогенная жидкостная микроэкстракция с высаливанием экстрагента

Помимо солей, большое внимание уделяется использованию углеводов в качестве агентов для разделения фаз в жидкостно-жидкостных системах. ГЖМЭ с высаливанием экстрагента основана на извлечении аналита полярным растворителем (например, ацетонитрилом) и выделении органической фазы после добавления высаливающего агента (моносахарида или дисахарида) [35]. Углеводы, с общей формулой (C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>O)<sub>x</sub> - большая группа органических соединений, включающая сахара, целлюлозу и крахмал. Эти молекулы не имеют заряда, подвержены биологическому разложению, нетоксичны и возобновляемы. Поэтому углеводы являются более эффективными и безопасными потенциальными заместителями солей

для определения биомолекул. Их классифицируют, как моносахариды, олигосахариды (2-10 связанных моносахаридов) и полисахариды (больше 10 связанных моносахаридов). Углеводы – это полигидроксиальдегиды и полигидроксикетоны, имеющие высокое сродство к воде, вследствие наличия нескольких гидроксильных групп в их составе, обладающих двойственным донорно/акцепторным характером, что позволяет им образовывать водородные связи в водных растворах и выступать в качестве высахаривающих агентов (высахаривающий эффект) [36].

Авторы статьи [37] разработали метод ВЭЖХ-УФ определения прокаиамида в моче с предварительной полностью автоматизированной процедурой ГЖМЭ с высахариванием экстрагента на принципах проточного анализа (рис. 2). Данный метод основан на выделении ацетонитрила в отдельную фазу, насыщенную аналитом, из гомогенного раствора пробы после введения высахаривающего агента (глюкозы) в смесительную камеру проточной системы. Поток воздуха использовался для перемешивания фаз, ускорения экстракционного процесса и разделения фаз. После быстрого фазового разделения в смесительной камере выделяющуюся фазу ацетонитрила, содержащую аналит, инжектировали в ВЭЖХ-УФ систему. При выбранных оптимальных условиях пробоподготовки линейный диапазон концентраций прокаиамида составил  $6 \times 10^{-7} - 4 \times 10^{-5}$  моль/л. Предел обнаружения данной методики -  $2 \times 10^{-7}$  моль/л.

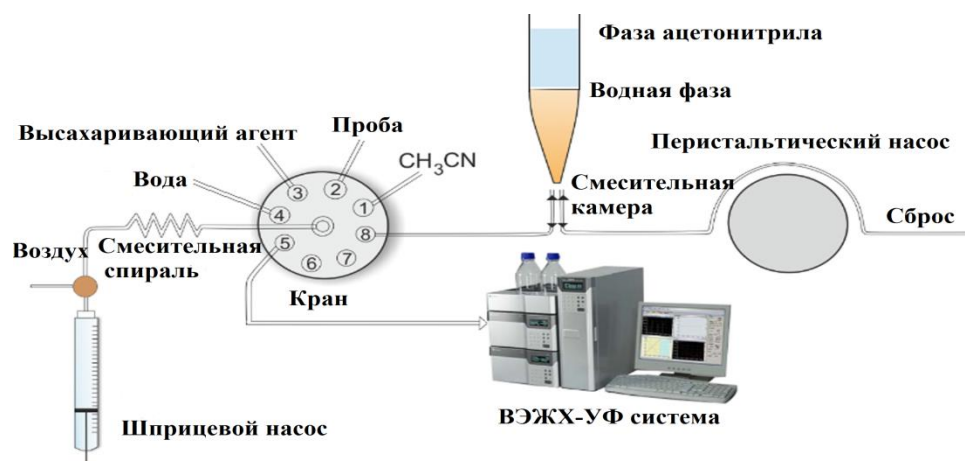


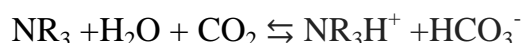
Рис.2 Схема определения прокаиамида в пробах мочи [37]

Jun Zhang и соавторы [38] продемонстрировали возможность определения лопинавира и ритонавира в плазме крови при использовании ГЖМЭ с высахариванием экстрагента и последующим ВЭЖХ-МС детектированием. К пробе

плазмы последовательно добавляли ацетонитрил и 2 моль/л раствор глюкозы, перемешивали. Далее полученный раствор центрифугировали в течение 4 минут. После отбирали верхнюю фазу ацетонитрила и смешивали с водой, направляли на ВЭЖХ-МС анализ. Авторами было показано, что методика не зависит от влияния матричных эффектов плазмы крови.

### **1.1.3 Гомогенная жидкостная микроэкстракция с применением растворителей с переключаемой гидрофильностью**

В последнее время особый интерес привлекают экстрагенты с переключаемой гидрофильностью, которые нерастворимы в воде в одной форме, но растворимы в другой, причем переход между этими двумя формами осуществляется при помощи простого изменения в системе – например, изменения pH [39]. Растворители с переключаемой гидрофильностью (РПГ) могут быть использованы для осуществления ГЖМЭ. Основные РПГ представлены амидинами, у которых было впервые обнаружено «переключаемое» поведение, и вторичными, третичными аминами [40]. Амидины и третичные амины образуют гомогенный раствор с водой при пропускании через систему углекислого газа или добавлении сухого льда благодаря протонированию азота и образованию соответствующего гидрокарбоната, растворимого в воде:



Кислотные РПГ представлены высшими карбоновыми кислотами. В основном, высшие карбоновые кислоты нерастворимы в воде в отличие от их солей со щелочными металлами. Авторы статьи [41] разработали новый полностью автоматизированный метод для определения офлоксацина в моче, основанный на применении ГЖМЭ с переключаемым растворителем и последующим ВЭЖХ определением с флуоресцентным детектированием (рис. 3). В этом экстракционном методе была показана возможность использования насыщенных жирных кислот (гексановой кислоты) в качестве РПГ. Конверсия жирной кислоты из ее гидрофобной формы в гидрофильную осуществлялась за счет добавления к экстракционной смеси карбоната натрия. При этом  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  выполнял тройную функцию: обеспечивал требуемую щелочную среду, способствовал перемешиванию и разделению фаз за счет выделения углекислого газа. Введение в раствор серной кислоты понижало pH системы, поэтому микрочастицы высшей карбоновой кислоты начинали



агрегировать, образуя единую фазу. Пузыри диоксида углерода образовывались непосредственно в растворе и способствовали экстракционному процессу и разделению фаз. При проведении процесса экстракции в оптимальных условиях линейный диапазон определяемых концентраций офлоксацина находился в диапазоне  $3 \cdot 10^{-8}$ – $3 \cdot 10^{-6}$  моль/л; предел обнаружения -  $1 \cdot 10^{-8}$  моль/л.

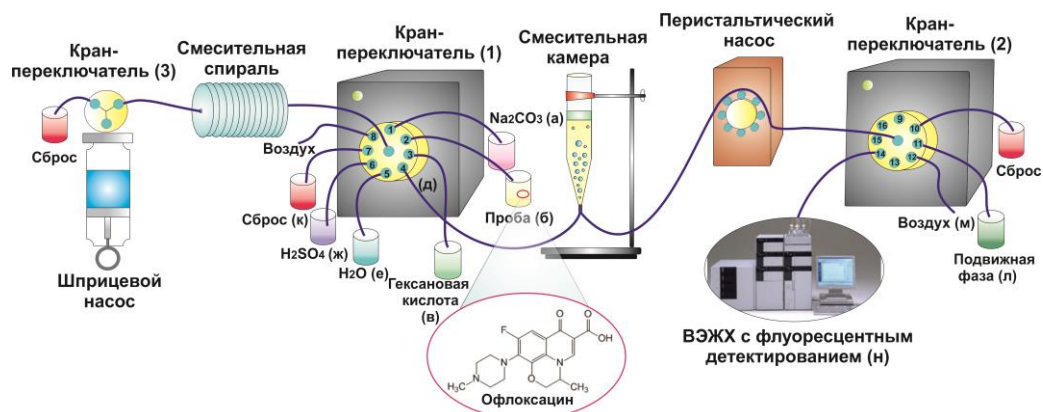


Рис.3 Схема определения офлоксацина в пробах мочи [41]

## 1.2 Карбапенемы и их применение в медицинской практике

Антимикробные препараты группы карбапенемов (имипенем, меропенем, дорипенем) являются одним из тех классов антибиотиков, которые обладают наиболее широким спектром активности в отношении большинства инфекционных возбудителей, включая штаммы, резистентные к другим антимикробным препаратам, и часто используются в качестве монотерапии большинства тяжелых и опасных для здоровья человека инфекций [42]. Спектр противомикробной активности карбапенемов включает в себя широкий круг аэробных и анаэробных грамположительных и грамотрицательных бактерий. Карбапенемы в основном применяются в отделениях реанимации и интенсивной терапии [43].

Антибиотики группы карбапенемов используются при лечении инфекций, вызываемых мультирезистентными бактериями. Данные антибактериальные средства имеют схожую структуру с пенициллинами, но в их структуре атом углерода в первой позиции замещен на атом серы, и присутствует двойная связь – отсюда вытекает их название, карбапенемы (рис. 4). Как пенициллины и цефалоспорины, карбапенемы относятся к классу бета-лактамов, которые поражают бактерии, связываясь с пенициллинсвязывающими белками, и ингибируют синтез клеточных стенок. Эффективность карбапенемов менее подвержена влиянию всевозможных механизмов устойчивости бактерий к антибиотикам по сравнению с другими бета-лактамами [44].

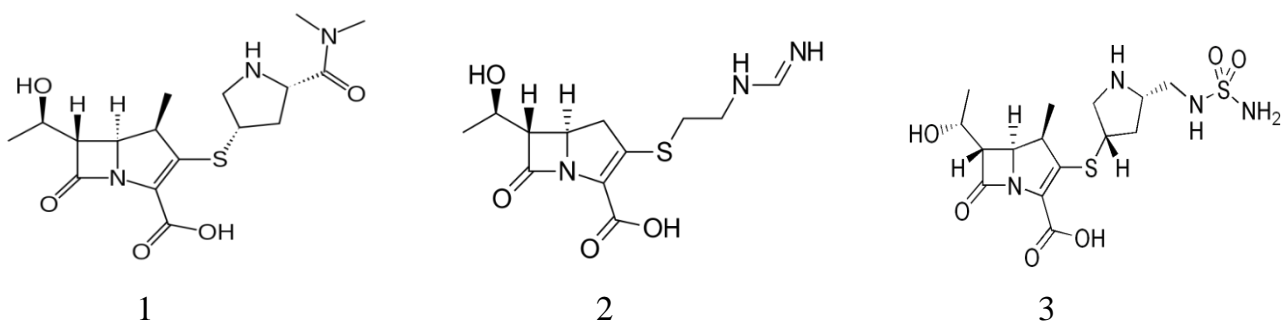


Рис.4 Структурные формулы карбапенемов меропенем (1); дорипенем (2); имипенем (3)

Карбапенемы обладают схожей антибактериальной активностью, так, было установлено, что дорипенем и меропенем эффективны как в борьбе против грамположительных бактерий, так и грамотрицательных бактерий. Эффективность меропенема подтверждена не только во многих клинических исследованиях, но и в процессе его применения в терапии при лечении многих тяжелых заболеваний, таких как бактериальный менингит, пневмония, сепсис, муковисцидоз, инфекций мочевыводящих путей, кожи, мягких тканей [45].

Фармакокинетические показатели имипенема и меропенема схожи. Данные антибиотики хорошо проникают в ткани и биологические жидкости и имеют относительно большие объемы распределения, 15,3 и 18,6 л/70 кг для имипенема и меропенема, соответственно [46]. Оба антибиотика имеют небольшие биологические времена полувыведения, приблизительно 1 час, и преимущественно выводятся из организма через почки. При применении имипенема и меропенема для лечения пациентов с почечной недостаточностью требуется корректировка их режимов дозирования. Имипенем обычно используют совместно с циластатином натрия, ингибитором почечного фермента—дегидропептидазы, с целью достижения достаточной концентрации имипенема в тканях и плазме для проявления им антимикробной активности и также для исключения нефротоксичных эффектов, вызываемых метаболитом имипенема [47]. Использование циластатина позволяет обеспечить выведение из организма с помощью почек в неизменном виде 70% введенной дозы имипенема. Несмотря на то, что меропенем тоже в некоторой степени метаболизируется в биологических жидкостях, его метаболит имеет низкий нефротоксичный потенциал [48].

Средняя концентрация имипенема-циластатина в плазме находится в диапазоне от 21 до 58 мг/л при внутривенном введении 500 мг имипенема-циластатина в течение 20 минут взрослым и составляет 41- 83 мг/л при дозе 1 г [49]. Имипенем связывается с белками плазмы примерно на 20%.

Имипенем-циластатин вводят внутривенно взрослым и детям старше 12 лет в количестве, не превышающем 4 граммов в день. Интервал дозирования обычно составляет 6 часов, но может быть увеличен до 8 часов для пациентов с легкими инфекциями, например, инфекциями мочевыводящих путей. Установленная доза для взрослых 500 мг или 1 г зависит от относительной восприимчивости патогенных микроорганизмов, степени тяжести заболевания и наличия или отсутствия осложнений.

После внутривенного введения единичной дозы меропенема в организм здоровых волонтеров средняя концентрация антибиотика в плазме составляла 23 мг/л при дозе 500 мг и 49 мг/л при дозе 1 г. После внутривенного введения 500 мг меропенема его средняя концентрация в плазме обычно уменьшается приблизительно до 1 мг/л в течение 6 часов [50]. Авторы статьи [51] определяли концентрацию меропенема в плазме пациентов больных менингитом через 1 час, 2 часа, 4 часа и 8 часов после введения антибиотика в организм человека. Полученные концентрации меропенема составили 45,04; 23,48; 5,64 и 1,20 мг/л для 1 часа, 2 часов, 4 часов и 8 часов, соответственно. Концентрация меропенема в моче составляет больше 10 мг/л и сохраняет такие значения в течение 5 ч после введения 500 мг антибиотика [52]. У пациентов с нормальной функцией почек время полувыведения меропенема составляет 1 час. Почти 70% антибиотика в неизменном виде выводится с мочой в течение 12 часов. Накопление препарата в организме не наблюдалось при введении 1 г каждые 6 часов взрослым с нормальной функцией почек. Примерно 2 % меропенема связываются белками плазмы. Меропенем хорошо проникает во многие биологические жидкости, включая спинномозговую жидкость, достигая концентраций, достаточных или превышающих необходимые для ингибирования возбудителей инфекций. Обычная доза для введения взрослым пациентам, не страдающим почечной недостаточностью, составляет 1 г каждые 8 часов [53].

Дорипенем – новый антибиотик группы карбапенемов, обладающий уникальными свойствами, что делает его наиболее эффективным антибиотиком среди карбапенемов. Дорипенем характеризуется хорошей переносимостью и отсутствием побочных эффектов по сравнению с имипенемом, низкой устойчивостью бактерий по отношению к нему. Также дорипенем характеризуется более высокими концентрациями в крови и временем полувыведения, чем меропенем и имипенем [54]. Данный антибиотик вводят внутривенно в организм пациента. После введения 250 мг дорипенема в течение 0,5 часов в организм шести добровольцев Shiba и соавторы [55] обнаружили перераспределение антибиотика из плазмы крови в слюну на 1,0-4,8 %. Авторы не говорят о взаимосвязи между временами достижения максимальной концентрации антибиотика в плазме крови и слюне и временем введения дорипенема пациентам. При введении 250 мг дорипенема добровольцам через 30 мин авторами статьи было обнаружено, что содержание дорипенема в тканях желчного пузыря составила 1,87 мг/л и 15,4 мг/л в желчи. Концентрация дорипенема в плазме достигала 46,6 мг/л. Высокое содержание дорипенема в моче 110 пациентов было обнаружено в течение 4 часов (601 мг/л) и в течение 4-8 часов (49,7 мг/л) после внутривенного введения 500 мг антибиотика в течение 60 минут. Дорипенем преимущественно выводится из организма через почки. Среднее содержание неизмененного дорипенема в моче пациентов с нормальной функцией почек составляет 68-80%. Период полувыведения дорипенема – 1 час. Среднее время полувыведения препарата увеличивается со снижением нормальной функции почек. Общий клиренс антибиотика лежит в диапазоне от 8,56 до 16,0 л/час. Плазменный клиренс составляет 15-36 л/час в здоровом организме, получающем ежедневно несколько доз дорипенема каждые 4-6 часов. Почечный клиренс дорипенема достигает 5,52-12,50 л/час. Общий клиренс данного препарата снижается со снижением клиренса креатинина.

Для сохранения исходного химического и биологического составов биологической жидкости ее необходимо хранить в месте, защищенном от проникновения солнечных лучей, и при низких температурах (-40-80 °С) в морозильных установках. Карбапенемы характеризуются неустойчивостью в биологических жидкостях, поэтому отобранные биологические образцы пациентов должны незамедлительно подвергаться анализу или же храниться в соответствующих

условиях. Так, например, авторы статьи обнаружили, что меропенем стабилен в плазме крови в течение 30 дней при температуре -40 °С [56].

Уже существующая у пациента почечная недостаточность и большое содержание карбапенемов в плазме крови являются факторами, способными вновь вызвать симптомы почечной недостаточности и нарушения деятельности центральной нервной системы. Очень важно, чтобы безопасное количество антибиотика достигло биологической жидкости пациента для лечения инфекций. Таким образом, возможность определения содержания карбапенемов в биологических образцах позволяет регулировать режим дозирования лекарственного препарата конкретного человека для сокращения вероятности возникновения побочных эффектов во время терапии.

### **1.3 Методы определения карбапенемов в биологических жидкостях**

Определение содержания карбапенемов в биологических жидкостях человека необходимо для установления безопасной дозы принимаемого лекарственного препарата, которая позволит избежать побочных эффектов во время лечения.

Наибольшее распространение среди методов определения карбапенемов получил гибридный метод ВЭЖХ с фотометрическим детектированием. Гибридные методы позволяют проводить разделение и детектирование аналитов, благодаря чему реализуется возможность определения содержания нескольких веществ одновременно. Анализ пробы обычно включает концентрирование с помощью различных методов разделения и концентрирования, позволяющих дополнительно устранить влияние матрицы. В качестве неподвижных фаз при анализе биологических жидкостей (мочи, сыворотки и плазмы крови), содержащих меропенем, используются силикагели с привитыми группами, чаще всего октадецильными [65-72]. Время удерживания меропенема обычно не превышает 10 минут. Для определения содержания меропенема применяются фотометрические, масс-спектрометрические детекторы. Минимальные пределы обнаружения при фотометрическом детектировании - 0,01 мг/л [65], [66]. Низкие пределы обнаружения достигаются при использовании масс-спектрометрического детектирования 0,005 мг/л [76].

В работе [57] представлен метод ультра-ВЭЖХ с матричным диодным детектированием для определения меропенема в плазме крови. В качестве пробоподготовки применяли миниатюризированный вариант твердофазной

экстракции. Твердофазная микроэкстракция, в сравнении с твердофазной экстракцией, характеризуется тем, что сорбционный материал непосредственно интегрирован в шприц, а не в колонку, и может быть совмещен on-line с аналитическими инструментальными методами анализа. Были исследованы следующие сорбционные материалы: материалы на основе кремния ( $C_2$ ,  $C_8$ ,  $C_{18}$ ), сильный катионообменник, и полимеры с молекулярными отпечатками. Установлено, что самым подходящим сорбционным материалом является  $C_{18}$ . Предел обнаружения составил 0,02 мг/л. Перед проведением твердофазной микроэкстракции пробы плазмы крови разбавляли ацетонитрилом и центрифугировали. Далее надосадочную жидкость помещали в коническую стеклянную колбу и упаривали под потоком азота при температуре 37 °С. Сухой остаток растворяли в 200 мкл буфера и центрифугирован в течение 10 минут. Далее надосадочная жидкость вводилась в хроматографическую систему.

Очень часто для устранения мешающего влияния матрицы пробы при определении содержания карбапенемов в биологических жидкостях используют жидкостную микроэкстракцию. Был представлен метод ультра ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием для определения содержания меропенема в плазме крови. В качестве пробоподготовки образцов плазмы использовали дисперсионную жидкостную микроэкстракцию с разделением фаз газовой фазой. Для устранения мешающего влияния белков 2 мл плазмы смешивали с 2 мл смеси, содержащей 15 % раствор сульфата цинка и 20 % раствор трихлоруксусной кислоты в соотношении 60:40; перемешивали и центрифугировали в течение 5 минут. Для уменьшения мешающего влияния матрицы пробы надосадочную жидкость разбавляли водой. К разбавленной надосадочной жидкости добавляли раствор хлорида натрия и раствор гидроксида натрия, экстрагент (1-додеканол) быстро вводили шприцом в систему, образовывалась эмульсия за счет дисперсии маленьких капель экстрагента, в которые извлекается аналит. После центрифугирования раствор охлаждали на ледяной бане для образования на поверхности раствора твердых маленьких капель 1-додеканола. Закристаллизованную фазу 1-додеканола отбирали и растворяли в 50 мкл метанола и направляли на анализ. Предел обнаружения для меропенема составил 0,025 мг/л [58]. Авторы статьи [59] разработали метод ультра ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием для совместного определения меропенема и имепенема и других 19

антибиотиков в биологических жидкостях. Инструментальному определению предшествовала процедура экстракции. Образцы мочи в два раза разбавляли подвижной фазой (метанолом и 0,01 % муравьиной кислотой) и непосредственно инжесктивировали в ВЭЖХ-МС систему. Пробы сыворотки крови смешивали с ацетонитрилом, центрифугировали, надосадочную жидкость разбавляли раствором подвижной фазы в 4 раза, анализировали. Предел обнаружения в пробах мочи для имипенема составил 0,25 мг/л; для меропенема – 0,1 мг/л. Предел обнаружения в пробах сыворотки крови составил для имипенема 0,4 мг/л; для меропенема – 0,2 мг/л.

Капиллярный электрофорез с фотометрическим детектированием без проведения предварительной экстракции был использован для определения концентраций меропенема в плазме крови и моче [60]. Пробы мочи пропускали через 0,45 мкм шприцевой фильтр и непосредственно анализировали. Плазму крови смешивали с 3 мл ацетонитрила, перемешивали, центрифугировали; надосадочную жидкость пропускали через 0,45 мкм шприцевой фильтр, анализировали. Пределы обнаружения были равны 0,5 мг/л для плазмы крови и 0,3 мг/л для мочи.

Мицеллярная электрокинетическая хроматография (МЭКХ) является одним из вариантов капиллярного электрофореза. Его работа основывается на разделении составов ионного и нейтрального характера, а для проведения данного процесса используется поверхностно-активные вещества (ПАВ). Определение концентрации меропенема в пробе осуществлялось методом МЭКХ при непосредственном инжесктивировании образцов сыворотки крови без предварительной пробоподготовки [61]. В качестве подвижной фазы использовали буфер: тетраборат натрия (25 ммоль/л) – гидроксид натрия (0,1 моль/л), содержащий додецил сульфат натрия (90 ммоль/л) (рН 10,0). Линейный диапазон определяемых концентраций составил 1-200 мг/л; предел обнаружения – 0,2 мг/л. Авторами статьи [62] была представлена МЭКХ для определения меропенема в пробах плазмы крови и спинномозговой жидкости. Образцы спинномозговой жидкости анализировались непосредственно без пробоподготовки; для пробоподготовки плазмы крови использовалась твердофазная экстракция с применением колонки C<sub>18</sub>. Линейный диапазон определяемых концентраций был 0,5-50 мг/л как для плазмы крови, так и для спинномозговой жидкости. Предел обнаружения составил для плазмы крови 0,2 мг/л, для спинномозговой жидкости – 0,3 мг/л.

Для автоматизации методики определения меропенема был использован проточный анализ. Проточно-инжекционный анализ (ПИА), схема которого предполагает периодическое введение дискретных порций пробы в непрерывный ламинарный несегментированный поток носителя, является одним из самых распространенных методов, используемых для автоматизации химического анализа. Основными достоинствами ПИА являются: высокая воспроизводимость результатов анализа; большая производительность по числу анализов, выполняемых в единицу времени; осуществление химико-аналитических реакций в закрытой в техническом смысле слова проточной системе при отсутствии контакта раствора с атмосферой, что обеспечивает возможность анализа химически неустойчивых аналитов и возможность использования неустойчивых реагентов и их генерирование непосредственно в потоке. Авторы статьи [63] впервые разработали метод определения меропенема в сыворотке крови человека, совмещающий ПИА и хемилюминесцентную систему. Присутствие меропенема в реакционной системе увеличивало сигнал хемилюминесценции. Для хемилюминесцентного детектирования в условиях ПИА была использована схема, представленная на рис. 5. Щелочной раствор люминола, наночастицы  $\text{CuO}$ , вода в качестве носителя, раствор пробы и раствор  $\text{KMnO}_4$  пропускали в детектор с помощью перистальтического насоса. Щелочной раствор люминофора и раствор пробы смешивались в смесительной спирали; после 100 мкл раствора смеси вводились в поток носителя. Далее смесь смешивалась с раствором  $\text{KMnO}_4$  и доставлялась в проточную ячейку, где происходило детектирование аналитического сигнала. Перед проведением анализа пробу смешивали с трихлоруксусной кислотой, центрифугировали, анализировали надосадочную жидкость. Предел обнаружения данного метода составил 0,0036 мг/л.



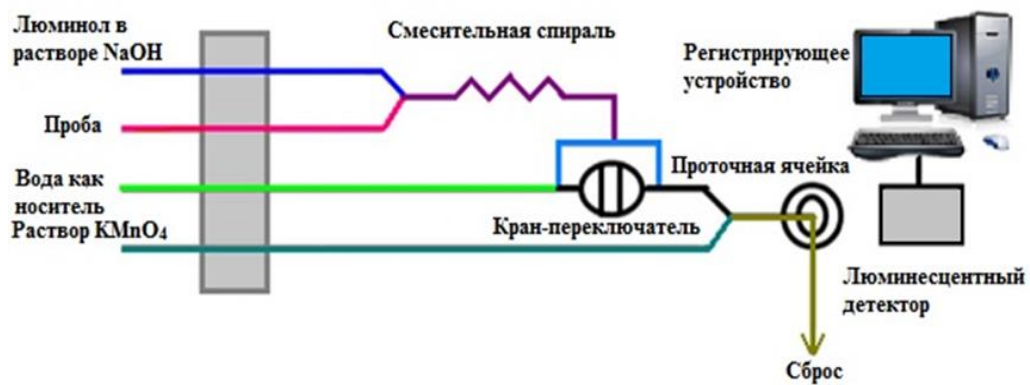


Рис.5 Схема хемилюминесцентного ПИА определения меропенема в пробах сыворотки крови [63]

Другие методики определения меропенема, имипенема и дорипенема коротко представлены в таблицах 1-3.

Таблица 1. Характеристики методов, используемых для определения меропенема: ДОК – диапазон определяемых концентраций; ПО – предел обнаружения; МЭХХ – мицеллярная электрокинетическая хроматография; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; КЭ – капиллярный электрофорез; ПИА – проточно-инжекционный анализ.

Метод детектирования		Объект анализа	Метод пробоподготовки	ДОК	ПО	Ссылка
Ультра-ВЭЖХ	Фотометрическое в УФ области	плазма крови	твёрдофазная экстракция с применением картриджей C <sub>2</sub> , C <sub>8</sub> , C <sub>18</sub> , сильного катионообменника, полимеров, полимеров с молекулярными отпечатками	-	0,02 мг/л	[57]
			разбавление ацетонитрилом	0,5-100 мг/л		[64]
	Диодно-матричное	плазма крови	дисперсионная микроэкстракция	0,1-100 мг/л	0,025 мг/л	[58]
	Масс-спектрометрическое	моча/сыворотка крови	жидкостно-жидкостная экстракция	-	0,1/0,2 мг/л	[59]
ВЭЖХ	Фотометрическое в УФ области	плазма крови	ультрафильтрация	0,05-100 мг/л	0,01 мг/л	[65]
			твёрдофазная экстракция с применением картриджа C <sub>18</sub>	0,02-50 мг/л	0,01 мг/л	[66]
			добавление ацетонитрила	0,5-80 мг/л	0,08 мг/л	[67]
			твёрдофазная экстракция	2,5-60 мг/л	0,8 мг/л	[68]
		кровь	твёрдофазная экстракция с применением картриджа C <sub>18</sub>	5,0-100 мг/л	1,25 мг/л	[69]

		спинномозговая жидкость	-	0,05-50 мг/л	0,01 мг/л	[70]
		плазма/диализат	твердофазная экстракция с применением колонки C <sub>18</sub>	5,0-100 мг/л	1,25 мг/л	[71]
		моча/плазма крови	добавление метанола, твердофазная экстракция	0,5-10 мг/л	0,5 мг/л	[72]
	<b>Автоматизация пробоподготовки, совмещенная с ВЭЖХ с фотометрическим детектированием в УФ области</b>	бронхиальный секрет/сыворотка	on-line твердофазная экстракция	0,5-40 мг/л	0,2 мг/л	[73]
		крови сыворотка крови	on-line твердофазная экстракция	1,0-100 мг/л	0,1 мг/л	[74]
	<b>Масс-спектрометрическое</b>	моча/сыворотка крови/спинномозговая жидкость	твердофазная экстракция с применением колонки C <sub>18</sub>	0,01-1,0 мг/л	0,005 мг/л	[75]
		сыворотка крови	твердофазная экстракция	0,1-50 мг/л	0,05 мг/л	[76]
	<b>МЭКХ</b>	<b>Фотометрическое в УФ области</b>	сыворотка крови	-	0-200 мг/л	2 мг/л
плазма крови/спинномозговая жидкость			твердофазная экстракция с применением колонки C <sub>18</sub>	0,5-50 мг/л	0,2 мг/л/0,3 мг/л	[62]
<b>КЭ</b>	<b>Фотометрическое в УФ области</b>	плазма крови/моча	добавление ацетонитрила	0,5-200 мг/л	0,5мг/л/0,3 мг/л	[60]
<b>ПИА</b>	<b>Хемилюминесцентное</b>	сыворотка крови	традиционная жидкостная экстракция	0,005-6 мг/л	0,0036 мг/л	[63]

Таблица 2. Характеристики методов, используемых для определения дорипенема: ДОК – диапазон определяемых концентраций; ПО – предел обнаружения; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография.

Метод		Объект анализа	Метод пробоподготовки	ДОК	ПО	Ссылка
ВЭЖХ	Фотометрическое	сыворотка крови/перитонеальный экссудат	ультрафильтрация	0,05-100 мг/л/0,05-100 мг/л	0,02 мг/л	[77]
		сыворотка крови	твёрдофазная экстракция	0,5-40 мг/л	0,8 мг/л	[78]
		плазма крови	твёрдофазная экстракция	0,5-50 мг/л	0,8 мг/л	[79]

Таблица 3. Характеристики методов, используемых для определения имипенема: ДОК – диапазон определяемых концентраций; ПО – предел обнаружения; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография.

Метод		Объект анализа	Метод пробоподготовки	ДОК	ПО	Ссылка
Дифференциальная импульсная полярография		моча	-	-	0,95-3,4 мг/л	[80]
Инверсионная адсорбционная вольтамперометрия		моча	-	-	1,63 мкг/л	[81]
Производная спектрофотометрия		плазма крови/моча	жидкостно-жидкостная экстракция	-	3 мг/л/2 мг/л	[82]
ВЭЖХ	Фотометрическое	плазма/диализат/ультрафильтрат плазмы	жидкостно-жидкостная экстракция	0,25-100 мг/л	0,8 мг/л	[83]
		сыворотка крови	ультрафильтрация	-	0,3 мг/л	[84]
		плазма крови	ультрафильтрация	0,1-100 мг/л	0,03 мг/л	[85]
			жидкостно-жидкостная экстракция	0,3-100 мг/л	0,07 мг/л	[86]
		сыворотка крови/ткань	жидкостно-жидкостная экстракция	-	0,5 мг/л	[87]
	Флуориметрическое	моча	жидкостно-жидкостная экстракция	0,35-42 мг/л	0,11 мг/л	[88]

## **Заключение**

В настоящее время многие методы пробоподготовки объектов анализа со сложной матрицей, в частности биологических жидкостей, основаны на применении ГЖМЭ. Гомогенная жидкостная мироекстракция позволяет достичь больших коэффициентов распределения аналитов и эффективно устранить мешающее влияние компонентов матрицы пробы. В основном ГЖМЭ применяется в комбинации с ВЭЖХ анализом с различными видами детектирования.

Однако предложенные на данный момент способы реализации ГЖМЭ не лишены недостатков. Самым существенным недостатком является необходимость использования в качестве инициаторов разделения фаз солей или других реагентов для изменения рН системы, что может привести к загрязнению пробы и хроматографической системы.

Карбапенемы находят широкое применение в медицине в качестве лекарственных препаратов, поэтому необходим постоянный контроль их содержания в биологических жидкостях, так как они способны оказывать негативное воздействие на организм человека. Поскольку состав матрицы биологических жидкостей в значительной степени может влиять на определение содержания карбапенемов, разработка методов предварительного концентрирования и выделения антибиотиков является актуальной задачей в аналитической химии.

## Глава 2. Методика экспериментальных исследований

### 2.1 Оборудование

1. ВЭЖХ анализ проводился с помощью жидкостного хроматографа «Стайер» с фотометрическим детектором с длиной волны поглощения равной 298 нм. Хроматографическое разделение проводилось на колонке Luna C18 (250 × 4,6 мм, размер частиц 5 мкм) в изократическом режиме при температуре 30 °С. Подвижная фаза представляла собой смесь ацетонитрила и 0,5 % раствора муравьиной кислоты в соотношении 80:20. Скорость потока подвижной фазы составляла 0,75 мл/мин.

2. Электронные весы «Ohaus Pioneer PA214C» (Китай); 2-ой класс точности; предел взвешивания 210 г; погрешность 0,1 мг.

3. Центрифуга лабораторная медицинская «СМ-50» (Латвия); скорость вращения ротора – 1000-15000 об/мин.

4. Исследование фаз методом динамического рассеяния осуществлялось с помощью установки PhotoCor Complex (Фотокор, Россия), погрешность измерения ±1%; углы рассеяния от 10° до 150°, погрешность 0,01°; источник излучения – диодный лазер: 445 или 654 нм; диапазон температур от 15 °С до 105 °С, погрешность 0,1 °С.

5. рН-метр рН-410, «Аквилон» (Россия).

6. Спектрофотометр «UVmini-1240» (Shimadzu, Япония). Спектральный диапазон от 220 до 900 нм.

7. Газовый хроматограф «Хроматэк-Кристалл 5000». Использовалась капиллярная колонка с полярной фазой (полиэтиленгликоль) OPTIMA WAXplus (30 м × 0,32 мм × 0,25 мкм). Детектор – ПИД (расход водорода – 50 мл/мин; температура - 250 °С). Газ-носитель – гелий. Режим элюирования: 50 °С в течение 4 минут, повышение температуры со скоростью 40 °С/мин до 250 °С в течение 5 минут, 250 °С в течение 5 минут. Дозируемый объем – 0,5 мкл. Температура испарителя – 200 °С. Скорость газа носителя (при 50 °С) – 2,3 мл/мин; давление – 75,621 кПа.

## 2.2 Реактивы и материалы

При выполнении экспериментальной части работы использовали следующие реактивы:

1. 1-Октиламин, х.ч.;
2. 1-Гептиламин, х.ч.;
3. 1-Нониламин, х.ч.;
4. 1-Дециламин, х.ч.;
5. Меропенем, х.ч.;
6. Метанол, х.ч.;
7. Ацетонитрил, х.ч.;
8. Карбонат натрия, ч.д.а., ГОСТ 83-79;
9. Гидрофосфат натрия, х.ч., ГОСТ 4172-76;
10. Дигидрофосфат натрия, х.ч., ГОСТ 245-76;
11. Хлорид натрия, х.ч., ГОСТ 4233-77;
12. Лимонная кислота, ч., ГОСТ 908-2004;
13. Глюкоза, х.ч., ГОСТ 975-88;
14. Гиппуровая кислота, ч.д.а.;
15. Креатин, ч.д.а.;
16. Глицин, ч.д.а.ГОСТ 5860-75;
17. Мочевая кислота, ч.д.а.;
18. Мочевина, ч.д.а., ГОСТ 2081-92;
19. Сульфат калия, ч.д.а., ГОСТ 4145-74;
20. Хлорид аммония, ч.д.а., ГОСТ 3773-72;
21. Хлорид кальция, ч.д.а., ГОСТ 450-77;
22. Нитрат магния, ч.д.а., ГОСТ 11088-75;
23. Нитрат натрия, ч.д.а., ГОСТ 19906-74.

## 2.3 Приготовление растворов

### *Приготовление 1,0 г/л раствора меропенема*

В химический стакан помещали 0,0113 г тригидрата меропенема, добавляли 5 мл дистиллированной воды, перемешивали до полного растворения антибиотика. Раствор количественно переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, промывали стакан двумя порциями дистиллированной воды по 2,5 мл, доводили объем раствора в



колбе до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивали. Рабочие растворы меропенема готовили путем последовательного разбавления исходного раствора дистиллированной водой.

#### *Приготовление 0,5% муравьиной кислоты*

В колбу вместимостью 500 мл с помощью мерной пипетки добавляли 2,9 мл концентрированной муравьиной кислоты (85%), доводили объем раствора в колбе до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивали.

#### *Приготовление 50 ммоль/л раствора дигидрофосфата натрия*

В химический стакан помещали 3,9 г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , добавляли 20 мл дистиллированной воды и перемешивали смесь до полного растворения соли. Раствор количественно переносили в мерную колбу вместимостью 500 мл, промывали стакан тремя порциями дистиллированной воды по 10 мл, доводили объем раствора в колбе до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивали.

#### *Приготовление 50 ммоль/л раствора гидрофосфата натрия*

В химический стакан помещали 3,55 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , добавляли 20 мл дистиллированной воды и перемешивали смесь до полного растворения соли. Раствор количественно переносили в мерную колбу вместимостью 500 мл, промывали стакан тремя порциями дистиллированной воды по 10 мл, доводили объем раствора в колбе до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивали.

#### *Приготовление 50 ммоль/л фосфатного буферного раствора (pH 6,4)*

В емкость вместимостью 500 мл добавляли 127,5 мл 50 ммоль/л раствора гидрофосфата натрия и 372,5 мл 50 ммоль/л дигидрофосфата натрия и перемешивали. pH контролировали с помощью pH-метра.

### **2.4 Отбор и подготовка проб**

Пробы сыворотки и плазмы крови, не содержащие меропенем, были помещены в холодильник и хранились в пластиковых контейнерах при +2 °C. Для приготовления модельных растворов в каждую пробу биологической жидкости объемом 1 мл вводили добавку раствора меропенема и оставляли в состоянии покоя на 30 минут для взаимодействия аналита с матрицей пробы.

### **Глава 3. ВЭЖХ-УФ определение меропенема с предварительным микроэкстракционным концентрированием**

#### **3.1 Теоретические аспекты и предполагаемый механизм гомогенной жидкостной микроэкстракции с разделением фаз полярным растворителем**

ГЖМЭ основана на добавлении дополнительного реагента к гомогенному раствору для инициирования разделения водной и органической фаз. Как уже отмечалось в литературном обзоре, введение дополнительных реагентов в экстракционную систему, таких как соли или сахараиды, может привести к загрязнению пробы и хроматографической системы. С целью устранения данной проблемы нами была предложена идея нового микроэкстракционного метода - гомогенной жидкостной микроэкстракции с разделением фаз полярным растворителем. В данной работе для реализации ГЖМЭ были применены в качестве экстрагентов первичные амины. Также было предложено использовать полярные растворители для инициирования выделения органической фазы амина. При этом нет необходимости использовать реагенты, неблагоприятные для осуществления хроматографического анализа.

Основываясь на общих химических свойствах веществ, можно предположить, какие процессы протекают в системе первичный амин/аналит/водная фаза/полярный растворитель при реализации ГЖМЭ с разделением фаз полярным растворителем. При добавлении первичного амина к раствору пробы происходит образование изотропного раствора и значительное увеличение вязкости системы по сравнению с вязкостью исходной пробы. Феномен образования изотропного раствора при смешении амина и водной фазы можно объяснить образованием гидратов амина [89]. Для разрушения изотропного раствора были применены полярные растворители. Для этого в анализируемую смесь шприцом быстро вводили полярный растворитель, что приводило к интенсивному перемешиванию фаз, диспергированию фазы амина, увеличению площади массообмена и образованию эмульсии. Предположительно, разрушение изотропного раствора происходит за счет большей растворимости полярного растворителя в водной фазе, что уменьшает число доступных молекул воды для взаимодействия с амином, поэтому его растворимость снижается. Для полного разделения фаз применяли центрифугирование (рис. 6).

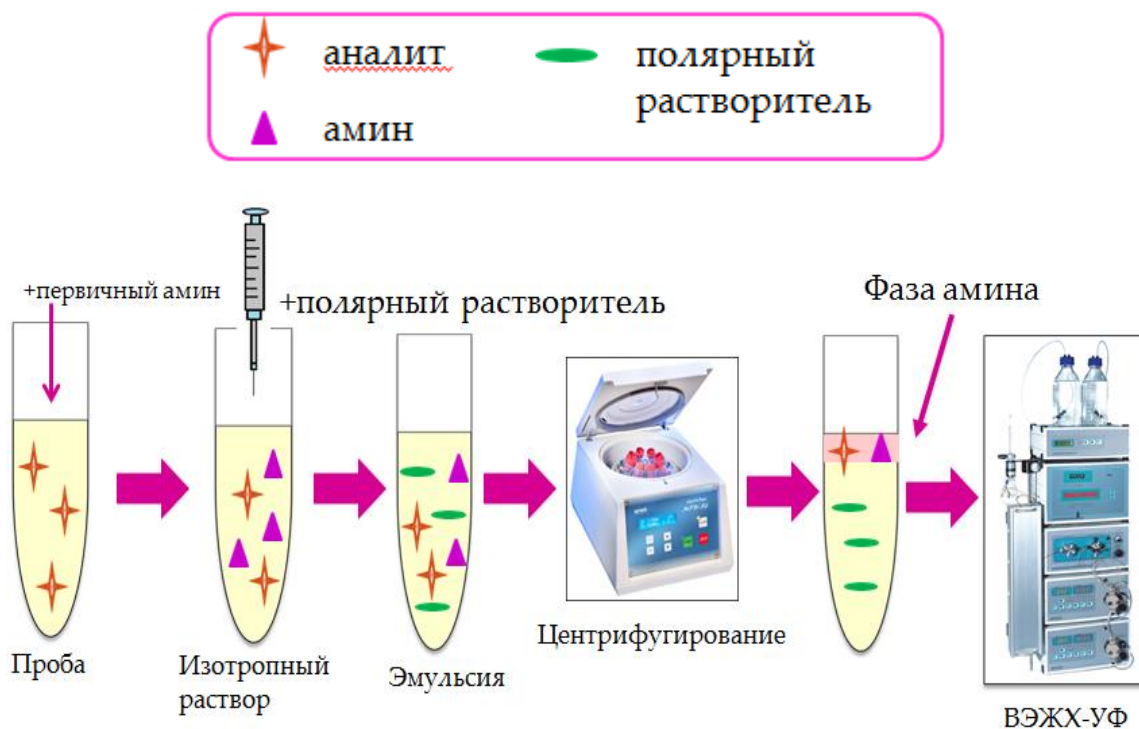


Рис.6 Предполагаемый механизм ГЖМЭ с разделением фаз полярным растворителем

Отличительной чертой данного метода по сравнению с ранее предложенными вариантами ГЖМЭ является использование полярных растворителей не в качестве экстрагентов, а как инициаторов разрушения гомогенной системы. Кроме того, применение полярных растворителей, таких как метанол или ацетонитрил, способствует осаждению белков и других макромолекулярных компонентов матрицы биологических жидкостей. Также их применение позволяет избежать попадания солей в ВЭЖХ систему.

Следует отметить, что предложенная схема позволяет извлекать пробы только в щелочной среде, что не всегда может быть применимо для определения аналитов, способных к ионизации или разрушению в щелочной среде.

### 3.2 Иллюстрация аналитических возможностей предложенного метода

Для изучения возможностей гомогенной жидкостной микроэкстракции была выбрана задача определения антибиотика меропенема в биологических жидкостях. Последовательность операций включает следующие стадии. Изначально, к 1 мл пробы, содержащей аналит, добавляли 50 мкл амина и перемешивали в течение 2 минут для образования гомогенной системы. Далее к полученному раствору добавляли шприцом 200 мкл ацетонитрила. Введение ацетонитрила провоцировало

разрушение гомогенной системы и образование эмульсии. Для разрушения эмульсии и эффективного разделения фаз проводили центрифугирование в течение 5 минут при 7000 об/мин. Далее 50 мкл органической фазы отбирали микропипеткой, разбавляли 50 мкл метанола для уменьшения вязкости органической фазы и инжесктировали в ВЭЖХ-УФ систему с установленной длиной волны поглощения 298 нм.

### **3.3 Оптимизация параметров, влияющих на эффективность микроэкстракции**

#### **3.3.1 Выбор метода анализа**

Биологические жидкости являются сложными по составу матрицами, поскольку содержат в себе как неорганические, так и органические компоненты. Так, в состав мочи входят не только такие основные компоненты, как катионы щелочных и щелочноземельных металлов ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $NH_4^+$ ), анионы сильных и слабых кислот ( $Cl^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $HPO_4^{2-}$ , оксалат- и цитрат-ионы), мочевины, креатин, мочевая и гиппуровая кислоты, но и различные метаболиты, а также лекарственные вещества [90]. Порядка 7-8 % состава плазмы крови составляют белки, которые представлены альбуминами, глобулинами, фибриногеном. Также в состав плазмы крови входят азотсодержащие соединения (аминокислоты, мочевины, мочевая кислота, креатинин). Неорганические вещества плазмы крови составляют 0,9 – 1%. К этим веществам относятся в основном катионы  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$  и анионы  $Cl^-$ ,  $HPO_4^{2-}$ ,  $HCO_3^-$  [91]. Сыворотка крови — плазма крови, лишённая фибриногена; по химическому составу схожа с плазмой крови [92]. Слюна имеет в своем составе белки (например, альбумин), а также вещества небелковой природы, такие как мочевины, аминокислоты, креатинин, мочевая кислота. Неорганические вещества слюны представлены следующими катионами  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$  и анионами  $Cl^-$ ,  $HPO_4^{2-}$ ,  $HCO_3^-$ ,  $CO_3^{2-}$  [93]. Компоненты биологической жидкости могут оказывать мешающее влияние на определение целевого аналита, что негативно сказывается на результатах химического анализа. Важным фактором при выборе метода анализа является содержание аналита в выбранном объекте анализа. Концентрация меропенема в моче составляет больше 10 мг/л и сохраняет такие значения в течение 5 ч после введения 500 мг антибиотика каждые 8 часов. Известно, что максимальная концентрация меропенема в плазме и сыворотке крови может достигать значения 23 мг/л после

введения 500 мг антибиотика. Таким образом, в качестве метода анализа для определения содержания меропенема был выбран ВЭЖХ с фотометрическим детектированием в ультрафиолетовой области, так как ВЭЖХ позволяет разделить вещества и таким образом устранить влияние возможных мешающих компонентов, а фотометрия – обеспечить необходимую чувствительность анализа.

Для достижения максимальной чувствительности анализа был снят спектр поглощения меропенема (рис. 7). Максимальная интенсивность поглощения была достигнута при длине волны возбуждения 298 нм.

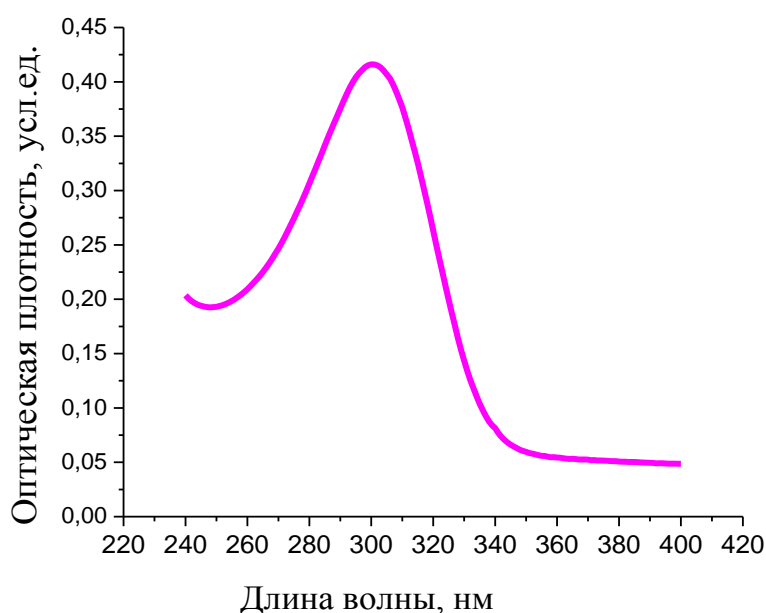


Рис.7 Спектр поглощения водного раствора меропенема при комнатной температуре (С (меропенема) – 10 мг/л)

Известно, что меропенем не устойчив в щелочной среде. Авторы статьи [94] изучали кинетику разложения меропенема в щелочном растворе методами ядерного магнитного резонанса и масс-спектрометрии. Щелочной раствор меропенема (1 мг/л) готовили, используя 0,1 моль/л раствор гидроксида натрия. Было выявлено, что основной продукт деградации меропенема в щелочной среде – натриевая соль деривата с раскрытым лактамным кольцом, образованная гидролизом лактамного кольца и ионизацией карбоксильной и гидроксильной групп (рис. 8).

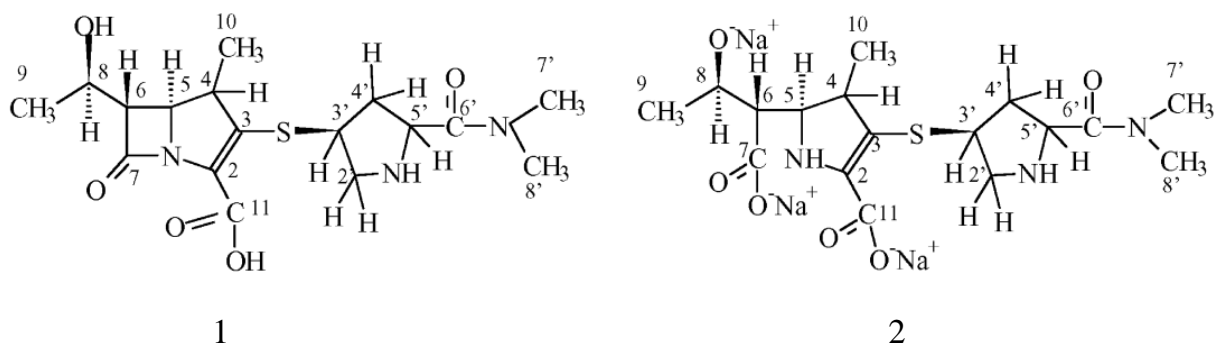
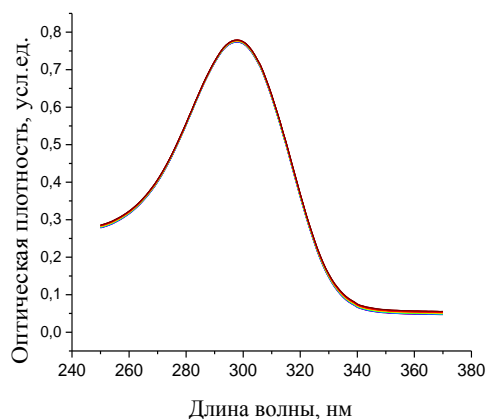


Рис.8 Химическая структура меропенема (1) и его продукта щелочного разложения (2) [94]

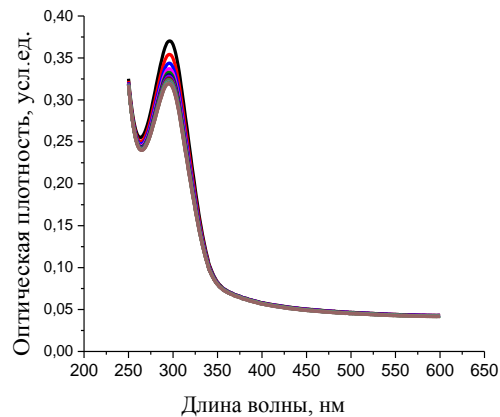
Так как в предложенной схеме ГЖМЭ с разделением фаз полярным растворителем применение амина обуславливает щелочную среду раствора, нами была изучена кинетика разложения меропенема методом спектрофотометрии.

Была изучена устойчивость стандартного водного раствора меропенема: были сняты спектры поглощения водного раствора меропенема (25 мг/л) при комнатной температуре в течение 45 минут (рис. 9.1). Была изучена кинетика щелочного раствора меропенема (25 мг/л в 0,5 М гидроксиде натрия) (рис. 9.2).

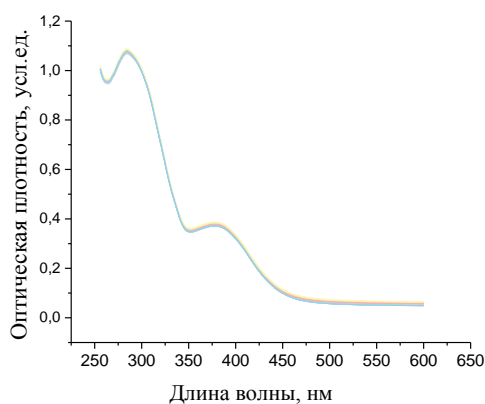
Была проведена стадия микроэкстракции из стандартного водного раствора меропенема (25 мг/л), органическая фаза была отобрана и разбавлена метанолом в 2 раза, после чего были сняты спектры поглощения в течение 45 минут (рис. 9.3). Также была проведена микроэкстракция из водного раствора пробы, не содержащей меропенем, органическая фаза была отобрана и разбавлена метанолом в 2 раза, далее были сняты спектры поглощения в течение 45 минут (рис. 9.4).



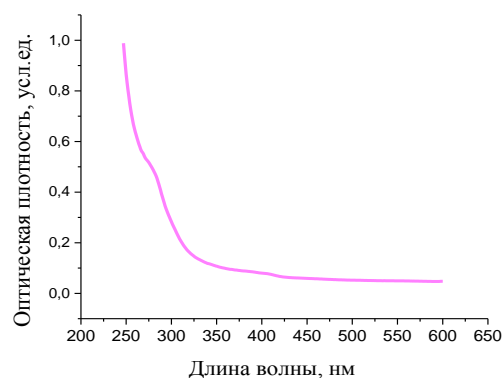
1



2



3



4

Рис.9 Изучение кинетики разложения водного раствора меропенема (С меропенема – 25 мг/л) (1); Изучение кинетики разложения щелочного раствора меропенема (С меропенема – 25 мг/л) (2); Изучение кинетики разложения органической фазы, выделяющейся после проведения ГЖМЭ с разделением фаз полярным растворителем (С меропенема – 25 мг/л) (3); Изучение кинетики разложения органической фазы, выделяющейся после проведения ГЖМЭ с разделением фаз полярным растворителем в отсутствие меропенема (4)

Исходя из полученных спектров поглощения, можно сделать вывод о том, что нейтральный стандартный водный раствор меропенема устойчив при комнатной температуре в течение 45 минут; максимум поглощения достигается при 298 нм. В щелочном растворе меропенема наблюдается его постепенное разложение; максимум длины поглощения при 298 нм. В спектрах поглощения органической фазы после микроэкстракции вместе с основным максимумом поглощения при длине волны 298 нм появляется менее интенсивный второй максимум поглощения при длине волны 383

нм. Однако следует отметить, что в фазе амина меропенем сохраняет свою стабильность по сравнению с раствором меропенема в щелочи, что позволяет применять амин в качестве экстрагента для определения меропенема.

### 3.3.2 Выбор оптимальной подвижной фазы

Основываясь на литературных данных, в качестве подвижной фазы для ВЭЖХ-УФ определения меропенема была выбрана система ацетонитрил – 0,5% муравьиная кислота в соотношении 80:20. Применение муравьиной кислоты необходимо для растворения амина, чтобы устранить его мешающее влияние на хроматографический анализ меропенема. Время удерживания меропенема составляет 5,65 мин (рис. 10).

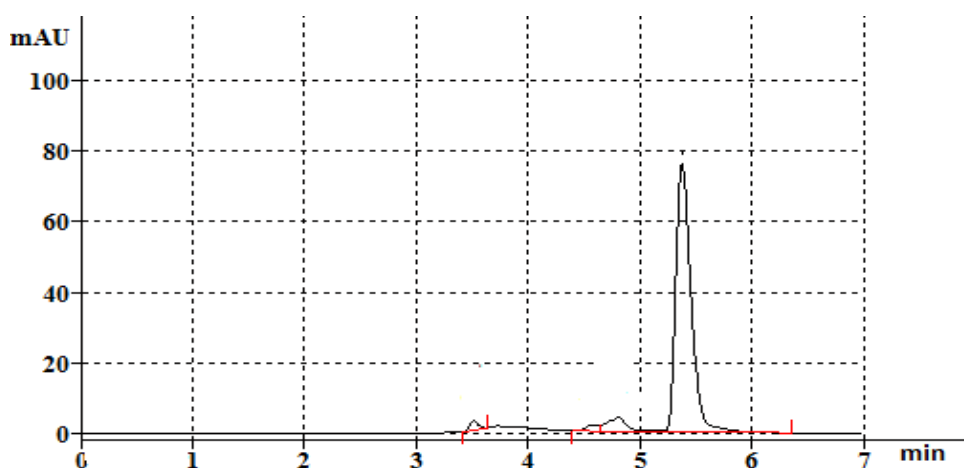


Рис.10 Типичная хроматограмма меропенема (С меропенема – 20 мг/л) в органической фазе 1-октиламина после проведения ГЖМЭ с разделением фаз полярным растворителем

### 3.3.3 Выбор оптимального экстрагента

В качестве экстрагентов для определения содержания меропенема была исследована возможность применения высших первичных аминов, таких как 1-гептиламин, 1-октиламин, 1-нониламмин, 1-дециламмин. Для выбора наиболее эффективного экстрагента проводили следующий эксперимент. К 1 мл водного раствора пробы меропенема добавляли 50 мкл экстрагента, перемешивали в течение 2 мин, добавляли 200 мкл ацетонитрила, перемешивали, центрифугировали при 7000 об/мин. Отбирали органическую фазу амина, разбавляли метанолом и отправляли на ВЭЖХ-УФ анализ. Все исследуемые первичные амины показали приблизительно равную эффективность извлечения меропенема. Однако для образования эмульсии из изотропного раствора при использовании 1-нониламина и 1-дециламина требуется больший объем ацетонитрила, чем при использовании 1-гептиламина и 1-октиламина.



В качестве экстрагента для дальнейших исследований был выбран 1-октиламин (таблица 4).

Таблица 4. Выбор оптимального экстрагента

Экстрагент	Степень извлечения, %
1-Гептиламин	69
1-Октиламин	77
1-Нониламин	79
1-Дециламин	81

### 3.3.4 Выбор оптимального объема экстрагента

При выборе оптимального объема 1-октиламина, была проведена экстракция меропенема из 1 мл его водного раствора. При этом объем вводимого 1-октиламина варьировали в диапазоне от 25 до 125 мкл. После добавления 1-октиламина к раствору меропенема, смесь перемешивали, далее добавляли 200 мкл ацетонитрила, центрифугировали в течение 5 минут при 7000 об/мин, фазу амина отбирали, разбавляли метанолом в соотношении 1:1 и инжигировали в ВЭЖХ-УФ систему. Оптимальный объем составил 50 мкл (рис. 11). При использовании больших объемах экстрагента наблюдается разбавление аналита в объеме экстрагента и снижение эффективности экстракции. При объемах ниже 50 мкл наблюдалась низкая воспроизводимость результатов.

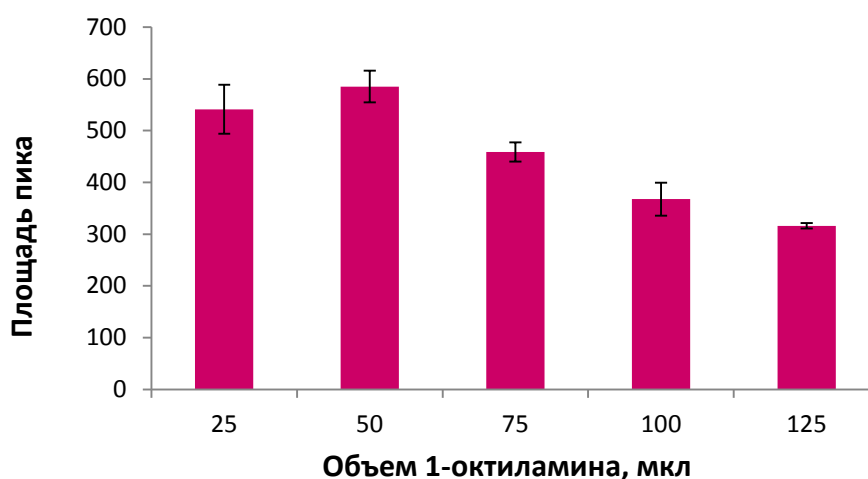


Рис.11 Влияние объема экстрагента на эффективность экстракции меропенема (С (меропенема) – 20 мг/л; объем пробы – 1 мл; объем ацетонитрила – 200 мкл)

### 3.3.5 Выбор оптимального полярного растворителя

Для исследования влияния полярного растворителя на аналитический сигнал были выбраны следующие наиболее часто используемые растворители: метанол, изопропанол, этанол, ацетонитрил. К 1 мл водного раствора меропенема добавляли 50 мкл 1-октиламина, перемешивали в течение 2 мин и добавляли 200 мкл одного из выбранных растворителей, перемешивали, центрифугировали при 7000 об/мин в течение 5 минут; отбирали органическую фазу и разбавляли метанолом в соотношении 1:1 и инжестировали в ВЭЖХ-УФ систему. Наибольший аналитический сигнал и наименьшее значение СКО были достигнуты при использовании ацетонитрила (рис. 12).

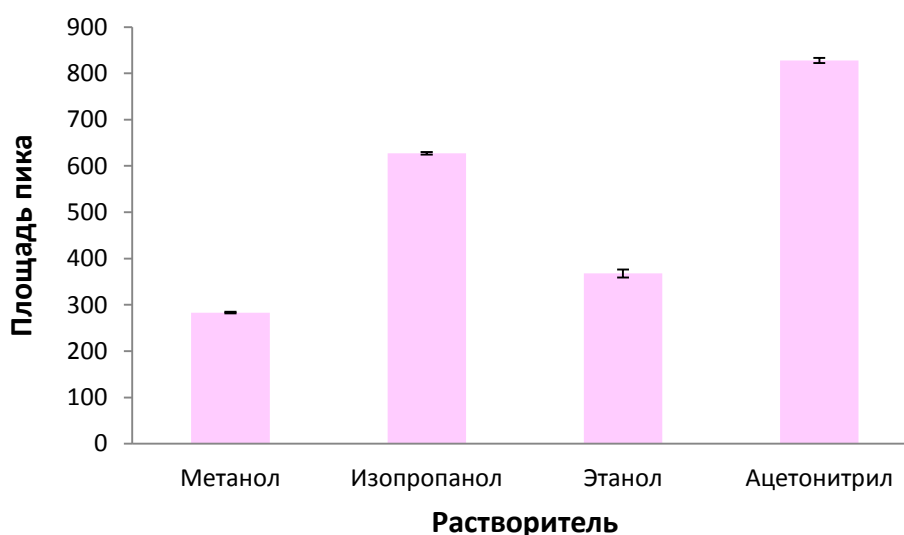


Рис.12 Влияние типа растворителя на эффективность экстракции меропенема (С (меропенема) – 20 мг/л; объем пробы – 1 мл; объем 1-октиламина – 50 мкл)

### 3.3.6 Выбор оптимального объема ацетонитрила

Объем ацетонитрила изменяли в пределах от 50 до 300 мкл при фиксированном объеме пробы 1 мл и объеме 1-октиламина 50 мкл. К 1 мл водного раствора меропенема добавляли 50 мкл 1-октиламина, перемешивали в течение 2 мин и добавляли определенный объем ацетонитрила, перемешивали, центрифугировали при 7000 об/мин в течение 5 минут; отбирали органическую фазу и разбавляли метанолом в соотношении 1:1 и инжестировали в ВЭЖХ-УФ систему. Установлено, что площади хроматографических пиков возрастают с увеличением объема ацетонитрила до 200 мкл. Использование объема полярного растворителя менее 200 мкл недостаточно для разрушения изотропного раствора и выделения собственной фазы экстрагента. При

дальнейшем увеличении объема ацетонитрила (более 200 мкл) степень извлечения резко падает из-за частичного растворения 1-октиламина и изменения коэффициентов распределения меропенема. Оптимальным был выбран объем 200 мкл, так как в этом случае наблюдается максимальная степень извлечения (рис. 13).

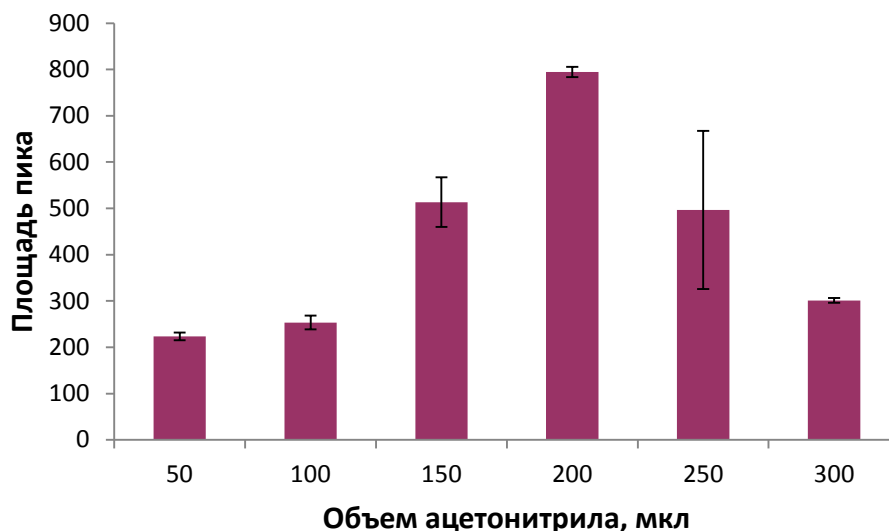


Рис.13 Влияние объема ацетонитрила на эффективность экстракции меропенема ( $C$  (меропенема) – 20 мг/л; объем пробы – 1 мл; объем 1-октиламина – 50 мкл)

### 3.3.7 Выбор оптимального времени образования изотропного раствора

Было изучено влияние времени проведения экстракции на эффективность экстракционного процесса. При выбранных оптимальных условиях (объем экстрагента 50 мкл; объем ацетонитрила 200 мкл) варьировали время перемешивания фаз после добавления к пробе 1-октиламина. Для изучения были выбраны времена перемешивания, равные 0,5; 1; 2; 5 и 7 минутам. Наилучшую эффективность экстракции и наименьшее СКО показало время перемешивание равное 2 минутам (рис. 14).

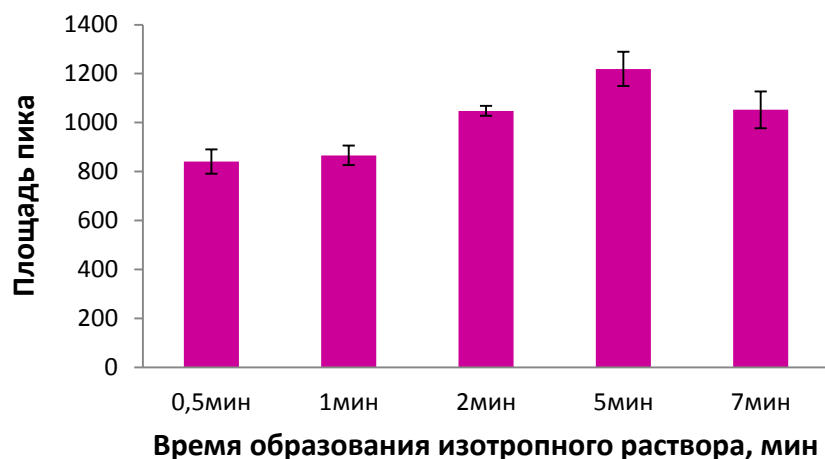


Рис.14 Влияние времени образования изотропного раствора (С (меропенема) – 20 мг/л; объем пробы – 1 мл; объем 1-октиламина – 50 мкл)

### 3.4 Определение физико-химических характеристик системы: $H_2O$ -1-октиамин-ацетонитрил

#### 3.4.1 Определение содержания ацетонитрила в фазе 1-октиламина

Для определения содержания ацетонитрила в фазе экстрагента (1-октиламина) был выбран метод газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектированием. Газохроматографический анализ проводился на газовом хроматографе «Хроматэк-Кристалл 5000» с использованием капиллярной колонки с полярной фазой. В качестве газа-носителя использовали гелий. Измерения проводились при изотермическом режиме (50 °С, 4 минуты), потом увеличивали температуру со скоростью 40 °С/мин до 250 °С. Дозируемый объем пробы был равен 0,5 мкл.

На первом этапе необходимо было построить градуировочную зависимость аналитического сигнала ацетонитрила от его содержания в метаноле. Были получены модельные растворы метанола с разным содержанием ацетонитрила. Линейный диапазон определяемых концентраций для ацетонитрила в растворе метанола составил от 5 до 43 %. В качестве аналитического сигнала были выбраны площади хроматографических пиков. Времена выхода компонентов: метанол – 2,60 мин; ацетонитрил – 3,25 мин; 1-октиамин – 7,15 мин. Была получена следующая градуировочная зависимость (рис. 15).

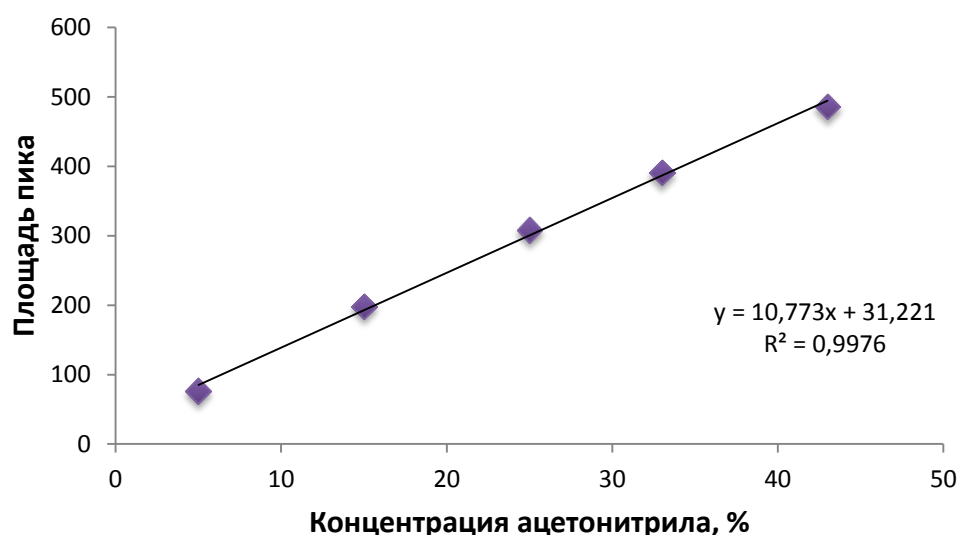


Рис.15 Градуировочная зависимость для определения содержания ацетонитрила в фазе 1-октиламина

Далее 1 мл воды смешивали с 50 мкл 1-октиламина, перемешивали в течение 2 минут, добавляли 200 мкл ацетонитрила, перемешивали, центрифугировали 5 минут при 7000 об/мин. После центрифугирования отбирали 50 мкл органической фазы и разбавляли 50 мкл метанола. Проводили по три параллельных измерения. Было установлено, что концентрация ацетонитрила в фазе 1-октиламина составила  $(17,3 \pm 2,2)\%$ .

### 3.4.2 Исследование фаз методом динамического рассеяния света

Явление рассеяния света в чистых жидкостях обусловлено флуктуациями плотности, а в растворах флуктуациями концентрации. Анализ динамики изменений интенсивности рассеянного света позволяет сделать выводы о распределениях по размерам диспергированных частиц. Исследуемый раствор в прозрачной кювете помещают в термостат и облучают светом от одномодового лазера, мгновенную интенсивность рассеянного света измеряют при помощи фотоэлектронного умножителя на углах рассеяния  $\theta$  от  $30^\circ$  до  $140^\circ$ . Зависимость интенсивности рассеянного света от времени анализируют при помощи коррелятора реального времени. В методе динамического рассеяния света (ДРС) результатом измерений является корреляционная функция интенсивности рассеянного света. Для раствора малых, по сравнению с длиной волны лазера, монодисперсных частиц она представляет собой спадающую экспоненциальную функцию. Скорость спада корреляционной функции определяется временем релаксации флуктуации

концентрации  $\tau$  диспергированных частиц. При равных внешних условиях корреляционная функция для раствора малых частиц будет спадать быстрее, чем для более крупных. Коэффициент трансляционной диффузии  $D$  диспергированных частиц определяется в соответствии с соотношением  $\frac{1}{\tau} = Dq^2$ , где  $q = 4\pi n / \lambda \sin(\theta/2)$  - волновой вектор рассеяния,  $n$  - показатель преломления среды,  $\lambda$  - длина волны лазера.

Гидродинамические радиусы диспергированных частиц могут быть рассчитаны с использованием соотношения Стокса-Эйнштейна:  $R_h = \frac{kT}{6\pi\eta_0 D}$ , где  $k$  - константа Больцмана,  $T$  - абсолютная температура,  $\eta_0$  - вязкость среды.

Органическая фаза, выделяющаяся после проведения ГЖМЭ с разделением фаз полярным растворителем, была исследована методом динамического рассеяния света. Эксперименты проводились на многоугольном спектрометре динамического и статического рассеяния света «Photocor Complex», оснащенном коррелятором реального времени (288 каналов, время корреляции 10 нс), углом рассеяния  $\theta$  в диапазоне 30–140°; длина волны лазера 405 нм. Кювету (цилиндрическая стеклянная кювета с диаметром 1 см) с исследуемым раствором погружали в иммерсионную жидкость, имеющую значение показателя преломления близкое к значению стеклянной кюветы. Нормированные интенсивности автокорреляционных функций рассчитывались с использованием обратного преобразования Лапласа; процедура регуляризации проводилась в программном обеспечении 'DynaLS', обеспечившим расчет распределения по временам релаксации и гидродинамическим радиусам.

Методом корреляционной спектроскопии рассчитывались автокорреляционные функции чистых компонентов, изотропного раствора (смеси 1-октиламина-водной фазы) и органической фазы, выделяющейся после проведения ГЖМЭ с разделением фаз ацетонитрилом, на основании которых можно говорить о распределении частиц по размерам.

Корреляций интенсивности рассеянного света для воды, ацетонитрила и 1-октиламина обнаружено не было, данное поведение характерно для чистых жидкостей. Для органической фазы, выделяющейся после проведения ГЖМЭ с разделением фаз ацетонитрилом, а также для изотропного раствора

автокорреляционные функции имели экспоненциальный характер, что может свидетельствовать о наличии надмолекулярных структур в данных системах (рис. 16).

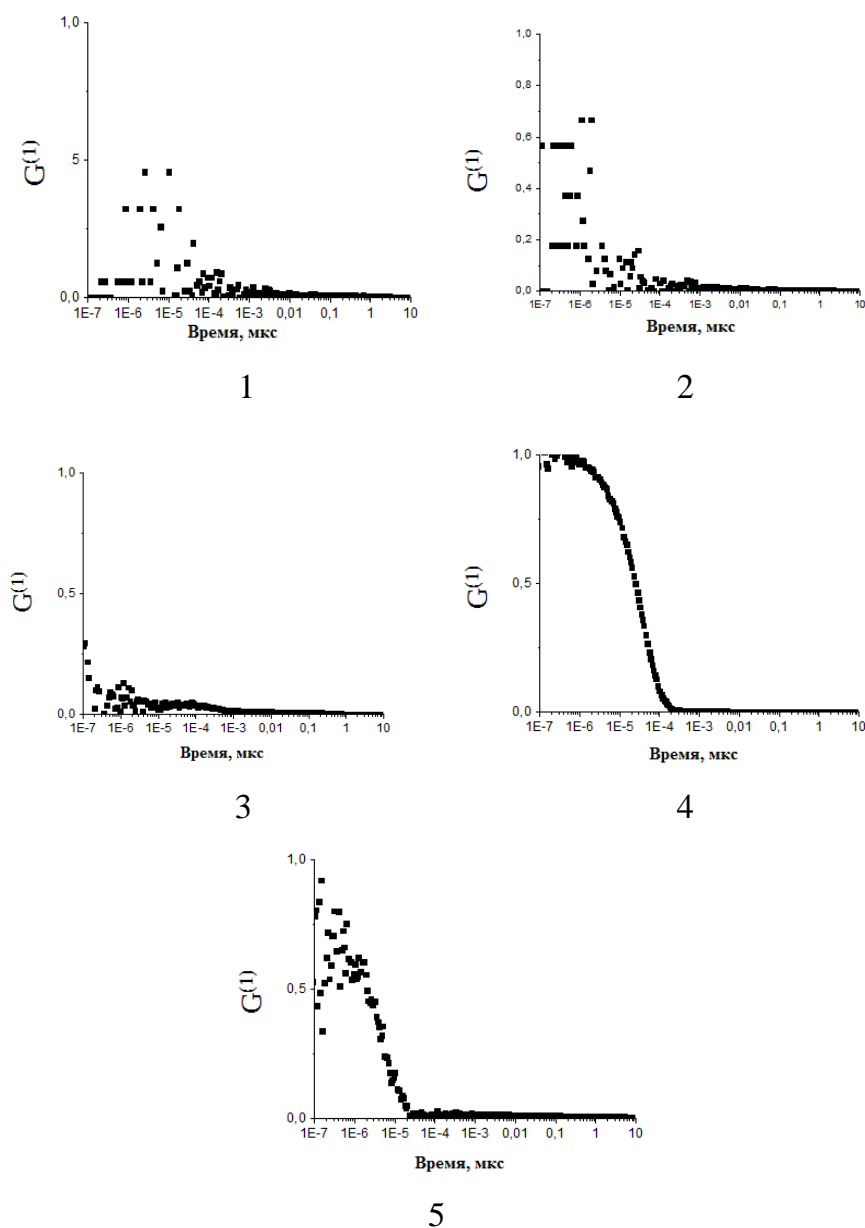


Рис.16 Автокорреляционные функции интенсивности рассеянного света для воды (1); ацетонитрила (2); 1-октиламина (3); изотропного раствора (4); органической фазы, выделяющейся после проведения ГЖМЭ с разделением фаз ацетонитрилом (5)

Методом статического рассеяния были получены интегральные интенсивности рассеянного света чистых компонентов, изотропного раствора (смеси 1-октиламина-водной фазы) и органической фазы, выделяющейся после проведения ГЖМЭ с разделением фаз ацетонитрилом. Интегральная интенсивность рассеянного света для смеси водной фазы и 1-октиламина имеет наибольшее значение, по сравнению с

интенсивностями остальных исследованных систем. Добавление к изотропному раствору ацетонитрила приводило к заметному уменьшению интегральной интенсивности, что может свидетельствовать об уменьшении доли и/или размеров надмолекулярных образований в системе. Система с добавлением ацетонитрила становится более оптически однородной, что подтверждает разрушение изотропного раствора ацетонитрилом (рис. 17).

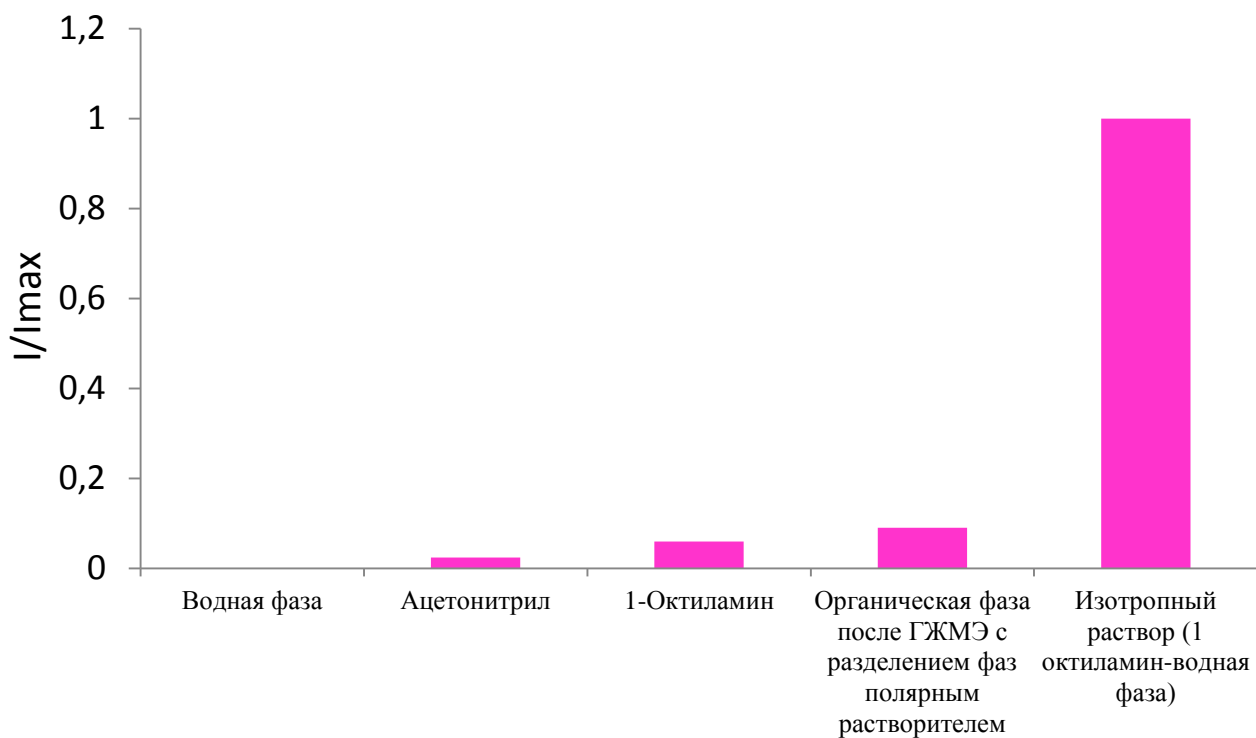


Рис.17 Гистограмма интенсивностей рассеянного света для исходных компонентов и смесей, нормированная на интенсивность воды. Все данные получены на угле рассеяния  $90^\circ$

Были рассчитаны коэффициенты трансляционной диффузии частиц, диспергированных в фазах изотропного раствора и органической фазы, выделяющейся после проведения ГЖМЭ с разделением фаз ацетонитрилом. Коэффициент трансляционной диффузии частиц, обнаруженных в органической фазе, выделяющейся после проведения ГЖМЭ с разделением фаз ацетонитрилом составил  $D=11,2 \cdot 10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$ . Коэффициент трансляционной диффузии частиц, обнаруженных в изотропном растворе составил  $D=1,6 \cdot 10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$ . Полученные значения коэффициентов трансляционной диффузии свидетельствуют об уменьшении размеров



диспергированных в изотропном растворе частиц при добавлении к нему ацетонитрила.

### 3.5 Изучение мешающего влияния компонентов биологических жидкостей

Было изучено мешающее влияние основных компонентов исследуемых биологических жидкостей: ионов  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ , и органических веществ, таких как глицин, креатин, мочевины, глюкоза, лимонная, мочевины и гиппуровая кислоты. К 900 мкл 10 мг/л раствора меропенема добавляли 100 мкл раствора добавки соответствующей концентрации, после перемешивания пробы анализировались согласно предложенной схеме анализа. Допустимый избыток мешающего компонента определялся по отклонению аналитического сигнала менее, чем на 5%. В таблице 5 указан допустимый избыток каждого мешающего компонента.

*Таблица 5.* Влияние основных компонентов биологических жидкостей при определении меропенема (концентрация меропенема – 10 мг/л)

<i>Мешающий компонент</i>	<i>Фактор селективности</i>
Мочевина	1000
$\text{HPO}_4^{2-}$	500
$\text{Na}^+$	500
Креатин	100
Глюкоза	100
$\text{NH}_4^+$	100
$\text{SO}_4^{2-}$	100
$\text{K}^+$	100
$\text{Cl}^-$	100
$\text{Mg}^{2+}$	50
Лимонная кислота	50
Гиппуровая кислота	50
$\text{Ca}^{2+}$	50
Мочевая кислота	10
Глицин	10
$\text{NO}_3^-$	10

### 3.6 Аналитические характеристики методики

В оптимизированных условиях были изучены следующие параметры: диапазон определяемых концентраций, предел обнаружения, коэффициент корреляции и повторяемость. На рисунке представлена градуировочная зависимость аналитического сигнала от концентрации меропенема с уравнением  $Y = 38,053 \cdot X +$

17,259, где Y - площадь хроматографического пика, X – концентрация меропенема, мг/л. Предел обнаружения по 3σ, составил 0,05 мг/л (рис. 18).

Повторяемость характеризовалась при помощи среднеквадратичного отклонения (СКО). СКО составило 4% и 2% для 0,1 и 100,0 мг/л, соответственно.

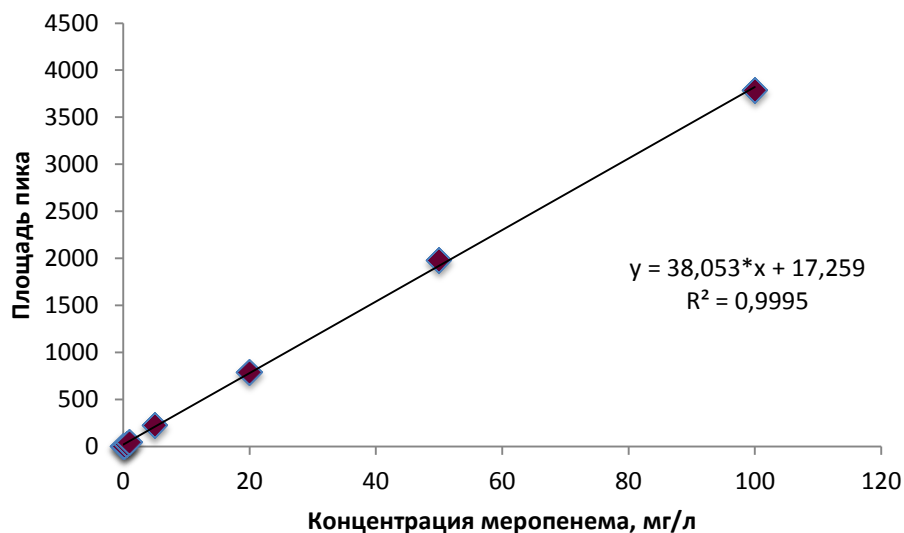


Рис.18 Градуировочная зависимость для определения содержания меропенема с применением предложенной методики

В таблице 6 представлены аналитические характеристики разработанной методики.

Таблица 6. Аналитические характеристики разработанной методики

Параметр	Значение параметра
Объем экстрагента, мкл	50
Объем пробы, мл	1
Объем растворителя, мкл	200
Диапазон определяемых концентраций, мг/л	0,1-100,0
Предел обнаружения, мг/л	0,05
Коэффициент корреляции	0,9995
СКО, % (n=5)	4
Продолжительность экстракции, мин	2

### 3.7 Проверка правильности методики референтным методом

Для проверки правильности предложенного метода пробоподготовки биологических жидкостей анализ был проведен по референтной методике, основанной на ВЭЖХ-УФ детектировании с предварительным осаждением мешающих компонентов пробы метанолом [95]. Анализ осуществлялся следующим образом: к 200 мкл пробы плазмы крови, содержащей определенное количество меропенема, добавляли 200 мкл метанола; перемешивали на шейкере в течение 15 минут, центрифугировали в течение 10 минут при 4000 об/мин. Чистую надосадочную жидкость непосредственно вводили в ВЭЖХ-систему. Такая же пробоподготовка была осуществлена для проб сыворотки крови.

Длина волны поглощения 298 нм; подвижная фаза - метанол и фосфатный буферный раствор (рН=6,6) в соотношении 30:70 %.

На рисунке 19 представлена градуировочная зависимость аналитического сигнала от концентрации меропенема с уравнением  $Y = 11,099 \cdot X - 3,445$ , где  $Y$  - площадь хроматографического пика,  $X$  - концентрация меропенема, мг/л, полученная при использовании в качестве пробоподготовки референтного метода.

Результаты, полученные при анализе реальных проб предложенным и референтным методами для анализа плазмы крови и сыворотки крови представлены в таблицах 7, 8, соответственно.

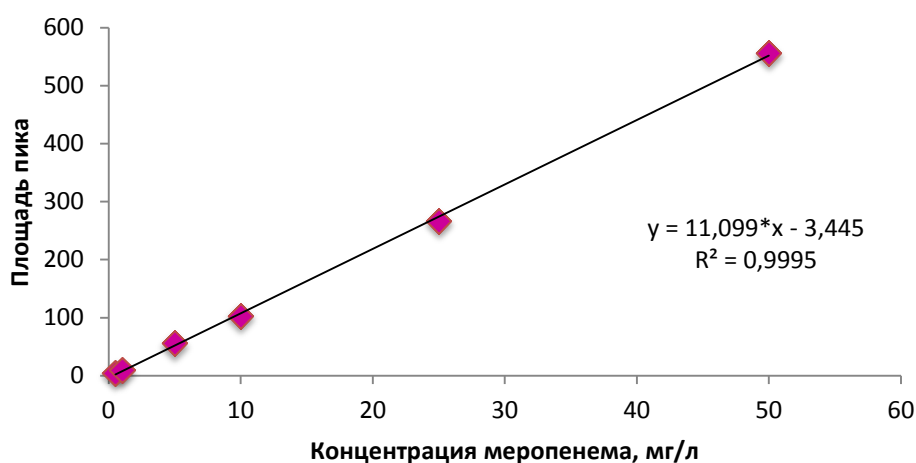


Рис.19 Градуировочная зависимость для определения содержания меропенема с применением референтной методики

Таблица 7. Сравнение результатов, полученных с помощью разработанной и референтной методики для проб плазмы крови ( $n=3$ ,  $P=0,95$ ,  $F_{кр.}=19$ ,  $t_{кр.}=2,78$ ).

Образец	Введено, мг/л	Концентрация меропенема, мг/л		F-тест	t-тест
		Данный метод	Референтный метод		
1	0	< ПО	< ПО	-	-
	5	4,6±0,6	4,9±0,5	1,4	2,2
2	0	< ПО	< ПО	-	-
	10	7,8±0,7	8,3±0,6	1,3	2,5
3	0	< ПО	< ПО	-	-
	25	21±6	24,1±1,4	17,7	2,1
4	0	< ПО	< ПО	-	-
	50	41±8	46±4	4,4	2,4

Таблица 8. Сравнение результатов, полученных с помощью разработанной и референтной методики для проб сыворотки крови ( $n=3$ ,  $P=0,95$ ,  $F_{кр.}=19$ ,  $t_{кр.}=2,78$ ).

Образец	Введено, мг/л	Концентрация меропенема, мг/л		F-тест	t-тест
		Данный метод	Референтный метод		
1	0	< ПО	< ПО	-	-
	5	4,3±1,3	5,1±0,5	6,9	2,2
2	0	< ПО	< ПО	-	-
	10	8,3±0,6	9,4±0,7	8,4	2,5
3	0	< ПО	< ПО	-	-
	25	19,0±1,7	20,2±1,1	2,2	2,6
4	0	< ПО	< ПО	-	-
	50	38±4	40±4	1,1	2,3

Полученные результаты свидетельствуют о том, что существенные различия в результатах между представленным и референтным методами отсутствуют для плазмы и сыворотки крови (табл.7, 8), так как значения F- и t-тестов не превышают критических значений.

Предложенная схема пробоподготовки биологических жидкостей, основанная на ГЖМЭ с разделением фаз полярным растворителем, была апробирована на реальных пробах сыворотки и плазмы крови, предоставленных волонтерами, принимавшими 500 мг меропенема внутривенно. Полученные результаты представлены в таблице 9. Пробы крови отбирали через 6 часов после приема дозы меропенема. Низкие содержания анализа в плазме и сыворотке крови волонтеров можно объяснить быстрым выведением меропенема из биологических жидкостей, что согласовывается с литературными данными [96].

*Таблица 9.* Результаты определения содержания меропенема в плазме и сыворотке крови

№	Сыворотка крови	Плазма крови
1	0,78±0,04 мг/л	<ПО мг/л
2	0,11± 0,07 мг/л	0,11±0,05 мг/л

## Выводы

1. Обоснована общая схема нового микроэкстракционного метода - гомогенной жидкостной микроэкстракции с разделением фаз полярным растворителем;
2. Оптимизированы условия микроэкстракционного выделения меропенема для последующего ВЭЖХ-УФ определения: тип и объем экстрагента, тип и объем полярного растворителя, время образования изотропного раствора;
3. Изучены физико-химические параметры состава системы 1-октиламин-водная фаза-ацетонитрил;
4. Разработанная методика была апробирована на реальных объектах и ее правильность была подтверждена референтным методом. Предел обнаружения для меропенема составил 0,05 мг/л. Время одного анализа – 20 минут.

### **Благодарность**

Автор выражает искреннюю благодарность к.х.н., доценту Вах Кристине Степановне и д.х.н., профессору Булатову Андрею Васильевичу за постановку интересной и актуальной задачи и неоценимую помощь и поддержку при выполнении данной работы, а также глубокую признательность к.ф.н. Лезову А. А.

Автор выражает благодарность ресурсному центру СПбГУ «Оптические и лазерные методы исследования вещества» и ресурсному образовательному центру СПбГУ по направлению «Химия» за помощь в проведении исследований.

## Список литературы

1. Namies J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices // Trends Anal. Chem. 2013. Vol. 50. P. 78–84.
2. Hashemi B. et al. Recent advances in liquid-phase microextraction techniques for the analysis of environmental pollutants // TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2017. Vol. 97. P. 83-95.
3. Zhu S. et al. Liquid–liquid microextraction of synthetic pigments in beverages using a hydrophobic deep eutectic solvent // Food Chemistry. 2018. Vol. 243. P. 351-356.
4. Fotouh R. et al. Pharmaceutical and biomedical applications of dispersive liquid–liquid microextraction // Journal of Chromatography B. 2017. Vol. 1061–1062. P. 382-391.
5. Nouri N. et al. Determination of amantadine in biological fluids using simultaneous derivatization and dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography-flame ionization detection // Journal of Chromatography B. 2013. Vol. 940. P. 142-149.
6. Timofeeva I. et al. Stepwise injection potentiometric determination of caffeine in saliva using single-drop microextraction combined with solvent exchange // Talanta. 2016. Vol. 150. P. 655–660.
7. Carasek E., Merib J. Membrane-based microextraction techniques in analytical chemistry : A review // Anal. Chim. Acta, 2015. Vol. 880. P. 8–25.
8. Paleologos E.K., Giokas D.L., Karayannis M.I. Micelle-mediated separation and cloud-point extraction // Trends Anal. Chem. 2005. Vol. 24, № 5. P. 426–436.
9. Ming-Jie L.I. et al. Progress of Extraction Solvent Dispersion Strategies for Dispersive Liquid-liquid Microextraction // Chinese J. Anal. Chem. 2015. Vol. 43, № 8. P. 1231–1240.
10. Anthemidis A.N., Ioannou K.G. Recent developments in homogeneous and dispersive liquid – liquid extraction for inorganic elements determination. A review // Talanta. 2009. Vol. 80. P. 413–421.
11. Norma S. et al. Direct immersion single drop micro-extraction method for multi-class pesticides analysis in mango using GC–MS // Food Chemistry. 2017. Vol. 237. P. 30-38.



12. Sharifi V. et al. Application of hollow fiber liquid phase microextraction and dispersive liquid–liquid microextraction techniques in analytical toxicology // *Journal of Food and Drug Analysis*. 2016. Vol. P.264-276.
13. Tang Y.Q., Weng N. Salting-out assisted liquid–liquid extraction for bioanalysis // *Bioanalysis*. 2013. Vol. 5. P.1583–1598.
14. Polson C. et al. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. B*. 2013. Vol. 785. P. 263–275.
15. Li C.H. et al. Recovery of aniline from wastewater by nitrobenzene extraction enhanced with salting-out effect // *Biomed. Environ. Sci.* 2010. Vol. 23. P. 208–212.
16. Jenkins T.F., Miyares P.H. Non evaporative preconcentration technique for volatile and semi-volatile solutes in certain polar solvent // *Anal. Chem.* 1991. Vol.63. P.1341–1343.
17. Tabata M. et al. Chemical properties of water miscible solvents separated by salt-out and their application to solvent extraction // *Anal. Sci.* 1994. Vol. 10. P. 383–388.
18. Matkovich C.E, Christian G.D. Salting-out of acetone from water-basis of a new solvent extraction system // *Anal. Chem.* 1973. Vol. 45. P. 1915–1921.
19. Zhao F.J. et al. Salting-out homogeneous liquid–liquid extraction approach applied in sample pre-processing for the quantitative determination of entecavir in human plasma by LC–MS // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2012. Vol. 881–882. P. 119–125.
20. Zhang J. et al. Salting-out assisted liquid/liquid extraction with acetonitrile: a new high throughput sample preparation technique for good laboratory practice bioanalysis using liquid chromatography-mass spectroscopy // *Biomed. Chromatogr.* 2009. Vol. 23. P. 419–425.
21. Tabata M. et al. Chemical properties of water miscible solvents separated by salt-out and their application to solvent extraction // *Anal. Sci.* 1994. Vol. 10. P. 383–388.
22. Zhang J. et al. Salting-out assisted liquid/liquid extraction with acetonitrile: a new high throughput sample preparation technique for good laboratory practice bioanalysis using liquid chromatography-mass spectroscopy // *Biomed Chromatogr.* 2009. Vol. 23. P.419–425.

23. Wu H. et al. Simultaneous determination of a hydrophobic drug candidate and its metabolite in human plasma with salting-out assisted liquid/liquid extraction using a mass spectrometry friendly salt // *J. Pharm Biomed. Anal.* 2008. Vol. 48. P. 1243–1248.
24. Tsai W.H. et al. Determination of sulfonamides in swine muscle after salting-out assisted liquid extraction with acetonitrile coupled with back-extraction by a water/dichloromethane ternary component system prior to high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2010. Vol. 1217. P. 250–255.
25. Myasein F. et al. Rapid, simultaneous determination of lopinavir and ritonavir in human plasma by stacking protein precipitations and salting-out assisted liquid/ liquid extraction, and ultrafast LC–MS/MS // *Anal. Chim. Acta.* 2009. Vol. 651/ P. 112–116.
26. Rustum A.M., Hoffman N.E. Determination of cyclophosphamide in whole blood and plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 1987. Vol. 422. P.125–134.
27. Yoshida M. et al. Extraction of thiamylal in serum using hydrophilic acetonitrile with subzero-temperature and salting-out methods // *Anal. Chem.*2004. Vol. 76. P. 4672–4675.
28. Sameh A. et al. A novel salting-out assisted extraction coupled with HPLC-fluorescence detection for trace determination of vitamin K homologues in human plasma // *Talanta.* 2015. Vol.144. P. 480-487.
29. Song S. et al. Development and application of salting-out assisted liquid/liquid extraction for multi-mycotoxin biomarkers analysis in pig urine with high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2013. Vol.1292.P. 111–120.
30. Matsuta S., Nakanishi K., Miki A. et al. Development of a simple one-pot extraction method for various drugs and metabolites of forensic interest in blood by modifying the QuEChERS method // *Forensic Sci. Int.* 2013.Vol. 232. P. 40–45.
31. Nanita S.C., Padivitage N.L.T. Ammonium chloride salting out extraction/cleanup for trace-level quantitative analysis in food and biological matrices by flow injection tandem mass spectrometry // *Anal. Chim. Acta.* 2013.Vol. 768. P. 1–11.
32. Magiera S. et al. Salting-out assisted extraction method coupled with hydrophilic interaction liquid chromatography for determination of selected  $\beta$ -blockers and their metabolites in human urine // *Journal of Chromatography B.* 2016. Vol. 1022. P. 93-101.

33. Alshishani A. et al. Salting-out assisted liquid-liquid extraction coupled with hydrophilic interaction chromatography for the determination of biguanides in biological and environmental samples // *Journal of Chromatography B*. 2018. Vol. 1073. P. 51-59.
34. Vakh C. et al. Automated alkaline-induced salting-out homogeneous liquid-liquid extraction coupled with in-line organic-phase detection by an optical probe for the determination of diclofenac // *Talanta*. 2017. Vol. 169. P.156–162.
35. Wang B. et al. Sugaring-out: a novel phase separation and extraction system // *Chem. Eng. Sci.* 2008. Vol. 63. P.2595–2600.
36. Solomons T.W.G. et al. *Organic Chemistry (second ed.)* // John Wiley & Sons, New York .2002.
37. Nugbienyo L. et al. Automated sugaring-out liquid-liquid extraction based on flow system coupled with HPLC-UV for the determination of procainamide in urine // *Talanta*. 2017. Vol. 167. P.709-713.
38. Zhang J. et al. Sugaring-out assisted liquid/liquid extraction with acetonitrile for bioanalysis using liquid chromatography–mass spectrometry // *Microchemical Journal*.2013. Vol. 108. P. 198-202.
39. Jessop P.G. et al. A solvent having switchable hydrophilicity // *Green Chem.* 2010. Vol. 12. P. 809–814.
40. Lasarte-aragones G. et al. Use of switchable hydrophilicity solvents for the homogeneous liquid – liquid microextraction of triazine herbicides from environmental water samples // *J. Sep. Sci.* 2015. Vol. 00. P. 1–6.
41. Pochivalov A. et al. Switchable hydrophilicity solvent membrane-based microextraction: HPLC-FLD determination of fluoroquinolones in shrimps // *Analytica Chimica Acta*. 2017. Vol. 976. P. 35-44.
42. Bradley J.S. et al. Carbapenems in clinical practice: a guid to their use in serious infection // *Int. J Antimicrob Agents*. 1999. Vol. 11. P. 93-100.
43. Чучалин А.Г. и соавторы. Внебольничная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике // *Клин. микробиол. антимикроб. химиотер.* 2006. Т. 8. С. 54-86.
44. Dreetz M., Hamacher J., Eller J. et al. Serum bactericidal actidities and comparative pharmacokinetics of meropenem and imipenem-cilastatin // *Antimicrob Agents Chemother.* Vol. 40. P. 105-109.

45. Calandra G.B. et al. Review of adverse experiences and tolerability in the first 2,516 patients treated with imipenem/cilastatin // *Ana J Med.* 1985. Vol. 78. P.73-
46. Topham J.C. et al. Safety evaluation of meropenem in animals: Studies on the kidney // *J Antimicrob Chemother.* 1989. Vol. 24. P. 287-306.
47. Lips M. et al. Pharmacokinetics of imipenem in critically ill patients during empirical treatment of nosocomial pneumonia: A comparison of 0.5-h and 3-h infusions // *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2014. Vol. 44. P. 358-362.
48. Jaruratanasirikul S. Population pharmacokinetics and dosing simulations of imipenem in serious bacteraemia in immunocompromised patients with febrile neutropenia // *Journal of Pharmacological Sciences.* 2015. Vol. 127. P. 164-169.
49. Adamis G. et al. Pharmacokinetic interactions of ceftazidime, imipenem and aztreonam with amikacin in healthy volunteers // *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2004. Vol. 23. P. 144-149.
50. Jacobs R. F. et al. Single-dose pharmacokinetics of imipenem in children // *The Journal of Pediatrics.* 1984. Vol.105. P. 996-1001.
51. Bernabeu-Wittel M. et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic assessment of the in-vivo efficacy of imipenem alone or in combination with amikacin for the treatment of experimental multiresistant *Acinetobacter baumannii* pneumonia // *Clinical Microbiology and Infection.* 2005. Vol.11. P. 319-325.
52. Chou Y.U. et al. Quantification of meropenem in plasma and cerebrospinal fluid by micellar electrokinetic capillary chromatography and application in bacterial meningitis patients // *Journal of Chromatography B.* 2007. Vol. 856. P. 294-301.
53. Parker E.M. et al. The pharmacokinetics of meropenem in infants and children: A population analysis // *J Antimicrob Chemother.* 1995. Vol. 36. P. 63-71.
54. Gales A.C. et al. Antimicrobial activity of doripenem against Gram-negative pathogens: results from INVITA-A-DORI Brazilian study // *Braz. J. Infect. Dis.* 2011/ Vol. 15. P.513–20.
55. Shiba K., Nakashima M., Tanlmura H., et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 5-4661, new parenteral carbapenem antibiotic // Presented at: 37th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1997.

56. Kongthavonsakul K. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of meropenem in children with severe infection // *International Journal of Antimicrobial Agents*/ 2016. Vol. 48.P. 151-157.
57. Ferrone V. et al. Meropenem, levofloxacin and linezolid in human plasma of critical care patients: A fast semi-automated micro-extraction by packed sorbent UHPLC-PDA method for their simultaneous determination // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*/ 2017. Vol. 140. P. 266-273.
58. Ferrone V. et al. Air assisted dispersive liquid-liquid microextraction with solidification of the floating organic droplets (AA-DLLME-SFO) and UHPLC-PDA method: Application to antibiotics analysis in human plasma of hospital acquired pneumonia patients // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018. Vol.151. P. 266-273.
59. Cazorla-Reyes R. et al. Simultaneous analysis of antibiotics in biological samples by ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *Journal of Chromatography A*. 2018. Vol. 1538. P. 54-59.
60. Mrestani Y. et al. Capillary zone electrophoresis determination of meropenem in biological media using a high sensitivity cell // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1999. Vol. 20.P. 899-903.
61. Kitahashi T., Furuta, I. Determination of meropenem by capillary electrophoresis using direct injection of serum. *J. Chromatogr. Sci.*. 2005. Vol. 43. P.430-433.
62. Chou, Y. et al. Quantification of meropenem in plasma and cerebrospinal fluid by micellarelectrokinetic capillary chromatography and application in bacterial meningitis patients // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2007. Vol. 856. P. 294-301.
63. Khataee A.R. et al. Enhanced chemiluminescence of the luminol – KMnO<sub>4</sub> system by CuO monosheets and its application for determination of meropenem in water and human serum. *Journal of Luminescence*. 2014. Vol. 149. P. 272-279.
64. Casals G. et al. Development and validation of a UHPLC diode array detector method for meropenem quantification in human plasma // *Clinical Biochemistry*. 2014. Vol.47. P. 223-227.
65. Ikeda K. et al. High-performance liquid chromatography with ultraviolet detection for real-time therapeutic drug monitoring of meropenem in plasma. *J. Chromatogr. B*. 2007. Vol. 856. P.371-375.

66. Farin, D. et al. High performance liquid chromatography method for the determination of meropenem in human plasma // *Chromatographia*. 1999. Vol. 49. P. 253-255.
67. Legard T. et al. Simultaneous determination of three carbapenem antibiotics in plasma by HPLC with ultraviolet detection // *J. of Chromatography B*. 2008. Vol. 875. P. 551-556.
68. Denooz R., Charlier C. Simultaneous determination of five - lactam antibiotics (cefepim, ceftazidim, cefuroxim, meropenem and piperacillin) in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection // *J. Chromatogr. B*. 2008. Vol. 864. P.161-167.
69. Robatel C. et al. Determination of meropenem in plasma and filtrate-dialysate from patients under continuous veno-venous haemodiafiltration by SPE-LC // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002. Vol. 29. P. 17-33.
70. Matsudo T. et al. LC method for the determination of meropenem in cerebrospinal fluid: application to therapeutic drug monitoring // *Chromatographia*. 2009. Vol. 69. P. 1031-1034.
71. Robatel C. et al. Determination of meropenem in plasma and filtrate-dialysate from patients under continuous veno-venous haemodiafiltration by SPE-LC // *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2002. Vol. 29. P.11-33.
72. Kipper K. et al. Rapid determination of meropenem in biological fluids by LC: comparison of various methods for samples preparation and investigation of meropenem stability // *Chromatographia*. 2009. Vol. 70. P.1422- 1427.
73. Ehrlich M.; Daschner, F.; Kummerer, K. Rapid antibiotic drug monitoring: meropenem and ceftazidime determination in serum and bronchial secretions by high-performance liquid chromatography-integrated sample preparation // *J. Chromatogr. B*. 2001. Vol. 751. P.357-363.
74. Bompadre S. et al. Determination of meropenem in serum by high-performance liquid chromatography with column switching // *J. Chromatogr. A*. 1998. Vol.812. P. 249-253.
75. Cazorla-Reyes R. et al. Simultaneous analysis of antibiotics in biological samples by ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014. Vol.89. P. 203-212.

76. Tomofumi O. et al. Simultaneous determination of eight  $\beta$ -lactam antibiotics in human serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *Journal of Chromatography B*. 2011. Vol. 879. P.1038-1042.
77. Ikawa K. et al. Peritoneal penetration of doripenem after intravenous administration in abdominal-surgery patients // *J. Antimicrob. Chemother.* 2007. Vol. 60. P. 1395-1397.
78. Dailly E. et al. A liquid chromatography assay for a quantification of doripenem, ertapenem, imipenem, meropenem concentrations in human plasma: Application to a clinical pharmacokinetic study // *Journal of Chromatography B*. 2011. Vol.879. P. 1137-1142.
79. Ikedaa K. et al. Quantification of doripenem in human plasma and peritoneal fluid by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection // *Journal of Chromatography B*. Vol. 867. P. 20-25.
80. Fernandez-Torres, R. et al. Urea as new stabilizing agent for imipenem determination. Electrochemical study and determination of imipenem and its primary metabolite in human urine // *Talanta*. 2008. Vol. 77. P. 241-248.
81. Fish, D., Teitelbaum I., Abraham E. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of imipenem during continuous renal replacement therapy in critically ill patients // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005. Vol. 49. P. 2421-2428.
82. Meyers C., Blumer J. Determination of imipenem and cilastatin in serum by high-pressure liquid chromatography// *Antimicrob. Agents Chemother.* 1984. Vol. 26. P. 78-81.
83. Garcia-Capdevila L. et al. Determination of imipenem by highperformance liquid chromatography for pharmacokinetics studies in patients // *J. Chromatogr. B*. 1997. Vol. 692. P. 127-132.
84. Swanson, D. et al. Degradation kinetics of imipenem in normal saline and human serum // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1986. Vol. 29. P. 936-937.
85. Fernandez-Torres, R. et al. Determination of imipenem and rifampicin in mouse plasma by high performance liquid chromatography-diode array detection // *Anal. Chim. Acta*. 2008. Vol. 608, 204-210.
86. Baranowska I. et al. Simultaneous determination of 11 drugs belonging to four different groups in human urine samples by reversed high-performance liquid chromatography method // *Anal. Chim. Acta*. 2006. Vol. 570. P. 46-58.

87. Lopez K. et al. Simultaneous determination of cefepime, vancomycin and imipenem in human plasma of burn patients by high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. B.* 2007. Vol. 860. P. 241-245.
88. Legrand T. et al. Simultaneous determination of three carbapenem antibiotics in plasma by HPLC with ultraviolet detection // *J. Chromatogr. B.* 2008. Vol. 875. P. 551-556.
89. Pettersson A. et al. A calorimetric investigation of the adsorption of octylamine on titanium dioxide from aqueous solutions // *Prog. Coll. Polym. Sci.* 1990. Vol. 82. P. 38-42.
90. Jonsson H. et al. Composition of urine, faeces, greywater and biowast for utilisation in the URWARE model // Dept. of Industrial Electrical Engineering and Automation Lund University. 2005.
91. Cardinale M. et al. Chapter 29: Blood, Blood Components, Plasma, and Plasma Products // *Side Effects of Drugs Annual.* 2017. Vol. 39. P. 331-343.
92. Brophy A. et al. Chapter 31: Blood, Blood Components, Plasma, and Plasma Products // *Side Effects of Drugs Annual.* 2016. Vol. 38. P. 335-353.
93. Chojnowska S. Human saliva as a diagnostic material // *Advances in Medical Sciences.* 2018. Vol. 63. P. 185-191.
94. Mendez A. et al. Thermal and alkaline stability of meropenem: Degradation products and cytotoxicity // *International Journal of Pharmaceutics.* 2008. Vol. 350. P. 95–102.
95. Carlucci G. et al. Determination of imipenem in human and tissue by high-performance liquid chromatography // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 1990. Vol. 8. P. 283-286.
96. Darville T. Imipenem and meropenem // *Seminars in Pediatric Infectious Diseases.* 1999. Vol. 10. P. 38-44.



