

УДК [54.062+543.422.3-76]:577.182.99 3.4.1 Промышленная фармация и технология получения лекарств

DOI: 10.37903/vsgma.2022.1.21

## РАЗРАБОТКА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА АНАЛИЗА МЕРОПЕНЕМА

© Кукурека А.В., Сипливая Л.Е., Шорманов В.К., Бесходарная М.И.

Курский государственный медицинский университет, Россия, 305041, Курск, ул. К. Маркса, 3

### Резюме

**Цель.** Разработка спектрофотометрических методик анализа меропенема в субстанции и инъекционной лекарственной форме.

**Методика.** Для спектрофотометрии готовили растворы с концентрациями от 0,00001% до 0,005% меропенема при использовании универсальной буферной смеси и 0,2 М раствора натрия гидроксида со значениями pH в интервале от 2 до 12, боратный буферный раствор с pH 8,0, а также дистиллированную воду в качестве растворителя. Измерение значений оптической плотности растворов анализируемого вещества в растворителе проводили с использованием регистрирующего спектрофотометра СФ-2000, для измерения применяли кварцевые кюветы с толщиной рабочего слоя 10 мм. Основываясь на результатах измерения оптических плотностей в точках максимумов поглощения, строили калибровочный график для расчета концентрации исследуемого раствора. В оптимальных условиях выполняли количественное определение в субстанции и лекарственной форме меропенема, проводили статистическую обработку полученных результатов.

**Результаты.** Обоснованы оптимальные условия спектрофотометрического количественного определения: использование боратного буфера с pH 8,0, аналитическая длина волны 301 нм. В результате расчётов получено значение молярного показателя поглощения 10510,9 и удельного – 274,1. Проведена валидация методик. Предел обнаружения меропенема равен 1,8 мкг/мл, открываемый минимум – 45 мкг. Относительная ошибка определения в субстанции не превышает 0,78%, в лекарственной форме – 1,13%.

**Заключение.** Разработанные методики спектрофотометрического анализа меропенема могут быть рекомендованы для использования в практике фармацевтического анализа.

**Ключевые слова:** спектрофотометрический метод, меропенем, количественное определение

## DEVELOPMENT OF A SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR THE ANALYSIS OF MEROPENEM

Kukureka A.V., Siplivaya L.E., Shormanov V.K., Beskhodarnaja M.I.

Kursk State Medical University, 3, K. Marksa St., 305041, Kursk, Russia

### Abstract

**Objective.** Development of spectrophotometric methods for the analysis of meropenem in substance and injectable dosage form.

**Methods.** For spectrophotometry, solutions were prepared with concentrations from 0.00001% to 0.005% meropenem using a universal buffer mixture and 0.2 M sodium hydroxide solution with pH values in the range from 2 to 12, borate buffer solution with pH 8.0, as well as distilled water as a solvent. The optical density values of solutions of the analyte in the solvent were measured using an SF-2000 recording spectrophotometer; quartz cells with a working layer thickness of 10 mm were used for measurements. Based on the results of measuring optical densities at the points of absorption maxima, a calibration graph was constructed to calculate the concentration of the test solution. Under optimal conditions, a quantitative determination was performed in the substance and dosage form of meropenem, and statistical processing of the results was carried out.

**Results.** The optimal conditions for spectrophotometric quantitative determination have been substantiated: the use of a borate buffer with pH 8.0, analytical wavelength of 301 nm. As a result of

calculations, the value of the molar absorption index is 10510.9 and the specific one - 274.1. The methods were validated. The detection limit for meropenem is 1.8  $\mu\text{g}$  / ml, the minimum opening is 45  $\mu\text{g}$ . The relative error of determination in the substance does not exceed 0.78%, in the dosage form - 1.13%.

**Conclusions.** The developed methods of spectrophotometric analysis of meropenem can be recommended for use in the practice of pharmaceutical analysis.

*Keywords:* spectrophotometric method, meropenem, quantitative determination

## Введение

С появлением в медицинской практике антибиотиков произошли кардинальные изменения в жизни людей – появилась возможность радикального излечения от многих инфекционных заболеваний, ранее считавшихся фатальными. Хотя эпоха антибиотиков относительно невелика, за этот период было создано множество препаратов разных классов. Применение карбапенемов в медицине началось в середине 1980-х годов, когда был внедрен в клинику первый препарат этой группы – имипенем. Спустя несколько лет был разработан новый препарат – меропенем. Это антибиотик сверхширокого спектра антимикробного действия, активен в отношении анаэробных и аэробных грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов [1, 8]. Особенности антимикробного действия карбапенемов определяются их химическим строением. Данные вещества имеют малый размер молекул и находятся в растворе в виде цвиттер-ионов, поэтому очень хорошо проникают в периплазматическое пространство микробной клетки. Меропенем действует бактерицидно, в том числе против штаммов, продуцирующих бета-лактамазы [1, 5].

Анализ нормативной документации показывает, что для количественного определения субстанции и инъекционной лекарственной формы меропенема зарубежные фармакопеи рекомендуют использование высокоэффективной жидкостной хроматографии [5, 7]. Данный метод даёт надёжные результаты, но является дорогостоящим, требует применения токсичных растворителей, стандартных образцов, является длительным и трудоёмким. Поэтому разработка альтернативного метода анализа является актуальной. Спектрофотометрический метод является одним из основных способов количественного определения фармацевтических субстанций [6]. При этом он имеет ряд преимуществ – отличается простотой методик, доступен, является достаточно экспрессным, не требует токсичных реактивов [2].

Цель работы – разработка спектрофотометрических методик анализа меропенема в субстанции и инъекционной лекарственной форме.

## Методика

Для спектрофотометрии готовили растворы с концентрациями от 0,00004% до 0,007% при использовании универсальной буферной смеси и 0,2 М раствора NaOH со значением pH в интервале от 2 до 12, боратный буферный раствор со значением pH 8,0, а также дистиллированную воду в качестве растворителя. Контроль pH осуществляли с помощью pH-метра-иономера Мультитест ИПЛ-101 («НПП СЕМИКО», г. Новосибирск). Измерение значений оптической плотности растворов анализируемого вещества в растворителе проводили с использованием регистрирующего спектрофотометра СФ-2000 («ОКБ Спектр», г. Санкт-Петербург), для измерения применяли кварцевые кюветы с толщиной рабочего слоя 10 мм. Основываясь на результатах измерения оптических плотностей в точках максимумов поглощения, строили калибровочный график для расчета концентрации исследуемого раствора. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Microsoft Excel (из пакета программ Microsoft Office 2010) на операционной системе Windows 7, используя t-критерий Стьюдента. Различия считали значимыми при доверительной вероятности  $p < 0,05$  [3].

Приготовление универсальной буферной смеси (УБС): для получения буферного раствора желаемого значения pH к 20 мл универсальной буферной смеси кислот (фосфорной, уксусной, борной) приливали рассчитанный объем 0,2 М раствора натрия гидроксида [4].

Состав боратного буферного раствора: 55,85 мл раствора натрия тетрабората (12,367 г борной кислоты), 100 мл 1 М раствора натрия гидроксида, воды дистиллированной до 1000 мл) доводили до метки 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты в мерной колбе емкостью 100 мл [4].

Приготовление раствора концентрации 0,002% меропенема безводного с использованием универсальной буферной смеси: 0,1141 г (точная навеска) меропенема тригидрата переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляли 20 мл воды дистиллированной, перемешивали до полного растворения препарата, доводили объем водой, дистиллированной до метки, перемешивали (раствор А). 10 мл раствора А переносили в мерную колбу емкостью 100 мл, доводили объем водой, дистиллированной до метки, перемешивали (раствор Б). В одну мерную колбу емкостью 25 мл переносили 5 мл раствора Б, добавляли 2,5 мл УБС с рН равным 2 и доводили объем раствора водой, дистиллированной до метки, перемешивали (раствор В). В другую – 2,5 мл УБС и доводили объем раствора водой, дистиллированной до метки (раствор сравнения). Аналогично поступали при приготовлении растворов препарата и растворов сравнения с использованием УБС с рН от 3 до 12. Измеряли оптическую плотность полученных растворов на спектрофотометре в интервале длин волн от 200 до 400 нм. Параллельно измеряли рН каждого раствора В.

Методика количественного определения меропенема методом спектрофотометрии: около 100 мг (точная навеска) субстанции или порошка для приготовления раствора для внутривенного введения переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляли 20 мл воды дистиллированной, перемешивали до полного растворения препарата, доводили объем водой, дистиллированной до метки, перемешивали (раствор А). 10 мл раствора А переносили в мерную колбу емкостью 100 мл, доводили объем водой, дистиллированной до метки, перемешивали (раствор Б). В одну мерную колбу емкостью 25 мл переносили 5 мл раствора Б, добавляли 2,5 мл боратного буферного раствора со значением рН 8,0 и доводили объем раствора водой, дистиллированной до метки, перемешивали. В другую – 2,5 мл боратного буферного раствора и доводили объем раствора водой, дистиллированной до метки. Измеряли оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 301 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор, приготовленный во второй колбе.

### Результаты исследования и их обсуждение

После приготовления растворов с концентрацией 0,002% меропенема безводного с использованием универсальной буферной смеси с шагом в единицу значения рН от 2 до 12, их фотометрировали и установили, что максимум светопоглощения находится в интервале от 297 до 304 нм. На основании полученных данных строили графическую зависимость оптической плотности в максимуме светопоглощения раствора от рН среды (рис. 1).

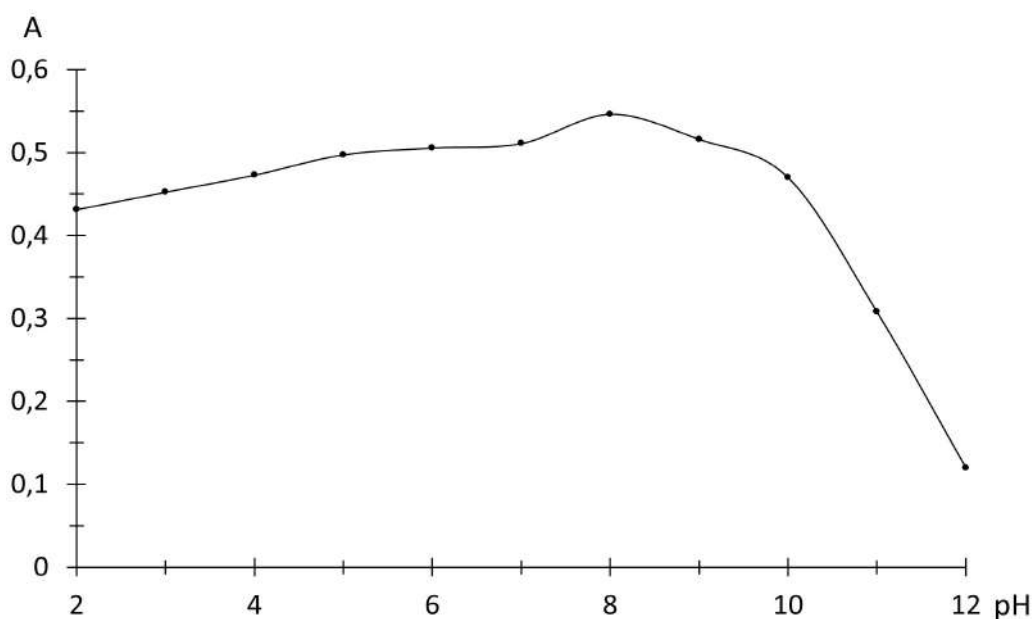


Рис. 1. Зависимость оптической плотности от рН среды

Для уточнения выбора оптимального значения рН готовили растворы с использованием универсальной буферной смеси со значением рН от 7 до 9 с разностью 0,2. Растворы фотометрировали, определяли длину волны максимума светопоглощения и оптическую плотность в нём (табл. 1). Для дальнейшего исследования выбрали рН со значением 8,0 и аналитическую длину волны 301 нм.

Таблица 1. Результаты измерения оптической плотности раствора меропенема при значении рН 7 – 9

рН	$\lambda_{\max}$ , нм	Оптическая плотность при $\lambda_{\max}$
7,01	299,3	0,5111
7,19	299,3	0,5122
7,40	299,3	0,5134
7,59	300,1	0,5161
7,81	300,7	0,5276
8,00	300,9	0,5463
8,22	301,0	0,5382
8,41	301,3	0,5354
8,61	300,9	0,5288
8,81	301,3	0,5214
8,99	300,9	0,5159

Выбор состава буферного раствора: готовили 0,002% растворы меропенема с использованием универсального и боратного буферных растворов по приведенной выше методике. Измеряли оптическую плотность при длине волны 301 нм (она в обоих случаях соответствовала максимуму светопоглощения). Для УБС она была равна 0,5463, для боратного буферного раствора – 0,5491. Для дальнейшего исследования было выбрано рН 8,0 с использованием боратного буферного раствора, так как его состав более прост, а оптическая плотность изменяется незначительно. Важным требованием оптимальности условий количественного определения спектрофотометрическим методом является стабильность исследуемого раствора [4]. Было установлено, что оптическая плотность в выбранных условиях остаётся стабильной в течение суток при температуре 25 °С в тёмном месте.

Для выявления прямолинейного участка зависимости оптической плотности от концентрации измеряли оптические плотности растворов в подобранных оптимальных условиях в интервале концентраций меропенема безводного от 0,00001 до 0,005%. Установили, что интервал линейной зависимости находится в диапазоне концентраций от 0,0002 до 0,004%. Для построения калибровочного графика проводили независимые испытания различных концентраций меропенема. Находили оптическую плотность для каждой концентрации и строили график зависимости оптической плотности от концентрации антибиотика (рис. 2).

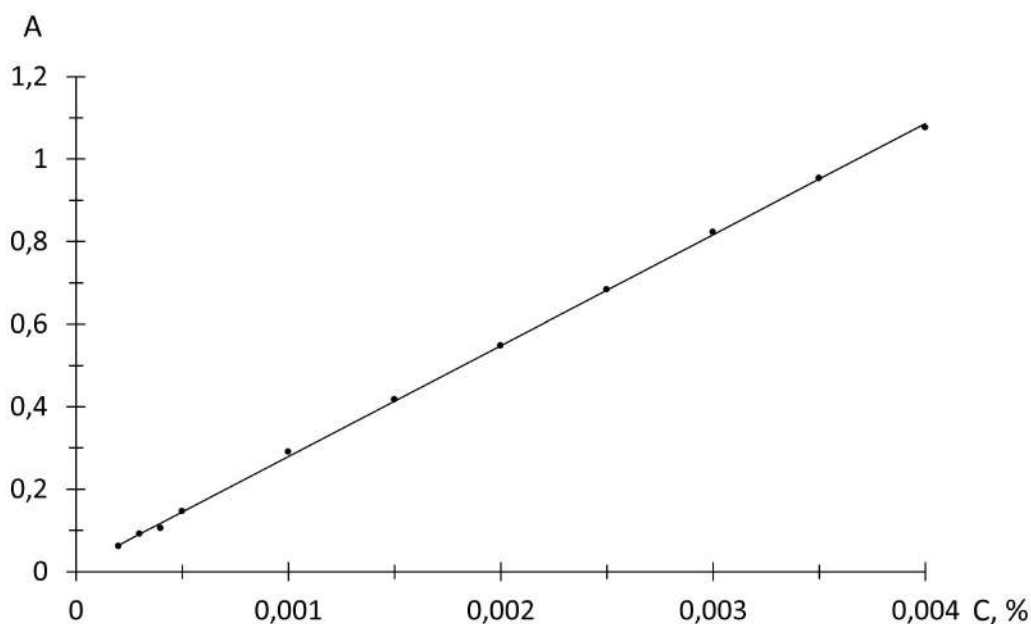


Рис. 2. Калибровочный график.

А – оптическая плотность, С – концентрация меропенема в %, — – теоретические значения, • – практические значения

Коэффициент корреляции составил 0,9998. Уравнение калибровочного графика имеет вид:  $A = 268,85 \cdot C + 0,0105$ . Коэффициенты рассчитывали методом наименьших квадратов в соответствии с [3]. Значения молярного и удельного показателей поглощения составили 10510,9 и 274,1 соответственно. В соответствии с [4] рассчитали предел обнаружения меропенема 1,8 мкг/мл и открываемый минимум 45 мкг.

Для количественного определения меропенема методом спектрофотометрии были разработаны методики анализа в субстанции и порошке для приготовления раствора для внутривенного введения. Содержание меропенема в субстанции в процентах (X %) вычисляли по формуле:

$$X \% = \frac{C_{\text{граф.}} \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot 1000 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot V_2 \cdot V_4 \cdot (100 - W)} = \frac{C_{\text{граф.}} \cdot 100 \cdot 25 \cdot 1000 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 10 \cdot 5 \cdot (100 - W)},$$

где  $C_{\text{граф.}}$  – концентрация меропенема, найденная по калибровочному графику, %; а – навеска исследуемой субстанции, мг;  $V_1, V_2, V_3, V_4$  – объемы разведения, мл; W – содержание воды в субстанции, %.

Содержание меропенема в порошке для приготовления раствора для внутривенного введения в процентах от заявленного количества (X %) вычисляли по формуле:

$$X \% = \frac{C_{\text{граф.}} \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot 1000 \cdot 100 \cdot G}{a \cdot V_2 \cdot V_4 \cdot L} = \frac{C_{\text{граф.}} \cdot 100 \cdot 25 \cdot 1000 \cdot 100 \cdot G}{a \cdot 10 \cdot 5 \cdot L},$$

где  $C_{\text{граф.}}$  – концентрация меропенема, найденная по калибровочному графику, %; а – навеска исследуемой лекарственной формы, мг;  $V_1, V_2, V_3, V_4$  – объемы разведения, мл; G – средняя масса содержимого одного флакона, мг; L – заявленное количество меропенема в одном флаконе, мг.

Для определения метрологических характеристик [3] разработанных методик выполняли количественное определение по 10 модельных образцов субстанции и лекарственной формы меропенема, P = 95% (табл. 2). Результаты не отягощены систематической погрешностью.

Таблица 2. Результаты количественного определения меропенема

Образец	$\bar{x}$	$s^2$	s	$S_{\bar{x}}$	$\Delta\bar{x}$	$\varepsilon$
Субстанция	99,46	1,1912	1,0914	0,3451	0,78	0,78
Лекарственная форма	98,93	2,4560	1,5672	0,4956	1,12	1,13

Для проверки, что разработанные методики гарантируют достоверные и точные результаты, была проведена валидация [3]. Результаты приведены в табл. 3 и свидетельствуют о пригодности методик для целей анализа.

Таблица 3. Валидация методик спектрофотометрического определения меропенема

Параметр	Критерий валидности	Результаты испытания меропенема	
		в субстанции	в лекарственной форме
Специфичность	стандартный образец меропенема	специфична	специфична
Аналитическая область	от 80 до 120% от номинального значения	от 15% до 225%	от 16% до 265%
Линейность	$r \geq 0,99$	$b = 268,85$ ; $a = 0,0105$ ; $r = 0,9998$	$b = 268,85$ ; $a = 0,0105$ ; $r = 0,9998$
Правильность	$t_{\text{табл}} \geq t_{\text{выч}}$	$t_{\text{табл}} = 2,26$ ; $t_{\text{выч}} = 1,56$	$t_{\text{табл}} = 2,26$ ; $t_{\text{выч}} = 2,16$
Прецизионность: повторяемость (сходимость)	$s < 2\%$	$s = 1,09$	$s = 1,57$

## Заключение

Разработанные методики спектрофотометрического анализа меропенема в субстанции и инъекционной лекарственной форме могут быть рекомендованы для использования в практике фармацевтического анализа. Они не требуют для выполнения токсичных и дорогостоящих реактивов, не трудоёмки, используют доступное оборудование. Было установлено, что разработанные методики позволяют получать достаточно воспроизводимые и надежные результаты для их области применения.

## Литература (references)

1. Березняков И.Г. Клиническое применение карбапенемов: когда, какой, как долго? // Клиническая Микробиология и Антимикробная Химиотерапия. – 2006. – Т.8, №4. – С. 325-349. [Bereznyakov I.G. *Klinicheskaya Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Khimioterapiya*. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. – 2006. – V.8, N4. – P. 325-349. (in Russian)]
2. Булатов М.И., Калинин И.П. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа. – Л.: Химия, 1986. – 432 с. [Bulatov M.I., Kalinkin I.P. *Prakticheskoe rukovodstvo po fotometricheskim metodam analiza*. A practical guide to photometric methods of analysis. – Leningrad: Chemistry, 1986. – 432 p. (in Russian)]
3. Государственная фармакопея РФ. 14 издание. Т.1. – М., 2018. [*Gosudarstvennaya farmakopeya RF. 14 izdanie*. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 14th edition. V.1. – Moscow, 2018. (in Russian)]
4. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. – М.: Химия, 1971. – 454 с. [Lur'e Yu.Yu. *Spravochnik po analiticheskoi khimii*. Analytical Chemistry Handbook. – Moscow: Chemistry, 1971. – 454 p. (in Russian)]
5. Никулин А.А., Цюман Ю.П., Мартинович А.А. и др. Об адекватности замены генериками внутривенных форм оригинальных препаратов: нужны ли сравнительные исследования? // Клиническая Микробиология и Антимикробная Химиотерапия. – 2010. – Т.12, №1. – С. 31-40. [Nikulina A.A., Tsyuman

- Yu.P., Martinovich A.A. i dr. *Klinicheskaya Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Khimioterapiya*. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. – 2010. – V.12, N1. – P. 31-40. (in Russian)]
6. Сакарян Е.И., Шемеринкина Т.Б., Бармин А.В. и др. Фармацевтические субстанции. Требования Государственной фармакопеи к их стандартизации // Антибиотики и химиотерапия. – 2017. – Т.62, №5-6. – С. 63-67. [Sakaryan E.I., Shemerinkina T.B., Barmin A.V. i dr. *Antibiotiki i himioterapiya*. Antibiotics and chemotherapy. – 2017. – V.62, N5-6. – P. 63-67. (in Russian)]
  7. Фармакопея США: USP 29; Национальный формуляр: NF24: в 2 т. [пер. с англ.]. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2009. – Т.1. – 1720 с. [*Farmakopeya SShA: USP 29; Natsional'nyi formulyar: NF24: v 2 t. [per. s angl.]*. United State Pharmacopoeia 29; National Formulary 24: in two volumes [translated from English]. – Moscow: GEOTAR – Media, 2009. – V.1. – 1720 p. (in Russian)]
  8. Sweetman S.C. (Ed.) Martindale: The Complete Drug Reference, 34th ed. – London: Pharmaceutical Press, 2005. – P. 229

### Информация об авторах

*Кукурека Александр Владимирович* – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: kukurekaav@kursksmu.net

*Сипливая Любовь Евгеньевна* – доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой фармацевтической, токсикологической и аналитической химии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: farmchim@rambler.ru

*Шорманов Владимир Камбулатович* – доктор фармацевтических наук, профессор, профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: r-wladimir@yandex.ru

*Бесходарная Марина Игоревна* – аспирант кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: marina\_kursk\_med@mail.ru

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.