

# Üçüncü ve Dördüncü Kuşaktan Seçilmiş Sefalosporinlerin İnsan Kaynaklı Biyolojik Materyallerden HPLC ile Tayinleri

Received : 26.11.2008  
Revised : 12.03.2009  
Accepted : 14.03.2009

**Emirhan Nemutlu\*<sup>o</sup>, Sedef Kır\***

## GİRİŞ

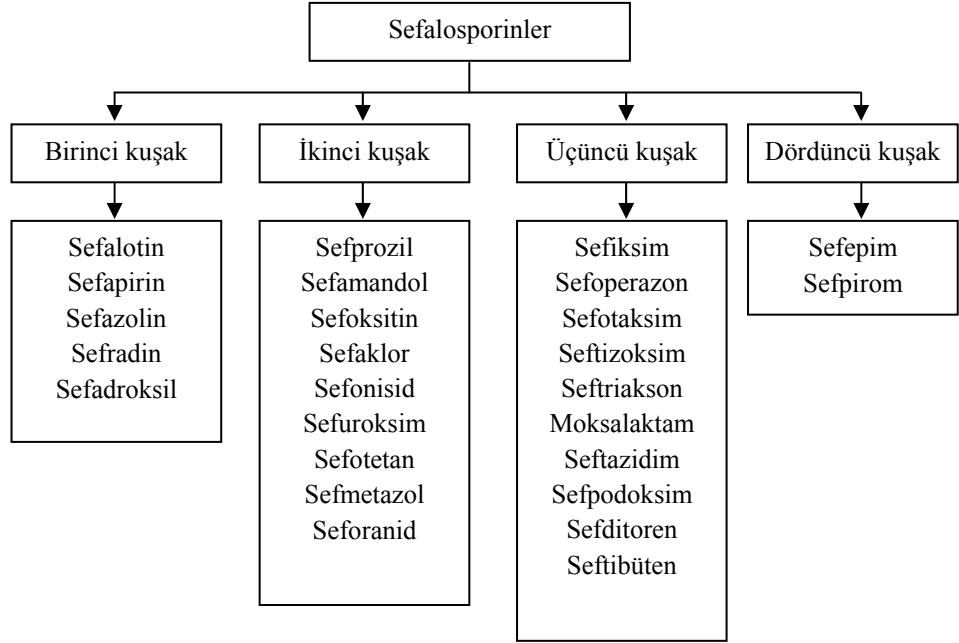
Sefalosporinler ilk kez *Cephalosporium* türü mantar kültürlerinden elde edilmiş  $\beta$  laktam grubu antibiyotiklerdir. Kimyasal yapıları, etki mekanizmaları ve antibakteriyel spektrumları bakımından penisilinlere benzerler ve bakteri hücre duvarının sentezini bozarak bakterisid etki yaparlar.

Sefalosporinler, antimikrobiyal etki spektrumlarına göre dört ana grupta veya kuşakta sınıflandırılabilir (Şekil 1). Genel bir kural olarak, birinci kuşak bileşikler Gram (+) organizmalara karşı daha iyi aktiviteye sahipken, diğer bileşikler Gram (-) aerobik organizmalara karşı daha iyileştirilmiş aktiviteye sahiptir<sup>1-4</sup>.

---

\* Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı,  
Ankara/TURKEY

<sup>o</sup> Corresponding author: Tel: +90(312) 305 14 99 email: [enemutlu@hacettepe.edu.tr](mailto:enemutlu@hacettepe.edu.tr)



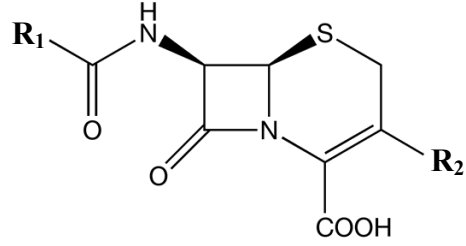
**Şekil 1** : Sefalosporinlerin sınıflandırılması

Derlemede Türkiye piyasasında kullanılan üçüncü ve dördüncü kuşaktan yedi sefalosporin [Sefepim (CEP), Seftazidim (CTA), Seftizoksım (CTI), Seftriakson (CTR), Sefotaksim (COT), Sefiksim (CIX) ve Sefoperazon (COP)] için insan kaynaklı biyolojik materyallerden son on yılda HPLC cihazı ile yapılan analizler incelenmiştir.

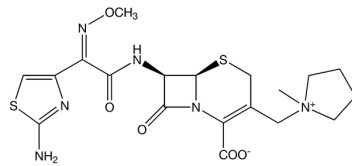
### **Kimyasal Yapı**

Sefalosporin grubu moleküller, ana çekirdeğini sefam türevi 7-amino-sefalosporanik asidin oluşturduğu  $\beta$ -laktam antibiyotikleridir (Şekil 2). Bu asit çekirdeğine çeşitli  $R_1$  ve  $R_2$  gruplarının eklenmesi ile doğal sefalosporinlere göre daha yüksek etkinlik ve düşük toksisiteye sahip ürünlerin oluşması sağlanmıştır<sup>1,5</sup>. Derlemede yer alan

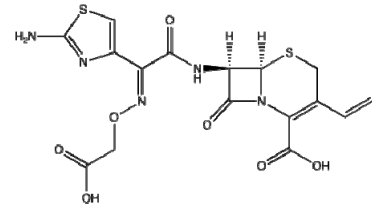
sefalosporinlerin kimyasal yapıları Şekil 3'de, fiziksel ve kimyasal özellikleri Tablo I'de verilmiştir.



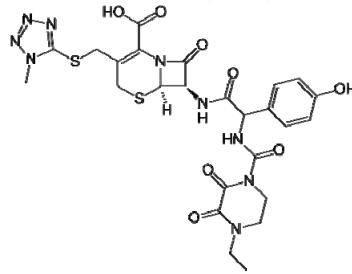
**Şekil 2 :** Sefalosporin grubu antibiyotiklerin temel yapı çekirdeği



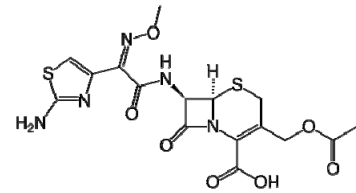
Sefepim (CEP)



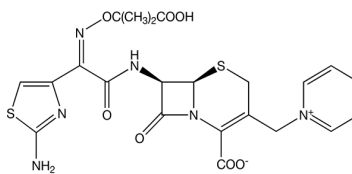
Sefiksım (CIX)



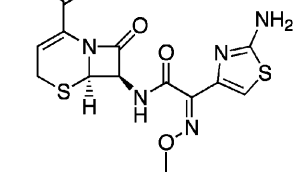
Sefoperazon (COP)



Sefotaksım (COT)



Seftazidim (CTA)



Seftizoksım (CTI)

**Şekil 3 :** Derlemede yer alan üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinlerin kimyasal yapıları

**TABLO I :** Derlemede yer alan üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri.<sup>1</sup>

Sefalopirin	Moleküler formül	LogD	LogP	Çözünürlük (g/L)	MA (g/mol)	pKa <sub>1</sub>	pKa <sub>2</sub>
CEP <sup>2</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub>	-6.44	1.12	-	480.56	3.16	10.61
CIX	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub>	-3.76	1.00±0.89	957.00	453.45	2.80±0.10	2.39±0.50
COP	C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> N <sub>9</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub>	-2.23	1.43±0.47	7.10	645.67	2.62±0.50	1.66±0.20
COT	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> N <sub>5</sub> NaO <sub>7</sub> S <sub>2</sub>	-2.47	1.20±0.89	46.00	455.47	2.66±0.50	2.90±0.50
CTA <sup>2</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub>	-6.02	2.03	-	646.57	3.08	10.09
CTR	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> S <sub>3</sub>	-4.00	-0.25±1.12	33.00	554.58	2.57±0.50	2.90±0.50
CTI	C <sub>13</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub>	-2.98	0.59±0.88	110.00	383.40	3.07±0.50	2.90±0.50

<sup>1</sup> Veriler Scifinder yazılımından Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) yazılımı (V8.14, 1994–2008 ACD/Labs) kullanarak hesaplanmıştır (6) .

<sup>2</sup>Sparc on-line calculator yazılımına göre hesaplanmıştır (7). D: pH 7'deki dağılım katsayısı, P: nötral haldeki dağılım katsayısı ve MA: moleküler ağırlık.

**Farmakokinetik, Etki Mekanizması ve Klinik Kullanımları**

Sefalosporinler düşük emilimlerinden dolayı kas içi veya damar içi yolla kullanılırken diğerlerine göre yüksek emilimi olan sefiksim oral yolla kullanılır. Yarılanma ömürleri seftriaksonun 6-9 saatken diğer sefalosporinlerin 2 saat civarındadır. Sefalosporinlerin birincil eliminasyon yolu böbreklerdir ve proteinlere bağlanma oranlarında farklılık gösterirler (Tablo II).

Birinci kuşak sefalosporinler pnömokoklar, streptokoklar ve stafilokokları da içeren Gram (+) koklara karşı oldukça etkilidir. İkinci kuşak sefalosporinler ise genel olarak, Gram (-) bakterilere karşı etkili olduğu gibi birinci kuşak sefalosporinlerin etkilediği organizmalara

karşı da etkilidirler. Ancak Gram (+) bakterilere karşı etkileri birinci kuşak ilaçlara göre daha düşüktür<sup>2,3,8</sup>.

Üçüncü kuşak sefalosporinler (Sefoperazon hariç) en önemli özelliği Gram (-)'lere etkinliğinin artmış olması ve bazılarının kan beyin engelini aşmasıdır. Diğer sefalosporinlerin inhibe ettiği Gram (-) bakterilere ek olarak üçüncü kuşak ilaçlar sitrobakter, *Serratia marcescens* ve *providensiya* karşı da etkilidirler<sup>2,8</sup>.

Dördüncü kuşak sefalosporinler, kromozomal  $\beta$  laktamazlara (örneğin, enterobakterlerin ürettiği) ve çoğu üçüncü kuşak sefalosporini inaktive eden genişlemiş spektrumlu  $\beta$  laktamazların hidrolizine daha dirençlidir. Bu kuşaktan Sefepim penisiline dirençli streptokokların çoğuna karşı iyi aktivite gösterir ve enterobakter enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilir. Diğer yandan klinik rolü üçüncü kuşak sefalosporinler gibidir<sup>2,3</sup>.

**TABLO II :** Derlemede yer alan üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinlerin farmakokinetik özellikleri.

İlaç	Biyoyararlanım (%)	$t_{1/2}$ (saat)	$t_{mak}$ (saat)	$C_{mak}$ $\mu\text{g/mL}$	Protein bağlanma oranı	Dağılıma hacmi (L/kg)	Birincil eliminasyon yolu
CEP	80 (i.m.)	2	1-1.5	60	18	17	Böbrek
CIX	45 (Oral)	3-4	2-6	4	55	0.85	Böbrek
COP	-	2	1-2	81	85	0.14-0.2	Böbrek
COT	-	1	0.5	15	40	0.22	Böbrek
CTA	90 (i.m.)	2	1	22	10	0.28-0.4	Böbrek
CTR	100 (i.m.)	6-9	2	60	90	0.15	Böbrek
CTI	-	1.7	1	84	30	0.26-0.5	Böbrek

$t_{1/2}$ : yarılanma ömrü,  $t_{mak}$ : maksimum ilaç derişimine ulaşmak için gerekli süre,  $C_{mak}$ : maksimum plazma derişimi ve i.m.: kas içi enjeksiyon.

### **Analiz Yöntemleri**

Antibiyotiklerle yapılan tedavilerin etkinliği, antibiyotiklerin organizmalar tarafından algılanmasına, doku ve organdaki derişimine ve organizmalardaki bozulma zamanına bağlıdır<sup>2</sup>. Biyolojik sıvılardan ve dokulardan, sefalosporinlerin hızlı ve kesin miktar analizleri, tedavi programının optimizasyonu ve zaman olarak düzeltilebilmesi için gereklidir<sup>9,10</sup>.

1990'ların ortalarına kadar biyolojik sıvılardaki ve dokulardaki antibiyotiklerin içeriği sıklıkla mikrobiyolojik yöntemlerle tayin edilirdi. Bu yöntemin en büyük dezavantajı numune içeriğinin bilinmemesiydi. Bu durum aynı anda birden fazla antibiyotiğin kullanılması ve organizma içinde antibiyotiğin çok fazla sayıda metabolitinin oluşmasıyla ilişkilidir. Diğer zorlukları ise analizlerin uzun zamanda gerçekleşmesidir<sup>11-14</sup>. 1970-1980'lerden sonra kromatografiye doğru kayış olmuştur. Kromatografik yöntemler yüksek hassasiyet, kesinlik ve seçicilikten dolayı birçok ilacın farmakokinetik çalışmalarında tercih edilmiştir<sup>15,16</sup>.

Sefalosporin grubu antibiyotiklerin insan<sup>5,17-21</sup> ve hayvan kaynaklı<sup>21,22</sup> biyolojik materyallerden, yiyeceklerden<sup>21,23</sup> ve sulardan analizleri<sup>24,25</sup>, sıvı kromatografisi<sup>17</sup>, kapiller elektroforez<sup>21,26</sup>, spektroskopik<sup>27,28</sup> ve elektrokimyasal yöntemler<sup>19,29</sup> ile gerçekleştirilmiştir. Derlemede, seçilen sefalosporinlerin plazmadan, idrardan, dokudan ve diğer insan kaynaklı biyolojik materyallerden ayırımını, tanımlamasını ve miktar tayinini içeren HPLC analiz yöntemlerinin ayrıntılı değerlendirilmesi sunulmuştur (Tablo III).

**TABLO III**

Sefalosporin grubu antibiyotiklerin insan biyolojik materyallerinden sıvı kromatografisi ile

İlaç	Matriks	Kolon	Hareketli Faz	Dedektör	Doğrusallık (µg/ml)	LOD/LOQ (µg/ml)	Numune Hazırlama
CEP	<sup>1</sup> Plazma <sup>2</sup> Göz içi sıvısı	Shandon Hypersil BDS C <sub>18</sub> (250×4.6 mm, 5 µm)	25 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 3) :MeOH (87:13, h/h) 1 mL/dak	UV 270 nm	<sup>1</sup> 1-50 <sup>2</sup> 1-15	<sup>1</sup> 0.83/2.52 <sup>2</sup> 0.68/2.52	% 70'lik HClO <sub>4</sub> + MeCN
CEP CTA <sup>a</sup>	Plazma	Hypersil BDS C <sub>18</sub> (150×4.6 mm, 5 µm) 40 °C	MeCN: Asetat tamponu (2.8:97.2, h/h) 1 mL/dak	UV 254 nm	0.5-500	-/0.5	%10 TCA CHCl <sub>3</sub>
CEP	Serum	Supelcosil ABZ+ C <sub>18</sub> (150×4.6 mm, 5 µm)	MeCN:20 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 2 (6:94, h/h) 1 mL/dak	UV 263 nm	0.50-200	CEP 0.1/0.5	Ultrafiltrasyon
CEP	<sup>1</sup> Plazma <sup>2</sup> İdrar <sup>3</sup> Diyaliz	Nucleosil C <sub>18</sub> (100×4.6 mm, 5 µm)	MeCN:Amonyum asetat (pH 4) <sup>1</sup> (10:90, h/h) <sup>2,3</sup> (12:88, h/h) 1 mL/dak	UV 280 nm	0.5-100	-/0.5	<sup>1</sup> TCA- MeCN- CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> <sup>2,3</sup> Doğrudan
CEP	<sup>1</sup> Serum <sup>2</sup> Karaciğer	Supelcosil ABZ+ C <sub>18</sub> (150×4.6 mm, 5 µm)	-	UV 263 nm	<sup>1</sup> 0.50-200 <sup>2</sup> 0.50-200 µg/g	-	Filtrasyon
CEP	İdrar	LiChrospher 100 RP-18 (250×4.6 mm, 5 µm)	MeCN:100 mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (pH 3):10 mM n- oktilamin (8:46:46, h/h/h) 1.3 mL/dak Gradient elüsyon	UV 259 nm	10–200	1.0/8.0	Mikrofiltre
CEP	İdrar	LiChrospher 100 RP-18 (250×4.6 mm, 5 µm)	MeCN:150 mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (pH 3):15 mM n- oktilamin (8:46:46, h/h/h) 1 mL/dak Gradient elüsyon	UV 256 nm	10–200	1.9/6.3	Mikrofiltre
CEP	Plazma Peritoneal sıvı	µ Bondasphere C <sub>18</sub> (150×3.9 mm, 5 µm) 40 °C	MeCN:Amonyum asetat (pH 4) (7:93, h/h) 1 mL/dak	UV 270 nm	0.5–150	-/0.5	TCA- MeCN- CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>

CEP	<sup>1</sup> Serum <sup>2</sup> İdrar <sup>3</sup> BOS	LiChrospher 100 RP-18 (250×4.6 mm, 5 µm)	10 mM fosfat tamponu (pH 7):MeOH (75:25, h/h) <sup>1,2</sup> 1 mL/dak <sup>3</sup> 0.5 mL/dak	UV 256 nm	1-100	<sup>1,2</sup> 0.1/0.3 <sup>3</sup> 0.08/0.24	<sup>1</sup> MeCN-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> <sup>2,3</sup> mikrofiltre
CEP	Plazma	Supelcosil LC-18 (250×4.6 mm, 5 µm)	75 mM asetat tamponu:MeCN (92:8, h/h), pH 5 0.8 mL/dak	UV 230 nm	0.8-200	0.4/0.8	MeCN
CEP CTA	Plazma	Symmetry C <sub>8</sub> (250×4.6 mm, 5 µm) 25 °C	Fosfat tamponu (pH 7.4):MeCN (95:5, h/h) 1 mL/dak Gradient elüsyon	UV 200-400 nm	2.5-60	-/1 -/0.5	SPE (M&N C <sub>18</sub> )
CEP	Plazma Diyaliz	Onyx monolithic C <sub>18</sub> (200×4.6 mm)	10 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 7) :MeOH (80:20, h/h) 1 mL/dak Gradient elüsyon	UV 254 nm	2-100	1/2	MeCN
CEP <sup>a</sup>	Serum İdrar	LC 18 (150×4.6 mm, 5 µm)	15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> :MeCN:MeOH (pH 2.8) (84:12:4, h/h) 1 mL/dak	UV 307 nm	-	-	-
CIX	<sup>1</sup> Plazma <sup>2</sup> BAL	µ-Bondapak C <sub>18</sub>	MeOH-Su:fosfat tamponu (22:28:50, h/h/h) 1.1 mL/dak	UV 286 nm	0.1-4.0 0.05-1.6	-	SPE (Sep-Pak C <sub>18</sub> )
CIX	Plazma	Zorbax C <sub>8</sub> (150×4.6 mm, 5 µm)	MeCN:su:formik asit (40:60:0.5, h/h/h)	MS/MS (SIM)	0.05-8.0	-/0.05	MeCN
COP CTI CTR	Serum	Supelcosil LC-18 (150×4.6 mm, 3 µm)	MeOH:MeCN:10 mM fosfat tamponu (pH 7) (20:15:65, h/h/h) 1 mL/dak	UV 267 nm	5-100	LOD 0.5-2	On-line
COP	Kan	Mightysil RP-18 (150×2 mm, 5 µm) 40 °C	MeOH:%0.1 formik asit (10:90, h/h) 0.2 mL/dak Gradient elüsyon	MS/MS (SIM)	0.097-1.93	0.048/0.097	MeCN



ÜÇÜNCÜ VE DÖRDÜNCÜ KUŞAKTAN SEÇİLMİŞ SEFALOSPORİNLERİN İNSAN KAYNAKLI BİYOLOJİK MATERYALLERDEN HPLC İL

COT	<sup>1</sup> Plasma <sup>2</sup> Göz içi sıvısı	ODS-Hypersil (300×4.6 mm, 5 µm)	10 m M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> :MeCN:dimetilfor- mamiit (79:15, h/h) pH 3	UV 285 nm	0.08-20	<sup>1</sup> -/0.31 <sup>2</sup> -/0.08	SPE (Varian C <sub>18</sub> )
COT	İdrar	LiChrospher 100 PR 18 (125×4 mm)	MeCN: 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 3) (10:90 h/h) 0.75 mL/dak Gradient elüsyon	UV 254 nm	1.25-500	0.25/-	SPE (Empore)
COT	<sup>1</sup> Plazma <sup>2</sup> BOS	Spherisorb ODS2 (150×4.6 mm, 5 µm)	7 mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> :MeCN (85:15, h/h) 1.3 mL/dak	UV 262 nm	<sup>1</sup> 0.58-940 <sup>2</sup> 0.54-148	<sup>1</sup> -/0.58 <sup>2</sup> -/0.80	Sodyum asetat-MeOH Su
COT	BOS	LiChrolut RP-18 (250×4 mm, 5 µm)	10 mM asetat tamponu pH 4.8:MeOH (85:15, h/h)	UV 254 nm	1.56-100	-/0.39	SPE (Bakerbond C <sub>18</sub> )
COT	Plazma	C18 Aqua (150×4.6 mm, 5 µm)	50 mM NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 3):MeCN:TEA (87.8:12.0:0.2, h/h/h) 1 mL/dak	UV 285 nm	1-50	-/1	MeCN
COT	<sup>1</sup> Serum <sup>2</sup> İdrar	Chromolith® SpeedRODRP-18e	Asetat tamponu (pH 4):MeOH (90:10, h/h) 1.8 mL/dak	UV 265 nm	0.001-5 ng/µL	0.025/0.075 ng/µL	<sup>1</sup> SPE (Oasis HLB) <sup>2</sup> Filtrasyon
COT	<sup>1</sup> Serum <sup>2</sup> İdrar	Spherisorb ODS (250×4.6 mm, 5 µm)	Asetat tamponu (pH 4):MeOH (78:22, h/h) 1.2 mL/dak	UV 265 nm	0.01-5 ng/µL	5-15 pg/µL	<sup>1</sup> SPE (Bondelut) <sup>2</sup> Filtrasyon
COT <sup>a</sup>	Plazma	ZorbaxSB-CN (150×4.6 mm, 5 µm)	MeCN:5 mM formik asit (24:76, h/h) 1 mL/dak	MS/MS	-	-	MeCN
CTA	Plazma	Spherisorb ODS C <sub>18</sub> (120×4 mm, 5 µm) 40 °C	MeCN:50 mM fosfat tamponu (pH 3.8) (94.5:5.5, h/h) 1 mL/dak	UV 254 nm	5-200	0.1/4	% 20 TCA
CTA	Plazma	Kromasil 100 C <sub>18</sub> (250×4.6 mm, 5 µm)	MeCN:25 mM fosfat tamponu (pH 7.4) (10:90, h/h) 0.9 mL/dak	ECD +1 V	5-200	0.75/3	% 30 TCA

CTA	<sup>1</sup> Plazma <sup>2</sup> Kemik	Nova-Pack C <sub>18</sub> (150×3.9 mm, 4 µm)	50 mM (NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 2.5):THF (494:6, h/h) 2 mL/dak	UV 258 nm	-	<sup>1</sup> 0.1/- <sup>2</sup> 0.1/- µg/g	% 4 Perklorik asit
CTA	<sup>1</sup> Serum <sup>2</sup> Balgam	Nucleosil 100-5 C <sub>18</sub> (250×4.6 mm, 5 µm) 35 °C	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 5):MeCN (95:5, h/h) 1 mL/dak Gradient elüsyon	UV 258 nm	0.5-40	0.5/-	On-line
CTA <sup>1</sup> CEP <sup>2</sup>	<sup>3</sup> Plazma <sup>4</sup> Diyaliz	Bondapak C <sub>18</sub> (300×4.9 mm, 10 µm) Oda sıcaklığında	Asetat:MeCN <sup>1</sup> (95:5, h/h) <sup>2</sup> (90:10, h/h) 2 mL/dak	UV <sup>1</sup> 257 nm <sup>2</sup> 280 nm	3-200 1-200	/3 -/1	<sup>3</sup> MeCN-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> <sup>4</sup> Doğrudan
CTA <sup>a</sup>	Plazma	Phenomenex Synergi Polar-RP (10×2 mm, 4 µm)	Su- amonyum asetat-%0.1 asetik asit (pH 3,8):MeOH (100:0, h/h) 0.5 mL/dak Gradient elüsyon	MS (SIM)	-	-	MeOH
CTI	Serum	Kromasil 100 C <sub>18</sub> (250×4.6 mm, 5 µm)	MeCN:Su (60:40, h/h) 0.75 mL/dak	UV 265-270 nm	0.05-100	0.1/0.3	-
CTR	Plazma	Nova-Pak C <sub>18</sub> (100×8 mm, 4 µm)	10 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 10 mM CTMAB (pH 6.5):MeCN (73:27, h/h) 1.5 mL/dak Gradient elüsyon	UV 274 nm	0.005-120	0.005/0.015	SPE (Sep-Pak C <sub>18</sub> )
CTR	BOS	Merck C <sub>18</sub> (125×4 mm, 5 µm)	MeCN:100 mM fosfat tamponu (pH 7.4)-3.2 g TBAB (30:70, h/h) 1 mL/dak	UV 270 nm	0.5-50	0.02/0.07	Santrifüj
CTR	BOS	Merck C <sub>18</sub> (125×4 mm, 5 µm)	MeCN:100 mM fosfat tamponu (pH 7.4)-3.2 g TBAB (30:70, h/h) 1 mL/dak	UV 270 nm	0.5-50	0.019/0.065	Santrifüj
CTR	Plazma Amniyotik sıvı	Nova-Pak C <sub>18</sub> (100×8 mm, 4 µm)	10 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 10 mM CTMAB (pH 6.5):MeCN (73:27, h/h)	UV 274 nm	0.005-120	-	SPE (Sep-Pak C <sub>18</sub> )

<sup>a</sup> Çalışmada iç standart olarak kullanılmıştır. <sup>1,2,3</sup> ve <sup>4</sup> aynı satırdaki sefalosporinler için açıklamadır.

## **Kromatografik koşullar/şartlar**

### **Sabit Faz**

Sabit faz seçiminde analizi gerçekleştirilecek maddelerin fizikokimyasal özellikleri en önemli parametredir. Üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinler oldukça polar bileşikler olmalarından dolayı normal faz sıvı kromatografisi ile ayrılabilirler<sup>64</sup>. Fakat son on yıldaki yayınlanmış çalışmalar incelendiğinde analizlerin %95'i (2/35=0.05) ters faz sıvı kromatografisi ile gerçekleştirilmiş olduğu görülmektedir. Bu durum oldukça kararlı apolar sabit fazların kullanılması ile açıklanabilir. Çalışmalarda genellikle C<sub>18</sub> sabit faz tercih edilirken iki çalışmada C<sub>8</sub> sabit faz olarak kullanılmıştır (Tablo III).

Samanidou ve arkadaşları, sefalosporinlerin ayırımını monolitik kolon kullanarak gerçekleştirmiş ve çalışma sonunda monolitik kolonla yapılan analizin silika temelli kolonlara göre daha hızlı, kesin, tekrarlanabilir ve hassas olduğunu belirtmiştir<sup>52</sup>.

Polar sabit fazın kullanıldığı iki çalışmada sefalosporinler (CTA<sup>60</sup> ve COT<sup>54</sup>) iç standart olarak kullanılmıştır.

### **Hareketli faz**

Sefalosporinler sefem halkasında üçüncü pozisyonda karboksil grubu içerirler. Bu yüzden sefalosporinler pH 8 civarında iyonize formda bulunurken pH 3 civarında karboksil grubunun iyonizasyonu baskılanır. Bu yüzden pH 3-8 aralığında sefalosporinlerin alıkonmaları önemli ölçüde üçüncü ve yedinci konumdaki substitüentlerin yapısına bağlıdır<sup>45,65</sup>.

Kromatografik koşulların belirlenmesinde diğer bir önemli parametre ise hareketli fazın iyonik şiddetidir. Van de Venne<sup>66</sup> ve Bompadre<sup>45</sup> ve arkadaşlarına göre iyonize olmuş asitlerin pH 8 civarında silika jel üzerinde tutunmaları tampondaki katyon derişimi ile doğru orantılıdır. Bu durum tüm sefalosporinler için geçerlidir. Bu mekanizma negatif yüklü sefalosporinlerin, pozitif yüklü hareketli faz katyonlarıyla birleşmeleri ile açıklanabilir. pH 3'de ise artan iyonik şiddetle, amino grubu içeren sefalosporinlerin adsorpsiyonu azalmaktadır<sup>45</sup>. Bu mekanizma ise hareketli fazdaki katyonlar ile proton

almış amino gruplu sefalosporinin sabit fazdaki silanol artıkları için aralarındaki yarışla açıklanabilir (ikili-alıkonma modeli). Tüm bunlardan dolayı, iyonize sefalosporinlerin tutunmaları, pH, iyonik şiddet ve maddelerin pKa'sına bağlı olan kompleks mekanizmalar ile açıklanabilir.

Sefalosporinlerin iyon çifti kromatografisi ile de ters faz kolonda analizleri gerçekleştirilebilir<sup>67</sup>. Sefalosporinlerin tayinlerinde iyon çifti ajanı olarak sülfat (sodyum hekzan-,heptan-, ve oktan-sülfanat) ve tetraamonyum tuzları (tetrabutilamonyum hidroksit, setiltetrametilamonyum bromür, tetrabutilamonyum bromür) kullanılmıştır<sup>62,63,67</sup>.

Sefalosporin molekülündeki sürekli pozitif yüklü kuarterner amin varlığı (sefepim ve seftazidim) geniş bir pH aralığında zwitter iyonun oluşmasına neden olmakta ve üçüncü konumdaki karboksil grubunu baskılamaktadır. Karşıt iyonun alıkonma üzerindeki etkisi sefalosporinin iyonlaşma derecesine bağlıdır. Karşıt iyon ile zıt yüklü molekülün iyon çifti oluşturması alıkonma zamanında önemli bir artışa neden olmaktadır. Zwitter iyon oluşturulan pH'larda moleküller içi etkileşim ortadan kalkmakta ve serbest yükün azalmasından dolayı alıkonma zamanı azalmaktadır. İyon çifti oluşumu ve zwitter iyon türleri arasındaki yarış, hareketli fazdaki karşıt iyon derişimine bağlıdır ve bu durum alıkonma süresine yansımaktadır<sup>67</sup>.

Hidrofobik karşıt anyonlar iyon çifti ajanı olarak, düşük pH'larda kullanıldığında protonlanmış aminotiyozol halkası içeren sefalosporinler ile iyon çifti oluşturmakta ve alıkonma süresini artırmaktadır. Aynı halkanın deprotonize olduğu yüksek pH'larda ise karşıt anyonlar kuarterner aminle etkileşerek zwitter iyon yapısını bozarlar ve alıkonma süresini azaltırlar. Katyonik karşıt iyon çifti ajanı kullanıldığında karboksil grubu ile etkileşeceğinden zwitter iyon yapının bozulmasına ve alıkonma süresinin azalmasına neden olur<sup>67</sup>.

Literatürdeki ters faz HPLC yöntemlerinin büyük bir kısmı düşük iyonik şiddette ve düşük pH'da gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak genelde fosfat tamponu tercih edilirken organik çözücü olarak MeOH veya MeCN kullanılmıştır (Tablo III).

### **Dedektörler**

Sefalosporinlerin miktar tayinlerinde, kromofor özellik göstermelerinden dolayı genellikle UV dedektör tercih edilmiştir. Çalışmalar 230-280 nm dalgaboyu aralığında gerçekleştirilmiştir (Tablo III).

Kaynaklarda sefalosporinlerin tayinlerinde amperometrik<sup>19</sup>, elektrokimyasal<sup>56</sup> ve kütle dedektörlerinin de<sup>44,46,54,60</sup> kullanılmış olduğu görülmektedir. Ayrıca ikinci kuşak sefalosporinlerden sefaklor türevlendirildikten sonra floresans ve kemilüminesans özelliklerinden yararlanarak analizleri gerçekleştirilmiştir<sup>68</sup>.

Sefalosporinlerin HPLC ile analizlerinde elde edilen gözlenebilme ve alt tayin sınırları genelde ng/mL düzeyindedir (Tablo III). Bu hassasiyet sefalosporinlerin farmakokinetik çalışmaları gerçekleştirebilmek için yeterli olmaktadır (Tablo II).

### **Numune Hazırlama**

Biyolojik materyaller protein, yağ gibi maddeleri içeren karmaşık karışımlardır. Bu maddelerin numunede bulunması madenin analizleri girişim yaparak engelleyeceği gibi, kolon, cihaz bağlantıları ve dedektör üzerinde tıkanmaya da neden olmaktadır. Bu yüzden mümkün oldukça basit numune matrikslerinin analitik kolonlara enjekte edilebilmesi için numunelerin ön işleme tabi tutulması/hazırlanması gerekmektedir<sup>16,69</sup>.

Sefalosporinlerin biyolojik materyallerden HPLC ile analizlerinde üç farklı numune hazırlama tekniği kullanılmıştır. Bunlar; i) uygun çözücü ile seyreltme, ii) protein çöktürme ve iii) katı faz tüketmedir (SPE).

- i) Uygun çözücü ile seyreltme: Protein içeriğinin az olduğu idrar, beyin omurilik sıvısı (BOS) gibi matriksler için kullanılabilir. Bu matriksler su ile veya kararlılık problemi yaratmayacak uygun pH'daki bir tampon çözelti ile seyreltilebilirler. Yapılan çalışmalarda su en fazla tercih edilen seyreltme çözeltisi olduğu görülmüştür<sup>32-36,38,52,53,59</sup>.

- ii) Protein çöktürme: Yüksek oranda protein içeren matrikslerden (plazma, serum ve doku gibi) kolon şartlarını değiştirmemek ve seçiciliği artırmak için proteinlerin uzaklaştırılması gerekmektedir. Protein çöktürme işlemi basit olması ve özel aletlere ihtiyaç duymaması bakımından avantaj sağlamasına rağmen, bir çok ilacın kontrolsüz bir biçimde çökmesine neden olabilmekte ayrıca asidik ortamdan dolayı ilaçların bozunmasına da yol açabilmektedir. Ayrıca bu işlem uygulandığında çökmenin tamamlanıp tamamlanmadığının da kontrolü gerekmektedir<sup>16</sup>.

Sefalosporinler için protein çöktürme işlemleri trikloroasetik asit, perklorik asit, metanol veya asetonitril ile gerçekleştirilmiştir (Tablo III). Asit ile yapılan işlemler etkin maddenin inaktivasyonuna, bazik ortamda ise kromatografik piklerin genişlemesine ve bazen de kimyasal yapının değişmesine neden olabilmektedir. Bu işlemin diğer bir dezavantajı ise numunenin seyreltilmesi ile analit derişiminin tayin sınırının altına düşmesidir. Bu durum ortamdaki fazla çözücünün uzaklaştırılmasıyla giderilebilmektedir<sup>16</sup>.

- iii) SPE: Günümüzde en etkili örnek hazırlama yöntemlerinden olan SPE, sahip olduğu avantajlar sayesinde özellikle çevre, gıda, ilaç, kozmetik vb. alanlarda kullanılmaktadır. Sefalosporinlerin SPE ile tayinleri C<sub>18</sub> ve polimerik temelli sorbentler kullanılarak gerçekleştirilmiştir<sup>70</sup>. Martinez ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sorbent olarak C<sub>18</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>2</sub>, sikloheksil, fenil, siyanopropil ve 3M Empore disk kartuş denenmiş ve C<sub>8</sub>, C<sub>2</sub>, sikloheksil, fenil, ve siyanopropil kartuşlarla düşük geri kazanım elde edilmiştir. Çalışmalarının sonunda disk kartuş olan 3M Empore'yi yüksek geri kazanım ve girişim olmamasından dolayı önermişlerdir<sup>48</sup>.

SPE sorbentlerinin şartlandırılması ve yıkanması sırasında çözelti olarak su<sup>62</sup> veya fosfat tamponu<sup>40</sup> kullanılarak geri kazanım artırılmıştır. Ayrıca tüketme verimi numunenin pH'sı ayarlanarak ve karşı iyonlar<sup>40,47</sup> eklenerek artırılmıştır. Elüsyon çözeltisi olarak ise metanol<sup>50</sup> veya asetonitril<sup>48</sup> içeren çözeltiler kullanılmıştır.

Ayrıca SPE'nin hat üstü (on-line) analizlerde de kullanıldığı görülmektedir<sup>45</sup>.

Derlemede yer alan sefalosporinlerin sekiz farklı biyolojik materyalden analizlerinde kullanılan numune hazırlama teknikleri Tablo IV'de özetlenmiştir.

**Tablo IV:** Derlemede yer alan sefalosporinlerin insan kaynaklı biyolojik materyallerden numune hazırlama teknikleri

Biyolojik materyal	Numune hazırlama teknikleri
Amniyotik sıvı	SPE (10)
Balgam	SPE (43)
BOS	Uygun çözücü ile seyreltme/Filtreleme (38,49,71) Protein çöktürme (63)
Diyaliz	Uygun çözücü ile seyreltme (33) Protein çöktürme (41)
Göz içi sıvısı	SPE (47) Protein çöktürme (30)
İdrar	Protein çöktürme (72,73) Filtreleme (38)
Kemik	Protein çöktürme (57)
Plazma	Protein çöktürme (37,44,47,74-79) SPE (10,31,40,62,80,81)
Peritoneal sıvı	Protein çöktürme (37)

Numune hazırlama tekniğinin seçimi sırasında matriksten gelen girişimleri engellemenin yanı sıra yüksek geri kazanım elde edilmesi hedeflenmiştir. Yapılan çalışmaların geri kazanım değerleri genelde % 90 civarındadır (Tablo III). Bazı çalışmalarda ise düşük geri kazanım (%60-70 civarında) değerleri elde edilmesi numune hazırlama tekniğinin optimizasyon çalışmalarının yetersizliğinden kaynaklandığını düşündürmektedir. En düşük geri kazanım (%50) ise Ehrlich ve

arkadaşlarının<sup>58</sup> yaptığı çalışmada CTA'nın balgam numunelerinden analizidir.

Sefalosporinlerin kararlılıkları pH'ya, sıcaklığa ve hazırlama süresine bağlıdır ve analizler sırasında kararlılık mutlaka kontrol edilmesi gereken bir parametredir<sup>9,20,21,82</sup>.

### Özet

#### **Üçüncü ve dördüncü kuşaktan seçilmiş sefalosporinlerin insan kaynaklı biyolojik materyallerden HPLC ile tayinleri**

Sefalosporinler 7-amino-sefalosporanik asit çekirdeğinden türevlendirilen beta-laktam antibiyotikleridir. Bu asit çekirdeğine çeşitli fonksiyonel gruplarının eklenmesi ile daha yüksek etkinlik ve düşük toksisiteye sahip ürünlerin oluşması sağlanmıştır. Sefalosporinler, antimikrobiyal etki spektrumlarına göre dört kuşakta sınıflandırılabilir. Genel olarak, birinci kuşaktan dördüncü kuşağa doğru gidildikçe Gram (-) spektrumda artış görülürken Gram (+) organizmalara karşı aktivitede bazı azalmalar görülmektedir. Derlemede Türkiye piyasasında kullanılan üçüncü ve dördüncü kuşaktan yedi sefalosporinin (Sefepim, Seftazidim, Seftizoksim, Seftriakson, Sefotaksim, Sefiksim ve Sefoperazon) insan kaynaklı biyolojik materyallerden son on yılda HPLC ile yapılan tayinleri incelenmiştir. İncelenen yöntemlerde kullanılan hareketli faz, sabit faz, dedektör, numune hazırlama tekniği, geri kazanım, gözlenebilme ve alt tayin sınırına göre yapılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** HPLC, Sefalosporin, biyolojik materyal, insan



*Summary***Determination of the cephalosporins selected from third and forth generation in biological materials originated from human by HPLC**

Cephalosporins, derived from the 7-aminocephalosporanic acid nucleus, are  $\beta$ - lactam antibiotics. Addition of substituent to this acidic nucleus provide to create new products having lower toxicity and higher efficiency. The cephalosporins have been classified into four group according to their antimicrobial spectrum. In general, progression from first to fourth generation is associated with a broadening of the Gram (-) antibacterial spectrum, some reduction in activity against Gram (+) organisms. In this review, the analysis of the seven cephalosporins, belong to third and fourth generations (Cefepime, Ceftazidime, Ceftizoxime, Ceftriaxone, Cefotaxime, Cefixime and Cefoperazon) currently on the market in Turkey, in biological material originated from human with HPLC in the last decade have been investigated. The investigation has been done according to mobile phase, stationary phase, detector, sample preparation technique, recovery, limit of detection and limit of quantitation of the methods.

**Keywords:** HPLC, Cephalosporin, Biological material, Human

## KAYNAKLAR

1. Bryskier, A. (2004). Antibacterial Agents Structure Activity Relationships, Ağ Sitesi: <http://www.infectio-lille.com/diaporamas/invites/struct-act-duatb05-bryskier.pdf>
2. Katzung, B.G. Basic & Clinical Pharmacology (9. bs.). London: The McGraw-Hill Companies (2005).
3. Shah, P.M. Classification of oral cephalosporins. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 19 (2), 163-164 (2002).
4. Williams, J.D., Naber, K.G., Bryskier, A., Hoiby, N., Gould, I.M., Periti, P., Giamarellou, H.,Rouveix, B. Classification of oral cephalosporins. A matter for debate. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 17 (6), 443-450 (2001).
5. Marzo, A.,Dal Bo, L. Chromatography as an analytical tool for selected antibiotic classes: a reappraisal addressed to pharmacokinetic applications. *J. Chromatogr.A*, 812 (1-2), 17-34 (1998).
6. 2007 Scifinder data calculated by using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V8.14 for Solaris ((C) 1994–2007 ACD/Labs).
7. Sparc on-line calculator vs 4.2. Ağ Sitesi: <http://ibmlc2.chem.uga.edu/sparc/>
8. Williams, J., Naber, K., Bryskier, A., Høby, N., Gould, I., Periti, P., Giamarellou, H.,Rouveix, B. Classification of oral cephalosporins. A matter for debate. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 17 (6), 443-450 (2001).
9. Sokolova, L.,Chernyaev, A. Reversed-phase HPLC determination of antibiotics of the cephalosporin series in biological objects review. *Pharm. Chem. J.*, 36 (5), 263-269 (2002).
10. Popovic, J., Grujic, Z.,Sabo, A. Influence of pregnancy on ceftriaxone, cefazolin and gentamicin pharmacokinetics in caesarean vs. non-pregnant sectioned women. *J. Clin. Pharm. Ther.*, 32 (6), 595-602 (2007).
11. Charles, D.,Larsen, B. Pharmacokinetics of cefotaxime, moxalactam, and cefoperazone in the early puerperium. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 29 (5), 873-876 (1986).
12. Schaad, U., McCracken Jr, G., Loock, C.,Thomas, M. Pharmacokinetics and bacteriologic efficacy of moxalactam, cefotaxime, cefoperazone, and rocephin in experimental bacterial meningitis. *J. Infect. Dis.*, 143 (2), 156-163 (1981).
13. Maitra, S., Yoshikawa, T., Guze, L.,Schotz, M. Determination of aminoglycoside antibiotics in biological fluids: a review. *Clin. Chem.*, 25 (8), 1361-1367 (1979).
14. Hamscher, G., Sczesny, S., Abu-Quare, A.,Nau, H. (2000). ESI-LC-MS-MS techniques used for the determination of antimicrobial [Bildiri].
15. Martín, J.,Méndez, R. HPLC analysis of cefmetazole and nocardicins A and E in human serum and urine using solid-phase extraction. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, 11 (8), 1729-1739 (1988).
16. Chamberlain, J. The Analysis of Drugs in Biological Fluids: CRC Press (1995).

17. Jehl, F., Birckel, P.,Monteil, H. Hospital routine analysis of penicillins, third-generation cephalosporins and aztreonam by conventional and high-speed high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.*, 413, 109-119 (1987).
18. Toothaker, R.D., Wright, D.S.,Pachla, L.A. Recent analytical methods for cephalosporins in biological fluids. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 31 (8), 1157-1163 (1987).
19. Fabre, H., Blanchin, M.D.,Kok, W.T. Liquid chromatography with amperometric detection for the determination of cephalosporins in biological fluids. *Analyst*, 113 (4), 651-655 (1988).
20. Péhourcq, F.,Jarry, C. Determination of third-generation cephalosporins by high-performance liquid chromatography in connection with pharmacokinetic studies. *J. Chromatogr.A*, 812 (1-2), 159-178 (1998).
21. El-Shaboury, S.R., Saleh, G.A., Mohamed, F.A.,Rageh, A.H. Analysis of cephalosporin antibiotics. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 45 (1), 1-19 (2007).
22. Yun, E.K., Prince, A.J., McMillin, J.E.,Welch, L.E. High-performance liquid chromatographic separation and electrochemical detection of cephalosporins. *J. Chromatogr. B.*, 712 (1-2), 145-152 (1998).
23. Niessen, W.M.A. Analysis of antibiotics by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.A*, 812 (1-2), 53-75 (1998).
24. Benito-Peña, E., Partal-Rodera, A., León-González, M.,Moreno-Bondi, M. Evaluation of mixed mode solid phase extraction cartridges for the preconcentration of beta-lactam antibiotics in wastewater using liquid chromatography with UV-DAD detection. *Anal. Chim. Acta*, 556 (2), 415-422 (2006).
25. Glaria, M.D., Moscciati, G.G., Ramos, R.G.,Riquelme, M.M. Stability of ceftriaxone in water and cerebrospinal fluid determined by high-performance liquid chromatography. *J. Sep. Sci.*, 26 (9-10), 939-942 (2003).
26. Coleraine, C.,Ireland, N. Recent applications of capillary electrophoresis-electrospray ionisation-mass spectrometry in drug analysis. *Electrophoresis*, 26, 1334-1357 (2005).
27. Al-Momani, I. Spectrophotometric determination of selected cephalosporins in drug formulations using flow injection analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 25 (5-6), 751-757 (2001).
28. Salem, H.,Askal, H. Colourimetric and AAS determination of cephalosporins using Reineck's salt. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 29 (1-2), 347-354 (2002).
29. Altinoz, S., Temizer, A.,Beksac, S. Determination of ceftriaxone in biological material by differential-pulse adsorptive stripping voltammetry. *The Analyst*, 115 (6), 873-874 (1990).
30. Valassis, I.N., Parissi-Poulou, M.,Macheras, P. Quantitative determination of cefepime in plasma and vitreous fluid by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.*, 721 (2), 249-255 (1999).
31. Calahorra, B., Campanero, M.A., Sadaba, B.,Azanza, J.R. Rapid high-performance liquid chromatographic determination of cefepime in human plasma. *Biomed. Chromatogr.*, 13 (4), 272-275 (1999).
32. Breilh, D., Lavallee, C., Fratta, A., Ducint, D., Cony-Makhoul, P.,Saux, M.C. Determination of cefepime and ceftiofime in human serum by high-performance

- liquid chromatography using an ultrafiltration for antibiotics serum extraction. *J. Chromatogr. B.*, 734 (1), 121-127 (1999).
33. Cherti, N., Kinowski, J.M., Lefrant, J.Y., Bressolle, F. High-performance liquid chromatographic determination of cefepime in human plasma and in urine and dialysis fluid using a column-switching technique. *J. Chromatogr. B.*, 754 (2), 377-386 (2001).
  34. Breilh, D., Saux, M.C., Delaisement, C., Fratta, A., Ducint, D., Velly, J.F., Couraud, L. Pharmacokinetic population study to describe cefepime lung concentrations. *Pulmonary Pharmacol. Ther.*, 14 (2), 69-74 (2001).
  35. Gonzalez, J.A.O., Palacios, F.J.J., Mochon, M.C., de la Rosa, F.J.B. Simultaneous determination of cefepime and grepafloxacin in human urine by high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 36 (1), 117-123 (2004).
  36. Gonzalez, J.A.O., Mochon, M.C., de la Rosa, F.J.B. Simultaneous determination of cefepime and the quinolones garenoxacin, moxifloxacin and levofloxacin in human urine by HPLC-UV. *Microchim. Acta*, 151 (1-2), 39-45 (2005).
  37. Ikawa, K., Morikawa, N., Hayato, S., Ikeda, K., Ohge, H., Sueda, T. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profiling of cefepime in plasma and peritoneal fluid of abdominal surgery patients. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 30 (3), 270-273 (2007).
  38. Palacios, F.J.J., Mochon, M.C., Sanchez, J.C.J., Lopez, M.A.B., Perez, A.G. Validation of an HPLC method for determination of cefepime (a fourth-generation cephalosporin). Determination in human serum, cerebrospinal fluid, and urine. Pharmacokinetic profiles. *Chromatographia*, 62 (7-8), 355-361 (2005).
  39. Lopez, K.J.V., Bertoluci, D.F., Vicente, K.M., Dell'Aquila, A.M., Santos, S.R.C.J. Simultaneous determination of cefepime, vancomycin and imipenem in human plasma of burn patients by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.*, 860 (2), 241-245 (2007).
  40. Denoos, R., Charlier, C. Simultaneous determination of five beta-lactam antibiotics (cefepim, ceftazidim, cefuroxim, meropenem and piperacillin) in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B.*, 864 (1-2), 161-167 (2008).
  41. Farthing, C., Farthing, D., Brophy, D.F., Larus, T., Maynor, L., Fakhry, I., Gehr, T.W.B. High-performance liquid chromatographic determination of cefepime and cefazolin in human plasma and dialysate. *Chromatographia*, 67 (5-6), 365-368 (2008).
  42. Ozkan, Y., Kucukguzel, I., Ozkan, S.A., Aboul-Enein, H.Y. A rapid, sensitive high performance liquid chromatographic method for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form, human serum and urine. *Biomed. Chromatogr.*, 15 (4), 263-266 (2001).
  43. Liu, S., Dai, Q., Ma, W., Ling, C., Tang, X. HPLC determination of cefixime in biological samples with solid phase extraction. *Yaowu Fenxi Zazhi*, 18 (1), 3-36 (1998).
  44. Meng, F., Chen, X.Y., Zeng, Y.L., Zhong, D.F. Sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of cefixime in human plasma: Application to a pharmacokinetic study. *J. Chromatogr. B.*, 819 (2), 277-282 (2005).
  45. Bompadre, S., Ferrante, L., Leone, L. On-line solid-phase extraction of cephalosporins. *J. Chromatogr. A*, 812 (1-2), 191-196 (1998).

46. Tsujikawa, K., Kuwayama, K., Miyaguchi, H., Kanamori, T., Iwata, Y., Inoue, H., Kishi, T. A fatal case of suspected anaphylaxis with cefoperazone and sulbactam: LC-MS analysis. *J. Forensic Sci.*, 53 (1), 226-231 (2008).
47. Kraemer, H.J., Gehrke, R., Breithaupt, A., Breithaupt, H. Simultaneous quantification of cefotaxime, desacetylcefotaxime, ofloxacin and ciprofloxacin in ocular aqueous humor and in plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.*, 700 (1-2), 147-153 (1997).
48. Martinez, L.G., Campins-Falco, P., Sevillano-Cabeza, A., Herraiz-Hernandez, R. Improved solid phase extraction procedure for assay of cephalosporins in human urine samples. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, 21 (14), 2191-2203 (1998).
49. Scanes, T., Hundt, A.F., Swart, K.J., Hundt, H.K.L. Simultaneous determination of cefotaxime and desacetylcefotaxime in human plasma and cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.*, 750 (1), 171-176 (2001).
50. Bafeltowska, J.J., Buszman, E., Mandat, K., Hawranek, J. Determination of cefotaxime and desacetylcefotaxime in cerebrospinal fluid by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.*, 976 (1-2), 249-254 (2002).
51. Rosseel, M.T., Vandewoude, K.H. Liquid chromatographic determination of the plasma concentrations of cefotaxime and desacetylcefotaxime in plasma of critically ill patients. *J. Chromatogr. B.*, 811 (2), 159-163 (2004).
52. Samanidou, V.F., Ioannou, A.S., Papadoyannis, I.N. The use of a monolithic column to improve the simultaneous determination of four cephalosporin antibiotics in pharmaceuticals and body fluids by HPLC after solid phase extraction - a comparison with a conventional reversed-phase silica-based column. *J. Chromatogr. B.*, 809 (1), 175-182 (2004).
53. Samanidou, V., Hapeshi, E., Papadoyannis, I. Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic determination of four cephalosporin antibiotics in pharmaceuticals and body fluids. *J. Chromatogr. B.*, 788 (1), 147-158 (2003).
54. Viberg, A., Sandstrom, M., Jansson, B. Determination of cefuroxime in human serum or plasma by liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 18 (6), 707-710 (2004).
55. Campanero, M.A., Zamarreno, A.M., Simon, M., Dios, M.C., Azanza, J.R. Simple and rapid determination of piperacillin and ceftazidime in human plasma samples by HPLC. *Chromatographia*, 46 (7-8), 374-380 (1997).
56. Guitton, J., Laffont, A., Bruzeau, J., Rochet-Mingret, L., Bonnefoy, M., Bureau, J. Determination of ceftazidime in plasma using high-performance liquid chromatography and electrochemical detection - Application for individualizing dosage regimens in elderly patients. *J. Chromatogr. B.*, 719 (1-2), 151-157 (1998).
57. Raymakers, J.T.F.J., Schaper, N.C., van der Heyden, J.J., Tordoir, J.H.M., Kitslaar, P.J.E.H.M. Penetration of ceftazidime into bone from severely ischaemic limbs. *J. Antimicrob. Chemother.*, 42 (4), 543-545 (1998).
58. Ehrlich, M., Daschner, F.D., 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.*, 751 (2), 357-363 (2001).
59. Isla, A., Arzuaga, A., Maynar, J., Gascon, A.R., Solinis, M.A., Corral, E., Pedraz, J.L. Determination of ceftazidime and cefepime in plasma and dialysate-ultrafiltrate from

- patients undergoing continuous veno-venous hemodiafiltration by HPLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 39 (5), 996-1005 (2005).
60. Koal, T., Deters, M., Resch, K., Kaever, V. Quantification of the carbapenem antibiotic ertapenem in human plasma by a validated liquid chromatography-mass spectrometry method. *Clin. Chim. Acta*, 364 (1-2), 239-245 (2006).
  61. Arayne, M.S., Sultana, N., Bi, Z.B. Simultaneous determination of cefazolin or ceftizoxime in presence of ascorbic acid from pharmaceutical formulation and human serum by RP-HPLC. *Pakistan J. Pharm. Sci.*, 20 (1), 56-61 (2007).
  62. Al-Rawithi, S., Hussein, R., Raines, D.A., AlShowaier, I., Kurdi, W. Sensitive assay for the determination of cefazolin or ceftriaxone in plasma utilizing LC. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 22 (2), 281-286 (2000).
  63. Glaria, M.D., Mosciati, G.G., Ramos, R.G. Determination of ceftriaxone in cerebrospinal fluid by ion-pair liquid chromatography. *J. AOAC Int.*, 88 (2), 436-439 (2005).
  64. Hanai, T. HPLC: a practical guide. Cambridge: Royal Society of Chemistry (1999).
  65. Rouan, M.C., Abadie, F., Leclerc, A., Juge, F. Systematic approach to the determination of cephalosporins in biological fluids by reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.*, 275, 133-144 (1983).
  66. Van de Venne, J.L.M., Hendrikx, J.L.H.M., Deelder, R.S. Retention behaviour of carboxylic acids in reversed-phase column liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 167, 1-16 (1978).
  67. Pistos, C., Tsantili-Kakoulidou, A., Koupparis, M. The effect of ion pairing reagents in the retention profile of zwitterionic cephalosporins. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, 26 (6), 937-952 (2003).
  68. Masaaki Kai, H.K., Kazuko Ohta, Shuuji Hara, Myung Koo Lee, Jianzhong Lu. Sensitive determination of a  $\beta$ -lactam antibiotic, cefaclor by liquid chromatography with chemiluminescence detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 30, 1765-1771 (2003).
  69. McDowall, R.D., Doyle, E., Murkitt, G.S., Picot, V.S. Sample preparation for the HPLC analysis of drugs in biological fluids. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 7 (9), 1087-1096 (1989).
  70. Molins-Legua, C., Campins-Falcó, P. Solid phase extraction of amines. *Anal. Chim. Acta*, 546 (2), 206-220 (2005).
  71. Nau, R., Prange, H.W., Muth, P., Mahr, G., Menck, S., Kolenda, H., Sorgel, F. Passage of cefotaxime and ceftriaxone into cerebrospinal-fluid of patients with uninflamed meninges. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37 (7), 1518-1524 (1993).
  72. Lafollette, G., Kaubisch, S., Gambertoglio, J.G., Lin, E.T. An ion-pairing high-pressure liquid-chromatography assay for the determination of cefoperazone in plasma and urine. *J. Liq. Chromatogr.*, 11 (3), 683-700 (1988).
  73. Falkowski, A.J., Look, Z.M., Noguchi, H., Silber, B.M. Determination of cefixime in biological samples by reversed-phase high-performance liquid-chromatography. *J. Chromatogr. B.*, 422, 145-152 (1987).
  74. Bowman, D.B., Aravind, M.K., Kauffman, R.E., Miceli, J.N. Reversed-phase high-performance liquid-chromatographic (HPLC) method to determine ceftriaxone in biological-fluids. *Clin. Chem.*, 29 (6), 1157-1157 (1983).

75. Lebel, M., Ericson, J.F., Pitkin, D.H. Improved high-performance liquid-chromatographic (HPLC) assay-method for ceftizoxime. *J. Liq. Chromatogr.*, 7 (5), 961-968 (1984).
76. Mcateer, J.A., Hiltke, M.F., Silber, B.M., Faulkner, R.D. Liquid-chromatographic determination of 5 orally active cephalosporins - cefixime, cefaclor, cefadroxil, cephalixin, and cephadrine - in human-serum. *Clin. Chem.*, 33 (10), 1788-1790 (1987).
77. Lafollette, G., Jayewardene, A.L., Seneviratne, A.K., Lin, E.T., Gambertoglio, J.G. Determination of ticarcillin in human plasma and in urine by reversed-phase LC. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 13 (2), 159-164 (1995).
78. Elkhaili, H., Linger, L., Monteil, H., Jehl, F. High-performance liquid chromatographic assay for cefepime in serum. *J. Chromatogr. B.*, 690 (1-2), 181-188 (1997).
79. Jungbluth, G.L., Jusko, W.J. Ion-paired reversed-phase high-performance liquid-chromatography assay for determination of ceftriaxone in human-plasma and urine. *J. Pharm. Sci.*, 78 (11), 968-970 (1989).
80. Moore, C.M., Sato, K., Hattori, H., Katsumata, Y. Improved Hplc Method for the Determination of Cephalosporins in Human Plasma and a New Solid-Phase Extraction Procedure for Cefazolin and Ceftizoxime. *Clin. Chim. Acta*, 190 (1-2), 121-123 (1990).
81. Augey, V., Grosse, P.Y., Albert, G., Audran, M., Bressolle, F. High-performance liquid chromatographic determination of tazobactam and piperacillin in human plasma and urine. *J. Chromatogr. B.*, 682 (1), 125-136 (1996).
82. Joshi, S. HPLC separation of antibiotics present in formulated and unformulated samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 28 (5), 795-809 (2002).