

## **Analitičke metode određivanja cefalosporina u cerebrospinalnoj tečnosti**

**Miloš Ilić, Jasmina Atanacković\*, Vera Kapetanović,  
Mara M. Aleksić,**

Institut za analitičku hemiju i Institut za fizičku hemiju,  
Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Vojvode Stepe 450,  
11000 Beograd, Srbija

---

### **Kratak sadržaj**

Većina objavljenih radova bavi se određivanjem cefalosporina u biološkom materijalu, poput plazme, urina i seruma, ali je istovremeno malo radova u kojima je opisano njihovo određivanje u cerebrospinalnoj tečnosti, verovatno zbog male koncentracije cefalosporina u ovom fluidu i njegovog težeg uzorkovanja. Ovaj rad predstavlja pregled rezultata određivanja cefalosporina u cerebrospinalnoj tečnosti objavljenih u poslednjih desetak godina i istovremeno vrši uporednu analizu analitičkih metoda koje se koriste za ova merenja. Metode koje se koriste za analitičko određivanje ovih antibiotika u cerebrospinalnoj tečnosti su tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC), kapilarna elektroforeza (kapilarna zonska elektroforeza (CZE), micelarna elektrokinetička kapilarna hromatografija (MEKC)), kao i adsorptivna „stripping“ voltometrija (AdSV). Cefalosporini koji su ispitani i određeni korišćenjem navedenih metoda su cefepim (HPLC, MEKC, AdSV), ceftriakson i cefotaksim (CZE, HPLC), cefiksim (HPLC), cefuroksim i ceftazidim (CZE). Najniže vrednosti granice detekcije (LOD) i granice određivanja (LOQ) cefalosporina u cerebrospinalnoj tečnosti dobijene su za cefepim i to metodom adsorptivne „stripping“ voltometrije i iznose  $2,3 \times 10^{-4}$  µg/mL i  $7,68 \times 10^{-4}$  µg/mL, respektivno. Ostale razmatrane metode pokazale su manju osetljivost, kod HPLC vrednost LOD se kretala od 0,08 µg/mL do 0,2 µg/mL, a kod CZE i MEKC granica detekcije pojedinih cefalosporina iznosila je preko 0,3 µg/mL.

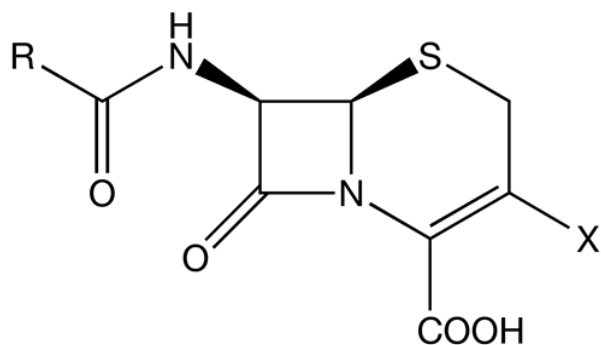
**Ključne reči:** cefalosporini, određivanje, cerebrospinalna tečnost, HPLC, CZE, MEKC, AdSV

---

\* adresa za korespodenciju: [jasmina.atanackovic@gmail.com](mailto:jasmina.atanackovic@gmail.com)

## Uvod

Cefalosporini [1] su sintetski antibiotici slični penicilinima po hemijskoj strukturi, mehanizmu dejstva i farmakokinetičkim karakteristikama, a od penicilina se razlikuju po širem antibakterijskom spektru i po otpornosti na penicilinazu, tj.  $\beta$  – laktamazu. Deluju na veliki broj G(-) bakterija (*E.coli*, *Proteus*, *Pseudomonas*), kao i na G(+) bakterije (*Staph. aureus*). Mehanizam dejstva cefalosporina sastoji se u inhibiranju sinteze ćelijskog zida bakterije (baktericidno dejstvo), za šta je odgovorna sama struktura cefalosporina, tj. 7 – amino – cefalosporanska kiselina, koja sadrži  $\beta$  – laktamski prsten, kao deo neophodan za antibakterijsku aktivnost (sl. 1).



Slika 1. Struktura derivata 7 – aminocefalosporanske kiseline  
Figure 1 Structure of the 7 – aminocephalosporanic acid derivatives

## Analitičke metode

U poslednjoj dekadi objavljen je veliki broj radova u kojima dominira HPLC kao metoda izbora za određivanje cefalosporina u humanom serumu, plazmi i urinu [2-9]. Spektrofotometrija [10], adsorptivna „stripping“ voltometrija [11-15] i kapilarna elektroforeza [16] su metode koje su takođe korišćene za određivanje cefalosporinskih antibiotika u urinu i serumu.

Manji je broj publikovanih članaka, koji se bave određivanjem cefalosporina u cerebrospinalnoj tečnosti (CSF) i to uglavnom korišćenjem HPLC metoda [17-23], elektroforetskih metoda [24-27] i AdS voltetrije [28].

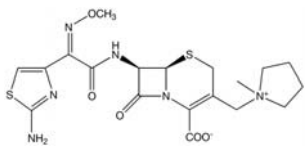
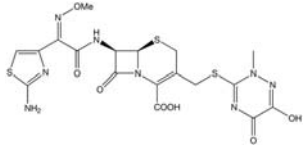
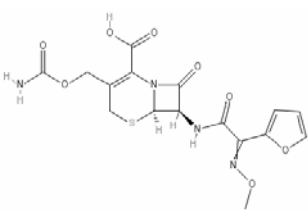
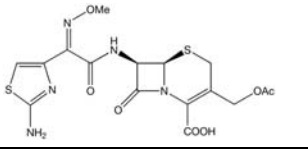
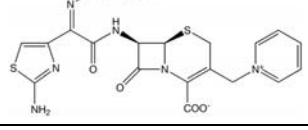
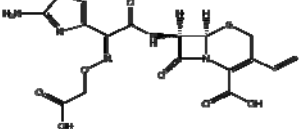
Dve HPLC metode se koriste za određivanje cefepima i ceftriaxona, dva polusintetska antibiotika širokog spektra dejstva kako na G(+) tako i na G(-)

bakterije. Ceftriakson pripada III, a cefepim IV generaciji cefalosporina. Zajednička osobina im je da dobro difunduju u ekstra celularni prostor, uključujući i cerebrospinalnu tečnost, što ih čini pogodnim u tretmanu infekcija centralnog nervnog sistema. Osim toga *sin* – konfiguracija metoksiimino grupe povećava stabilnost na  $\beta$  – laktamaze. Ono što razlikuje cefepim od ceftriaksona je prisustvo kvaternog azota na položaju C-3 dihidrotiazinskog prstena, dajući mu „zwitter“ jonski karakter. Ova „zwitter“ jonska struktura omogućava cefepimu lako prolaženje kroz lipidne membrane i odličnu penetraciju u CST. Od izuzetnog značaja je postizanje odgovarajuće, merljive, koncentracije ovoga leka u CST u terapiji bakterijskog meningitisa. Preporučena doza cefepima u ovom slučaju je veoma visoka, 2 g intravenozno svakih 8 – 12 h kod odraslih. Iz ovih razloga ovaj cefalosporin je veoma interesantan za određivanje različitim analitičkim metodama.

Cilj prve HPLC metode koju su predložili Palacios i saradnici [17] bio je validacija i određivanje cefepima u cerebrospinalnoj tečnosti u farmakokinetičkim i farmakodinamičkim studijama. Drugom HPLC metodom [18] Glaria i saradnici ispitivali su stabilnost ceftriaksona u cerebrospinalnoj tečnosti i vodi u prisustvu ili odsustvu  $0,05 \text{ mol/dm}^3$  fosfatnog pufera (pH 6,0), na četiri različite temperature (sobna temperatura,  $+8^\circ\text{C}$ ,  $-20^\circ\text{C}$ , i  $-40^\circ\text{C}$ ) u različitim vremenskim intervalima. U oba slučaja korišćena je RP C18 kolona. Pri određivanju cefepima kao mobilna faza korišćena je smeša fosfatnog pufera (pH 7) i  $10 \text{ mmol/dm}^3$  metanola (75:25), s protokom od  $0,5 \text{ mL/min}$  i talasnom dužinom detekcije koja iznosi  $256 \text{ nm}$  uz prethodnu neophodnu pripremu uzorka mikrofiltracijom ( $0,45 \mu\text{m}$  injekcijski filtri). Kod određivanja ceftriaksona mobilna faza predstavlja smešu acetoneitrila (300 mL),  $0,1 \text{ mol/dm}^3$  fosfatnog pufera (pH 7,4; 50 mL) i tetrabutil – amonijumbromida (3,2 g), koja je dopunjena vodom do 1 L. Protok mobilne faze bio je  $1 \text{ mL/min}$  i talasna dužina detekcije na  $270 \text{ nm}$  (Tabela I). Kao interni standard korišćen je cefradin ( $15 \mu\text{g/mL}$ ). Priprema uzorka sastojala se iz mešanja  $200 \mu\text{L}$  CST i  $30 \mu\text{L}$  cefradina u trajanju od 15 s na magnetnoj mešalici, a zatim je dobijena smeša centrifugirana 3 minuta.

**Tabela I** Metode i uslovi za određivanje cefalosporina u cerebrospinalnoj tečnosti

**Table I** Methods and conditions for cephalosporine determination in cerebrospinal fluid

Cefalosporin	Struktura	Metoda	Uslovi određivanja			Referenca
			T(°C)	pH	,nm/E	
Cefepim		HPLC	25	7	256	17
		MEKC	25	7	254,214	25, 27
		AdSV	25	5,8	-1,2V	28
Ceftriakson		HPLC	-40,-20 20,25	6 7,4	270	18
		CZE	20,25	9,2	270	24
Cefuroksim		CZE	25	9,2	270	24
Cefotaksim		HPLC	25	5,2	262	22
		CZE	25	9,2	270	24
Ceftazidim		CZE	25	9,2	270	24
		MEKS	25	7	254,214	26
Cefiksiksim		HPLC	25	7	280	23

Nakon proverene stabilnosti rastvora za analizu, urađen je „system suitability“ test sa namerom da se dokaže da su rezolucija i ponovljivost prihvatljivi za analizu. Faktor kapaciteta ( $k$ ), iznosio je 1,70 za vrednost brzine protoka od 0,5 mL/min. Faktor kapaciteta predstavlja meru zadržavanja komponente u koloni i mora imati vrednost  $1 < k < 10$ . Faktor rezolucije,  $R_s$  iznosio je 2,052. Vrednost  $R_s \geq 1,5 - 2,0$  je uobičajeno prihvatljiva kao dobra rezolucija između posmatranog pika i najbližeg potencijalno interferirajućeg pika. Preciznost je potvrđena veličinom relativne standardne devijacije  $RSD < 1\%$ .

**Proces validacije.** Linearnost je potvrđena odličnim koeficijentom korelacije  $r = 0,9998$ . Tačnost je merena na uzorcima tri različite koncentracije (1, 50, i 150  $\mu\text{g/mL}$ ) i srednja vrednost ponovljivosti bila je  $100 \pm 2\%$  za svaku koncentraciju, što je u saglasnosti sa FDA [29] i ICH [30] smernicama. Preciznost merenja koja su vršena istog dana („intra – day precision“) je potvrđena vrednošću  $RSD$  od 0,9 %, kao i srednja preciznost („inter – day precision“) sa  $RSD$  od 1,1 %. Granica detekcije (LOD) je računata korišćenjem obrasca:

$LOD = 3 \times S_a/a$ , gde  $S_a$  predstavlja standardnu devijaciju odgovora detektora, dok  $a$  predstavlja nagib kalibracione krive, pri čemu je dobijena vrednost 0,08  $\mu\text{g/mL}$ . Granica određivanja (LOQ) je računata iz izraza  $LOQ = 10 \times S_a/a$  i dobijena je vrednost 0,24  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela II). Specifičnost metode je ispitivana na još 42 leka od kojih samo ceftriakson pokazuje potencijalnu interferenciju. Promena eksperimentalnih parametara unutar koje data metoda daje zadovoljavajući odgovor, kao što je pH mobilne faze, promena koncentracije pufera i odnosa zapremina mobilne faze, je pokazala da nijedan od ovih parametara nije uticao na razvijanje hromatograma. Jedini kritičan parametar bio je protok.

**Tabela II** Statistički parametri određivanja cefalosporina u cerebrospinalnoj tečnosti

**Table II** Statistic parameters for cephalosporine determination in cerebrospinal fluid

Cefalosporin	Metoda	Parametri određivanja				Referenca
		r	Ponovljivost	LOD	LOQ	
Cefepim	HPLC	0,9998	100 2 %	0,08 g/mL	0,24 g/mL	17
	MEKC	>0,999	90 %	0,3 g/mL	1 g/mL	25,27
	AdSV	0,9991	93%	$2,3 \times 10^{-4}$ µg/mL	$7,68 \times 10^{-4}$ µg/mL	28
Ceftriakson	HPLC	0,9988	100 2,4 %	0,02 g/mL	0,07 g/mL	18
	IP HPLC	>0,999	96%	0,019 g/mL	0,065 g/mL	19,20
	CZE	>0,999	/	0,23 g/mL	0,77 g/mL	24
Cefuroksim	CZE	>0,999	/	0,36 g/mL	1,2 g/mL	24
Cefotaksim	CZE	>0,999	/	0,21 g/mL	0,7 g/mL	24
	HPLC	0,9973	88%	0,24 g/mL	0,8 g/mL	22
Cefiksim	HPLC	>0,999	97%	0,05 g/mL	0,17 g/mL	23
Ceftazidim	CZE	>0,999	/	0,48 g/ml	1,6 g/ml	24
	MEKS	>0,999	90 %	2 g/mL	6,8 g/mL	26

U farmakokinetičkoj studiji za određivanje količine cefepima u cerebrospinalnoj tečnosti kod pet bolesnika korišćena je HPLC metoda [17]. Studija je bila odobrena od strane bolničke etičke komisije. Dobijene koncentracije su poređene sa rezultatima druge dve HPLC metode, korišćenjem Student-ovog t – testa i F – testa. Dobijeni su odlični rezultati.

Prednost ove metode je u korišćenju metanola kao rastvarača koji je mnogo jeftiniji od acetonitrila, koji se uglavnom koristi, kao i protok od 0,5 mL/min što pruža mogućnost detekcije veoma niskih koncentracija cefepima.

HPLC metoda određivanja stabilnosti ceftriaksona [18], dala je isto tako dobru linearnost sa koeficijentom korelacije  $r = 0,9988$  (Tabela II). U okviru validacije ispitana je ponovljivost, srednja preciznost i reproduktivnost i dobijene su RSD vrednosti 2,1%, 2,1%, 4,6% za koncentraciju 5 µg/mL i 1,3%, 3,3%, 0,6% za koncentraciju 20 µg/mL. Tačnost je određena pomoću uzoraka dve različite koncentracije (5 i 20 µg/mL) i srednja vrednost ponovljivosti bila

je  $100 \pm 2,4\%$ . LOD je bio  $0,02 \mu\text{g/mL}$  i LOQ je bio  $0,07 \mu\text{g/mL}$ , a dobijeni su izračunavanjem odnosa signal/šum 3:1, odnosno 10:1.

Ova metoda ispitivanja stabilnosti ceftriaksona u vodi i CST pokazala je da se njegova degradacija odvija po kinetici prvog reda i da je veća pri višim temperaturama i u odsustvu fosfatnog pufera. Konstanta degradacije predstavlja vreme za koje koncentracija supstance opadne na 90% njene početne koncentracije. Iz ovog razloga, predlagani uslovi ( $0,05 \text{ mol/dm}^3$  fosfatni pufer (pH 6,0) i temperatura  $-40^\circ\text{C}$ ) su preporučeni za čuvanje uzoraka pre analize.

Određivanje koncentracije i stabilnosti ceftriaksona u cerebrospinalnoj tečnosti vršeno je i «ion - pair» tečnom hromatografijom [19, 20]. Ova metoda je pokazala znatne prednosti za određivanje relativno polarnih supstanci kakav je ceftriakson u odnosu na standardne reverzno fazne C18 kolone. Mobilna faza sastojala se od smeše acetonitrila i fosfatnog pufera (pH 7,4), uz dodatak tetrabutilamonijum bromida kao «ion-pair» agensa. Postignuta je preciznost sa koeficijentom varijacije manjim od 4,61%. Ostali analitički parametri sumirani su u Tabelama I i II.

Cefotaksim u CST određivan je sam [21], ali i simultano sa svojim aktivnim metabolitom dezacetilcefotaksimom [22] korišćenjem HPLC metode (Tabele I i II). Postupak je podrazumevao taloženje proteina, a zatim razdvajanje na RF koloni sa UV detekcijom na 262 nm. Retencionna vremena za cefotaksim i dezacetilcefotaksim iznosila su 6,2 i 2,2 min što ukazuje na dobro razdvajanje koje je postignuto korišćenjem mobilne faze  $\text{H}_3\text{PO}_4$  – acetonitril (85:15).

Cefiksim, oralni antibiotik koji se primenjuje u pedijatriji ispitan je korišćenjem HPLC metode sa C8 kolonama [23] uz UV detekciju na 280 nm.

**Kapilarna elektroforeza (CE)** se takođe pokazala kao moćna tehnika za analizu cefalosporina u cerebrospinalnoj tečnosti. U poslednjih nekoliko godina objavljeni su radovi o određivanju cefalosporina kapilarnom zonskom elektroforezom (CZE) [24] i micelarnom elektrokinetičkom hromatografijom (MEKC) [25-27] u CST. CE je tehnika koja obećava veliku primenu s obzirom na odličnu moć razdvajanja i mogućnost direktnog injektiranja uzoraka u kapilare bez prethodne pripreme, što omogućuje uštedu u vremenu i ceni. Direktno injektiranje uzoraka kod CZE moguće je samo u slučaju da uzorak ne sadrži veliku količinu proteina (cerebrospinalna tečnost, urin – razblaženi). U suprotnom, npr. kod plazme ili seruma, MEKC je metoda izbora, kod koje se natrijum lauril sulfat (NaLS) koristi kao surfaktant koji reagujući sa proteinima stvara negativno naelektrisane micle koje se vezuju za kapilaru i na taj način omogućujući prvo eluciju analita.

U članku autora Gaspar A. i saradnika [24], istraživana je mogućnost direktnog određivanja četiri cefalosporina (ceftazidim, cefotaksim, cefuroksim, ceftriakson) u biološkom materijalu (CST, serumu, urinu) primenom kapilarne elektroforeze. Kao i kod ceftriaksona *sin* – konfiguracija metoksiimino grupe povećava stabilnost cefotaksima i cefuroksima na  $\beta$  – laktamaze, a *sin* – konfiguracija karboksipropanoksiimino grupe daje izuzetnu stabilnost ceftazidimu prema  $\beta$  – laktamazama koje stvaraju G(-) bakterije. Pritom, piridinska grupa povećava njegovu rastvorljivost u vodi.

Kod ovih ispitivanja, uglavnom je korišćena CZE, osim kod određivanja iz seruma, kada je zbog visokog sadržaja proteina primenjena MEKC. Tehnika CZE je izvedena u kapilarama punjenim silicijumom, spolja prekrivenim polimidom koje su pre i između analiza bile kondicionirane. Primenjeni napon je bio +25 kV, temperatura kapilare 25°C, sa detekcijom na 270 nm. Urin i serum su pre analize bili pet puta razblaženi destilovanom vodom. Svi uzorci su pre analize filtrirani kroz 0,45  $\mu$ m injekcijske filtre. Cefalosporini sadržani u CST mogu biti određivani pomoću CZE bez prethodnog predtretmana – bez razblaživanja uzoraka ili dodavanja različitih reagenasa elektrolitu. Ispitivan je uticaj pH na migraciono vreme cefalosporina i izabran boratni pufer (pH 9,2) kao najoptimalniji elektrolit. Razdvajanje smeše četiri cefalosporina u vodenom rastvoru rezultovalo je granicom detekcije (LOD) u intervalu od 0,206 do 0,478  $\mu$ g/mL i granicom određivanja (LOQ) od 0,686 do 1,593  $\mu$ g/mL. Preciznost je postignuta samo nakon prvog iniciranja RSD < 0,84%. Glavni razlog zbog koga nije kasnije postignuta preciznost bolja od RSD < 2,4% verovatno je bila spora degradacija cefalosporina u vodenom medijumu. Linearnost je postignuta u intervalu koncentracija od 2 – 150  $\mu$ g/mL ( $r = 0,999$ ). Ovom metodom (CZE) smeša četiri cefalosporina je određivana u CST u terapijskom opsegu doza od 1 – 50  $\mu$ g/mL bez ikakve prethodne pripreme uzoraka. Ovo je veoma jednostavna metoda u kojoj je kompletno razdvajanje cefalosporina bilo postignuto za 5 min (Tabele I i II).

Autor Chen S. H. i ostali [25-27] koristili su MEKC metodu za određivanje cefepima [25,27] i ceftazidima [26] u cerebrospinalnoj tečnosti sa UV detekcijom na 254 i 214 nm, bez ikakve prethodne pripreme uzorka. Eksperimentalni uslovi pod kojima su određivani cefepim i ceftazidim su skoro identični, pri čemu je linearnost za ceftazidim postignuta u intervalu od 3 – 90  $\mu$ g/mL sa granicom detekcije od 2  $\mu$ g/mL, a za cefepim u intervalu od 1 – 20  $\mu$ g/mL sa granicom detekcije od 0,3  $\mu$ g/mL. Razdvajanje je vršeno u kolonama punjenim silicijumom na temperaturi od 25°C, uz kondicioniranje. Kao elektrolit [25, 26] upotrebljavana je smeša tris(hidroksi-metil)aminometan (Tris) pufera i Na – lauril sulfata (NaLS). Metoda je modifikovana kako bi se



mogla koristiti za istovremeno određivanje cefepima i vankomicina [27]. Navedenoj smeši dodat je metanol, jer prisustvo samo NaLS i Tris-a nije dovelo do željene rezolucije ova dva leka.

CST je u sva tri slučaja uzeta od pacijenata obolelih od meningitisa. Korišćena su dva načina injektovanja uzorka u kapilaru: hidrodinamički i elektrokinetički. U prvom slučaju, kada je određivan sam cefepim [25] dobijeni su dobri rezultati primenom direktnog, hidrodinamičkog ubrizgavanja uzorka, dok je u drugom slučaju određivanja cefepima u smeši sa vankomicinom [27], elektrokinetički način injektovanja (10 kV, 15 s) dao bolje rezultate. Elektrokinetičko unošenje uzorka obezbeđuje bolje i efikasnije razdvajanje komponenata smeše tako što dodatno ubrzava pozitivno naelektrisane čestice primenom potencijala od 10 kV na anodi u trajanju od 15 s.

Humani proteini u biološkom uzorku reaguju sa hidrofobnim NaLS, što čini proteine veoma rastvornim u micelarnoj fazi i zbog toga slabo pokretnim duž kapilare. Nekoliko parametara kao što su: pH, koncentracija Tris pufera, NaLS kao i koncentracija metanola (5% metanol je izabran kao optimalna koncentracija za određivanja u CST), utiču na određivanje ovim metodama. Dobri korelacioni koeficijenti  $r = 0,999$  ukazuju na linearnost kalibracionog dijagrama. Ponovljivost ("intra – day") dala je RSD < 1,8%, dok je srednja preciznost ("inter – day") dala RSD < 2,4% u prvom slučaju, u drugom 1,7%, odnosno 3,5%. Tačnost metode u prvom slučaju bila je potvrđena sa "recovery" – vrednošću od  $100 \pm 3,1\%$ , dok su u drugom slučaju sve varijacije ponovljivosti u intervalu  $\pm 1\%$ . U slučaju određivanja cefepima iz smeše sa vankomicinom [27], ispitana je i robustnost metode. Menjane su vrednosti koncentracija Tris pufera, NaLS-a, metanola, kao i vrednost pH, napona i talasne dužine detekcije, pri čemu su fluktuacije migracije i osetljivosti ispitivanih supstanci bile manje od 4%. LOD bio je 0,3  $\mu\text{g/mL}$  u oba slučaja, dok je LOQ bio 0,9 odnosno 1  $\mu\text{g/mL}$ , za svaki posebno. Pod datim MEKC uslovima selektivnost metode u sva tri slučaja je potvrđena ispitivanjem velikog broja drugih cefalosporinskih antibiotika.

MEKC metoda sa direktnim injektovanjem uzorka bez njegove prethodne obrade za određivanje cefepima u CST opisana je kao brza, osetljiva i efikasna metoda. Proces prethodne obrade uzorka poput čvrsto – tečne ekstrakcije, tečno – tečne ekstrakcije ili deproteinizacije nekim organskim rastvaračem može biti komplikovan i zahteva veći utrošak vremena. Validacioni parametri su pokazali da metoda ima visoku tačnost. Cefepim u biološkom rastvoru ostaje stabilan 30 dana na temperaturi od  $-40^{\circ}\text{C}$ , pa je stoga ova metoda pogodna za njegovu analizu u CST prikupljenoj za vreme farmakokinetičkih istraživanja.

**Elektroanalitičke metode** su potvrđene kao osjetljive i selektivne metode određivanja cefalosporina. Objavljeni radovi se uglavnom baziraju na redukciji na kapajućoj (KŽE) ili stacionarnoj (SŽE) živinoj elektrodi u biološkom materijalu. U poslednjih nekoliko godina objavljen je samo jedan članak o određivanju koncentracije cefepima primenom adsorptivne „stripping“ voltometrije u cerebrospinalnoj tečnosti [28] i veći broj radova koji se bave određivanju u urinu i serumu [11-15]. „Stripping“ voltometrija je važna tehnika određivanja tragova organskih i neorganskih supstanci, sa detekcijom količina manjih od nanogramskih. To je brza, osjetljiva metoda sa jednostavnim načinom izvođenja.

Cilj ove tehnike [28] bio je da optimizira elektrohemijski postupak određivanja cefepima u CST primenjujući katodnu adsorptivnu „stripping“ linearnu voltometriju (CAAdSLV) na stacionarnoj živinoj elektrodi. Ispitivana je zavisnost intenziteta struje voltometrijskog pika od potencijala i vremena akumulacije, vremena mirovanja rastvora, brzine promene potencijala i pH, korišćenjem  $10^{-2}$   $\mu\text{g/mL}$  rastvora cefepima. Snimljen je veliki broj voltamograma na različitim pH i najbolje izražen voltometrijski pik dobijen je na pH 5,8, pa je ta vrednost uzeta za dalja merenja. Zavisnost visine pika od potencijala akumulacije pokazala je da se cefepim najbolje akumulira na potencijalu -0,3 V, pa je ova vrednost korišćena u daljim merenjima kao potencijal akumulacije. Za vreme akumulacije uzeto je 120 s, a 15 s je uzeto kao vreme potrebno za smirivanje rastvora. Optimalna vrednost brzine promene potencijala iznosila je 0,5 V/s i primenjena je na sva merenja. Primenom svih ovih uslova koji su izabrani za CAAdSLV određivanje cefepima, linearnost struje voltometrijskog pika i koncentracije cefepima je postignuta u opsegu  $10^{-4}$  –  $10^{-2}$   $\mu\text{g/mL}$ , sa vrednošću koeficijenta korelacije od  $r = 0,9991$ , uz dobru tačnost i preciznost (Tabele I i II). Iz kalibracione krive određeni su LOD i LOQ čije su vrednosti  $2,3 \times 10^{-4}$   $\mu\text{g/mL}$  i  $7,68 \times 10^{-4}$   $\mu\text{g/mL}$ . Ispitivanjem preciznosti dobijena je vrednost relativne standardne devijacije RSD = 0,93%.

Cerebrospinalna tečnost kojoj je dodat cefepim u koncentracijama  $2,28 \times 10^{-3}$   $\mu\text{g/mL}$  i  $2,4 \times 10^{-3}$   $\mu\text{g/mL}$  ispitivana je voltametrijom metodom pod već opisanim uslovima. Izvedena su tri određivanja za svaku koncentraciju i dobijene su srednje vrednosti ponovljivosti od 99,1% i 98,9% sa RSD 2,5 % i 2,8%, za svaku koncentraciju posebno. Metoda je veoma osjetljiva i pouzdano meri niske doze leka.

## Zaključak

Ovaj rad pokazuje da su ispitivanja cefalosporina u cerebrospinalnoj tečnosti iako malobrojna (verovatno zbog njihove male koncentracije u ovom

fluidu i njegovog težeg uzorkovanja), dala veoma dobre rezultate i da se u poslednje vreme intenzivno razvijaju i modifikuju tehnike za njihovo određivanje. HPLC metoda je jednostavna, brza i tačna, pa je njome moguće određivanje cefalosporina u ovom biološkom materijalu. Elektroforetske metode pokazuju odličnu moć razdvajanja i mogućnost direktnog injektiranja uzoraka u kapilare bez prethodne pripreme, što omogućuje uštedu u vremenu i ceni. Direktno injektiranje uzoraka kod CZE moguće je samo u slučaju da uzorak ne sadrži veliku količinu proteina. U suprotnom, npr. kod plazme ili seruma, MEKC je metoda izbora, opisana kao brza, osetljiva i efikasna metoda. Adsorptivna voltometrija je takođe opisana kao jednostavna, brza i osetljiva metoda. Ono što je čini izuzetno dobrom je detekcija veoma niskih koncentracija, nanogramskih, koje se recimo metodom HPLC ne mogu detektovati. Najniže vrednosti granice detekcije (LOD) i granice određivanja (LOQ) cefalosporina u cerebrospinalnoj tečnosti dobijene su za cefepim i to metodom adsorptivne „stripping“ voltometrije i iznose  $2,3 \times 10^{-4}$  µg/mL i  $7,68 \times 10^{-4}$  µg/mL respektivno. Ostale razmatrane metode HPLC, CZE i MEKC pokazale su nešto manju osetljivost.

## Zahvalnica

Ovaj rad je finansiran od strane Ministarstva nauke i životne sredine Republike Srbije, projekat broj. 142071.

## Literatura

1. Wilson CO and Gisvold O in: Delago JN, Remers WA (Eds), Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry, Lippincott, Philadelphia New York London Hagerstown, 1991.
2. Samanidou VF, Hapeshi EA, Papadoyannis IN. Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic determination of four cephalosporin antibiotics in pharmaceuticals and body fluids. *J. Chromatogr. B* 2003; 788: 147-158.
3. Johnson VM, Allanson JP, Causon RC. Determination of the cephalosporin antibiotic cephadrine in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B* 2000; 740: 71-80.

4. Fujitomo H, Nagaoka T, Nishino I, Umeda T. Determination of a new oral cephalosporin, S-1090, in human plasma and urine by direct injection high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection and column switching. *J Chromatogr. B* 1999; 728: 125-131.
5. Guitton J, Laffont A, Bruzeau J, Rochet-Mingret L, Bonnefoy M and 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* 1998; 719: 151-157.
6. Nishino I, Fujitomo H, Umeda T. Determination of a new oral cephalosporin, cefmatilen hydrochloride hydrate, and its seven metabolites in human and animal plasma and urine by coupled systems of ion-exchange and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 2000; 749: 101-110.
7. Bompadre S, Ferrante L, Leone L. On-line solid-phase extraction of cephalosporins. *J Chromatogr. A* 1998; 812: 191-196.
8. Kovar A, Dalla Costa T, Derendorf H. Comparison of plasma and free tissue levels of ceftriaxone in rats by microdialysis. *J. Pharm. Sci.* 1997; 86: 52-56.
9. Can NÖ, Altiocka G, Aboul-Enein HY. Determination of cefuroxim axetil in tablets and biological fluids using liquid chromatography and flow injection analysis. *Anal Chim Acta* 2006; 576: 246-252.
10. Ródenas V, García MS, Sánchez-Pedreño C, Albero MI. Spectrophotometric methods for the determination of cephadrine or ceftazidime in human urine using batch and flow-injection procedures. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1997; 15: 1687-1693.
11. Ogorevc B, Krašna A, Hudnik V, Gomišček S. Adsorptive stripping voltammetry of selected cephalosporin antibiotics and their direct determination in urine. *Microchimica Acta* 1991; 103: 131-144.
12. Ahmad H, Al-ghamdi, Mohammed A, Al-shadokhy, Al-warthan AA. Electrochemical determination of Cephalotin antibiotic by adsorptive stripping voltammetric technique. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004; 35: 1001-1009.
13. Aleksić MM, Ilić M, and Kapetanović V. Adsorptive properties of cefpodoxime proxetil as a tool for a new method of its determination in urine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004; 36: 899-903.
14. Aleksic M, Milovanovic Lj, Kapetanovic V. Adsorptive properties of cefpodoxime proxetil as a tool for a new method of its determination in urine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003; 32: 957-966.
15. Aleksić MM, Kapetanović V. Voltammetric behavior and square-wave voltammetric determination of cefotaxime in urine. *J. Electroanal. Chem.* 2006; 593: 258-266.
16. Mrestani Y, Reinhard H, Neubert H, Härtl A, Wohlrab J. Determination of cephalosporins in urine and bile by capillary zone electrophoresis. *Anal Chim Acta* 1997; 349: 207-213.

17. Palacios FJJ, Mochón MC, Sánchez JCJ, Bello López MA, Pérez AG. Validation of an HPLC Method for Determination of Cefepime (a Fourth-Generation Cephalosporin). Determination in Human Serum, Cerebrospinal Fluid, and Urin. Pharmacokinetic Profiles. *Chromatographia* 2005; 62: 355-361.
18. Glaria MD, Mosciati GG, Ramos RG, Riqueme MM. Stability of ceftriaxone in water and cerebrospinal fluid determined by high-performance liquid chromatography. *J. Sep. Sci.* 2003; 26: 939-942.
19. Glaria MD, Mosciati GG, Ramos RG. Determination of Ceftriaxone in Cerebrospinal Fluid by Ion-Pair Liquid Chromatography. *J AOAC Int.* 2005; 88: 436-439.
20. Granich GG, Krogstad DJ. Ion pair high-performance liquid chromatographic assay for ceftriaxone. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 385-388.
21. Nau R, Prange HW, Muth P, Mahr G, Menck S, Kolenda H et al. Passage of cefotaxime and ceftriaxone into cerebrospinal fluid of patients with uninflamed meninges. *Antimicrob Agens Chemother* 1993; 37: 1518-1524.
22. Scanes T, Hundt AF, Swart KJ, Hundt HK. Simultaneous determination of cefotaxime and desacetylcefotaxime in human plasma and cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001; 750: 171-6.
23. Nahata MC. Measurement of Cefixime in Serum and Cerebrospinal Fluid by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Techn.* 1991; 14: 3755-3759.
24. Gáspár A, Kardos Sz, András M, Klekner A. Capillary Electrophoresis for the Direct Determination of Cephalosporins in Clinical Sample. *Chromatographia* 2002; 56: 109-114.
25. Tseng SH, Yang YH, Chen YR, Chen SH. Determination of cefepime in plasma and cerebrospinal fluid by micellar electrokinetic chromatography with direct sample injection. *Electrophoresis*, 2004; 25: 1641-1647.
26. Yeh HH, Yang YH, Chou YW, Ko JY, Chou CA, Chen SH. Determination of ceftazidime in plasma and cerebrospinal fluid by micellar electrokinetic chromatography with direct sample injection. *Electrophoresis*, 2005; 26: 927-934.
27. Yang YH, Wu WY, Yeh HH, Chen SH. Simultaneous determination of cefepime and vancomycin in plasma and cerebrospinal fluid by micellar electrokinetic chromatography with direct sample injection and application for bacterial meningitis. *Electrophoresis* 2007; 28: 1788-1797.
28. Palacios FJJ, Mochón MC, Sánchez JCJ, Carranza JH. Adsorptive Stripping Voltammetric Determination of Cefepime at the Mercury Electrode in Human Urine and Cerebrospinal Fluid, and Differential Pulse Polarographic Determination in Serum. *J. Pharm. Sci.* 2003; 92: 1854-1859.
29. [www.fda.gov/CDER/GUIDANCE/pv.htm](http://www.fda.gov/CDER/GUIDANCE/pv.htm)
30. [www.fda.gov/cder/Guidance/1320fnl.pdf](http://www.fda.gov/cder/Guidance/1320fnl.pdf)

# **Analytical methods for determination of cephalosporins in cerebrospinal fluid**

**Miloš Ilić, Jasmina Atanacković,  
Vera Kapetanović, Mara M. Aleksić**

Institute for Physical Chemistry and Institute for Analytical Chemistry,  
Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Vojvode Stepe 450,  
11000 Belgrade, Serbia

---

## **Summary**

There are a lot of papers describing cephalosporin determination in biological samples, like plasma, urine and serum, but very few of them dealing with their determination in cerebrospinal fluids (CSF). The reason for this is probably the low cephalosporin concentration in CSF and difficulties with sample collection. This paper presents review of the articles dealing with determination of cephalosporins in the cerebrospinal fluid, published in last ten years. The aim of this article is to compare available analytical methods used for these determinations. There are several analytical methods that are used for cephalosporin determination in CSF, such as high-performance liquid chromatography (HPLC), capillary electrophoresis (capillary zone electrophoresis (CZE), micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC)) and adsorptive stripping voltammetry (AdSV). Cefepime, ceftriaxone, cefuroxime, cefotaxime, cefixime and ceftazidime are cephalosporins already investigated and determined in CSF using above mentioned techniques. The lowest limit of detection ( $2,3 \times 10^{-4}$   $\mu\text{g/mL}$ ) and limit of quantification ( $7,68 \times 10^{-4}$   $\mu\text{g/mL}$ ) for cephalosporins in cerebrospinal fluid were determined for cefepime using Adsorptive "Stripping" Voltammetry. Other techniques showed lower sensitivity, with LOD values in the range from 0.08  $\mu\text{g/mL}$  to 0.2  $\mu\text{g/mL}$  for HPLC, and above 0.3  $\mu\text{g/mL}$  in the case of CZE and MEKC.

**Key words:** cephalosporine, determination, cerebrospinal fluid, HPLC, CZE, MEKC, AdSV

---