

DETERMINATION OF CEPHALOSPORIN ANTIBIOTICS IN POST-MORTEM MATERIAL

Ewa PUFAL, Marzena SYKUTERA, Karol ŚLIWKA

*Department of Forensic Medicine, L. Rydygier Academy of Medicine,
Bydgoszcz*

ABSTRACT: The aim of the present study was to work out a method of isolation and identification of cephalosporin antibiotics in biological material and then to find out if the method can be used for autopsy material – especially in the case of children's deaths in which only small amounts of material are available, and medicine concentration in the tested sample is very low. Isolation of cephalosporin antibiotics from post-mortem material was conducted by the liquid-liquid extraction method. The identification of cephalosporin antibiotics separated from the biological material was carried out by the use of thin-layer chromatography, applying various developing and location systems. Cephalosporin was determined by the HPLC method.

KEY WORDS: Cephalosporin antibiotics; Determination; Post-mortem material; TLC; HPLC.

*Z Zagadnień Nauk Sądowych, z. XLI, 2000, 37–51
Received 14 January 2000, accepted 28 March 2000*

INTRODUCTION

In spite of the significant progress in chemotherapy of bacterial infections, deaths of infants and children with known bacterial infections are still noted. Recently, several cases were directed to the Department of Forensic Medicine, L. Rydygier Academy of Medicine in Bydgoszcz, in order to establish or confirm the cause of death of children in whom bacterial infections had been diagnosed, but therapy carried out had been ineffective. In such cases it is very often questioned whether the therapy applied or medicine prescribed were correct and, indeed whether the prescribed medicine was administered at all.

Nowadays, β -lactam cephalosporin antibiotics are most frequently applied in heavy, relapsing cases of bacterial infections of children [1, 2, 3, 11]; so the problem of establishing their presence in post-mortem material can come up in the course of forensic medical work.

Cephalosporins – semisynthetic derivatives of 7-aminocephalosporate acid (7-ACA) originate from cephalosporin C discovered in the nineteen fifties. Through modifications of the particle of 7-aminocephalosporate acid in

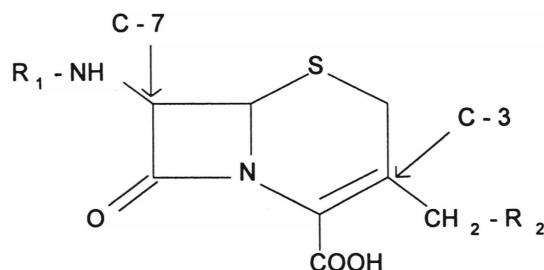


Fig. 1. The general structure of cephalosporin.

positions C-3 and C-7 (Figure 1), a great number of antibiotics of various properties and different spectra of action (generation I, II and III cephalosporin) have been obtained.

Cephalosporin antibiotics are medicines that are considered as safe and not exhibiting toxicity related to dose. They are excreted unchanged, for the most part with urine. Pharmacokinetic data of the cephalosporins studied in the current paper are presented in Table I.

One can find in the literature that the following analytical methods have been used for determination of cephalosporin antibiotics: spectrophotometry, electrochemistry and chromatography [4, 5, 6, 7, 8, 9]. In clinical toxicology and therapy, when the level of the medicine in serum is being monitored, the most frequently used analytical method is high performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection [4, 5, 6, 7]. Application of this method to the determination of cephalosporin antibiotics in biological material other than serum and urine is rather limited due to the need to carry out the inconvenient process of isolation of the medicine from biological material.

As cases where cephalosporin antibiotics have to be determined in post-mortem material have begun to occur more frequently, we have attempted to present the analytical techniques routinely used for identification of these medicines in the Department of Forensic Medicine, L. Rydygier Academy of Medicine, Bydgoszcz. In chemical and toxicological analysis for forensic purposes one of the most widely used methods of screening is thin layer chromatography (TLC). Application of this method to the determination of cephalosporins in biological material has not been mentioned in the literature so far, thus it would be worthwhile performing an evaluation of the usefulness of the TLC method for identification of cephalosporin antibiotics in post-mortem material, especially when only a small amount of the material is accessible or when the concentration of medicine is very low in the sample. The study was two fold:

1. establishing of the conditions for isolation of the studied medicines from biological material;
2. establishing of the conditions for identification of medicines chosen from the group of cephalosporins with the use of the TLC method (selection of proceeding system and the developing chemical reagent).

Quantitative analysis of the antibiotics isolated from biological material was carried out using the HPLC method.

The method of analysis worked out in this publication was checked in practice by determination of the level of Cefuroxime (Zinacef) in post-mortem material collected in the case of the death of a nine-month-old infant that had suffered from bronchitis, was treated with this medicine, and was suspected of having received an overdose (of the medicine).

MATERIALS AND METHODS

Isolation and identification of selected cephalosporin antibiotics: Cefazolin (Kefzol) – generation I cephalosporin; Cefamandole (Mandol) and Cefuroxime (Zinacef) – generation II cephalosporin; Ceftazidim (Fortum) – generation III cephalosporin, were carried out for standard aqueous solutions as well as for samples of urine and fragments of internal organs (liver), to which the appropriate cephalosporins were added at concentration of 40 µg/ml. Cefaclor at concentration 60 µg/ml was also added as an internal standard to each sample. Samples prepared in such a manner in quantities of 4 ml (4 g of homogenate) were subjected to extraction at pH = 7.4 with the use of solvents that are most frequently applied in the isolation of xenobiotics from biological material (ether, chloroform, acetonitrile, mixture of dichloromethane and isopropanol 15:85). Condensed extracts were analysed with thin layer chromatography on silicon gel GF₂₅₄. As the moving phases, two proceeding systems were applied: methanol and ammonium 100:1.5, i.e. the most frequently used proceeding system for screening purposes, and also the system ethanol: water 7:3, that is one of various systems used in antibiotics identifications.

In order to reveal the zones of the studied medicines plates were observed in UV light. The following chemicals were used to develop the obtained chromatograms: potassium permanganate, diphenylcarbazone with mercury chloride and ninhydrine. Identification of the studied compounds was based on comparison of the values of R_f coefficients with R_f coefficients of standard medicines chromatographed simultaneously.

Determination of the concentrations of the medicines (in aqueous standard solutions, urine samples and fragments of liver) extracted as described above was performed using the HPLC method. The analysis was carried out

TABLE I. PHARMACOKINETIC DATA OF THE CEPHALOSPORINS STUDIED

Drug	Therapeutic concentration in plasma	Half-life	Urinary excretion	Protein binding
Cefazolin (Kefzol)	>150 µg/ml	2 h	80%	75–80%
Cefamandole (Mandol)	10–40 µg/ml	45–60 min	100%	70–80%
Cefuroxime (Zinacef)	10–60 µg/ml	1.5 h	100%	30–35%
Ceftazidim (Fortum)	50–200 µg/ml	1.5–1.85 h	100%	10–20%

TABLE II. EFFICIENCY OF ISOLATION OF CEPHALOSPORIN ANTIBIOTICS

Drug	Efficiency of isolation [%]																			
	Ether					Chloroform					Dichloromethan : Isopropyl alcohol (15:85)					Acetonitrile				
	w	b	u	l	l	w	b	u	l	l	w	b	u	l	w	b	u	l		
Cefazolin (Kefzol)	20.2 ± 3.2	11.2 ± 4.3	18.3 ± 3.2	10.1 ± 4.4	32.6 ± 5.2	29.4 ± 5.3	30.9 ± 3.3	26.4 ± 3.3	65.5 ± 7.4	48.8 ± 8.9	60.6 ± 7.1	45.8 ± 8.3	99.1 ± 5.9	94.4 ± 6.5	96.6 ± 6.6	90.4 ± 4.6				
Cefamandole (Mandol)	10.5 ± 4.6	8.5 ± 4.3	9.4 ± 2.6	5.8 ± 2.3	40.8 ± 5.2	36.9 ± 8.6	38.9 ± 5.3	35.7 ± 4.4	98.6 ± 8.1	93.6 ± 5.9	96.8 ± 6.9	88.3 ± 7.8	96.4 ± 6.8	86.7 ± 8.8	88.9 ± 6.7	80.7 ± 4.8				
Cefuroxime (Zinacef)	22.7 ± 4.4	14.5 ± 4.1	17.6 ± 4.3	10.5 ± 3.3	48.7 ± 6.6	33.5 ± 5.5	35.9 ± 5.6	30.5 ± 5.2	46.8 ± 7.6	40.9 ± 9.6	42.8 ± 5.9	38.6 ± 4.4	95.5 ± 5.3	89.9 ± 9.4	90.7 ± 6.7	85.8 ± 4.6				
Ceftazidim (Fortum)	18.5 ± 3.6	12.6 ± 5.6	16.2 ± 3.1	13.8 ± 3.4	49.5 ± 6.5	41.5 ± 8.8	45.8 ± 4.4	40.9 ± 6.2	60.6 ± 6.5	54.2 ± 7.7	58.8 ± 6.2	50.7 ± 5.6	98.6 ± 4.6	90.7 ± 6.1	93.9 ± 6.3	88.9 ± 5.2				

w – water, b – blood, u – urine, l – liver.

with Pharmacia LKB apparatus with a spectrophotometric detector. The conditions of analysis of cephalosporin antibiotics were based on data published in a technical note of Supelco [10]. For the examinations a Supelcosil LC-18 DB column was applied with the use of the following moving phase: 0.5% acetic acid in a solution of acetonitrile and water 15:85, flow of 2 ml/min and UV detection at $\lambda = 254$ nm. The samples were introduced onto the column with a 200 μ l injection loop.

In the case of analysis of biological material collected during autopsy of an infant that was treated with Cefuroxime, acetonitrile was used for extraction. Qualitative analysis of the studied samples was performed with TLC method under the conditions described above. Concentration of each medicine in biological material was determined with the HPLC method (in conditions as described above). The internal standard (Cefaclor) was added to samples before the injection onto the chromatographic column.

RESULTS

The determination of the concentration of cephalosporin medicines extracted from aqueous solutions, blood, urine and fragments of liver was carried out by the HPLC method. An example of a chromatogram obtained from analysis of a blood sample containing a mixture of these medicines is presented in Figure 2.

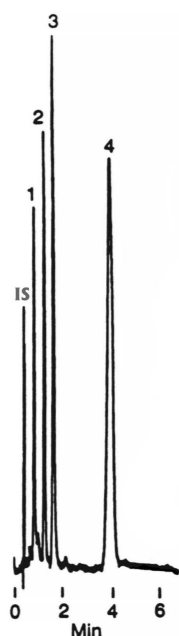


Fig. 2. Chromatogram of HPLC separation of cephalosporin antibiotics (blood).

1. Cefazolin (Kefzol)
2. Cefamandole (Mandol)
3. Cefuroxime (Zinacef)
4. Ceftazidim (Fortum)
- IS – Cefaclor

The obtained results of separation efficiency of analysed antibiotics are presented in Table II. For the purpose of isolation of Cefalomandole from aqueous solutions and biological material, the mixture of dichloromethane and isopropanol (15:85) turned out to be best among the solvents examined. For the other medicines the highest extraction efficiency was achieved using acetonitrile (above 85.8%).

Results of identification of medicines analysed by the TLC method are presented in Table III. The following two developing systems were applied: methanol and ammonium (100:1.5) as well as ethanol and H₂O (70:30). The chromatographic plates were observed under UV light at wavelength $\lambda = 254$ nm for revealing areas of the analysed components and they were developed by three colouring reagents (diphenylcarbazone with mercuric chloride, ninhydrin and potassium permanganate). Detection limits for the analysed cephalosporins in the TLC conditions are presented in Table IV. From

TABLE III. RESULTS OF SCREENING EXAMINATIONS BY THE TLC METHOD

Drug	$R_f \times 100$		Location system			
			Mercuric chloride – diphenylcarbazone	Ninhydrin	KMnO ₄	UV $\lambda = 254$ nm
	Ethanol : water (70:30)	Methanol : ammonia (100:1.5)	Colour			
Cefazolin (Kefzol)	0	85	–	–	Yellow-brown	+
Cefamandole (Mandol)	0	75	–	–	Yellow-brown	+
Cefuroxime (Zinacef)	80	50	–	–	Yellow-brown	+
Ceftazidim (Fortum)	50	30	Yellow-brown	Orange-red	–	+

TABLE IV. LIMIT OF DETECTION OF CEPHALOSPORIN ANTIBIOTICS IN TLC METHOD

Drug	Location reagent – limit of detection			
	Mercuric chloride-diphenylcarbazone	Ninhydrin	KMnO ₄	UV $\lambda = 254$ nm
Cefazolin (Kefzol)	–	–	200 ng	100 ng
Cefamandole (Mandol)	–	–	500 ng	300 ng
Cefuroxime (Zinacef)	–	–	500 ng	300 ng
Ceftazidim (Fortum)	200 ng	200 ng	–	100 ng

the performed study it was found that 100 ng of Cefazolin or Ceftazidim and 300 ng of Cefamandole and Cefuroxime could be detected with TLC and UV detection at wavelength $\lambda = 254$ nm.

Results of the analysis of Cefuroxime in biological material taken from the corpse of a nine-month-old infant who had suffered from bronchitis and was treated with this medicine, are presented in Table V. Quantitative analysis was carried out by the HPLC technique.

TABLE V. CEFUROXIME (ZINACEF) LEVEL IN AUTOPSY MATERIAL

Material	Cefuroxime (Zinacef) level
Blood	11.0 $\mu\text{g/ml}$
Liver	87.2 $\mu\text{g/g}$
Kidney	24.5 $\mu\text{g/g}$
Brain	21.6 $\mu\text{g/g}$

DISCUSSION

As mentioned above, in the presented work the chemical and toxicological analysis carried out was twofold. First, the conditions of extraction of the analysed medicines from biological material were determined and the extraction efficiency of cephalosporins was calculated for solvents that are most often used in toxicological work: ether, chloroform, acetonitrile and a mixture of dichloromethane and isopropanol (15:85). In the case of Cefamandole (Mandel) the best results were obtained during extraction with a mixture of dichloromethane and isopropanol (the extraction efficiency was: 88.3% for fragments of liver, 93.6% for blood, 96.8% for urine and 98.6% for aqueous solution). In the case of the remaining medicines: Ceftazidim (Fortum), Cefuroxime (Zinacef), Cefazolin (Kefzol) the most effective solution for the extraction process was acetonitrile. The extraction efficiency of Ceftazidim medicine using this solvent was: 88.9% for fragments of liver, 90.7% for blood, 93.9% for urine and 98.6% for aqueous solution; the extraction efficiency of Cefazolin medicine: 90.4% for fragments of liver, 94.4% for blood, 96.6% for urine and 99.1% for aqueous solution and the extraction efficiency of Cefuroxime medicine was: 85.8 % for fragments of liver, 89.9% for blood, 90.7% for urine, 95.5% for aqueous solution. The extraction efficiency of the analysed medicines from the biological material, when ether was used, fluctuated within the range 5.8–22.7% and in the case of chloroform 26.4–49.5%.

The other part of the analysis concerned the choice of developing systems and reagents that would enable identification of the considered medicines. One can find from data included in Table III that the developing system that enabled a satisfactory isolation of the studied components was the mixture of methanol and ammonium (100:1.5). The applied developers (diphenylcarbazone with mercuric chloride, ninhydrin and potassium permanganate) reacted with cephalosporins present in the chromatogram at various sensitivity levels. However, distinct colour stains were achieved and after their comparison to those obtained for standards had been performed, it was possible to identify all of the studied compounds. Using diphenylcarbazone with mercuric chloride and ninhydrin, a colour reaction was achieved only for Ceftazidim, whereas Cefazolin, Cefamandole and Cefuroxime only gave a colour reaction with KMnO_4 .

In order to determine the concentration of antibiotics extracted from biological materials the HPLC method with UV detection was applied – the most commonly used analytical method for this group of medicines. One can find in the literature that, for analysis of cephalosporins, chromatographic column Cv-18 [4, 5, 6, 7] has most frequently been used with detection at various wavelengths (265 nm, 254 nm, 235 nm) and using different mobile phases:

- acetonitrile : buffer (15 mM heptasulfonic acid), pH = 3.3 (4.5:95.5);
- 0,3% triethylamine in H_2O , pH = 5.1;
- methanol : 0.01M KH_2PO_4 , pH = 3.3 (20:80);
- acetonitrile : 0.1% tetrabutylamine bromate aqueous solution (45:55).

In the presented study quantitative analysis of antibiotics from the group of cephalosporins was performed by HPLC method and UV detection according to data published by Supelco [10] (a Supelco LC-18 DB column, detection at wavelength $\lambda = 254$ nm, the mobile phase: 0.5% acetic acid in acetonitrile aqueous solution; 15:85). Analysis in these conditions allowed us to obtain a satisfactory separation of mixtures of all the studied medicines. Retention times for the respective medicines were as follows: Cefaclor – 0.36 min, Cefazolin – 0.95 min, Cefamandole – 1.20 min, Cefuroxime – 1.9 min, Ceftazidim – 4.0 min.

As a result of toxicological analysis in blood and in fragments of internal organs taken from the body of an infant, the presence of Cefuroxime was established. The determined concentration of Cefuroxime in blood (Table V) was within the range of therapeutic concentrations.

CONCLUSIONS

1. Ether and chloroform are the solvents most frequently used in toxicological practice for extraction of medicines from blood. It has been proved in this study that the efficiency of extraction of cephalosporin antibiotics with these solvents is very low (under 50%), thus, in the case of analysis of cephalosporins in biological material the application of acetonitrile can be recommended.
2. One can ascertain from the results obtained that the TLC method can be utilised as a simple and inexpensive screening method for identification of cephalosporin antibiotics (Cefazolin, Cefamandole, Cefuroxime and Ceftazidim) in biological material, even at therapeutic levels.
3. The analytical process described in this paper proved to be useful in the determination of Cefuroxime (Zinacef) in post-mortem material from an infant that had been treated with the medicine. The concentration of Cefuroxime obtained was found to be within the range of therapeutic concentrations.

References:

1. Cunha B. A., Third-generation cephalosporins: a review, *Clinical Therapeutics* 1992, vol. 14, pp. 616–652.
2. Hupková M., Blahová J., Babalová M. [et al.], A review of new cephalosporin antibiotics, *Vnitřní Lekarství* 1994, vol. 40, pp. 118–121.
3. Kamińska E., *Antybiotyki w pediatrii*, Wydawnictwa Fundacji PB Büchnera, Warszawa 1995.
4. Kearns G. L., Johnson V. A., Hendry I. R. [et al.], Microanalytical high-performance liquid chromatographic assay for cefpirome human milk and urine, *Journal of Chromatography* 1992, vol. 574, pp. 356–360.
5. Kinowski J. M., Bressole F., Fabre D. [et al.], High-performance liquid chromatographic determination of ceftibuten and its metabolite in biological fluids: applications in pharmacokinetics studies, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1994, vol. 83, pp. 736–741.
6. Kovach P. M., Lantz R. J., Brier G., High-performance liquid chromatographic determination of loracarbef, a potential metabolite, cefaclor and cephalixin in human plasma, serum and urine, *Journal of Chromatography* 1991, vol. 567, pp. 129–139.
7. Matsubayashi K., Yoshioka M., Tachzawa H., Simple method for determination of the cephalosporin DQ-2556 in biological fluids by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography* 1990, vol. 515, pp. 547–554.
8. Moore C. M., Sato K., Katsumata Y., High-performance liquid chromatographic determination of cephalosporin antibiotics using 0.3 mm I.D. columns, *Journal of Chromatography* 1991, vol. 539, pp. 215–220.

9. Ogorevc B., Gomiscek S., Electrochemical analysis of cephalosporin antibiotics, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1991, vol. 9, pp. 225–236.
10. Supelco, Cephalosporin antibiotics, Publikacja techniczna nr 713-0655.
11. Verhaegen J., Verbist L., Oral cephalosporin, *Acta Clinica Belgica* 1992, vol. 47, pp. 377–386.

OZNACZANIE ANTYBIOTYKÓW Z GRUPY CEFALOSPORYN W MATERIALE SEKCYJNYM

Ewa PUFAL, Marzena SYKUTERA, Karol ŚLIWKA

WSTĘP

Mimo istotnego postępu w chemioterapii zakażeń bakteryjnych nadal notowane są zgony niemowląt i dzieci z rozpoznanymi infekcjami bakteryjnymi. W minionym czasie do Zakładu Medycyny Sądowej AM im. L. Rydygiera w Bydgoszczy kilkakrotnie kierowano sprawy dotyczące ustalenia lub potwierdzenia przyczyny śmierci dzieci, u których wcześniej stwierdzono zakażenia bakteryjne, a prowadzone leczenie okazało się nieskuteczne. W takich przypadkach często kwestionowano prawidłowość zastosowanej terapii lub poddawano w wątpliwość, czy zaordynowano odpowiednie leki bądź czy przepisane leki zostały podane.

Obecnie w leczeniu ciężkich, nawrotowych zakażeń bakteryjnych u dzieci stosuje się najczęściej antybiotyki β -laktamowe z grupy cefalosporyn [1, 2, 3, 11], dlatego też w praktyce sądowo-lekarskiej można spotkać się z problemem konieczności stwierdzenia ich obecności w materiale sekcyjnym.

Cefalosporyny – półsyntetyczne pochodne kwasu 7-aminocefalosporanowego (7-ACA) pochodzą od odkrytej w latach pięćdziesiątych dwudziestego stulecia cefalosporyny C. Poprzez modyfikację cząsteczki kwasu 7-aminocefalosporanowego w pozycji C-3 i C-7 (ryc. 1) otrzymano wiele antybiotyków o różnych właściwościach i różnym spektrum działania (cefalosporyny I, II oraz III generacji).

Antybiotyki z grupy cefalosporyn uważa się za leki bezpieczne i zazwyczaj nie wykazujące toksyczności związanej z dawką. Wydalane są z organizmu w postaci niezmienionej w przeważającej części z moczem. Dane farmakokinetyczne analizowanych w niniejszej pracy cefalosporyn przedstawiono w tabeli I.

Piśmiennictwo z zakresu metod oznaczania antybiotyków z grupy cefalosporyn dotyczy metod spektrofotometrycznych, elektrochemicznych oraz chromatograficznych [4, 5, 6, 7, 8, 9]. Z danych literaturowych wynika, że w toksykologii klinicznej oraz w terapii, gdzie monitorowany jest poziom leku w surowicy, najczęściej stosowaną metodą analityczną jest wysokosprawną chromatografią cieczową HPLC z detekcją UV [4, 5, 6, 7]. Zastosowanie chromatografii cieczowej do oznaczania cefalosporyn w materiale biologicznym innym niż surowica lub mocz jest jednak ograniczone ze względu na konieczność przeprowadzenia uciążliwych procesów izolacji leku z materiału biologicznego.

Z uwagi na pojawiające się przypadki, gdy konieczne jest oznaczanie antybiotyków z grupy cefalosporyn w materiale sekcyjnym, podjęto próbę przedstawienia rezultatów identyfikacji tych leków przy zastosowaniu technik analitycznych stosowanych rutynowo w praktyce Zakładu Medycyny Sądowej AM w Bydgoszczy. W analizie chemiczno-toksykologicznej dla potrzeb medyczno-sądowych powszechnie stosowaną metodą badań skryningowych jest chromatografia cienkowsarstwowa. W literaturze nie ma danych na temat oznaczania cefalosporyn w materiale biologicznym metodą TLC, dlatego też stwierdzono, iż celowym byłoby określenie przydatności tej

metody dla identyfikacji antybiotyków z grupy cefalosporyn w materiale sekcyjnym, zwłaszcza gdy dysponuje się małą ilością badanego materiału lub gdy zawartość leku w próbce badanej jest na niskim poziomie. Badania przeprowadzono w dwóch kierunkach:

1. ustalenie warunków izolacji badanych leków z materiału biologicznego;
2. ustalenie warunków identyfikacji metodą chromatografii cienkowarstwowej (dobór układu rozwijającego i odczynnika wywołującego) wybranych leków z grupy cefalosporyn.

Analizę ilościową wyizolowanych z materiału biologicznego antybiotyków przeprowadzono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

Schemat postępowania analitycznego zastosowany w niniejszej pracy sprawdzono praktycznie, oznaczając poziom Cefuroksymu (Zinacef) w materiale biologicznym pobranym ze zwłok dziewięciomiesięcznego dziecka, które chorowało na zapalenie oskrzeli, było leczone tym lekiem, a zachodziło podejrzenie przedawkowania leku.

MATERIAŁY I METODY

Izolację i identyfikację wybranych antybiotyków z grupy cefalosporyn: Cefazolina (Kefzol) – cefalosporyna I generacji; Cefamandol (Mandol) i Cefuroksym (Zinacef) – cefalosporyna II generacji; Ceftazydym (Fortum) – cefalosporyna III generacji przeprowadzono ze wzorcowych roztworów wodnych oraz z próbek moczu i wycinków narządów wewnętrznych (wątroby), do których dodano poszczególne cefalosporyny w stężeniach 40 µg/ml. Do próbek dodawano również standard wewnętrzny – Cefaklor w stężeniu 60 µg/ml. Tak przygotowane próby w ilości 4 ml (4 g homogenatu) poddawano ekstrakcji przy pH = 7,4, stosując rozpuszczalniki najczęściej używane do izolacji ksenobiotyków z materiału biologicznego (eter, chloroform, acetonitryl, mieszanina dichlorometan : izopropanol 15:85). Zagęszczone ekstrakty badano metodą chromatografii cienkowarstwowej na żelu krzemionkowym GF₂₅₄. Jako fazy ruchome stosowano dwa układy rozwijające: metanol : amoniak (100:1,5) – układ rozwijający najczęściej stosowany w badaniach skryningowych – oraz układ etanol : woda (7:3) – jeden z wielu układów stosowanych w celu identyfikacji antybiotyków.

Dla ujawnienia stref poszukiwanych leków płytki obserwowano w świetle ultrafioletowym. Do wywołania chromatogramów zastosowano: nadmanganian potasu, dwufenylokarbazon z chlorkiem rtęci oraz ninhydrynę. Identyfikację badanych związków oparto na porównaniu wartości współczynników R_f ze współczynnikami R_f leków wzorcowych chromatografowanych równolegle.

Oznaczenia stężeń badanych leków (w wodnych roztworach wzorcowych, próbkach moczu i wycinkach wątroby), po ekstrakcji opisanej powyżej, przeprowadzono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Badania wykonano na aparacie firmy Pharmacia LKB z detektorem spektrofotometrycznym. Warunki analizy antybiotyków z grupy cefalosporyn oparto na danych przedstawionych w publikacji technicznej firmy Supelco [10]. Do badań użyto kolumnę Supelcosil LC-18 DB, stosując fazę ruchomą: 0,5% kwas octowy w roztworze acetonitryl : woda (15:85), przepływ 2 ml/min oraz detekcję UV przy $\lambda = 254$ nm. Próby wprowadzano na kolumnę z wykorzystaniem 200 µl pętli nastrzykowej.

W przypadku analizy materiału biologicznego pobranego w czasie sekcji zwłok dziecka, które było leczone lekiem Cefuroksym, do ekstrakcji użyto acetonitrylu. Analizę jakościową analizowanych próbek przeprowadzono metodą chromatografii cienkowarstwowej w warunkach opisanych powyżej. Stężenie leku w próbach biologicznych oznaczono metodą HPLC (warunki jak wyżej). Standard wewnętrzny (Cefalor) był dodawany do prób przed nastrzykiem na kolumnę chromatograficzną.

WYNIKI

Oznaczenie stężenia leków z grupy cefalosporyn wyekstrahowanych z roztworów wodnych, próbek krwi, moczu i wycinków wątroby, przeprowadzono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Przykładowy chromatogram analizy próby krwi zawierającej mieszaninę tych leków przedstawiono na rycinie 2.

Uzyskane wyniki wydajności izolacji badanych antybiotyków zamieszczono w tabeli II. W celu izolacji Cefamandolu z roztworów wodnych i materiału biologicznego spośród zastosowanych rozpuszczalników najlepszą okazała się mieszanina dichlorometan : izopropanol (15:85). W przypadku pozostałych leków najwyższą wydajność ekstrakcji uzyskano przy zastosowaniu acetonitrylu (powyżej 85,8%).

Wyniki identyfikacji analizowanych leków metodą chromatografii cienkowarstwowej przedstawiono w tabeli III. Zastosowano dwa układy rozwijające: metanol : amoniak (100:1,5) i etanol : H₂O (70:30), a dla ujawnienia na chromatogramach stref badanych związków płytki chromatograficzne oglądano w świetle UV o długości fali $\lambda = 254$ nm oraz wywoływano trzema odczynnikami wybarwiającymi (dwufenylokarbazonem z chlorkiem rtęci, ninhydryną, nadmanganianem potasu). Limity detekcji dla analizowanych cefalosporyn w warunkach w chromatografii cienkowarstwowej przedstawiono w tabeli IV. Badania wykazały, że 100 ng w przypadku Cefazoliny i Ceftazydymu, a 300 ng w przypadku Cefamandolu i Cefuroksymu, jest możliwe do wykrycia metodą chromatografii cienkowarstwowej z detekcją w świetle UV o długości fali $\lambda = 254$ nm.

W tabeli V przedstawiono wyniki analizy Cefuroksymu w materiale biologicznym pobranym ze zwłok dziewięciomiesięcznego dziecka, które chorowało na zapalenie oskrzeli i było leczone tym lekiem. Analizę ilościową przeprowadzono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Jak wspomniano powyżej, w niniejszej pracy badania chemiczno-toksykologiczne przeprowadzono w dwóch kierunkach. Po pierwsze, ustalono warunki ekstrakcji badanych leków z materiału biologicznego i obliczono wydajność ekstrakcji cefalosporyn z użyciem rozpuszczalników, które w tym celu są najczęściej stosowane w praktyce toksykologicznej: eter, chloroform, acetonitryl, mieszanina dichlorometan : izopropanol (15:85). W przypadku leku Cefamandol (Mandol) najlepsze rezultaty otrzymano podczas ekstrakcji mieszaniną rozpuszczalników dichlorometan : izopropanol (wydajność ekstrakcji wynosiła: 88,3% dla wycinków wątroby, 93,6% dla krwi, 96,8% dla moczu, 98,6% dla roztworu wodnego). W przypadku pozostałych leków: Ceftazydym (Fortum), Cefuroksym (Zinacef), Cefazolina (Kefzol) najbardziej efektywnym

rozpuszczalnikiem w procesie ekstrakcji okazał się acetonitryl. Wydajność ekstrakcji leku Cefazydym przy zastosowaniu tego rozpuszczalnika wynosiła: 88,9% dla wycinków wątroby, 90,7% dla krwi, 93,9% dla moczu, 98,6% dla roztworu wodnego; wydajność ekstrakcji leku Cefazolina: 90,4% dla wycinków wątroby, 94,4% dla krwi, 96,6% dla moczu, 99,1% dla roztworu wodnego; natomiast w przypadku leku Cefuroksym wydajność ekstrakcji wynosiła: 85,8% dla wycinków wątroby, 89,9% dla krwi, 90,7% dla moczu, 95,5% dla roztworu wodnego. Wydajność ekstrakcji badanych leków z materiału biologicznego w przypadku zastosowania eteru wahała się w granicach 5,8–22,7%, natomiast w przypadku użycia chloroformu 26,4–49,5%.

Drugi kierunek analizy wiązał się z wyborem układów rozwijających i odczynników, które pozwoliłyby na identyfikację analizowanych leków. Jak wynika z danych zawartych w tabeli III, układem rozwijającym, który umożliwił dostateczny rozdział analizowanych związków, okazał się układ metanol : amoniak (100:1,5). Zastosowane odczynniki wywołujące (dwufenylokarbazon z chlorkiem rtęci, ninhydryna, nadmanganian potasu) reagowały z obecnymi na chromatogramie cefalosporynami ze zróżnicowaną czułością. Otrzymano jednak wyraźne barwne plamy, które po porównaniu z plamami uzyskanymi dla wzorców pozwoliły na jednoznaczną identyfikację badanych związków. Przy zastosowaniu dwufenylokarbazonu z chlorkiem rtęci oraz ninhydryny reakcje barwne otrzymano tylko dla Cefazydymu, natomiast Cefazolina, Cefamandol i Cefuroksym dały reakcje barwną tylko z KMnO_4 .

W celu określenia stężenia wyizolowanych z materiału biologicznego antybiotyków z grupy cefalosporyn zastosowano wysokosprawną chromatografię cieczową z detektorem UV – metodę analityczną powszechnie stosowaną do analizy tej grupy leków. Z danych literaturowych wynika, że w celu analizy cefalosporyn stosowano najczęściej kolumnę chromatograficzną Cv-18 [4, 5, 6, 7], detekcję przy różnych długościach fali (265 nm, 254 nm, 235 nm) oraz różne fazy ruchome:

- acetonitryl : bufor (15 mM kwas heptanosulfonowy) o pH = 3,3 (4,5:95,5);
- 0,3% trietyloamina w H_2O o pH = 5,1;
- metanol : 0,01 M KH_2PO_4 o pH = 3,3 (20:80);
- acetonitryl : 0,1% roztwór wodny bromianu tetrabutylaminy (45:55).

W niniejszej pracy analizę ilościową antybiotyków z grupy cefalosporyn przeprowadzono metodą HPLC z detektorem UV w oparciu o dane opublikowane przez firmę Supelco [10]: (kolumna Supelcosil LC-18 DB, detekcja przy długości fali $\lambda = 254$ nm, faza ruchoma: 0,5% kwas octowy w roztworze acetonitryl : woda (15:85). Analiza w powyższych warunkach pozwoliła osiągnąć zadowalający rozdział mieszaniny wszystkich objętych badaniami leków. Czasy retencji dla poszczególnych leków były następujące: Cefaklor – 0,36 min, Cefazolina – 0,95 min, Cefamandol – 1,20 min, Cefuroksym 1,9 min, Cefazydym – 4,0 min.

W wyniku analizy toksykologicznej, we krwi oraz w wycinkach narządów wewnętrznych pobranych ze zwłok dziecka stwierdzono obecność leku Cefuroksym. Jak wynika z danych przedstawionych w tabeli V, wykazane stężenie Cefuroksymu we krwi mieści się w zakresie stężeń terapeutycznych.

WNIOSKI

1. Z praktyki toksykologicznej wynika, że w celu izolacji leków z materiału biologicznego najczęściej stosowanymi rozpuszczalnikami są eter i chloroform. Na podstawie wyników badań uzyskanych przez autorów niniejszej publikacji, wydajność ekstrakcji leków z grupy cefalosporyn za pomocą powyższych rozpuszczalników jest stosunkowo niska (poniżej 50%) i dlatego też w przypadkach analizy cefalosporyn w materiale biologicznym wskazanym byłoby przeprowadzanie ekstrakcji tych leków przy zastosowaniu acetonitrylu.
2. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, iż chromatografia cienkwarstwowa (TLC) daje się zastosować jako prosta i tania metoda skryningowa identyfikacji antybiotyków z grupy cefalosporyn (Cefazoliny, Cefamandolu, Cefuroksymu, Ceftazydymu) w materiale biologicznym, nawet w zakresie stężeń na poziomie terapeutycznym.
3. Schemat postępowania analitycznego zastosowany w niniejszej pracy sprawdzony na konkretnym przypadku zgonu dziecka leczonego lekiem Cefuroksym (Zinacef) okazał się w pełni przydatny do oznaczania tego leku w materiale sekcyjnym. Stwierdzony we krwi poziom Cefuroksymu mieścił się w zakresie stężeń terapeutycznych.