

Особенности определения цефпиром в биологическом материале

А.А. Безъязычная, В.К. Шорманов, Л.Е. Сипливая, М.В. Рымарова, А.В. Кукурека

Курский государственный медицинский университет,
Российская Федерация, 305004, Курск, ул. К. Маркса, д. 3

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Безъязычная Антонина Александровна – аспирант кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета (КГМУ). Тел.: +7 (4712) 58-13-23. E-mail: baa02061993@rambler.ru. ORCID: 0000-0001-8435-0785

Шорманов Владимир Камбулатович – профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии КГМУ, доктор фармацевтических наук, профессор. Тел.: +7 (4712) 58-13-23. E-mail: R-WLADIMIR@yandex.ru. ORCID: 0000-0001-8872-0691

Сипливая Любовь Евгеньевна – профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии КГМУ доктор биологических наук. Тел.: +7 (4712) 58-13-23. E-mail: R-WLADIMIR@yandex.ru. ORCID: 0000-0003-4793-5579

Рымарова Марина Викторовна – доцент кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии КГМУ, кандидат фармацевтических наук. Тел.: +7 (4712) 58-13-23. E-mail: kalina1170@yandex.ru. ORCID: 0000-0003-4793-5519

Кукурека Александр Владимирович – доцент кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии КГМУ, кандидат фармацевтических наук. Тел.: +7 (4712) 58-13-23. E-mail: R-WLADIMIR@yandex.ru. ORCID: 0000-0002-5244-0636

РЕЗЮМЕ

Введение. Цефпиром – гигроскопичный, кристаллический порошок от белого до светло-желтого цвета, легко растворим в воде. Относится к группе цефалоспориновых антибиотиков III поколения, обладает широким спектром действия.

Цель исследования: разработка и валидация методики определения цефпиром в биологическом материале.

Материал и методы. Изолирование цефпиром производили растворителями различной химической природы из модельных смесей с тканью печени. Изучали влияние на процент извлечения исследуемого соединения оптимальным изолирующим агентом продолжительности изолирования, его кратности и массового соотношения изолирующего агента и биологического объекта. В качестве способа очистки применяли макроколonoчную обращенно-фазовую (ОФ) жидкостную хроматографию низкого давления. Идентификацию и количественное определение проводили методом ОФ высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Методику определения валидировали по общеизвестным параметрам.

Результаты. Наиболее приемлемым изолирующим агентом для извлечения цефпиром из материала биологического происхождения является смесь состава ацетон-вода (5:5). Необходимая кратность изолирования аналита данной смесью – 2, продолжительность каждого контакта изолирующей смеси с биологическим объектом – 30 мин, количественное соотношение изолирующей смеси и биоматрицы – 2:1. Разработана методика определения цефпиром в тканях трупных органов методом ОФ ВЭЖХ, включающая предварительное изолирование аналита смесью ацетон-вода (5:5) и его очистку в макроколonoнке (150×10 мм) сорбента Silasorb C8 с размером частиц 15 мкм. Валидация разработанной методики проведена по критериям специфичности, линейности, точности и прецизионности.

Заключение. Результаты проведенных исследований позволяют представить характер изолирования цефпиром из биологического материала. Разработанная методика обеспечивает извлечение, очистку, идентификацию и количественное определение цефпиром в биологическом материале.

Ключевые слова: цефпиром, изолирование и очистка, идентификация и количественное определение, макроколonoчная хроматография низкого давления, высокоэффективная жидкостная хроматография, валидация.

Для цитирования: Безъязычная А.А., Шорманов В.К., Сипливая Л.Е., Рымарова М.В., Кукурека А.В. Особенности определения цефпиром в биологическом материале. Фармация, 2021; 70 (1): 46–51. <https://doi.org/10.29296/25419218-2021-01-08>

FEATURES OF DETERMINATION OF CEPPIROME IN BIOLOGICAL MATERIAL

A.A. Bez'yazychnaya, V.K. Shormanov, L.E. Siplivaya, M.V. Rymarova, A.V. Kukureka
Kursk State Medical University, 3, Karl Marx St., Kursk 305004, Russian Federation

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Bez'yazychnaya Antonina Alexandrovna – Post graduate student of the Department of Pharmaceutical, Toxicological and Analytical Chemistry of Kursk state medical University (KSMU). Tel.: +7 (4712) 58-13-23. E-mail: baa02061993@rambler.ru. ORCID: 0000-0001-8435-0785

Shormanov Vladimir Kamblatovich – Professor of the Department of Pharmaceutical, Toxicological and Analytical Chemistry of KSMU, Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor. Tel.: +7 (4712) 58-13-23. E-mail: R-WLADIMIR@yandex.ru. ORCID: 0000-0001-8872-0691

Siplivaya Lyubov Evgenievna – Professor of the Department of Pharmaceutical, Toxicological and Analytical Chemistry of KSMU, Doctor of Biological Sciences. Tel.: +7 (4712) 58-13-23. E-mail: R-WLADIMIR@yandex.ru. ORCID: 0000-0003-4793-5579

Rymarova Marina Viktorovna – Associate Professor of the Department of Pharmaceutical, Toxicological and Analytical Chemistry of KSMU, PhD. Tel.: +7 (4712) 58-13-23. E-mail: kalina1170@yandex.ru. ORCID: 0000-0003-4793-5519

Kukureka Alexander Vladimirovich – Associate Professor of pharmaceutical, Toxicological and analytical chemistry Department of KSMU, PhD. Tel.: +7 (4712) 58-13-23. E-mail: R-WLADIMIR@yandex.ru. ORCID: 0000-0002-5244-0636

SUMMARY

Introduction. Cefpirome is white to slightly yellow hygroscopic, crystalline powder, freely soluble in water. It belongs to the group of third-generation cephalosporin antibiotics and has a broad spectrum of action.

Objective: to develop and validate procedures for determining cefpirome in biological material.

Material and methods. Cefpirome was isolated with solvents of different chemical nature of the mixture models with liver tissue. The duration of isolation, its multiplicity, and the mass ratio of the isolating agent to the biological object were examined for its impact on the percentage of extraction of the test compound with an optimal isolating agent. Low-pressure macrocolumn reversed-phase liquid chromatography was used as a purification procedure. Identification and quantification were done by reverse-phase HPLC. The determination methods were validated according to well-known parameters.

Results. An acetone-water (5:5) mixture was the most suitable isolating agent for extracting cefpirome from biological material. The necessary frequency of isolation of the analyte of this mixture was 2; the duration of each contact of the isolating mixture with the biological object was 30 min; the isolating mixture/biomatrix ratio was 2:1. A procedure was developed to determine cefpirome in cadaveric organ tissues by reversed-phase HPLC, which involves preliminary isolation of the analyte with an acetone-water (5:5) mixture and its purification in a 150×10-mm macrocolumn containing Silasorb C8 sorbent with a particle size of 15 μm. The developed procedure was validated according to the criteria of specificity, linearity, accuracy, and precision.

Conclusion. The results of the investigations make it possible to present the nature of isolation of cefpirome from biological material. The developed procedure provides extraction, purification, identification, and quantitative determination of cefpirome in biological material.

Key words: cefpirome, isolation and purification, identification and quantification, low-pressure macrocolumn chromatography, HPLC, validation.

For reference: Bez'yazychnaya A.A., Shormanov V.K., Siplivaya L.E., Rymarova M.V., Kukureka A.V. Features of determination of cefpirome in biological material. *Farmatsiya*, 2021; 70 (1): 46–51. <https://doi.org/10/29296/25419218-2021-01-08>

Введение

Цефпиром – 1-[[[(6R,7R)-7-[[[(2Z)-(2-Амино-4-тиазолил) (метоксиимино) ацетил]амино]-2-карбоксо-8-оксо-5-тиа-1-азабицикло[4.2.0]окт-2-ен-3-ил]метил]-6,7-дигидро-5Н-циклопента[b]-пиридиния сульфат является антибактериальным препаратом из класса цефалоспоринов III поколения, обладающим широким спектром действия. Это кристаллический порошок, от белого до светло-желтого цвета, гигроскопичный. Растворим в воде, практически нерастворим в этиловом спирте (96%), ацетоне. Молекулярная масса – 612,66 а.е.м. Молекулярная брутто-формула – $C_{22}H_{22}N_6O_5S_2 \cdot H_2SO_4$ [1]. Исследуемое лекарственное вещество оказывает токсическое воздействие на теплокровные организмы. LD₅₀ для мышей при внутрибрюшинном введении составляет 3850 мг/кг, при внутривенном – 2400 мг/кг, при пероральном – 16 200 мг/кг [2].

В настоящее время антибактериальные препараты стали все более широко и бесконтрольно применяться для самолечения, отчего возрастает опасность отравлений этими веществами. Известен ряд случаев смертельного исхода от приема цефалоспоринов, в частности, цефтриаксона. В этой связи актуальной является проблема доказательств и количественной оценки присутствия подобных веществ, в том числе и цефпирома, в биологических объектах.

Такие вопросы, как поиск приемлемых условий извлечения цефпирома из тканей внутренних органов, оптимальных схем очистки получаемых вытяжек для последующего возможного определения аналита изучены недостаточно и требуют дальнейшей разработки [3–5].

Целью настоящего исследования явилась разработка и валидация методики определения цефпирома в биологическом материале.

Материал и методы

В качестве объекта исследования был выбран образец цефпирома сульфата с содержанием основного вещества 95%.

Изолирование цефпирома из биоматрицы, которой являлась ткань печени, проводили 18 изолирующими жидкостями (индивидуальными веществами или их смесями) различной химической природы.

Модельные смеси цефпирома с мелкодиспергированной печенью (содержащие 0,05 % аналита) после полуторачасового выдерживания при 18–20°C подвергали двукратному настаиванию с каждым изолирующим агентом при массовом отношении «изолирующая жидкость – модельная смесь» 2:1 по известной схеме [6]. Так же поступали с контрольными образцами биоматрицы, не содержащими вещества. Продолжительность каждого настаивания – 30 мин. Вытяжки, полученные после первого и второго настаивания, сливали вместе и подвергали перемешиванию. По 15% объема каждой из полученных объединенных вытяжек испаряли до удаления жидкой фазы, полученный остаток растворяли в 0,3–0,5 мл воды очищенной и количественно переносили этот водный раствор на стартовую линию пластины «Сорбфил» с УФ-индикатором (ПТСХ-АФ-А-УФ) размерами 100×100 мм. Далее двукратно проводили процесс хроматографирования: первый раз, используя в качестве подвижной фазы ацетон, второй раз, применяя подвижную фазу состава ацетон-вода (6:4). Процедуру хроматогра-

фирования проводили в камерах, выполненных из стекла, с внутренним рабочим объемом около 600 см³ в присутствии вещества-свидетеля. По завершении процесса хроматографирования пластины высушивали в вытяжном шкафу при температуре 18–25°C и проводили детектирование, облучая их УФ-светом (длина волны – 254 нм).

После хроматографирования методом ТСХ по вышеприведенной схеме участок хроматографической пластины с пятном исследуемого вещества вырезали, помещали в стеклянную пробирку и проводили процесс элюирования аналита смесью вода-диметилсульфоксид (5:5) продолжительностью 15 мин. Поглощение полученного элюата исследовали на сканирующем спектрофотометре Shimadzu UV-1800 на фоне смеси диметилсульфоксид-вода (5:5) в кюветках из кварцевого стекла (l = 10 мм). По величине оптической плотности

элюата в области 270 нм рассчитывали количественное содержание вещества, используя уравнение градуировочного графика [7–10].

Наиболее приемлемый (оптимальный) изолирующий агент выявляли по наибольшему проценту извлечения цефпиромы из материала биологической природы. Применяя указанную выше схему извлечения, очистки и определения процентного содержания исследуемого вещества, изучали зависимость степени извлечения аналита из материала биологического происхождения оптимальным изолирующим агентом от продолжительности контакта изолирующей жидкости с биоматериалом, кратности настаивания и соотношения масс изолирующего агента и объекта биологического происхождения.

Для очищения цефпиромы от соэкстрактивных веществ биоматрицы применяли обращенно-фазовую (ОФ) колоночную хроматографию. При этом использовали колонку сорбента Silasorb C8, имеющую размеры 150×10 мм, и проводили процесс элюирования мобильной фазой ацетон-вода (5:5). Элюат, выходящий из колонки, собирали фракциями по 2 мл. Исследуемое вещество обнаруживали во фракциях методом ТСХ (пластины «Сорбфил» ПТСХ-АФ-В-УФ; объем фракции, наносимый на пластину – 5-10 мкл; двукратное хроматографирование: первая подвижная фаза – ацетон, вторая – ацетон-вода (6:4)). Фракции с 3 по 7, содержащие цефпиром, объединяли, проводили процедуру испарения элюента в вытяжном шкафу при температуре 18–25°C до объема приблизительно 3–4 мл (исчезновение запаха ацетона), количественно переносили в мерную колбу вместимостью 5 мл и доводили до метки водой.

Идентификацию и определение количественного содержания исследуемого соединения проводили на жидкостном лабораторном хроматографе «МАЭСТРО» производства ООО «Интерлаб» Россия (2016) с УФ-детектором, используя колонку Zorbax SB-C18 размером 250×4,6 мм (размер частиц сорбента – 5 мкм) производства Agilent

Результаты извлечения цефпиромы из биологического материала различными изолирующими агентами

Results of cefpirome extraction from biological material with different isolating agents

Таблица 1

Table 1

Изолирующий агент	Найдено цефпиромы (n=5, P=0,95), %				
	\bar{x}	S	$S_{\bar{x}}$	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\epsilon}$
Ацетон	70,95	2,88	1,29	3,58	5,05
Метанол	75,83	3,29	1,47	4,09	5,40
Этанол	62,38	2,92	1,31	3,63	5,82
Ацетонитрил	37,14	2,76	1,23	3,43	9,22
1,4-Диоксан	63,32	2,88	1,29	3,58	5,66
Вода дистиллированная	39,30	3,35	1,50	4,16	10,59
8% раствор уксусной кислоты	35,69	2,97	1,33	3,70	10,35
Уксусная кислота	50,82	3,99	1,78	4,96	9,76
Ангидрид уксусной кислоты	65,55	6,30	2,82	7,83	11,94
0,1 н. р-р натрия гидроксида	30,24	2,16	0,97	2,69	8,88
Диметилсульфоксид	39,15	2,08	0,93	2,59	6,62
Диметилформамид	53,68	2,19	0,98	2,72	5,07
Диметилсульфоксид-вода (5:5)	61,60	3,31	1,48	4,11	6,68
Метанол-вода (5:5)	85,79	5,95	2,66	7,40	8,62
Диметилсульфоксид-вода (8:2)	78,43	3,97	1,77	4,93	6,29
Метанол-вода (8:2)	69,95	3,32	1,49	4,13	5,09
Ацетонитрил-вода (5:5)	71,35	3,26	1,46	4,05	5,67
Ацетон-вода (5:5)	69,45	1,81	0,81	2,26	3,25

Technology. Температура колонки – 25°C; УФ-детектирование в области 270 нм; объем вводимой пробы – 10 мкл; скорость потока элюента – 1 мл/мин [11–13].

Результаты и обсуждение

Данные, полученные в ходе экспериментов по сравнительному извлечению цефпиром из печени растворителями разной химической природы и их смесями, приведены в табл. 1. На основе представленных данных логично заключить, что наиболее приемлемым изолирующим агентом для извлечения цефпиром из ткани печени служит изолирующая смесь состава ацетон-вода (5:5). Также выявлено, что оптимальными условиями извлечения цефпиром из модельных смесей с тканью печени оказались двукратный контакт биоматериала с изолирующим агентом, соотношение биоматериала и изолирующего агента 1:2 и время контакта ≥ 30 мин.

При определении хроматографической активности цефпиром в макроколонке с ОФ сорбентом в условиях нормального давления, было показано, что приемлемой для элюирования мобильной фазой является смесь ацетон-вода (5:5). В выбранных условиях достигается компактный выход исследуемого лекарственного средства из хроматографической колонки и обеспечивается

необходимый уровень очистки извлеченного из печени аналита [14].

Идентификация цефпиром проводилась с применением метода УФ-спектроскопии в среде диметилсульфоксид-вода (5:5) по наличию максимума в области 270 нм. Для идентификации и определения количественного содержания исследуемого соединения методом ОФ ВЭЖХ предложена мобильная фаза состава: фосфатный буферный раствор рН 3-метанол-ацетонитрил (8:1:1 по объему).

Методика определения цефпиром в биологическом материале

Изолирование. 25 г мелкодиспергированной печени, содержащей аналит, или такое же количество контрольного образца биоматрицы двукратно настаивали при 18–20°C со смесью ацетон-вода (5:5) при отношении массы смеси к массе биоматериала 2:1. Временной интервал каждого настаивания – 30 мин. Вытяжки, полученные после первого и второго настаивания, объединяли и подвергали тщательному перемешиванию.

Очистка. 2 мл полученной объединенной вытяжки переносили в колонку для хроматографии 150×10 мм, предварительно наполненную сорбентом Silasorb C8, и проводили процесс элюирования подвижной фазой ацетон-вода (5:5). Элюат, выходящий из колонки, собирали фракциями

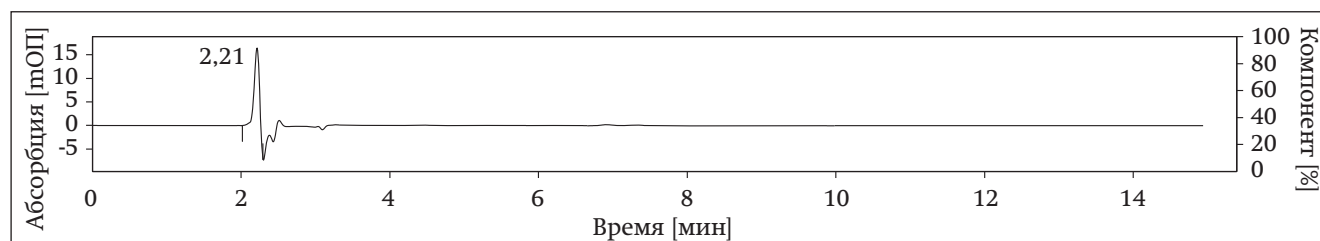


Рис. 1. Общий вид хроматограммы растворителя, подвижная фаза – фосфатный буферный раствор-метанол-ацетонитрил (8:1:1), длина волны 270 нм

Fig. 1. General view of the solvent chromatogram; mobile phase – phosphate buffer solution-methanol-acetonitrile (8:1:1); wavelength, 270 nm

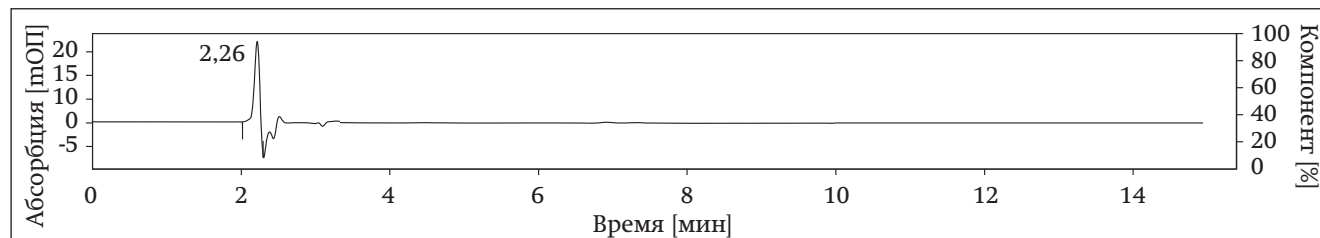


Рис. 2. Хроматограмма проверочного образца из печени, подвижная фаза – фосфатный буферный раствор-метанол-ацетонитрил (8:1:1), длина волны 270 нм

Fig. 2. Chromatogram of a test liver sample, mobile phase – phosphate buffer solution-methanol-acetonitrile (8:1:1), wavelength 270 nm

по 2 мл. Исследуемое вещество обнаруживали во фракциях методом ТСХ (пластины «Сорбфил» ПТСХ-АФ-В-УФ, объем фракции, наносимый на пластину – 5–10 мкл). Фракции с 3 по 7, содержащие анализируемый анализ, объединяли, проводили процедуру испарения элюента в вытяжном шкафу при температуре 18–25°C до объема приблизительно 3–4 мл, количественно переносили в мерную колбу вместимостью 5 мл и доводили до метки водой (раствор А).

Идентификация методом УФ-спектрофотометрии. 0,5 мл раствора А доводили до 10 мл диметилсульфоксидом (раствор Б) и измеряли оптическую плотность раствора Б на сканирующем спектрофотометре Shimadzu UV-1800 на фоне диметилсульфоксид-вода (5:5) в кварцевых кюветках с толщиной рабочего слоя 10 мм.

Идентификацию исследуемого соединения проводили по форме спектра и положению точки максимума.

Идентификация и количественное определение методом ВЭЖХ. 0,5 мл раствора А доводили до 5 мл подвижной фазой состава: фосфатный буферный раствор рН 3-метанол-ацетонитрил (8:1:1) (раствор В). 10 мкл раствора В вводили в хроматограф. Идентификацию анализа проводили по совпадению времени удерживания с временем удерживания вещества-стандарта. Далее находили концентрацию антибиотика по уравнению градуировочного графика.

На следующем этапе производили валидацию разработанной аналитической методики по следующим параметрам: специфичность, линейность, точность и прецизионность.

Таблица 2

Валидационные показатели методики количественного определения цефпирома в ткани печени с использованием нормальнофазовой ВЭЖХ

Table 2

Validation parameters of the procedure for quantitative determination of cefpirome in liver tissue, by using normal-phase HPLC

Уровень концентрации вещества, мкг в 1 г биологического объекта	Определение в первый день эксперимента				Определение во второй день эксперимента			
	значение площади пика на хроматограмме модельного раствора	найденно, мкг в 1 г биологического объекта	относительная погрешность, %	метрологические характеристики	значение площади пика на хроматограмме модельного раствора	найденно, мкг в 1 г биологического объекта	относительная погрешность, %	метрологические характеристики
400	31,955	366,21	-4,06	\bar{x} =383,756; S=23,008; S_x =10,289; $\Delta\bar{x}$ =28,605; \bar{e} =7,454; S_f =5,995 %	37,033	412,56	-5,55	\bar{x} =377,816; S=26,999; S_x =12,074; $\Delta\bar{x}$ =233,566; \bar{e} =8,884; S_f =7,146 %
400	31,510	362,15			35,794	401,25		
400	37,837	419,90			31,147	358,84		
400	34,479	389,25			31,510	362,15		
400	33,605	381,27			30,648	354,28		
2500	272,681	2563,38	5,29	\bar{x} =2632,320; S=113,799; S_x =50,892; $\Delta\bar{x}$ =2141,481; \bar{e} =5,375; S_f =4,323 %	272,674	2563,32	5,45	\bar{x} =2636,360; S=128,218; S_x =57,341; $\Delta\bar{x}$ =2159,408; \bar{e} =6,047; S_f =4,863 %
2500	278,292	2614,59			290,025	2721,68		
2500	266,107	2503,38			287,508	2698,71		
2500	298,464	2798,71			293,290	2751,48		
2500	285,627	2681,54			259,887	2446,61		
4000	458,163	4256,32	4,59	\bar{x} =4183,540; S=149,917; S_x =67,045; $\Delta\bar{x}$ =2186,385; \bar{e} =4,455; S_f =3,584 %	426,276	3965,28	5,08	\bar{x} =4203,312; S=141,912; S_x =63,465; $\Delta\bar{x}$ =2176,433; \bar{e} =4,197; S_f =3,376 %
4000	421,485	3921,55			457,640	4251,55		
4000	451,649	4196,87			467,202	4338,82		
4000	461,211	4284,14			458,555	4259,90		
4000	458,437	4258,82			452,103	4201,01		

Специфичность. На хроматограммах растворителя и контрольного извлечения (рис. 1, 2) отсутствуют пики, по времени удерживания соответствующие пикам исследуемого соединения. Это позволяет сделать заключение о специфичности аналитической методики.

Линейность. Градуировочный график, отражающий линейную зависимость площади хроматографического пика (S , усл. ед.) от содержания анализируемого вещества в пробе (C , мкг/г), для определения цефпинома методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в биологическом материале (ткани печени), описываются уравнением:

$$S = 0,109562 \cdot C - 8,168037.$$

Значение коэффициента корреляции (r) составило 0,9999 (критерий приемлемости – $r \geq 0,990$).

Точность и прецизионность. Точность устанавливалась путем проведения 9 параллельных определений модельных растворов на трех уровнях концентрации в пределах аналитической области. Для цефпинома готовили смеси с 400, 2500 и 4000 мкг исследуемого препарата в 1 г биологического объекта. Для оценки прецизионности методика воспроизводилась в каждый из двух следующих друг за другом дней. Каждый день выполнялось по шесть параллельных испытаний. Согласно полученным данным (табл. 2), методика удовлетворяет критериям точности (относительная погрешность $\leq \pm 20\%$) и прецизионности (относительное стандартное отклонение (S_r) $< 20\%$).

Заключение

Изучено изолирование цефпинома из биологического материала (ткань печени) с применением в качестве изолирующего агента смеси ацетон-вода (5:5). Разработана схема сорбционной очистки анализируемого вещества, выделенного из биологической матрицы, на основе использования макроколоночной хроматографии в ОФ сорбенте Silasorb C8. Обосновано использование ВЭЖХ для идентификации и оценки количественного содержания аналита. Разработана методика определения цефпинома в ткани печени и проведена ее валидация по критериям специфичности, линейности, точности и прецизионности.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Литература/References

1. Bhooshan R. Separation and identification of some cephalosporins on impregnated TLC plates. *Biomedical Chromatography*. 1996; 10: 258–60.
2. Guitton J., Laffont A., Bruzeau J. et al. Determination of ceftazidime in plasma using high-performance liquid chromatography and electrochemical detection. Application for individualizing dosage regimens in elderly patients. *Biomedical and Sciences Applied*. 1998; 719: 151–7.
3. Sengar M.R., Gandhi S.V., Patil U.P., Rajmane V.S. Reverse phase high performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of cefuroxime axetil and potassium clavulanate in tablet dosage form. *International J. of Chem Tech Research*. 2009; 4: 1105–8.
4. Siddiqui M.R., Tariq A., Chaudhary M. et al. Development and validation of high performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of ceftazidime and sulbactam in spiked plasma and combined dosage form-zydotam. *American J. of Applied Sciences*. 2009; 6 (10): 1781–7.
5. Ali S.M., Elbashir A.A., Aboul-Enein H.Y. Spectroscopic methods for analysis of cephalosporins in pharmaceutical formulations. *World J. of Analytical Chemistry*. 2015; 3 (1A): 21–32. DOI: 10.12691/wjac-3-1A-5.
6. Шорманов В.К., Коваленко Е.А., Дурицын Е.П. и др. Определение карбофурана при судебно-химическом исследовании биологического материала. Судебно-медицинская экспертиза. 2013; 56 (4): 30–4. [Shormanov V.K., Kovalenko E.A., Duritsyn E.P. et al. Determination of carbofuran in the forensic chemical study of biological material. *Sudebno-meditsinskaya ekspertiza*. 2013; 56 (4): 30–4 (In Russian)].
7. Lindenmann J., Kugler S.A., Matzi V. et al. High extracellular levels of ceftriaxone in unaffected and infected lung tissue of patients. *Antimicrob Chemother*. 2011; 66 (1): 160–4. DOI: 10.1093/jac/dkq413.
8. 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. of Chromatography*. 2000; 749 (1): 101–10. DOI: 10.1016/S0378-4347(00)00381-9
9. El-Shaboury S.R., Saleh G.A., Mohamed F.A., Rageh A.H. Analysis of cephalosporin antibiotics. *Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007; 45(1): 1-19. DOI: 10.1016/j.jpba.2007.06.002
10. Solangi A.R., Memon S.Q., Khuhawar M.Y., Bhangar M.I. Quantitative analysis of eight cephalosporin antibiotics in pharmaceutical products and urine by capillary zone electrophoresis. *Acta Chromatographica*. 2007; 19: 81–96.
11. Rathinavel G., Mukherjee P.B., Valarmathy J. et al. Validated RP – HPLC method for simultaneous estimation of cefixime and cloxacillin in tablets. *E-Journal of Chemistry*. 2008; 5 (3): 648–51. DOI: 10.1155/2008/152390
12. Signs S.A., File T.M., Tan J.S. High-pressure liquid chromatographic method for analysis of cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1984; 26 (5): 652–5.
13. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. Washington, DC: HHS/ FDA/ CDER. 2001.
14. Безъязычная А.А., Шорманов В.К., Сипливая Л.Е. Определение цефтриаксона в биологическом материале. Курский научно-практический вестник Человек и его здоровье. 2018; 1: 128–32. [Bezyazychnaya A.A., Shormanov V.K., Siplivaya L.E. Determination of ceftriaxone in biological material. *Kurskiy nauchno-prakticheskiy vestnik «Chelovek i ego zdorovye»*. 2018; 1: 128–32 (In Russian)]. DOI: 10.21626/vestnik/2018-1/19.

Поступила 12 июля 2020г.

Received 12 July 2020

Принята к публикации 15 января 2021 г.

Accepted 15 January 2021