

## 인체 혈장 및 소변 중 에르타페넴의 정량을 위한 LC-MS/MS 분석법 검증

김윤정<sup>1</sup> · 한송희<sup>1</sup> · 전지영<sup>1</sup> · 황민호<sup>1</sup> · 임용진<sup>1</sup> · 채수완<sup>1,2</sup> · 김민걸<sup>1,2</sup> ★

<sup>1</sup>전북대학교병원 임상시험센터, <sup>2</sup>전북대학교 의학전문대학원 약리학교실  
(2011. 11. 9. 접수, 2011. 12. 19. 수정, 2011. 12. 27. 승인)

### Validation of LC-MS/MS method for determination of ertapenem in human plasma and urine

Yun-Jeong Kim<sup>1</sup>, Song-Hee Han<sup>1</sup>, Ji-Young Jeon<sup>1</sup>, Min-Ho Hwang<sup>1</sup>, Yong-Jin Im<sup>1</sup>,  
Soo-Wan Chae<sup>1,2</sup> and Min-Gul Kim<sup>1,2</sup> ★

<sup>1</sup>Clinical Trial Center, Chonbuk National University Hospital

<sup>2</sup>Department of Pharmacology, College of Medicine, Chonbuk National University, 20,  
Geonji-ro, Deokjin-Gu, Jeonju-si, Jeollabuk-do 561-712, Korea

(Received November 9, 2011; Revised December 19, 2011; Accepted December 27, 2011)

**요 약:** LC-MS/MS를 이용하여 혈장과 소변 중 에르타페넴의 신속하고 정확한 분석법을 개발하고 이 분석법에 대한 검증을 수행하였다. 혈장과 소변 분석을 위하여 내부 표준 물질인 세프트아지딴을 첨가한 후 메탄올로 단백질을 침전시키고, 그 상층액을 취하여 메탄올로 희석하여 LC-MS/MS로 분석하였다. MS/MS의 MRM (multiple reaction monitoring) 방법을 이용하여 혈장과 소변 중의 에르타페넴을 어떠한 분석의 방해물 없이 선택적으로 검출할 수 있었다. 혈장 중 에르타페넴의 표준 검량선은 1~100 µg/mL의 농도 범위에서 우수한 직선성( $r^2 = 0.9996$ )을 보였으며, 일내, 일간 재현성은 변동계수 8.9% 이하, 정확성은 97.2~106.2% 이었다. 또한 소변 중 에르타페넴의 분석 결과는 좋은 상관관계( $r^2 = 0.9992$ )를 보였고, 일내, 일간 재현성이 변동계수 7.2% 이하, 정확성이 97.9~111.6% 이었다. 결과적으로 에르타페넴의 약동학 연구에 적용되기에 충분한 감도와 특이성, 직선성, 정밀성 및 정확성을 가지고 있음을 확인하였다.

**Abstract:** Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method has been developed and validated for the quantitative determination of ertapenem in human plasma and urine. After addition of internal standard (ceftazidime), plasma and urine was diluted with methanol and analyzed by LC-MS/MS. Using MS/MS with multiple reaction monitoring (MRM) mode, ertapenem were selectively detected without severe interference from human plasma and urine. The standard calibration curve for ertapenem was linear ( $r^2 = 0.9996$ ) over the concentration range 1~100 µg/mL in human plasma. The intra- and inter-day precision over the concentration range of ertapenem was lower than 8.9% (correlation of variance, CV), and accuracy was between 97.2~106.2%. On the other hand, it was showed good relationship ( $r^2 = 0.9992$ ) and the precision (intra- and

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)63-250-2532 Fax : +82-(0)63-250-2349

E-mail : mgkim@jbctc.org

inter-day) over the concentration range of ertapenem was lower than CV 7.2%, and accuracy was between 97.9~111.6% for urine. This method has been successfully applied to the pharmacokinetic study of ertapenem in human plasma and urine.

**Key words:** ertapenem, LC-MS/MS, validation, human plasma, human urine

## 1. 서 론

에르타페넴은 베타-락탐 타입의 광범위 활성을 나타내는 항생제인 카바페넴 계열의 약물로서 메로페넴과 매우 유사한 구조의 1 $\beta$ -메틸 카바페넴이다.<sup>1,2</sup> 에르타페넴은 비경구용 카바페넴계로 복잡성 복부 내 감염과 복잡성 피부 및 피부조직 감염을 치료하는 새로운 주사제로 개발되었다.<sup>3</sup> 이러한 에르타페넴 주사제는 세포벽 구성성분인 펩티도글리칸의 형성을 억제, 세포벽 합성을 저해함으로써 살균효과를 나타내는 베타-락탐계 항생제로, 기존 카바페넴계 항생제가 원내 감염 등 중증의 감염치료에 사용된 것과는 달리 중등도 및 중증의 지역사회 획득성 감염 치료에 쓰인다.<sup>4</sup> 또한 일반적인 그람 양성과 음성, 호기성 및 혐기성균에 대한 뛰어난 항균력을 가지고 있는 것으로 알려져 있으며, 1일 1회 1 g 단독요법으로 간편한 투여가 장점이다.<sup>5</sup> 또한 정맥주사뿐만 아니라 근육주사도 가능하다는 장점을 가지고 있다.<sup>6</sup> 이는 대장균 등으로 인한 복잡성 복부 내 감염 외에 복잡성 피부 및 피부조직감염, 지역사회 획득성 폐렴, 복잡성 요로감염, 급성골반감염에 적용증이 있다. 에르타페넴은 카바페넴 계열의 타 약물과는 달리 84-96%의 높은 단백 결합력을 가지며 1 $\beta$ -메틸기의 도입으로 다른 카바페넴에 비해 비교적 신장의 가수분해에 안정하여 에르타페넴 나트륨 단독제제로서 사용이 가능하다.<sup>6</sup> 에르타페넴을 정맥주사 하였을 때, 거의 80%는 고리가 열린 형태의 대사체와 미변화체 형태로서 소변으로 배출된다.<sup>7,8</sup> 그러므로 에르타페넴의 약동학 연구를 위해서는 혈액뿐 아니라 소변에 존재하는 약물의 양을 측정하는 것이 중요하다.

지금까지 보고된 생체시료 중의 에르타페넴의 분석 방법은 주로 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 이용한 것으로 UV 검출기를 이용한 분석법이 많이 있고, 액체 크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)를 사용하는 방법이 알려져 있다.<sup>6,8</sup> 그러나 UV 검출기(300 nm) 사용의 경우는 정확한 약물의 양을 측정하기 어렵고, HPLC 분석의 경우는 직선성 상관계수가 낮고, Musson 등, Soltani 등의 보고와 같이 최저정량한계

(limit of quantitation, LOQ)가 1.25  $\mu$ g/mL로 높아 소변에 있는 약물의 저농도를 측정하기에는 한계가 있다.<sup>9,10</sup> 10 ng/mL로 낮은 정량한계에서 LC-MS/MS에 의한 분석법도 보고된 바가 있으나 내부표준물의 첨가 없이 분석하였다.<sup>11,12</sup> 전처리 방법으로는 단백질 침전법 혹은 액체-액체 추출법을 이용하는 방법들이 있다. 액체-액체 추출법을 사용하여 혈장내 매트릭스 성분들은 효과적으로 제거하였으나, 전처리 과정이 너무 복잡하여 수백-수천 개의 생체시료 분석을 수행해야 하는 약동학 연구의 고효율 분석법으로는 적합하지 않았다. 최근 들어 고체상 추출법(solid phase extraction, SPE)을 이용한 방법이 사용되었으나 이는 숙련된 전문가에 의해 재현성 있는 결과를 얻을 수 있으며, 다량의 SPE 컬럼을 고비용으로 구입해야 하는 단점이 있다. UPLC-MS/MS의 경우, 짧은 분석 시간과 높은 분리능으로 최근 생체시료 중의 약물 분석에 많이 적용되고 있으나, 아직까지는 일반 HPLC보다 보급률이 낮고 고비용이 요구되며 사용할 수 있는 컬럼에 제한성이 있어, 많은 실험실에서 일상적인 분석법으로 사용하기에는 한계가 있다.

따라서, 본 연구에서는 기존 분석법의 단점을 개선하고, 많은 실험실에서 일반적으로 사용할 수 있는 인체의 혈장 및 소변 내의 에르타페넴 생체시료 분석법을 개발하였다.

## 2. 실험방법

### 2.1. 시약 및 기기

본 연구에서 사용한 표준물질인 에르타페넴 나트륨은 한국엠에스디(주)에서 제공받았고, 내부표준물질로 사용한 세프타지딴 표준품은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA)로부터 구입하였다(Fig. 1). 이동상으로 사용한 ammonium acetate는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA), 아세트산은 JUNSEI Chemical (Japan)에서 구입하였다. HPLC 등급의 water와 acetonitrile, 메탄올은 Fisher Scientific(USA)에서 구입하였으며 전처리 과정에 사용된 MES 완충액은 Sigma Chemical Co. (St.

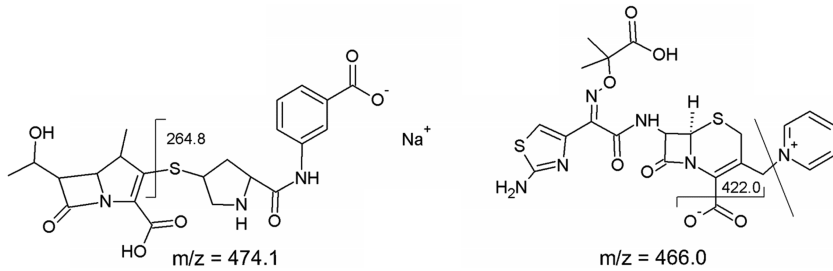


Fig. 1. Chemical structures of ertapenem and ceftazidime.

Louis, Mo, USA)에서 구입하였다. 약물분석 기기로는 Agilent HPLC 1100 series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), 4000QTRAP LC-MS/MS (AB SCIEX, Foster City, CA, USA)와 원심분리기(MICRO 17TR, Hanil Science Industrial Co, Korea) 등을 사용하였다.

## 2.2. LC-MS/MS 조건 최적화

혈장 및 소변 중 에르타페넴 정량을 위한 질량분석기의 세부조건으로는 전기분무이온화법(electrospray ionization (ESI) mode), curtain gas 20 psi, nebulizing gas 50 psi, turbo gas 50 psi, source 온도는 500 °C, CAD gas는 5 psi, entrance potential -10 V, MRM ion transfer (m/z) 및 collision energy (CE)는 각각 -28 V, -11 V이었다. 에르타페넴의 precursor molecular ion과 product ion의 m/z 는 각각 474.1과 264.8로 모니터링하였고, 세프트라지딴의 precursor ion의 m/z는 pyridine moiety가 떨어져나간 형태인 466.0로, product ion의 m/z는 422.0로 모니터링 하였다. 또한, 이동상은 2 mM ammonium acetate 0.1% acetic acid, pH 3.8 (A) 과 acetonitrile (B)로 0 분: 100%(A) 0%(B), 6 분: 0%(A) 100%(B), 8 분: 100%(A) 0%(B), 2 분간 100%(A) 기울기 용리 조건으로 설정하여 분석하였다. 컬럼은 Betabasic-8 컬럼(C8, 4.6 × 100 mm, Thermo, USA), 유속은 1 mL/min, 주입량은 10 µL로 하여 분석하였다.

## 2.3. 표준검량선 작성 및 분석법 검증

에르타페넴 및 세프트라지딴 표준품을 50% acetonitrile에 녹여 에르타페넴은 10 mg/mL, 세프트라지딴은 1 mg/mL로 만들었다. 에르타페넴은 10, 20, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 µg/mL의 농도로 만들어 공혈장 90 µL에 100 mM MES 완충액 90 µL를 넣고 만들어 놓은 표준시료 각 20 µL를 넣어 최종 농도 1, 2, 5, 10, 20, 40, 80, 100 µg/mL로 만든 후 새로운 바이알에 100 µL씩 옮긴 후 내부표준물인 세프트라지딴

1 mg/mL의 용액을 20 µL씩 더하여 넣었다. 그 후 메탄올을 400 µL씩 더하여 넣은 후 20초 동안 혼합한 후 4 °C로 설정해 둔 원심분리기를 사용하여 20,800 g에서 10분 동안 원심분리 하였다. 원심분리 후 상등액 20 µL와 메탄올 380 µL를 넣고 20배 희석하여 200 µL를 바이알에 옮겨 이 중 10 µL를 LC-MS/MS에 주입하였다. 소변 분석을 위한 표준검량선 시료는 위와 동일한 방법으로 제조하였으며 1, 2, 5, 10, 20, 40, 80, 100 µg/mL의 농도로 조제하여 LC-MS/MS로 분석하였다. 분석법 검증을 위한 특이성 시험으로서 6개의 다른 기원의 공혈장과 공소변을 준비하여 각 시료에 LOQ 농도의 에르타페넴을 spiking하여 분석 시 다른 물질들에 의한 간섭이 없는지 확인하였다. 직선성 실험을 위해서는 얻어진 크로마토그램으로부터 내부표준물질의 피크 면적에 대한 에르타페넴의 피크 면적비를 구하고, 검량선은 선형회귀 방법으로 구하였으며 가중치는 1/x을 이용하였다. 여기에서 얻은 내부표준물질의 피크 면적에 대한 에르타페넴 피크 면적을 가지고 검량선을 작성하였으며 quality control (QC) 시료 1, 2, 40, 80 µg/mL 농도의 혈장과 소변 표준시료를 이용하여 상기의 검체 처리방법으로 처리하여 분석하였다(n=5). 각 성분과 내부표준물질의 측정치의 표준편차를 평균값으로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였다. 하루에 5번 시행하여 일내 정밀성(% CV로 표시)을 구하였고 5일간 실험을 반복 시행하여 일간 정밀성을 구하였다. 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였다. 시험방법의 회수율을 조사하기 위하여 에르타페넴이 포함된 혈장시료와 소변시료를 우선 전처리한 후, 내부표준물질을 가하여 각 성분의 회수율을 구하였고, 내부표준물질도 동일한 방법으로 혈장에 첨가하여 우선 전처리를 한 다음 농도를 알고 있는 표준물질용액을 가하여 분석하고 얻어진 크로마토그램의 피크 면적비를 이용하여 회수율을 구하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 특이성

건강한 성인의 공혈장과 소변에 내부표준물질만 spiking한 것과 에르타페넴을 함께 spiking한 것에 대해 본 시험 방법에 따라 LC-MS/MS로 분석하였다 (Fig. 2). LC-MS/MS 분석법을 통하여 얻어진 크로마토그램에서 에르타페넴과 세프타지딴은 각각 4.07분과 3.90분의 피크 유지시간을 나타내었다. 내부표준물질은 가하지 않은 공혈장과 소변에서는 크로마토그램 상에 peak가 검출되지 않았으며(A1과 B1), 내부표준물질을 첨가한 공혈장과 소변에서는 내부표준물질의 peak만 검출되었고(A3와 B3), 내부표준물질이 에르타페넴의 크로마토그램에 영향을 주지 않음을 확인하였다(A2, B2). 본 실험의 분석 조건에서 에르타페넴 및 내부표준물질은 기타 혈장 및 소변에 존재하는 다른 성분들과 잘 분리되었다. 여섯 개의 다른 기원을 가진

공혈장과 소변에 최저정량한계 농도를 spiking하여 분석하였을 때, 각 성분의 피크가 다른 간섭효과 없이 잘 분석되는 것을 확인하였다.

#### 3.2. 직선성

표준물질 1, 2, 5, 10, 20, 40, 80, 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 혈장시료에 내부표준물질을 spiking 한 혈장시료를 전처리하여 LC-MS/MS로 분석하여  $r^2$ 을 구한 결과 0.9991로 양호한 직선성을 나타내었고, 최저검출한계(limit of detection, LOD)는 신호 대 잡음 비가 3대 1 일 때의 농도, LOQ는 신호 대 잡음 비가 10 대 1 일 때의 농도로 구한 결과 각각 0.4, 1  $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 소변시료도 1, 2, 5, 10, 20, 40, 80, 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 조제하여 LC-MS/MS 분석한 결과  $r^2$ 을 구하였고, LOD와 LOQ는 각각 0.3, 1  $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 혈장 시료로부터 구한 에르타페넴의 계산식은  $y=0.0000341x-0.000345$  ( $r^2=0.9996$ ) [ $y$ =에르타페넴/내부표준물질 피크 면적의

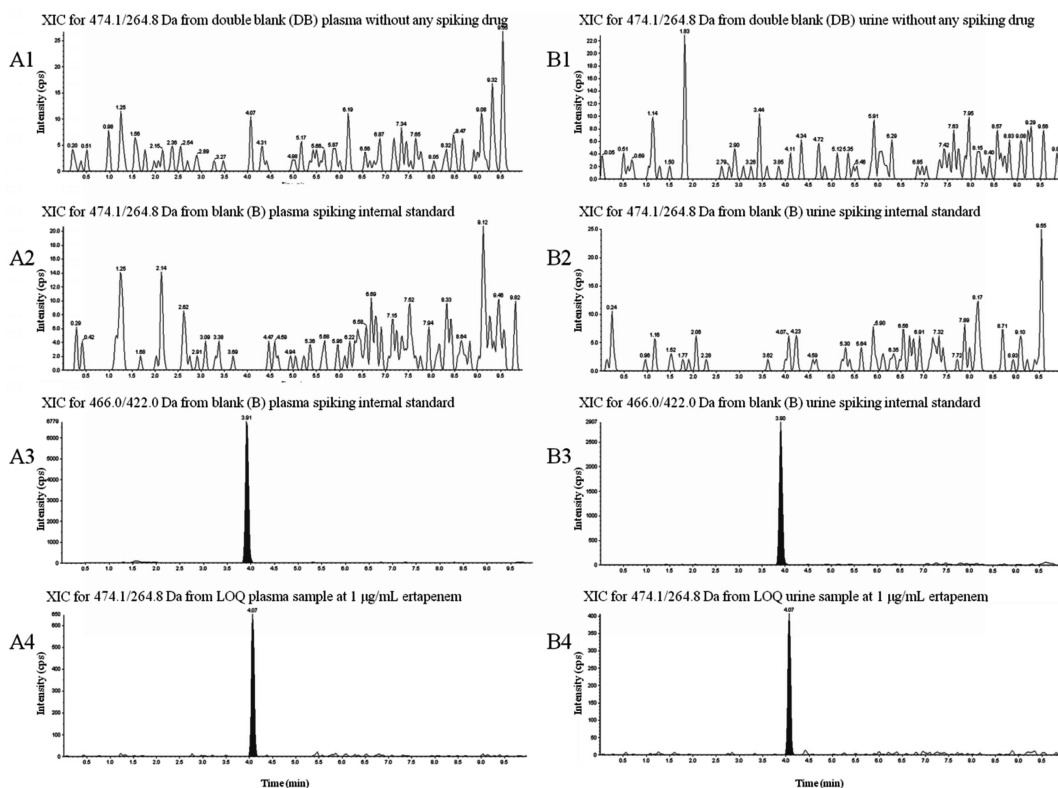


Fig. 2. Extracted ion chromatograms (XIC) of plasma (A1, A2, A3 and A4) and urine (B1, B2, B3 and B4). The chromatograms of double blank (DB) matrix without internal standard (A1 and B1), blank (B) matrix with internal standard (A2 and B2 for 474.1/264.8 Da, A3 and B3 for 466.0/422.0 Da) and LOQ sample spiking of erTapenem (1  $\mu\text{g/mL}$ ) to blank matrix (A4 and B4), respectively.

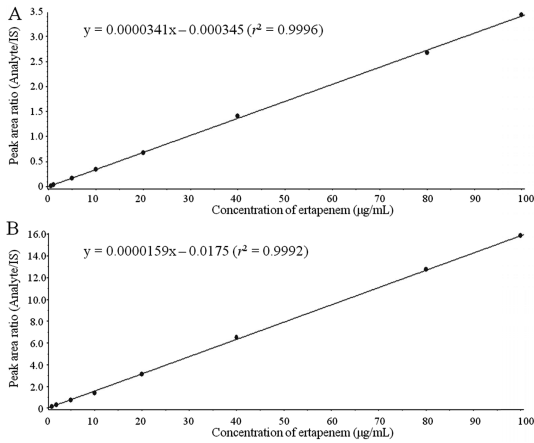


Fig. 3. Standard calibration curve of erlapenem in (A) plasma and (B) urine.

비율,  $x$ =에르타페넴의 농도( $\mu\text{g/mL}$ )였으며 1~100  $\mu\text{g/mL}$ 의 범위에서 양호한 직선성을 나타내었다. 소변시료에서의 에르타페넴은  $y = 0.0000159x - 0.0175$  ( $r^2 = 0.9992$ )으로 직선성에서 양호한 결과를 얻었다(Fig. 3).

### 3.3. 정확성 및 정밀성

정밀성은 에르타페넴과 내부표준물질의 피크 면적비의 표준편차를 에르타페넴과 내부표준물질의 피크 면적비의 평균값으로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였다. 표준용액에 대하여 QC시료는 1, 2, 40, 80  $\mu\text{g/mL}$ 로 하루에 5번 시행하여 일내 정밀성을 구하였고, 5일간 실험을 반복 시행하여 일간 정밀성을 구하였다. 또한, 정확성은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였다. 감도(정량 한계)는 크로마토그램 상에서 신호 대 잡음비(signal to noise ratio)를 10 이상으로 하였다. 판정기준은 CV(%)가 10%이하를 만족하는 지와 정확성(Accuracy, %) 85~115% 일 때 만족하는 것으로 판정하였으며, 실험결과 Table 1에 나타난 것처럼 일내 분석시의 CV(%)는 3.2~6.3%로 만족하는 결과를 보였

Table 1. Intra-day and inter-day precision and accuracy for erlapenem in human plasma

Statistical variable	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	1	2	40	80
Intra-day ( $n=5$ )				
Mean	1.1	2.0	39.4	77.9
CV (%)	3.2	4.0	6.3	4.4
Accuracy (%)	106.2	99.6	98.6	97.2
Inter-day ( $n=25$ )				
Mean	1.1	2.0	39.1	80.3
CV (%)	8.9	7.7	8.4	6.3
Accuracy (%)	100.6	99.4	97.7	100.4

Table 2. Intra-day and inter-day precision and accuracy for erlapenem in human urine

Statistical variable	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	1	2	40	80
Intra-day ( $n=5$ )				
Mean	1.1	2.0	39.3	80.2
CV (%)	7.2	5.6	4.8	3.2
Accuracy (%)	111.6	100.2	98.2	100.2
Inter-day ( $n=25$ )				
Mean	1.0	2.0	41.5	83.7
CV (%)	6.8	3.7	4.8	6.4
Accuracy (%)	97.9	101.5	103.6	104.6

고, 일간 분석시의 CV(%) 6.3~8.9%의 결과를 나타내었다. 그리고 소변시료의 일내 5회 반복시험과 5일간 반복시험의 CV(%)가 각각 3.2~7.2%와 3.7~6.8%로 결과를 모두 만족하였다(Table 2). Accuracy는 혈장시료와 소변시료 모두 기준을 만족하였다. 추출효율의 실험결과는 회수율로서 평가하였으며, 기지 량의 분석물질에 대해 본 시험법의 시료 추출과 처리과정을 모두 거친 후 얻은 분석치의 기지 량에 대한 퍼센트로 계산하여 85~115% 일 경우 적합으로 판정하였고, 일내, 일간 실험결과 혈장시료는 97.1~106.0%, 소변 시료는 97.0~111.2%로 적합한 결과를 나타내었다(Table 3).

Table 3. Intra-day and inter-day recovery of erlapenem in human plasma and urine

Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Plasma (%)		Urine (%)	
	Intra-day ( $n=5$ )	Inter-day ( $n=25$ )	Intra-day ( $n=5$ )	Inter-day ( $n=25$ )
1	106.0 $\pm$ 0.03	100.6 $\pm$ 0.03	111.2 $\pm$ 0.07	97.0 $\pm$ 0.06
2	99.5 $\pm$ 0.08	99.45 $\pm$ 0.08	100.4 $\pm$ 0.11	101.5 $\pm$ 0.07
40	98.4 $\pm$ 2.46	97.7 $\pm$ 2.46	98.2 $\pm$ 1.89	103.6 $\pm$ 1.97
80	97.1 $\pm$ 3.42	100.3 $\pm$ 3.42	100.2 $\pm$ 2.55	104.6 $\pm$ 5.35

Values are presented as Mean  $\pm$  SD

이때 본 분석방법의 정밀성은 일내, 일간 모두 10% 이하, LOQ에서의 정밀성은 20% 이하였고, LOQ는 혈장과 소변에서 각각 1 µg/mL이었다. 이로부터 혈중 에르타페넴에 대한 상기 LC-MS/MS 분석법은 인체에 대한 생체이용률시험 및 약물상호작용 연구 등 약동학적 특성을 평가하는 임상연구에 이용될 수 있는 충분한 감도, 특이성, 직선성, 정확성 및 정밀성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

#### 4. 결 론

에르타페넴의 인체의 혈장과 소변 중의 LC-MS/MS 분석법을 설정하고 이의 유효성을 검증하는 실험을 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 혈장시료와 소변 시료를 각각 제단백으로 전처리하여 LC-MS/MS 크로마토그램으로 분석한 결과 혈장 성분이나 소변 내부에 있는 여러 가지 간섭물질의 방해없이 에르타페넴 및 내부표준물질을 분리하였다.

2. 혈장시료와 소변 시료로부터 구한 에르타페넴의 검량선은  $r^2 \geq 0.999$ 로 1~100 µg/mL 범위에서 양호한 직선성을 나타내었고 LOQ는 1 µg/mL이었다. 분석법을 검증한 결과 일내 재현성과 일간 재현성의 평균 정밀성과 정확성이 모두 기준값 이내에 들어 이 분석법은 충분한 감도와 정확성 및 정밀성이 있었다.

이 분석법은 이미 보고된 분석법에 비교하여 시료 전처리가 간단하고, 낮은 정량한계를 가지며, 생체시료 분석법으로서의 양호한 특이성, 직선성, 정확성 및 정밀성을 나타내었다. 따라서 LC-MS/MS 분석법을 이용한 인체 혈장과 소변 내의 에르타페넴을 정량한 본 시험법은 적합한 시험법임을 검증하였다. 향후 본 연구에서 정립한 에르타페넴의 생체시료분석법을 약동학 연구에 적용할 수 있을 것으로 예상되고, 약물치료에 유용한 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료되었다.

#### 참고문헌

1. I. Odenholt, *Expert. Opin. Investig. Drugs.*, **10**(6), 1157-1166 (2001).
2. C. G. Zhanel, C. Johanson, J. M. Embil, A. Noreddin, A. Gin, L. Vercaigne and D. J. Hoban, *Expert Rev Anti Infect Ther.*, **3**(1), 23-39 (2005).
3. J. B. Gordien, E. Boselli, C. Fleureau, B. Allaouchiche, G. Janvier, O. Lalaude, M. C. Saux and D. Breilh, *J. Chromatogr. B*, **830**(2), 218-223 (2006).
4. M. L. Hammond, *J. Antimicrob. Chemother.*, **53**, Suppl. S2, ii7-ii9 (2004).
5. O. Burkhardt, H. Derendorf and T. Welte, *Expert. Opin. Pharmacother.*, **8**(2), 237-256 (2007).
6. D. G. Musson, A. Majumdar, K. Birk, S. Holland, P. Wickersham, S. X. Li, G. Mistry, A. Fisher, S. Waldman, H. Greenberg, P. Deutsch and J. D. Rogers. *Antimicrob Agents Chemother.*, **47**(5), 1732-1735 (2003).
7. D. E. Nix, A. K. Majumdar and M. J. DiNubile, *J. Antimicrob. Chemother.*, **53**, Suppl. S2, ii23-ii28 (2004).
8. O. Burkhardt, C. Hafer, A. Langhoff, V. Kaefer, V. Kumar, T. Welte, H. Haller, D. Fliser and J. T. Kielstein, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **24**, 267-271 (2009).
9. D. G. Musson, K. L. Birk, A. M. Cairns, A. K. Majumdar and J. D. Rogers, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, **720**, 99-106 (1998).
10. D. G. Musson, A. Majumdar, S. Holland, K. Birk, L. Xi, G. Mistry, D. Sciberras, J. Muckow, P. Deutsch, J. D. Rogers, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **48**(2), 521-524 (2004).
11. M. Soltani, A. P. MacGowan and A. M. Lovering, *Int. J. Antimicrob. Agents.*, **27**(2), 165-167 (2006).
12. S. Lefevre, N. Venisse, S. Marchand, M. Bachelet and W. Couet., *J. Chromatogr. B*, **862**, 242-245 (2008).