

УДК [543.422.3+543.552]:543.632.6:547.556.3:547.563.13:615.33

## ЗАСТОСУВАННЯ АЗОСПОЛУКИ АМОКСИЦИЛІНУ ІЗ СУЛЬФАНІЛАМІДОМ ДЛЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ МЕТАБОЛІТУ $\beta$ -ЛАКТАМНОГО АНТИБІОТИКА У СЕЧІ

О. Коркуна\*, А. Футрик, К. Слободенюк, Н. Мошкун

*Львівський національний університет імені Івана Франка,  
вул. Кирила і Мефодія, 6, 79005 Львів, Україна  
e-mail: olha.korkuna@lnu.edu.ua*

Амоксицилін (АМ) напівсинтетичний  $\beta$ -лактамний антибіотик групи пеніцилінів, який виводиться, головню, з сечею в незмінному стані. Для спектрофотометричного визначення амоксициліну у сечі було обрано розроблену нами спектрофотометричну методику з використанням реакції азосполучення із сульфаніламідом (САМ) ( $C_{\min} = 0,4$  мкг/мл). Проведено апробацію методики визначення АМ на модельних розчинах сечі здорової людини. Результати досліджень показали, що компоненти сечі значно підвищують світлопоглинання розчину в ділянці, де поглинає продукт азосполучення АМ із діазосіллю САМ. Досліджено, що метод добавок не діє у випадку кількостадійних реакцій. З'ясовано, що компоненти сечі глюкоза, Са(II) та натрій оксалат не заважають визначенню АМ, натомість сечовина та сечова кислота заважають, оскільки остання утворює сполуку із діазотованим САМ.

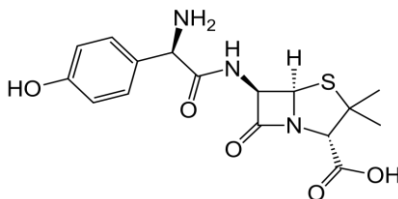
*Ключові слова:* амоксицилін, сульфаніламід, сеча, азосполучення, спектрофотометрія.

DOI: <https://doi.org/10.30970/vch.6501.155>

### 1. Вступ

Лікування антибіотиками потребує контролю за дозуванням лікарського засобу, оскільки недосягнення терапевтичної дози призводить до неефективного лікування, а передозування препаратами негативно впливає на сам організм, який лікують. Крім того, визначення кількості антибіотика в біологічних рідинах з плином часу може допомогти визначити період напіввиведення препарату. У процесі метаболізму лікарських засобів може простежуватись як збільшення, так і зниження активності препарату; підвищення або зниження токсичності фармакологічних середників; активація або дезактивація метаболітів лікарського засобу. У процесі метаболізму більшості лікарських засобів проходить їх перетворення із ліпофільних речовин, які добре реабсорбуються в ниркових каналцях і тому погано виводяться із організму, на гідрофільні полярні сполуки, які не реабсорбуються у каналцях нирок, і тому краще виводяться із організму. Тому, під час терапії антибіотиками потрібно контролювати їх вміст та вміст їхніх метаболітів у біологічних рідинах – крові, сечі.

Нашу увагу привернув один з найпоширеніших у лікарській практиці напівсинтетичний  $\beta$ -лактамний антибіотик групи пеніцилінів – амоксицилін (АМ). Через наявність фенольного гідроксилу АМ може бути азоскладовою у реакції азосполучення:



Препарати на основі АМ застосовують для лікування інфекційно-запальних захворювань, таких як інфекції нижніх та верхніх дихальних шляхів, ЛОР-органів, сечостатевої системи, шлунково-кишкового тракту, жовчних шляхів, шкіри та м'яких тканин, гінекологічних інфекцій [1]. АМ руйнується бета-лактамазами. Він є кислотостійким.

Фармакологічна дія АМ пов'язана із порушенням синтезу клітинної стінки бактерій у фазі активного росту, що викликає загибель мікроорганізмів. Амоксицилін має бактерицидний вплив на ряд грампозитивних та грамнегативних бактерій, а також до деяких спірохет [2]. АМ – це один з найбільш значущих антибіотиків завдяки його ефективності та безпеці у процесі лікування бактеріальних інфекцій. АМ добре всмоктується під час прийому внутрішньо, максимальний вміст антибіотика у крові досягається через 1–2 год після прийому. Період напіввиведення АМ становить 1–2 год, причому антибіотик виводиться, головню, нирками, виділяється з сечею в незмінному стані. Близько 60–80 % прийнятої дози елімінує через 6 год у незмінному стані. Амоксицилін частково виділяється з сечею у вигляді неактивної пеніцилової кислоти в кількостях, еквівалентних 10–25 % початкової дози. Різні дослідження показали, що 50–85 % АМ упродовж 24 год виводяться із сечею. Це дає змогу визначати їх у біологічних рідинах, зокрема у сечі.

Сеча – це рідина, в якій містяться органічні й неорганічні речовини, що виводяться з організму. На 95 % сеча людини складається з води. Містить азотисті продукти розпаду білкових речовин: сечовину, сечову і гіпурову кислоти, креатинін, ксантин, уробілін, індикан, а також солі – переважно хлориди, сульфати і фосфати. *Органічні компоненти сечі:* сечовина (20–35 г/доб), кетонів тіла (<3 г/доб), амінокислоти (1–3 г/доб), креатинін (1–1,5 г/доб), сечова кислота (0,3–2, г/доб), глюкоза (<0,16 г/доб), білок (<0,15 г/доб), гіпурова кислота (0,15 г/доб), креатин (0,05–0,1 г/доб), індикан (5–25 мг/доб), молочна й пірвіноградна кислоти (1,1 і 0,11 ммоль/доб, відповідно). *Неорганічні компоненти:* катіони ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $NH_4^+$ ), аніони ( $Cl^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $HPO_4^{2-}$ ) [3].

Складна матриця цих об'єктів потребує попередньої пробопідготовки для вилучення АМ, зокрема методу екстракційного концентрування, що ускладнює процес проведення аналізу, та потребує використання додаткових органічних реагентів. Для визначення амоксициліну у сечі використовують, головню, високоефективну рідинну хроматографію. В літературі також наявні методики визначення антибіотиків у біологічних рідинах за допомогою спектрофотометрії та деяких підвидів вольтамперометрії. Зокрема, у праці [4] автори пропонують використовувати скануючу

диференційно-імпульсну вольтамперометрію на вуглецевому пастовому електроді, модифікованому поліаніліновою плівкою для визначення амоксициліну в біологічних рідинах у надзвичайно малих кількостях ( $3,5 \cdot 10^{-10}$  моль/л). Відома методика визначення АМ у сечі методом квадратно-хвильової вольтамперометрії з використанням скловуглецевого електрода модифікованого глутаровим альдегідом та поліглутаміновою кислотою [5].

Для своїх досліджень ми обрали розроблену попередньо спектрофотометричну методику визначення амоксициліну за допомогою реакції азосполучення із сульфаніламідом (САМ), яка є досить чутливою. Діазотований під дією натрій нітрити САМ у лужному середовищі утворює забарвлену у жовтий колір сполуку з амоксициліном, яка характеризується новим максимумом світлопоглинання за  $\lambda = 445$  нм [6, 7]. У табл. 1 наведено умови максимального виходу забарвленої сполуки амоксициліну з САМ та її спектрофотометричні характеристики.

Таблиця 1

Умови максимального виходу забарвленої сполуки амоксициліну з САМ та її спектрофотометричні характеристики

Table 1

Conditions for the maximum yield of the amoxicillin colored compound with SAM and its spectrophotometric characteristics

Умови	АМ+САМ
<b>Діазотування</b>	
Концентрація HCl	0,6 М
Концентрація NaNO <sub>2</sub>	> 15-кратний надлишок до концентрації САМ
Тривалість реакції	20 хв при 20 ° С
Порядок додавання реагентів	[кислота + СА + NaNO <sub>2</sub> ] <sub>20 хв</sub>
<b>Азосполучення</b>	
Надлишок САМ	5-кратний надлишок до АМ
Концентрація буферного розчину	0,1 М розчин бури
pH	10,5
Послідовність додавання реагентів	[САМ <sub>діаз.</sub> + АМ +буфер+NaOH]→pH
<b>Характеристика продукту взаємодії АМ+САМ</b>	
Стабільність забарвленого продукту	10 хв
$\epsilon \cdot 10^4, \text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$	1,74
$\lambda_{\text{max}}, \text{нм}$	445

Інтенсивність забарвлення продукту азосполучення пропорційна концентрації амоксициліну. У табл. 2 наведено метрологічні характеристики спектрофотометричного визначення АМ з використанням сульфаніламиду [8].

Таблиця 2

Метрологічні характеристики спектрофотометричного визначення АМ з використанням САМ,  $n = 5$ ;  $P = 0,95$ .  
Умови діазотування:  $C_{\text{HCl}} = 0,6 \text{ M}$ ,  $C_{\text{САМ}} = 1,9 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ;  $C_{\text{NaNO}_2} = 2,9 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ .  
Умови азосполучення:  $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7} = 0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 10,5$ ;  $l = 1 \text{ cm}$

Table 2

Analytical characteristics of AM spectrophotometric determination using SAM,  $n = 5$ ;  $P = 0,95$ .  
Diazotization conditions:  $C_{\text{HCl}} = 0,6 \text{ M}$ ,  $C_{\text{SAM}} = 1,9 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ;  $C_{\text{NaNO}_2} = 2,9 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ .  
Conditions for azo coupling:  $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7} = 0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 10,5$ ;  $l = 1 \text{ cm}$

Лінійність $C_{\text{AM}}$ , мкг/мл	Рівняння графіка $C_{\text{AM}}$ , мкг/мл	$C_{\text{min}}$ , мкг/мл	$C_{\text{H}}$ , мкг/мл	$R$
1,3 – 32,9	$\Delta A_{445} = -0,071 + 0,059 \cdot C$	0,40	1,32	0,9987

## 2. Матеріали та методика експерименту

### 2.1. Реагенти

Усі водні розчини, які використовували в роботі, готували на дистильованій воді.

Розчин амоксициліну готували розчиненням точної наважки реактиву фармакопейної чистоти (не менше 99 %) фірми Sigma-Aldrich в 0,1 М розчині HCl. Робочі розчини зберігали за кімнатної температури в захищеному від світла місці не більше двох днів.

Вихідний стандартний розчин реагенту сульфаниламід у концентрацією  $\sim 10^{-3} \text{ M}$  готували розчиненням точної наважки (реактив фармакопейної чистоти (не менше 99 %) фірми Sigma-Aldrich у 0,1 М розчині натрій гідроксиду.

Робочий розчин хлоридної кислоти готували розведенням концентрованої кислоти кваліфікації “х.ч.”. У роботі використовували розчини натрій гідроксиду, який готували розчиненням реактиву кваліфікації “х.ч.”.

Розчини солей натрій тетраборату та натрій нітриту готували з відповідних реагентів кваліфікації “ч.д.а.”.

### 2.2. Об'єкт досліджень

У роботі використовували сечу здорового добровольця для дослідження впливу компонентів сечі на визначення амоксициліну за реакцією азосполучення із сульфаниламідом, а також для виготовлення модельних сумішей із антибіотиком.

### 2.3. Апаратура

Вимірювання світлопоглинання проводили на скануючому спектрофотометрі SPECORDM-40 (CarlZeissJena, Німеччина) в кюветах  $l = 1 \text{ cm}$ .

Величину pH вимірювали за допомогою pH-150 М (РУП “Гомельський завод вимірювальних приладів”, Білорусь) з використанням комбінованого скляного електрода. Необхідне значення pH середовища створювали за допомогою додавання розчинів хлоридної кислоти чи натрій гідроксиду.

У роботі використовували аналітичну вагу 2-го класу точності марки XAS 100/C (RADWAG, Польща),  $\text{Max} = 100 \text{ g}$ ,  $\text{Min} = 10 \text{ mg}$ ;  $T = -100 \text{ g}$ ;  $d = 0,1 \text{ mg}$ .

#### 2.4. Методика спектрофотометричного визначення амоксициліну за реакцією азосполучення із діазотованим сульфаніламідом

До мірної колби об'ємом 25,0 мл вносять 5,0 мл 0,6 М хлоридної кислоти, додають 2,0 мл  $5,5 \cdot 10^{-3}$  М розчину сульфаніаміду, додають 1,75 мл 0,1 М розчину натрій нітриту. Після перемішування суміш витримують упродовж 20 хв за кімнатної температури, додають аліквоту досліджуваного розчину амоксициліну в межах 1,3–32,9 мкг/мл (кінцева концентрація), вносять 10,0 мл 0,25 М розчину натрій тетраборату, нейтралізують розчином натрій гідроксиду до рН 10,5. Доводять розчин до позначки дистильованою водою. Вимірювання інтенсивності світлопоглинання досліджуваного розчину відносно холостого розчину проводять за  $\lambda = 445$  нм,  $l = 1$  см. Концентрацію АМ знаходять методом градуувального графіка або методом добавок [6].

### 3. Результати досліджень та їх обговорення

На першому етапі досліджень ми отримали спектри світлопоглинання холостого розчину, що містив діазотований сульфаніламід та буру за рН = 10,0 та холостого розчину за наявності сечі здорової людини (рис. 1). Також отримали спектри світлопоглинання розчину азосполуки АМ у чистому розчині та в розчинах, у які ми вводили сечу від 1 до 3 мл сечі у мірні колби об'ємом 25,0 мл.

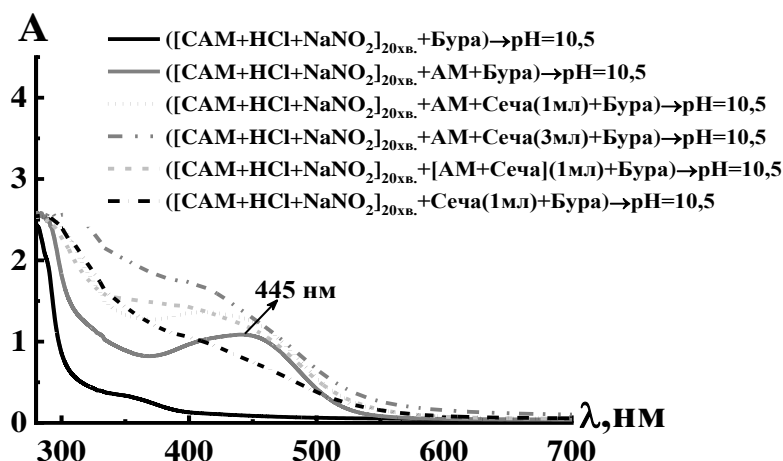


Рис. 1. Спектри світлопоглинання холостого розчину діазотованого САМ та продуктів азосполучення АМ із діазосіллю САМ у розчинах стандартного зразка та модельних розчинах за наявності сечі.

Умови діазотування:  $C_{\text{SAM}} = 4,4 \cdot 10^{-4}$  М,  $C_{\text{HCl}} = 0,6$  М,  $C_{\text{NaNO}_2} = 7,0 \cdot 10^{-3}$  М.

Умови азосполучення:  $C_{\text{AM}} = 4,8 \cdot 10^{-5}$  М,  $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7} = 0,1$  М, рН = 10,5;  $l = 1$  см

Fig. 1. Absorption spectra of a blank solution of diazotized SAM and AM azo coupling products with the SAM diazonium salt in standard sample solutions and model solutions at the urine presence.

Diazotization conditions:  $C_{\text{SAM}} = 4.4 \cdot 10^{-4}$  M,  $C_{\text{HCl}} = 0.6$  M,  $C_{\text{NaNO}_2} = 7.0 \cdot 10^{-3}$  M.

Conditions for azo coupling:  $C_{\text{AM}} = 4.8 \cdot 10^{-5}$  M,  $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7} = 0.1$  M, pH = 10.5;  $l = 1$  cm

Як бачимо зі спектрів світлопоглинання (рис. 1), компоненти сечі, очевидно, самі поглинають світло в спектральному діапазоні 300–500 нм, або взаємодіють із діазотованим сульфаніламідом, утворюючи певні продукти, що поглинають світло в цій ділянці спектра. На спектрі світлопоглинання продукту взаємодії АМ із діазосіллю САМ з'являється максимум світлопоглинання новоутвореної азогрупи за 445 нм. За наявності 1 мл сечі характер спектра не змінюється, зате величина світлопоглинання адитивно зростає. Якщо ж виготовити попередньо модельний розчин, щоб в 1 мл сечі містилась така сама кількість АМ, як у стандартному зразку, то на спектрах взаємодії цієї суміші із діазотованим САМ максимум дещо згладжується і має вигляд, подібний до плеча. Збільшення кількості сечі у три рази порівняно із її кількістю у попередніх експериментах показало незначне збільшення світлопоглинання розчину за довжини хвилі 445 нм.

Для детального вивчення взаємодії ми отримали спектри розчину чистої сечі у лужному середовищі (рис. 2), поступово вводючи всі реагенти, які використовуються у двостадійній реакції, оскільки сеча є полікомпонентним об'єктом, склад якого може коливатися в певних межах. Особливістю експерименту було те, що розчини отриманих сполук фотометрували через 17 год після їхнього приготування.

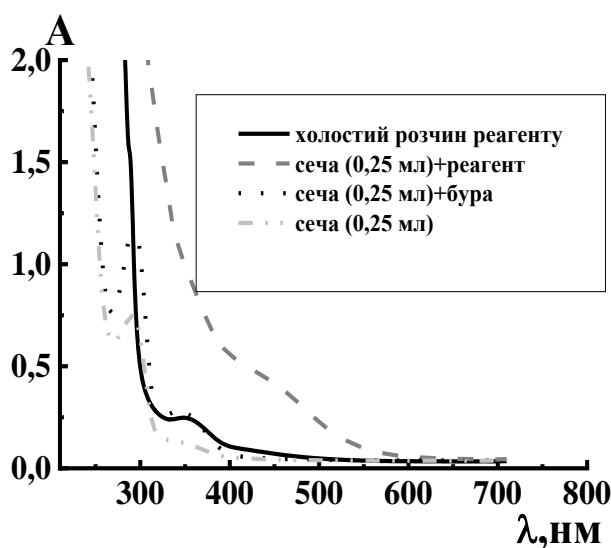


Рис. 2. Спектри світлопоглинання холостого розчину діазотованого САМ та продуктів азосполучення компонентів сечі із діазосіллю САМ і розчинів сечі.

Умови діазотування:  $C_{\text{SAM}} = 4,4 \cdot 10^{-4}$  М,  $C_{\text{HCl}} = 0,6$  М,  $C_{\text{NaNO}_2} = 7,0 \cdot 10^{-3}$  М.

Умови азосполучення:  $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7} = 0,1$  М,  $\text{pH} = 10,5$ ;  $V_{\text{к.би}} = 25,0$  мл;  $l = 1$  см

Fig. 2. Absorption spectra of a blank solution of diazotized SAM and products of urine components azo coupling with a SAM diazonium salt, and urine solutions.

Diazotization conditions:  $C_{\text{SAM}} = 4,4 \cdot 10^{-4}$  М,  $C_{\text{HCl}} = 0,6$  М,  $C_{\text{NaNO}_2} = 7,0 \cdot 10^{-3}$  М.

Conditions for azo coupling:  $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7} = 0,1$  М,  $\text{pH} = 10,5$ ;  $V_{\text{flask}} = 25,0$  ml;  $l = 1$  cm

Як бачимо з рис. 2, на спектрі сечі у лужному середовищі (pH=10,5) немає смуг з максимумами у видимій ділянці спектра, натомість за наявності бури з'являється невеликий максимум за 350 нм. Аналогічний максимум простежуємо також на холостому розчині, який можна пов'язати із утворенням продукту власного азосполучення діазотованого сульфаніламідів, оскільки реакційна суміш перебувала у контакті ~17 год, а концентрація САМ була значною. Зі спектрів також бачимо, що до складу сечі входить якийсь компонент, який реагує із діазотованим сульфаніламідом, що веде до появи широкого плеча світлопоглинання в межах 350–500 нм.

У зв'язку зі значним матричним ефектом ми вирішили провести визначення АМ у сечі методом добавок (рис. 3). Однак варто зазначити, що ми не знали, чи метод добавок спрацює на такій багата стадійній реакції. Тому спочатку застосували метод добавок до чистих модельних розчинів, а тоді вже до суміші, яка містила однакові кількості сечі та розчину амоксициліну.

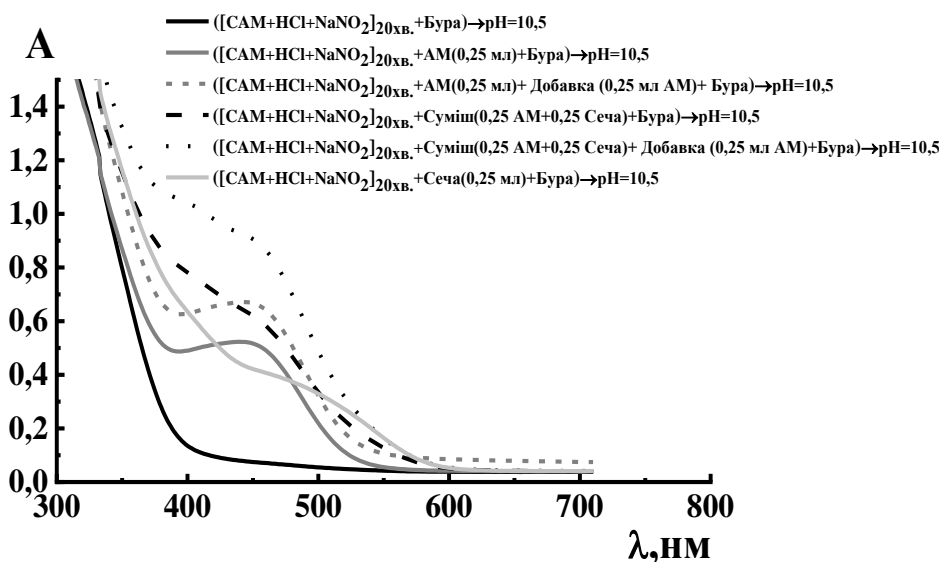


Рис. 3. Спектри світлопоглинання холостого розчину діазотованого САМ та продуктів азосполучення АМ із діазосіллю САМ у розчинах стандартних зразків та модельних розчинах за наявності сечі.

Умови діазотування:  $C_{\text{SAM}} = 4,4 \cdot 10^{-4}$  М,  $C_{\text{HCl}} = 0,6$  М,  $C_{\text{NaNO}_2} = 7,0 \cdot 10^{-3}$  М.

Умови азосполучення:  $C_{\text{AM}} = 1,19 \cdot 10^{-3}$  М,  $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7} = 0,1$  М, pH = 10,5;  $V_{\text{к-би}} = 25,0$  мл;  $l = 1$  см.

Fig. 3. Absorption spectra of a blank solution of diazotized SAM and products of AM azo coupling with a SAM diazonium salt in standard samples solutions and model solutions at the urine presence.

Diazotization conditions:  $C_{\text{SAM}} = 4.4 \cdot 10^{-4}$  M,  $C_{\text{HCl}} = 0.6$  M,  $C_{\text{NaNO}_2} = 7.0 \cdot 10^{-3}$  M.

Conditions for azo coupling:  $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7} = 0.1$  M, pH = 10.5ml;  $V_{\text{flask}} = 25,0$  ml;  $l = 1$  cm.

Як бачимо з рис. 3, вигляд спектрів розчинів продуктів азосполучення діазотованого сульфаніламідів із амоксициліном за наявності сечі сильно спотворюється, на них немає чіткого максимуму за 445 нм, однак у розчині із добавкою світлопоглинання вище. На основі отриманих даних ми визначили вміст амоксициліну, а також вивчили модельні суміші на основі сечі двох різних здорових людей. Отримані дані наведено в табл. 3.

Таблиця 3

Спектрофотометричне визначення амоксициліну у модельних розчинах із додаванням сечі методом добавок.  $n=5$ ;  $P=0,95$

Table 3

Spectrophotometric amoxicillin determination in model solutions with the addition of urine by the standard addition method.  $n=5$ ;  $P=0.95$

Введено АМ, мг	Знайдено АМ, мг		
	Модель стандарту	Модель сечі № 1	Модель сечі № 2 <sup>a</sup>
0,108	0,324	0,214	0,124
		0,071 <sup>b</sup>	0,049 <sup>b</sup>

*a* – розчини фотометрували через 17 год після приготування;

*b* – результати, отримані згідно з градуїваним графіком на фоні сечі.

Як бачимо з табл. 3, метод добавок зовсім не працює на стандартних розчинах, однак на фоні сечі добавка проявляє себе більшою мірою, проте отримані результати все одно не задовільні. Це пов'язано з тим, що на кожному етапі реакції встановлюється рівновага, а отримання проміжних продуктів, очевидно, відбувається не за 100 % виходом. Коли додавати компонент, який може конкурентно взаємодіяти із реагентом, то рівновага порушується і виходи продуктів змінюються. Ну а це відображається на величині світлопоглинання.

Ми спробували підійти до проблеми визначення АМ у сечі з іншого боку і отримати градуїований графік визначення АМ на фоні сечі (рис. 4) і за ним зробити визначення АМ у модельних сумішах на основі сечі.

Як бачимо з рис. 4, нам вдалося отримати пряmolінійний графік залежності світлопоглинання розчинів азосполук АМ із діазосіллу САМ на фоні сечі від концентрації амоксициліну. Результати визначення за цим графіком наведено в табл. 3. Вони вийшли дуже заниженими, а результати, отримані методом добавок, навпаки, значно завищеними, що достатньо складно пояснити.



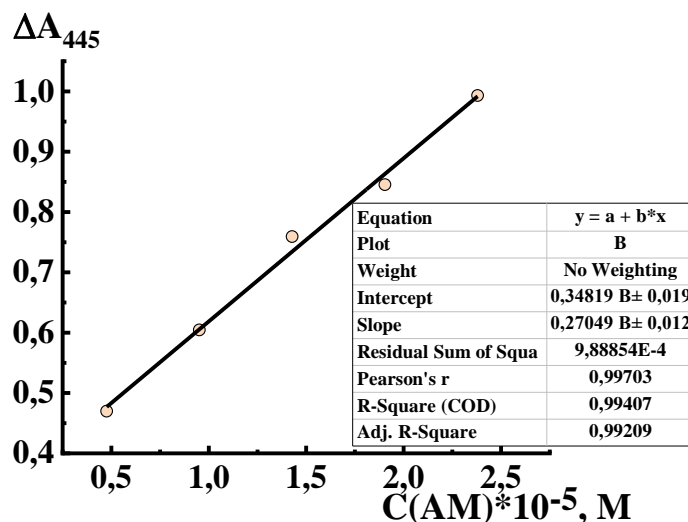


Рис. 4. Графік лінійної залежності аналітичного сигналу від концентрації АМ на фоні сечі ( $V_{\text{сечі}} = 0,25$  мл;  $V_{\text{р-би}} = 25,0$  мл). Умови діазотування:  $C_{\text{SAM}} = 4,4 \cdot 10^{-4}$  М,  $C_{\text{HCl}} = 0,6$  М,  $C_{\text{NaNO}_2} = 7,0 \cdot 10^{-3}$  М. Умови азосполучення:  $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7} = 0,1$  М, pH 10,5;  $l = 1$  см;  $n = 5$ ;  $P = 0,95$

Fig. 4. Calibration curve for AM determination on the urine background ( $V_{\text{urine}} = 0.25$  ml;  $V_{\text{flask}} = 25.0$  ml). Diazotization conditions:  $C_{\text{SAM}} = 4.4 \cdot 10^{-4}$  M,  $C_{\text{HCl}} = 0.6$  M,  $C_{\text{NaNO}_2} = 7.0 \cdot 10^{-3}$  M. Conditions for azo coupling:  $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7} = 0.1$  M, pH=10.5;  $l = 1$  cm;  $n = 5$ ;  $P = 0,95$

Зважаючи на отримані незадовільні результати визначення амоксициліну у сечі, ми спробували повторити визначення методом добавок, однак виготовити наперед модельний розчин сечі із амоксициліном, а також аналогічний розчин із внесеною в нього добавкою (рис. 5). Крім того, ми використали оптимальний надлишок реагенту як для модельного розчину, так і для модельного розчину із добавкою (рис. 6).

Як показали отримані результати (рис. 5), у модельну суміш було внесено 0,217 мг амоксициліну, а знайдено – 0,378 мг. Тобто спосіб уведення в контакт із реагентом уже готової суміші зразка із добавкою не привів до отримання кращих результатів. Це можна пояснити лише неоднорідністю сечі та наявністю в ній білків. Для визначення амоксициліну, очевидно, потрібно застосовувати попереднє осадження білків, тобто попрацювати над пробопідготовкою сечі.

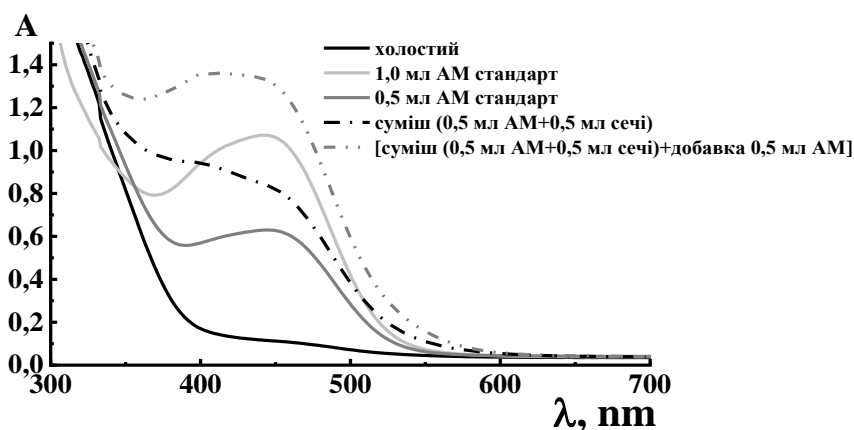


Рис. 5. Спектри світлопоглинання холостого розчину діазотованого САМ та розчинів продуктів азосполучення АМ із діазосільлю САМ у модельних розчинах за наявності сечі та за її відсутності отриманих за методом добавок. Умови діазотування:  $C_{\text{SAM}} = 4,4 \cdot 10^{-4}$  М,  $C_{\text{HCl}} = 0,6$  М,  $C_{\text{NaNO}_2} = 7,0 \cdot 10^{-3}$  М.

Умови азосполучення:  $C_{\text{AM}} = 1,19 \cdot 10^{-3}$  М,  $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7} = 0,1$  М,  $\text{pH} = 10,5$ ;  $V_{\text{к-би}} = 25,0$  мл;  $l = 1$  см

Fig. 5. Absorption spectra of a blank solution of diazotized SAM and solutions of AM azo coupling products with SAM diazonium salt in model solutions in the urine presence and at the urine absence, obtained by the standard addition method. Diazotization conditions:  $C_{\text{SAM}} = 4.4 \cdot 10^{-4}$  M,  $C_{\text{HCl}} = 0.6$  M,  $C_{\text{NaNO}_2} = 7.0 \cdot 10^{-3}$  M.

Conditions for azo coupling:  $C_{\text{AM}} = 1.19 \cdot 10^{-3}$  M,  $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7} = 0.1$  M,  $\text{pH} = 10.5$ ;  $V_{\text{flask}} = 25.0$  ml;  $l = 1$  cm

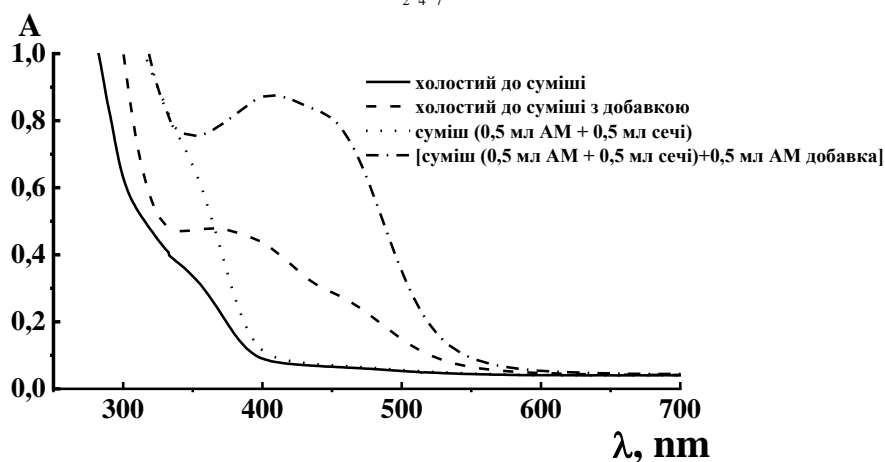


Рис. 6. Спектри світлопоглинання холостих розчинів діазотованого САМ та продуктів азосполучення АМ із діазосільлю САМ у модельних розчинах за наявності сечі та за її відсутності за умови оптимальних надлишків реагенту отриманих за методом добавок.

Умови діазотування:  $C_{\text{SAM}} = 1,2 \cdot 10^{-4}$  М ( $C_{\text{SAM}} = 2,4 \cdot 10^{-4}$  М),  $C_{\text{HCl}} = 0,6$  М,  $C_{\text{NaNO}_2} = 7,0 \cdot 10^{-3}$  М.

Умови азосполучення:  $C_{\text{AM}} = 1,19 \cdot 10^{-3}$  М,  $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7} = 0,1$  М,  $\text{pH} = 10,5$ ;  $V_{\text{к-би}} = 25,0$  мл;  $l = 1$  см

Fig. 6. Absorption spectra of blank solutions of diazotized SAM and products of AM azo coupling with the SAM diazonium salt in model solutions in the urine presence and at the urine absence under the condition of optimal reagent excesses obtained by the standard addition method.

Diazotization conditions:  $C_{\text{SAM}} = 1.2 \cdot 10^{-4}$  M ( $C_{\text{SAM}} = 2.4 \cdot 10^{-4}$  M),  $C_{\text{HCl}} = 0.6$  M,  $C_{\text{NaNO}_2} = 7.0 \cdot 10^{-3}$  M.

Conditions for azo coupling:  $C_{\text{AM}} = 1.19 \cdot 10^{-3}$  M;  $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7} = 0.1$  M,  $\text{pH} = 10.5$ ;  $V_{\text{flask}} = 25.0$  ml;  $l = 1$  cm

Як показали отримані результати, під час використання оптимального 5-кратного надлишку реагенту САМ до АМ у випадку модельної суміші та модельної суміші із добавкою (рис. 6) у модельну суміш було внесено 0,217 мг амоксициліну, а знайдено – 0,097 мг. Тобто навіть однаковий надлишок реагенту щодо вмісту амоксициліну на фоні сечі не дає однаковий вихід продукту азосполучення, на відміну від стандартних розчинів (рис. 7, введено 0,219 мг АМ, знайдено методом добавок 0,220 мг АМ). Це можна пояснити лише тим, що частина реагенту витрачається на реакцію із компонентами сечі і його не вистачає для взаємодії із амоксициліном. Тому важливо провести вивчення впливу компонентів сечі на утворення азосполуки АМ із сульфаніламідом.

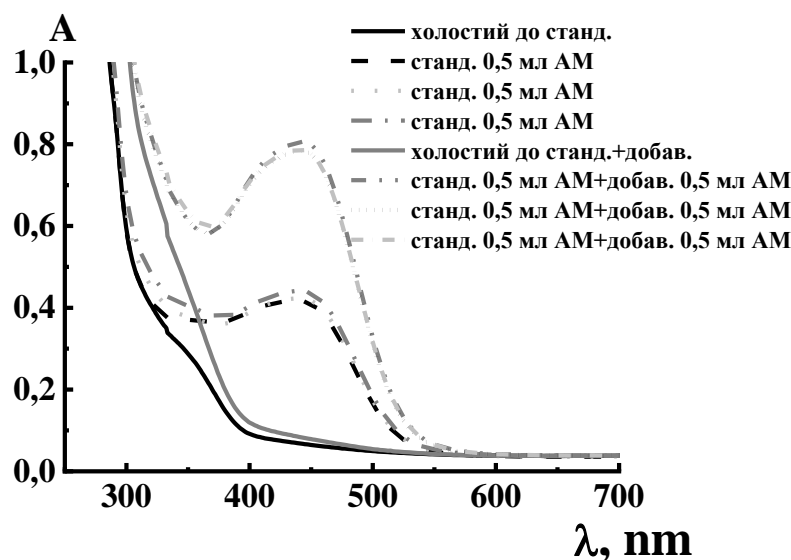


Рис. 7. Спектри світлопоглинання холостих розчинів діазотованого САМ та продуктів азосполучення АМ із діазосіллю САМ у стандартних розчинах без добавки АМ та з добавкою за умови оптимальних надлишків реагента.

Умови діазотування:  $C_{SAM} = 1,2 \cdot 10^{-4} M$  ( $C_{SAM} = 2,4 \cdot 10^{-4} M$ ),  $C_{HCl} = 0,6 M$ ,  $C_{NaNO_2} = 7,0 \cdot 10^{-3} M$ .

Умови азосполучення:  $C_{AM} = 1,2 \cdot 10^{-3} M$ ,  $C_{Na_2B_4O_7} = 0,1 M$ ,  $pH = 10,5$ ;  $V_{к-би} = 25,0$  мл;  $l = 1$  см.

Fig. 7. Absorption spectra of blank solutions of diazotized SAM and AM azo coupling products with the SAM diazonium salt in standard solutions without AM additive and with the AM additive under the condition of optimal reagent excesses.

Diazotization conditions:  $C_{SAM} = 1,2 \cdot 10^{-4} M$  ( $C_{SAM} = 2,4 \cdot 10^{-4} M$ ),  $C_{HCl} = 0,6 M$ ,  $C_{NaNO_2} = 7,0 \cdot 10^{-3} M$ .

Conditions for azo coupling:  $C_{AM} = 1,2 \cdot 10^{-3} M$ ;  $C_{Na_2B_4O_7} = 0,1 M$ ,  $pH = 10,5$ ;  $V_{disk} = 25,0$  ml;  $l = 1$  cm.

Наступним етапом стало дослідження впливу компонентів сечі на реакцію азосполучення амоксициліну із діазотованим сульфаніламідом. Сеча є полікомпонентним зразком, склад якої є індивідуальним для кожного пацієнта і залежить від часу доби, харчування. Нам вдалося дослідити вплив п'ятьох сполук: сечовини, глюкози, натрій оксалату, сечової кислоти та кальцію (II) хлориду (рис. 8 та 9).

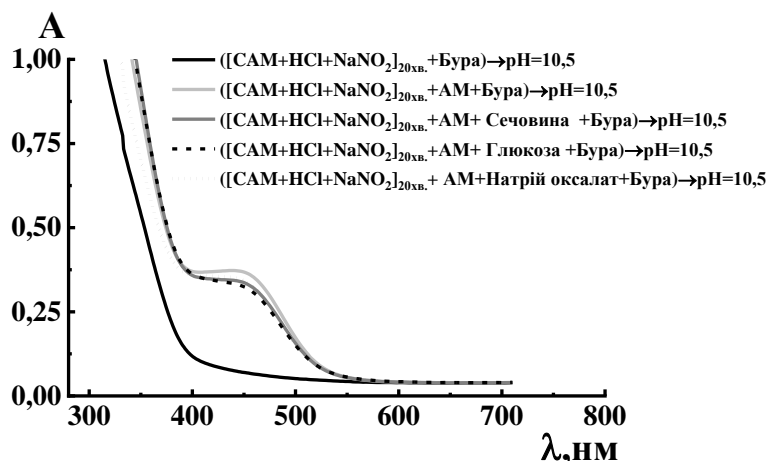


Рис. 8. Спектри світлопоглинання холостого розчину діазотованого САМ та продуктів азосполучення АМ із діазосіллю САМ за наявності сторонніх речовин. Умови діазотування:  $C_{\text{CAM}} = 4,4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ,  $C_{\text{HCl}} = 0,6 \text{ M}$ ,  $C_{\text{NaNO}_2} = 7,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ . Умови азосполучення:  $C_{\text{AM}} = 1,19 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ,  $C_{\text{сеч.}} = 1,2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ,  $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7} = 0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 10,5$ ;  $V_{\text{к-би}} = 25,0 \text{ мл}$ ;  $l = 1 \text{ см}$

Fig. 8. Absorption spectra of a blank solution of diazotized SAM and products of AM azo coupling with the SAM diazonium salt in the presence of extraneous substances. Diazotization conditions:  $C_{\text{SAM}} = 4,4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ,  $C_{\text{HCl}} = 0,6 \text{ M}$ ,  $C_{\text{NaNO}_2} = 7,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ . Conditions for azo coupling:  $C_{\text{AM}} = 1,19 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ,  $C_{\text{sub.}} = 1,2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ,  $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7} = 0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 10,5$ ;  $V_{\text{flask}} = 25,0 \text{ ml}$ ;  $l = 1 \text{ cm}$

Як бачимо із рис. 8, наявність сечовини, глюкози та натрій оксалату не впливають на характер спектра, однак впливають на його висоту. Детальніше результати досліджень наведено в табл. 4.

Як бачимо із рис. 9, за наявності іонів кальцію (II) спектри світлопоглинання азосполуки ідентичні до спектрів світлопоглинання азопродукту у чистому стандартному розчині амоксициліну, тому зрозуміло, що  $\text{Ca(II)}$  не взаємодіє ні з реагентом, ні з амоксициліном за умов експерименту. Щодо сечової кислоти, то за умов експерименту вона реагує із діазосіллю САМ; на спектрах простежується максимум світлопоглинання за  $\lambda = 370 \text{ нм}$ .

Однак за співвідношення АМ : Сеч. кисл. = 1:1 сечова кислота визначення АМ не заважає, а за збільшення її кількості світлопоглинання азосполуки АМ суттєво знижується. Це може бути пов'язано із тим, що реагент витрачається як на взаємодію із АМ, так і з сечовою кислотою, і, можливо якщо збільшити надлишок реагенту, то заважаючий вплив сечової кислоти буде зменшений. У сечі така кількість сечової кислоти, що відповідає відношенню АМ : Сеч. кисл. = 1:19 за умов нашого експерименту; за таких надлишків сечової кислоти азосполука із АМ практично не утворюється, очевидно, що сполука із сечовою кислотою утворюється швидше, а для амоксициліну реагенту вже не вистачає. Детальніше результати досліджень селективності наведено в табл. 4.

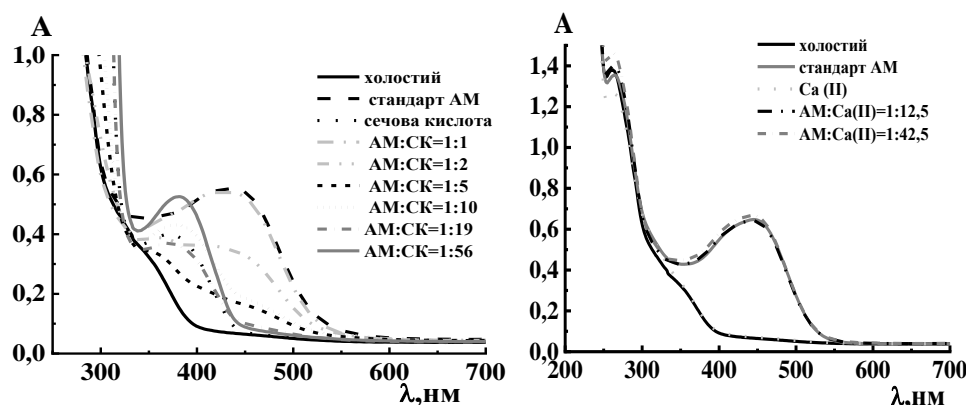


Рис. 9. Спектри світлопоглинання холостого розчину діазотованого SAM та продуктів азосполучення AM із діазосілью SAM за наявності компонентів сечі.

Умови діазотування:  $C_{SAM} = 4,4 \cdot 10^{-4}$  М,  $C_{HCl} = 0,6$  М,  $C_{NaNO_2} = 7,0 \cdot 10^{-3}$  М.

Умови азосполучення:  $C_{AM} = 2,4 \cdot 10^{-5}$  М,  $C_{сеч. \text{кисл.}} = 4,5 \cdot 10^{-4}$  М,  $C_{Ca(II)} = 4,5 \cdot 10^{-4}$  М,  $C_{Na_2B_4O_7} = 0,1$  М, pH = 10,5;  $l = 1$  см

Fig. 9. Absorption spectra of a blank solution of diazotized SAM and AM azo coupling products with the SAM diazonium salt in the presence of urine components.

Diazotization conditions:  $C_{SAM} = 4.4 \cdot 10^{-4}$  M,  $C_{HCl} = 0.6$  M,  $C_{NaNO_2} = 7.0 \cdot 10^{-3}$  M.

Conditions for azo coupling:  $C_{AM} = 2.4 \cdot 10^{-5}$  M,  $C_{uric. \text{acid}} = 4.5 \cdot 10^{-4}$  M,  $C_{Ca(II)} = 4.5 \cdot 10^{-4}$  M,  $C_{Na_2B_4O_7} = 0.1$  M, pH = 10.5;  $V_{flask} = 25.0$  ml;  $l = 1$  cm

Таблиця 4

Склад сечі та допустима концентрація її компонентів під час визначення амоксициліну у сечі.

Умови діазотування:  $C_{SAM} = 4,4 \cdot 10^{-4}$  М,  $C_{HCl} = 0,6$  М,  $C_{NaNO_2} = 7,0 \cdot 10^{-3}$  М.

Умови азосполучення:  $C_{AM} = 1,19 \cdot 10^{-5}$  М,  $C_{Na_2B_4O_7} = 0,1$  М, pH = 10,5;  $l = 1$  см;  $n = 5$ ;  $P = 0,95$

Table 4

The urine composition and the allowable urine components concentration at the amoxicillin determination in urine. Diazotization conditions:  $C_{AM} = 4.4 \cdot 10^{-4}$  M,  $C_{HCl} = 0.6$  M,  $C_{NaNO_2} = 7.0 \cdot 10^{-3}$  M.

Conditions for azo coupling:  $C_{AM} = 1.19 \cdot 10^{-5}$  M,  $C_{Na_2B_4O_7} = 0.1$  M, pH = 10.5;  $l = 1$  cm;  $n = 5$ ;  $P = 0.95$

	Компоненти сечі				
	Сечовина	Глюкоза	Натрій оксалат	Сечова кислота	Ca(II)
Концентрація в сечі <sup>*</sup> , М	0,5	$8 \cdot 10^{-4}$	$3,3 \cdot 10^{-6}$	$1,2 \cdot 10^{-2}$	$7,5 \cdot 10^{-3}$
Максимально допустима концентрація, М	$1,2 \cdot 10^{-4}$ Зважає	$1 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-4}$	$2,4 \cdot 10^{-5}$	$2,2 \cdot 10^{-2}$

\*Розрахунки концентрації компонентів сечі робили, зважаючи на їхню середньодобову кількість у сечі. Здорова людина виділяє за добу 0,8–1,5 л сечі, ми робили розрахунок на 1 л сечі.

Як бачимо з даних табл. 4, іони Ca(II) не заважають визначенню АМ, глюкоза та натрій оксалат заважає в значно більших кількостях за ті, які містяться у сечі, а сечовина та сечова кислота заважає, оскільки понижує сигнал. Сечовина взаємодіє із непрореагованим натрій нітритом, тим самим унеможлиблює процес нітрозуювання, яке наявне у випадку чистих стандартних розчинів АМ. Нітروزований продукт має вище світлопоглинання. А сечова кислота утворює сполуку із діазотованим САМ і за достатньої кількості реагенту простежуватиметься адитивне світлопоглинання цієї сполуки та азосполуки амоксициліну, що ми спостерігали на модельному зразку сечі. Серед компонентів сечі подібний ефект можна очікувати ще від індекану та триптофану, однак ми їх впливу не досліджували.

Отже, в підсумку можна стверджувати, що потрібно дослідити різні способи пробопідготовки сечі та селективність за наявності ще кількох компонентів сечі, які здатні реагувати із діазотаним сульфаніламідом для того, щоб запропонувати методику визначення АМ у такому складному об'єкті, як сеча.

#### 4. Висновки

Для спектрофотометричного визначення  $\beta$ -лактамного антибіотику амоксициліну у біологічних рідинах було обрано реакцію азосполучення із сульфаніламідом. Обрана методика характеризується достатньою чутливістю, що передбачає можливе її застосування для визначення малих кількостей АМ у сечі. Проведено апробацію методики визначення АМ на модельних розчинах сечі здорової людини. Результати досліджень показали, що компоненти сечі значно підвищують світлопоглинання розчину в ділянці, де поглинає продукт азосполучення АМ із діазосіллю САМ. Досліджено, що метод добавок не працює у випадку систем кількостадійних реакцій. З'ясовано, що компоненти сечі глюкоза, Ca(II) та натрій оксалат не заважають визначенню амоксициліну, натомість сечовина та сечова кислота заважає, остання утворює сполуку із діазотованим сульфаніламідом.

#### 5. Подяки

Цю роботу частково підтримано Фондом Сімонса ("Presidential Discretionary–Ukraine Support Grants"; Award Number: 1037973).

1. Amoxicillin / Normative–directive documents of the Ministry of Health of Ukraine. [Cit. 2023, October 29]. Access mode : <https://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=8076> (in Ukrainian).
2. *Chekman I. S. Gorchakova N. O., Kazak L. I.* [and others]. Pharmacology: textbook for students of the medical faculties. Vinnytsia: Nova Kniga, 2017. 784 p. (in Ukrainian).
3. *Kozinets G. I.* Interpretation of blood and urine tests and their clinical significance. Moscow: Triada-X, 1998. 104 p. (in russian).
4. *Brahman Pr. K., Dar R. Ah., Pitre Kr. S.* Conducting polymer film based electrochemical sensor for the determination of amoxicillin in micellar media // Sens. Actuators, B. 2012. Vol. 176. P. 207–314. DOI: [10.1016/j.snb.2012.09.007](https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.09.007)

5. Santos D. P., Bergamini M. F., Valnice M., Zanoni B. Voltammetric sensor for amoxicillin determination in human urine using polyglutamic acid/glutaraldehyde film // *Sens. Actuators, B.* 2008. Vol. 133, No. 2. P. 398–403. DOI: [10.1016/j.snb.2008.02.045](https://doi.org/10.1016/j.snb.2008.02.045)
6. Kostiv O., Korkuna O., Rydchuk P. Development and validation of the simple and sensitive spectrophotometric method of amoxicillin determination in tablets using sulphanilamides // *Acta Chim. Slov.* 2020, Vol. 67, No. 1. P. 23–35. DOI: [10.17344/acsi.2019.5041](https://doi.org/10.17344/acsi.2019.5041)
7. Kostiv O., Rydchuk P., Korkuna O., Khavchuk M. A new approach for the voltammetric determination of amoxicillin in the dosage form using azo coupling reaction with sulphanilamide // *Electroanalysis.* 2021. Vol. 33, No. 10. P. 2169–2179. DOI: <https://doi.org/10.1002/elan.202100072>
8. Kostiv O. I., Korkuna O. Ya. Azo compound reaction in the analysis of  $\beta$ -lactam and tetracycline antibiotics // *Coll. Abstr. XVIII Sciences Conf. "Lviv chemical readings – 2021"*, Lviv, 31 May – 2 June 2021. Lviv: Publishing House from A to Z, 2021. P. U19 (in Ukrainian).

## THE USE OF THE AZO COMPOUND OF AMOXICILLIN WITH SULFONAMIDE FOR SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF THE $\beta$ -LACTAM ANTIBIOTIC METABOLITE IN URINE

O. Korkuna\*, A. Futryk, K. Slobodenyuk, N. Moshkun

*Ivan Franko National University of Lviv,  
Kyryla i Mefodiya Str., 6, 79005 Lviv, Ukraine  
\*e-mail: olha.korkuna@lnu.edu.ua*

Treatment with antibiotics requires control over the drug dosage strength since not reaching the therapeutic concentration can lead to ineffective treatment, and drug overdose can cause toxic effects and adverse reactions on the human organism. Such control can be carried out by monitoring the content of antibiotics or their metabolites in biological fluids.

For the study, we chose one of the most common in medical practice, the  $\beta$ -lactam antibiotic of the penicillin group, amoxicillin (AM). A feature of  $\beta$ -lactam antibiotics is that they are practically not metabolized in the body, which makes it possible to determine them in biological fluids, such as blood, urine, and saliva. According to the literature data, the biological half-life of AM is 1–2 hours, and about 60–80 % of the dose is eliminated after 6 hours, mainly through the kidneys, excreted in the urine unchanged, partially excreted in the form of inactive penicillic acid in quantities, equivalent to 10–25 % of the initial dose. Chromatographic methods are usually used to quantify the AM amount in biological fluids. Still, voltammetric and spectrophotometric determination methods are also used according to the literature data, which are more rapid, simpler, and accessible. However, the complex matrix of these objects requires preliminary sample preparation for AM extraction.

For the amoxicillin determination in the urine, the spectrophotometric method developed by us previously using the reaction of azo coupling with sulphanilamide (SAM) was chosen.

The technique is based on the SAM diazotization by the action of sodium nitrite in a medium of 0.6 M hydrochloric acid and subsequent azo coupling with AM in an alkaline medium at pH = 10.5 at the availability of a 0.1 M sodium tetraborate solution, with the formation of a yellow-colored azo compound, which is characterized by a new absorbance maximum at  $\lambda = 445$  nm (LOD = 0.4  $\mu\text{g/ml}$ ).

To study the urine components' influence on azo coupling reaction, we introduced the urea aliquot into the reagent solution, and a broad absorbance shoulder in the range of 350–500 nm appeared on the diazotized SAM absorption spectra in the presence of urine at pH = 10.5. The urine components at such reaction conditions do not absorb light. It is indicated that some of the urine components react with diazotized SAM. The attempt to carry out the AM determination by the standard addition method was not successful. This is because equilibrium is established at each stage of the two-stage reaction, and the obtaining of intermediate products does not occur with 100 % yield. When adding a component that can competitively interact with the reagent, the equilibrium will be shifted, and the yields of the reaction products will change, and this is reflected in the absorbance value. It is shown that the standard addition method does not work with pure AM solutions either. We also used the methods of the calibration for AM amount in the concentration range of  $5 \cdot 10^{-6}$ – $2.5 \cdot 10^{-5}$  M on the urine background. Since urea with a concentration of 0.5 M is the main component of urine, it destroys sodium nitrite, which, except for the SAM diazotization, participates in the nitrosation of the AM azo product. Therefore, for SAM diazotization, larger amounts of sodium nitrite should be used (they depend on the urine aliquot) than in the studies of pure AM solutions. However, the disadvantage of this method is that the urine composition of the different patients can differ significantly.

It was found that such components of urine as glucose, Ca(II), and sodium oxalate do not influence the AM determination but urea and uric acid interfere because they react with diazotized SAM.

*Keywords:* amoxicillin, sulphanilamide, urine, azo compound, spectrophotometry.

Стаття надійшла до редколегії 31.10.2023

Прийнята до друку 09.09.2024