

УДК [543.422.3]:543.632.6:547.556.3:615.357

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ЦЕФТАЗИДИМУ У СЕЧІ ЗА РЕАКЦІЮ АЗОСПОЛУЧЕННЯ ІЗ РЕЗОРЦИНОМ

О. Коркуна*, Н. Лукашик

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

Цефтазидим (Цефт) – напівсинтетичний β -лактамний антибіотик групи цефалоспоринів, який виводиться головню з сечею у незмінному стані. Для спектрофотометричного визначення цефтазидиму у сечі ми обрали розроблену нами спектрофотометричну методику з використанням реакції азосполучення із резорцином (Рез) ($C_{\min} = 1,54 \cdot 10^{-6} \text{ М}$). Проведено апробацію методики визначення ЦЕФТ на модельних розчинах сечі здорової людини. Результати досліджень показали, що величина світлопоглинання азосполуки ЦЕФТ за наявності сечі має значно нижче значення, що зумовлене здатністю діазотованого ЦЕФТ вступати в реакцію із деякими компонентами сечі (продукти взаємодії в досліджуваній ділянці не поглинають), внаслідок цього вихід азопродукту ЦЕФТ із Рез суттєво зменшується. Метод добавок у випадку визначення цефтазидиму дав гірші результати, ніж метод градувального графіка.

Ключові слова: цефтазидим, резорцин, сеча, азосполучення, спектрофотометрія.

DOI: <https://doi.org/10.30970/vch.6601.157>

1. Вступ

Антибіотикотерапія потребує ретельного моніторингу дозування препарату, оскільки недостатня доза може призвести до неефективного лікування, тоді як надмірне дозування може завдати шкоди самому організму. Відстеження рівня антибіотиків у біологічних рідинах на різних етапах лікування допомагає визначити період напіввиведення препарату, що є важливим для визначення оптимального режиму прийому. У процесі метаболізму ліків може простежуватися як зростання, так і зниження активності діючої речовини, зміна токсичності або перетворення активних метаболітів на неактивні форми. Більшість ліків у процесі метаболізму перетворюється з ліпофільних речовин, які легко реабсорбуються в ниркових канальцях, на гідрофільні полярні сполуки, що погано реабсорбуються та легше виводяться з організму. Тому під час антибіотикотерапії важливо контролювати концентрацію антибіотиків та їх метаболітів у крові та сечі, що допомагає підвищити ефективність лікування та уникнути небажаних побічних ефектів.

Додатково до основного моніторингу рівня антибіотиків важливо брати до уваги індивідуальні особливості пацієнта, зокрема, вік, масу тіла, функцію нирок та печінки, а також наявність супутніх захворювань. Ці фактори можуть впливати на швидкість метаболізму та виведення препарату, тому оптимальне дозування може відрізнятися навіть під час схожих захворювань.

Крім того, варто взяти до уваги можливість розвитку резистентності мікроорганізмів до антибіотика, особливо за тривалого застосування.

Щоб уникнути цього, антибіотики часто поєднують або чергують з іншими протимікробними засобами для зниження ризику адаптації бактерій.

Деякі антибіотики також мають вузький терапевтичний індекс, що означає, що навіть невелике перевищення дози може викликати серйозні побічні ефекти. У таких випадках контроль концентрації препарату у крові є особливо важливим, оскільки допомагає підтримувати ефективну концентрацію без ризику токсичності. Останніми роками в рамках персоналізованої медицини активно впроваджуються фармакогенетичні дослідження, які дають змогу визначити індивідуальну чутливість пацієнта до певних антибіотиків на основі його генетичного профілю. Це особливо корисно для пацієнтів із підвищеним ризиком побічних реакцій, або тих, хто має стійкі інфекції, не піддаються лікуванню стандартними препаратами [1].

Отже, ефективна антибіотикотерапія передбачає комплексний підхід, який включає регулярний контроль рівня препарату в біологічних рідинах, адаптацію дози відповідно до індивідуальних характеристик пацієнта, запобігання розвитку резистентності та, за можливості, використання фармакогенетичних методів.

До найпоширеніших антибіотиків на фармацевтичному ринку України належать представники класу β -лактамів: амоксицилін, цефтріаксон та цефтазидим (ЦЕФТ). Раніше ми опублікували результати визначення амоксициліну у сечі методом спектрофотометрії за допомогою реакції азосполучення [2]. У цій праці свою увагу ми сконцентрували на розробленні методики визначення цефтазидиму у сечі.

Цефтазидим – це бактерицидний цефалоспориновий антибіотик (ЦА) третього покоління, механізм дії якого пов'язаний з порушенням синтезу стінок бактеріальної клітини [3].

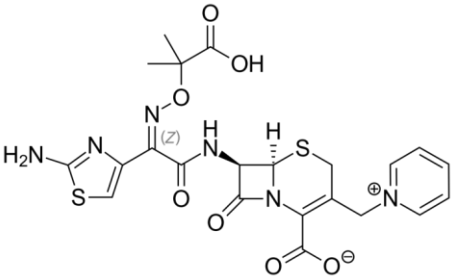
Структуру та детальнішу інформацію про цей антибіотик наведено у табл. 1. Через наявність первинної ароматичної аміногрупи в тіазолільному кільці ЦЕФТ, після його діазотування може виступати як діазокомпонента у реакції азосполучення.

Таблиця 1

Фізико-хімічні характеристики цефтазидиму

Table 1

Physicochemical characteristics of ceftazidime

Антибіотик	Хімічна назва за УРАС, характеристики
Цефтазидим <i>Брутто-формула:</i> $C_{22}H_{22}N_6O_7S_2$. <i>Молекулярна маса</i> – 546,58 г/моль. 	((Піридин 1-[[7-[[2-аміно-4-тіазоліл) [(1-карбокси-1-метилетокси) іміно] ацетил] аміно]-2-карбокси-8-оксо-5-тіа-1-азабіцикло [4.2.0] окт-2-ен-3-ил] метил)-, гідроксид внутрішня сіль пентагідрат [6R-[6альфа, 7бета (Z)]]]. CAS індекс: Цефтазидим 72558-82-8. Порошок білого кольору із специфічним запахом. Розчинність: у воді 5 мг/мл, у етанолі 1 мг/мл, малорозчинний у ацетонітрилі. $\log K_{ow} = 1,60$ [4, 5].

Механізм дії ЦЕФТ пов'язаний з пригніченням активності ферменту траспептидази та порушенням біосинтезу пептидоглікану клітинної стінки мікроорганізмів. Цефалоспорины третього покоління володіють бактерицидним ефектом проти великої кількості грампозитивних (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, β -гемолітичних стрептококів групи А, (*S.pyogenes*), стрептококів групи В (*S.agalactiae*), *Streptococcus viridans*, *Streptococcus bovis*, неентерококових стрептококів групи D), грамнегативних (*Haemophilus influenzae*, *Escherichiacoli*, *H. parainfluenzae*, *Klebsiella*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Providencia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*), аеробних (*Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseriameningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*) та облигатних анаеробних (*Peptococcus*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium*) бактерій.

ЦЕФТ не застосовують внутрішньо, тому що він швидко руйнується під впливом шлункового соку. Антибіотик цефтазидим не метаболізує в організмі.

Після парентерального введення досягається висока та стійка концентрація цефтазидиму у сироватці крові. Період напіввиведення становить приблизно 2 год. Препарат виводиться у незміненому стані, в активній формі із сечею шляхом гломерулярної фільтрації; приблизно 80–90 % дози виводиться із сечею протягом 24 год. До 1 % препарату виводиться з жовчю, що значно обмежує кількість препарату, яка потрапляє у кишечник [6]. Це дає змогу визначати ЦЕФТ у біологічних рідинах, зокрема у сечі.

Сеча – це рідина, що містить органічні та неорганічні речовини, які виводяться з організму. Вона складається на 95 % з води. У сечі наявні азотовмісні продукти розпаду білків, такі як сечовина, сечова та гіпурова кислоти, креатинін, ксантин, уробілін, індикан, а також солі, здебільшого хлориди, сульфати та фосфати. До органічних складових сечі належать: сечовина (20–35 г/добу), кетоніві тіла (<3 г/добу), амінокислоти (1–3 г/добу), креатинін (1–1,5 г/добу), сечова кислота (0,3–2 г/добу), глюкоза (<0,16 г/добу), білок (<0,15 г/добу), гіпурова кислота (0,15 г/добу), креатин (0,05–0,1 г/добу), індикан (5–25 мг/добу), молочна і піровиноградна кислоти (1,1 та 0,11 ммоль/добу, відповідно). Неорганічні компоненти сечі утворені катіонами (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+) і аніонами (Cl^- , SO_4^{2-} , HPO_4^{2-}) [7].

Складна матриця цих об'єктів потребує попередньої пробопідготовки для вилучення ЦЕФТ, що ускладнює процес проведення аналізу. Для визначення залишків цефтазидиму у біологічних тканинах та фізіологічних рідинах найчастіше використовують високоефективну рідинну хроматографію, особливо в поєднанні із різними різновидами мас-спектрометрії. В літературі також трапляються методики визначення цефалоспоринових антибіотиків в біологічних рідинах за допомогою імуно-ферментного аналізу та спектрофотометрії. Зокрема, у праці [8] запропоновано спектрофотометричну методику визначення цефтазидиму у сечі за допомогою вимірювання світлопоглинання комплексної сполуки ЦЕФТ із $Pd(II)$ за 330 нм. Відома методика СФ визначення ЦЕФТ у сечі [9] за допомогою реакції Душмана (взаємодія із йодидом і йодатом калію). Після додавання цих реагентів до зразка утворюється жовтий комплекс, світлопоглинання якого визначають при 352 нм. У праці [10] запропоновано СФ метод на основі здатності цефтазидиму відновлювати іони Ag^+ до наночастинок срібла ($Ag-NP$) за наявності полівінілпіролідон (PVP) як стабілізуючого агента, що створює дуже інтенсивний поверхневий плазмонний резонансний пік $Ag-NPs$ ($\lambda_{max} = 410–430$ нм).

Для своїх досліджень ми обрали розроблену попередньо спектрофотометричну методику визначення цефтазидиму за допомогою реакції азосполучення із резорцином (Рез), яка є досить чутливою. Цефалоспориновий антибіотик цефтазидим (ЦЕФТ) під дією натрій нітриту у кислому середовищі утворює високореакційноздатну діазосіль, яка здатна до власного азосполучення. Проте використання концентрованої 12,0 М хлоридної кислоти для діазотування цефтазидиму перешкоджає утворенню цього продукту. У процесі досліджень було з'ясовано, що під час взаємодії діазосолі цефтазидиму з лужним розчином резорцину (Рез) утворюється забарвлена у червоний колір сполука, яка характеризується появою нового максимуму світлопоглинання за $\lambda_{\text{max}} = 519$ нм (рис. 1) [11, 12].

У табл. 2 наведено умови максимального виходу забарвленої сполуки діазосолі цефтазидиму з фенольним реагентом резорцином та її спектрофотометричні характеристики.

З'ясовано, що аналітичний сигнал у розчинах азосполук у системі ЦЕФТ–Рез у процесі визначення цефтазидиму лінійно залежить від концентрації аналіту у розчині [11, 12]. У табл. 3 наведено метрологічні характеристики спектрофотометричного визначення ЦЕФТ за допомогою резорцину.

Таблиця 2

Умови максимального виходу забарвленої сполуки цефтазидиму з резорцином та її спектрофотометричні характеристики

Table 2

Conditions for the maximum yield of the ceftazidime colored compound with resorcinol and its spectrophotometric characteristics

λ_{max} , нм	$\varepsilon \cdot 10^{-3}$, $\frac{\text{л} \cdot \text{моль}^{-1}}{\text{см}}$	Ант:Реаг, стабільність аналітичного сигналу	Умови	
			Діазотування	Азосполучення
519	$6,70 \pm 0,13$	1:1 1 год	$C(\text{HCl}) = 12 \text{ M}$, (≥ 10 -кратний надл. NaNO_2 до ЦЕФТ) $t_{\text{діазот.}} = 3 \text{ хв}$ при 20°C	10-кратний надл. Рез*

*Розчини реагенту готували на 4М NaOH для того, щоб у кінцевому об'ємі $C(\text{NaOH})$ становила 0,16 М.

Таблиця 3

Метрологічні характеристики спектрофотометричного визначення ЦЕФТ з використанням Рез, $n = 5$, $P = 0,95$. Умови діазотування: $C_{HCl} = 12,0$ М, $C_{NaNO_2} = 2,1 \cdot 10^{-3}$ М, $t_{diazot.} = 3$ хв.

Умови азосполучення: $C_{Res} = 1,2 \cdot 10^{-3}$ М, $C_{NaOH} = 0,16$ М; $l = 1$ см.

Table 3

Analytical characteristics of CEFT spectrophotometric determination using Res, $n = 5$, $P = 0.95$.

Diazotization conditions: $C_{HCl} = 12.0$ M, $C_{NaNO_2} = 2.1 \cdot 10^{-3}$ M, $t_{diazot.} = 3$ min.

Conditions for azo coupling: $C_{Res} = 1.2 \cdot 10^{-3}$ M, $C_{NaOH} = 0.16$ M; $l = 1$ cm

Лінійність C_{CEFT} мкг/мл	Рівняння графіка C мкг/мл	C_{min} , М (мкг/мл)	C_H , М (мкг/мл)	R
2,75–185,5	$\Delta A_{519} = 0,027 + 0,007 \cdot C$	$1,54 \cdot 10^{-6}$ (0,84)	$4,65 \cdot 10^{-6}$ (2,54)	0,9993

2. Матеріали та методика експерименту

Реагенти

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

Розчин цефтазидиму готували розчиненням точної наважки реактиву цефтазидиму пентагідрату фармакопейної чистоти (вміст у перерахунку на безводний 88,2 %) фірми Sigma-Aldrich у воді. Розчин зберігали за кімнатної температури в захищеному від світла місці не більше двох днів.

Вихідні стандартні розчини реагенту резорцину готували розчиненням точної наважки реагенту фірми Sigma-Aldrich кваліфікації “ч.д.а.” (не менше 99 %) у 4 М розчині натрій гідроксиду безпосередньо перед виконанням експерименту.

Розчин натрій нітриту готували розчиненням точної наважки реактиву кваліфікації “ч.д.а.” у дистильованій воді.

Робочі розчини хлоридної кислоти та натрій гідроксиду готували розведенням концентрованої кислоти та лугу кваліфікації “х.ч.” у дистильованій воді.

Об'єкт досліджень

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

Апаратура

Вимірювання світлопоглинання проводили на скануючому спектрофотометрі SPECORDM-40 (Carl Zeiss Jena, Німеччина) в кюветах $l = 1$ см.

У роботі використовували аналітичну вагу 2-го класу точності марки XAS 100/C (RADWAG, Польща), $M_{\max} = 100$ г, $M_{\min} = 10$ мг; $T = -100$ г; $d = 0,1$ мг.

Методика спектрофотометричного визначення цефтазидиму за реакцією азосполучення із резорцином

До мірної колби об'ємом 25,0 мл додають аліквоту досліджуваного розчину цефтазидиму в межах 2,75–185,5 мкг/мл (кінцева концентрація), вносять 0,5 мл 12,0 М хлоридної кислоти, 1,4 мл 0,06 М розчину натрій нітриту, додають 2,5 мл $3,4 \cdot 10^{-2}$ М розчину резорцину, приготованого на 4,0 М натрій гідроксиді. Доводять розчин до позначки дистильованою водою. Вимірювання інтенсивності світлопоглинання досліджуваного розчину стосовно холостого розчину проводять за $\lambda = 519$ нм, $l = 1$ см. Концентрацію цефтазидиму знаходять методом градувального графіка або способом порівняння [12].

Адаптована методика спектрофотометричного визначення цефтазидиму за реакцією азосполучення із резорцином методом градувального графіка на фоні сечі

До мірної колби об'ємом 25,0 мл додають аліквоту досліджуваного розчину цефтазидиму в межах $(5-62,5) \cdot 10^{-6}$ М (кінцева концентрація), вносять 0,25 мл сечі, додають 0,5 мл 12,0 М хлоридної кислоти, 1,3 мл 0,1 М розчину натрій нітриту, чекають 3 хв, додають 2,5 мл $6,25 \cdot 10^{-3}$ М розчину резорцину, приготованого на 4,0 М натрій гідроксиді. Доводять розчин до позначки дистильованою водою. Вимірювання інтенсивності світлопоглинання досліджуваного розчину стосовно холостого розчину проводять за $\lambda = 519$ нм, $l = 1$ см. Концентрацію цефтазидиму знаходять методом градувального графіка.

3. Результати досліджень та їх обговорення

Беручи до уваги дані, що період напіввиведення цефтазидиму становить приблизно 2 год без змін із сечею та що приблизно 80–90 % дози виводиться із сечею впродовж 24 год, ми розрахували концентрацію ЦЕФТ у добовій сечі, враховуючи її кількість у середньому 1,5 л для дози ЦЕФТ 1 г, яку вводять кожні 8 год (максимально 9 г на добу). Отже, якщо за добу пацієнт отримає 3 г ЦЕФТ, то в добовій сечі концентрація цефтазидиму може становити $3,3 \cdot 10^{-3}$ М, це є достатньо висока концентрація. Однак ми вирішили працювати з дещо меншими концентраціями, аби мати можливість застосовувати методику за меншого дозування антибіотика.

Першим етапом наших досліджень було порівняти, який вигляд мають спектри світлопоглинання азопродукту із резорцином на основі стандартного розчину цефтазидиму, а також ЦЕФТ за наявності сечі та чистого розчину сечі. Варто зазначити, що перед початком роботи із сечею ми її гомогенізували шляхом витримування на ультразвуковій бані впродовж 10 хв і так само ми витримували модельні зразки ЦЕФТ з сечею на ультразвуковій бані впродовж 10 хв. Також у нашому експерименті ми використовували для реакції діазотування цефтазидиму значні надлишки натрій нітриту, щоб його було достатньо як для діазотування, так і для взаємодії із сечовиною, оскільки в сечі концентрація сечовини становить 0,5 М. Результати досліджень зображено на рис. 1.

Як бачимо з рис. 1, компоненти сечі не утворюють ніяких сполук із резорцином у лужному середовищі за умов нашого експерименту згідно зі спектрами світлопоглинання в діапазоні довжин хвиль 450–650 нм, де є максимум світлопоглинання азосполуки Рез із ЦЕФТ. Однак величина світлопоглинання на максимумі за $\lambda = 519$ нм, характерного для азосполуки ЦЕФТ за наявності сечі, має значно нижче значення, що може свідчити про те, що діазотований ЦЕФТ може вступати в реакцію з певними компонентами сечі, витрачатись на неї (самі продукти взаємодії в досліджуваній ділянці не поглинають) і внаслідок цього вихід азопродуктів ЦЕФТ із Рез суттєво зменшується. Змінювати кількість сечі, яку ми беремо для аналізу, можна, однак співвідношення ЦЕФТ до компонентів сечі змінюватись не буде, бо ЦЕФТ є аналітом, який міститься у сечі. Щоб урахувати вплив фону сечі, ми можемо застосувати метод добавок, щоб урахувати взаємодію ЦЕФТ із компонентами сечі. Результати визначення ЦЕФТ у сечі за методом добавок наведено на рис. 2 і табл. 4.

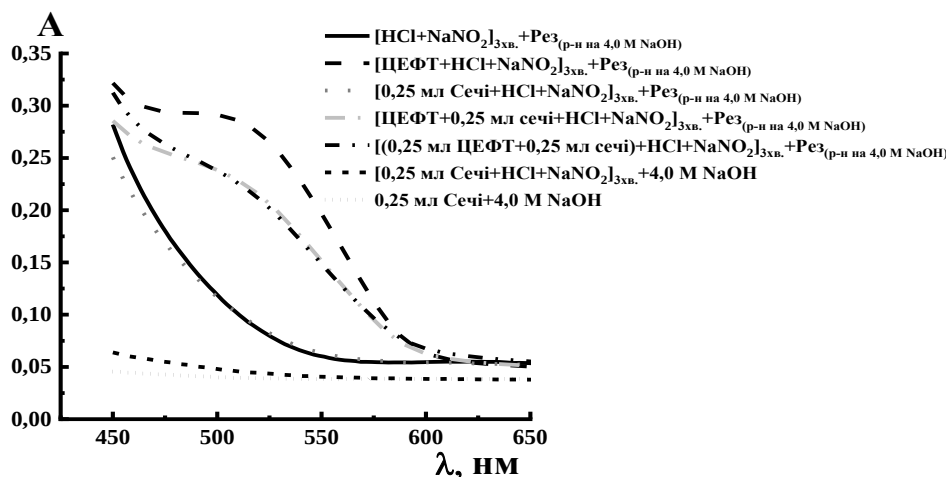


Рис. 1. Електронні спектри світлопоглинання розчинів резорцину та продуктів його взаємодії із діазотованим цефтазидимом, сечею та модельним розчином ЦЕФТ на фоні сечі.

Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 12,0 \text{ M}$, $C_{\text{ЦЕФТ}} = 1,25 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ($C_{\text{ЦЕФТ}} = 1,25 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ у колбі на 25,0 мл), $C_{\text{NaNO}_2} = 5,2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $t_{\text{діазот.}} = 3 \text{ хв}$. Умови азосполучення: $C_{\text{Рез}} = 6,25 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{NaOH}} = 0,16 \text{ M}$; $l = 1 \text{ см}$

Fig. 1. Absorption spectra of solutions of resorcinol and its azo coupling products with diazotized ceftazidime, urine and a model solution of CEFT at the urine presence. Diazotization conditions: $C_{\text{HCl}} = 12.0 \text{ M}$, $C_{\text{CEFT}} = 1.25 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ($C_{\text{CEFT}} = 1.25 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ in a 25.0 ml flask), $C_{\text{NaNO}_2} = 5.2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $t_{\text{diazot.}} = 3 \text{ min}$. Conditions for azo coupling: $C_{\text{Res}} = 6.25 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{NaOH}} = 0.16 \text{ M}$; $l = 1 \text{ cm}$

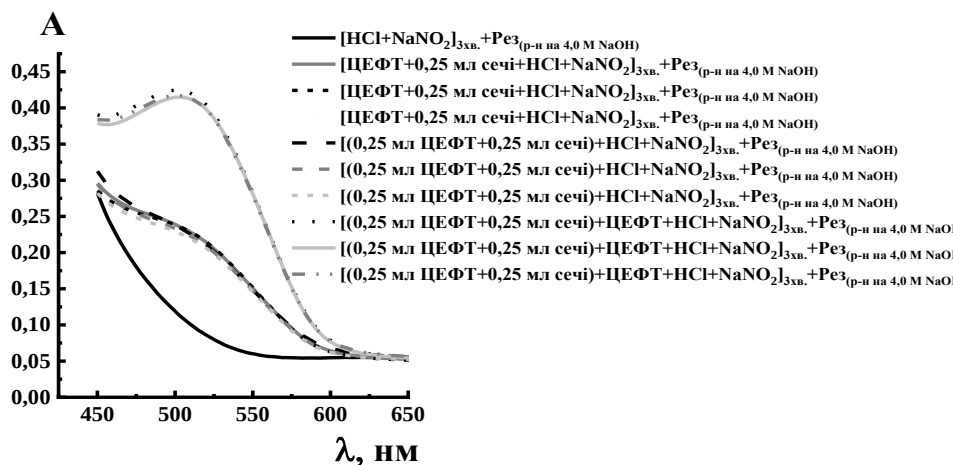


Рис. 2. Електронні спектри світлопоглинання розчинів резорцину та продуктів його взаємодії із діазотованим цефтазидимом за наявності сечі, модельним розчином (ЦЕФТ + сеча) та модельним розчином (ЦЕФТ + сеча) з добавкою ЦЕФТ. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 12,0 \text{ M}$, $C_{\text{ЦЕФТ}} = 1,25 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ($C_{\text{ЦЕФТ}} = 1,25 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ у колбі на 25,0 мл), $C_{\text{NaNO}_2} = 5,2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $t_{\text{діазот.}} = 3 \text{ хв}$.

Умови азосполучення: $C_{\text{Рез}} = 6,25 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{NaOH}} = 0,16 \text{ M}$; $l = 1 \text{ см}$

Fig. 2. Absorption spectra of solutions of resorcinol and its azo coupling products with diazotized ceftazidime at the urine presence, a model solution (CEFT + urine) and a model solution (CEFT + urine) with the addition of standard CEFT solution. Diazotization conditions: $C_{\text{HCl}} = 12.0 \text{ M}$, $C_{\text{CEFT}} = 1.25 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ($C_{\text{CEFT}} = 1.25 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ in a 25.0 ml flask), $C_{\text{NaNO}_2} = 5.2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $t_{\text{diazot.}} = 3 \text{ min}$.

Conditions for azo coupling: $C_{\text{Res}} = 6.25 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{NaOH}} = 0.16 \text{ M}$; $l = 1 \text{ cm}$

Як бачимо зі спектрів на рис. 2, добавка ЦЕФТ до модельної суміші на основі сечі веде до збільшення аналітичного сигналу. Зробивши відповідні розрахунки, ми отримали занижені результати (табл. 4). Очевидно, такий факт можна пояснити тим, що хоча для експерименту ми використовували значний надлишок натрій нітриту, проте він одночасно витрачається на взаємодію із сечовиною, тому для діазотування ЦЕФТ, який міститься у добавці, вже, можливо, буде недостатньо.

Крім методу добавок, ми спробували отримати градуйований графік для визначення цефтазидиму на фоні сечі (рис. 3) і за ним зробити визначення ЦЕФТ у модельних сумішах на основі сечі. Варто відмітити, що в процесі діазотування цефтазидиму за наявності сечі ми використали набагато більший, ніж оптимальний 10-кратний надлишок NaNO_2 , зважаючи на необхідну кількість натрій нітриту для компенсації його взаємодії із сечовиною, яка міститься в сечі.

Як бачимо з рис. 3, нам вдалося отримати прямолінійний графік залежності світлопоглинання розчинів азосполук діазосолей ЦЕФТ із резорцином на фоні сечі від концентрації цефтазидиму. Результати визначення ЦЕФТ за цим графіком наведено в табл. 4.

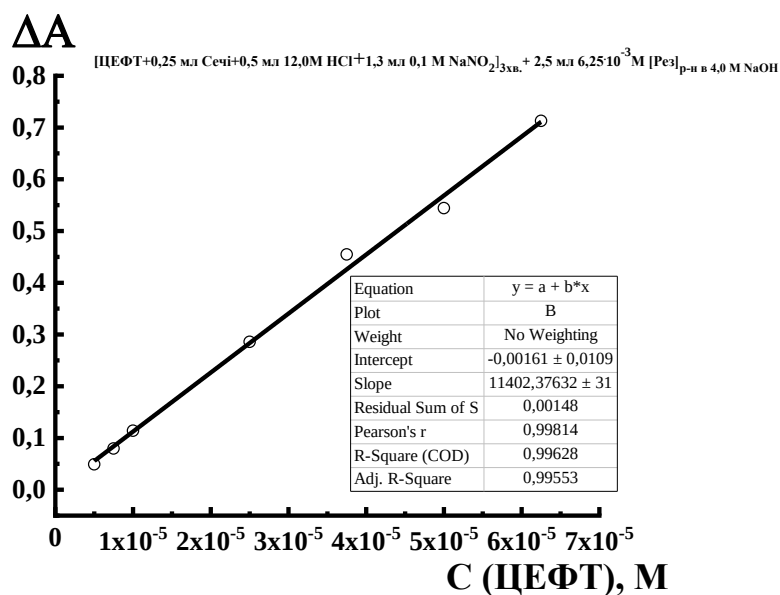


Рис. 3. Графік лінійної залежності аналітичного сигналу від концентрації ЦЕФТ на фоні сечі ($V_{\text{сечі}} = 0,25$ мл; $V_{\text{к-би}} = 25,0$ мл). Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 12,0$ М, $C_{\text{NaNO}_2} = 5,2 \cdot 10^{-3}$ М, $t_{\text{діазот.}} = 3$ хв. Умови азосполучення: $C_{\text{Рез}} = 6,25 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{NaOH}} = 0,16$ М; $l = 1$ см, $n = 5$; $P = 0,95$

Fig. 3. Calibration curve for CEFT determination on the urine background

($V_{\text{urine}} = 0,25$ ml; $V_{\text{flask}} = 25,0$ ml). Diazotization conditions: $C_{\text{HCl}} = 12,0$ М, $C_{\text{NaNO}_2} = 5,2 \cdot 10^{-3}$ М, $t_{\text{діазот.}} = 3$ min. Conditions for azo coupling: $C_{\text{Res}} = 6,25 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{NaOH}} = 0,16$ М; $l = 1$ cm, $n = 5$; $P = 0,95$

Як бачимо з табл. 4, результати визначення ЦЕФТ методом градуйовального графіка на фоні сечі вийшли дещо заниженими для стандартного розчину ЦЕФТ у аналогічних умовах, у яких будували градуйовальний графік, а у наперед виготовленій модельній суміші – ще нижчими. Однак загалом цей метод визначення дав кращі результати, ніж метод добавок.

Однак великим його недоліком є те, що хімічний склад сечі не є сталим і залежить від стану здоров'я пацієнта та їжі, яку він споживає. Тому єдиним варіантом залишається, мабуть, метод багатократних добавок. Хоча для кількох стадійних реакцій метод добавок не працює задовільно. 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 буде порушена і виходи продуктів зміняться. Ну а це відображається на величині світлопоглинання.

Отже, зважаючи на те, що кращі результати було отримано методом градуального графіка на фоні сечі, то пропонуємо адаптовану методику визначення цефтазидиму у сечі за реакцією азосполучення із фенольним реагентом резорцином.

Таблиця 4

Результати спектрофотометричного визначення цефтазидиму у модельних розчинах із додаванням сечі методом градуального графіка на фоні сечі та методом добавок ($V_{\text{сечі}} = 0,25$ мл; $V_{\text{к-би}} = 25,0$ мл), $n = 5$; $P = 0,95$. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 12,0$ М, $C_{\text{NaNO}_2} = 5,2 \cdot 10^{-3}$ М, $t_{\text{діазот.}} = 3$ хв. Умови азосполучення: $C_{\text{Рез}} = 6,25 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{NaOH}} = 0,16$ М; $l = 1$ см, $n = 5$; $P = 0,95$

Table 4

Results of ceftazidime spectrophotometric determination in model solutions with the addition of urine by the calibration curve method on the urine background and by the standard addition method.

($V_{\text{urine}} = 0.25$ ml; $V_{\text{flask}} = 25.0$ ml), $n = 5$; $P = 0.95$. Diazotization conditions: $C_{\text{HCl}} = 12.0$ M, $C_{\text{NaNO}_2} = 5.2 \cdot 10^{-3}$ M, $t_{\text{diazot.}} = 3$ min.

Conditions for azo coupling: $C_{\text{Res}} = 6.25 \cdot 10^{-4}$ M, $C_{\text{NaOH}} = 0.16$ M; $l = 1$ cm

	Введено ЦЕФТР, М	Знайдено ЦЕФТР, М $\bar{x} \pm \frac{S \cdot t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$ S_r	Знайдено ЦЕФТР у суміші, М $\bar{x} \pm \frac{S \cdot t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$ S_r
Метод градуального графіка на фоні сечі	$1,25 \cdot 10^{-5}$	$(1,15 \pm 0,05) \cdot 10^{-5}$ 0,029	$(1,09 \pm 0,01) \cdot 10^{-5}$ 0,006
Методом добавок		–	$(7,99 \pm 0,16) \cdot 10^{-6}$ 0,016

4. Висновки.

Для спектрофотометричного визначення β -лактамного антибіотику цефтазидиму у біологічній рідині сечі було обрано реакцію азосполучення із резорцином. Ця методика характеризується достатньою чутливістю, що передбачає можливе її застосування для визначення малих кількостей ЦЕФТ у сечі. Проведено апробацію методики визначення ЦЕФТ на модельних розчинах сечі здорової людини. Результати досліджень показали, що величина світлопоглинання азосполуки ЦЕФТ за наявності сечі має значно нижче значення, що зумовлене здатністю діазотованого ЦЕФТ вступати в реакцію із деякими компонентами сечі (продукти взаємодії в досліджуваній ділянці не поглинають), унаслідок цього вихід азопродукту ЦЕФТ із Рез суттєво зменшується. Метод добавок у випадку визначення цефтазидиму дав гірші результати, ніж метод градуального графіка, недоліком якого є залежність хімічного складу сечі від стану здоров'я пацієнта та їжі, яку він споживає.

5. Подяки

Роботу частково підтримано Simons Foundation (SFI-PD-Ukraine-00014574).

1. *Goodman & Gilman's*. The pharmacological basis of therapeutics. 11th ed. / editor, Brunton L. L.; associate editor, Lazo J. S., Parker K. L. New York: McGraw-Hill, 2006. 2021 p.
2. *Korkuna O., Futryk A., Slobodenyuk K., Moshkun N.* The use of the azo compound of amoxicillin with sulfonamide for spectrophotometric determination of the β -lactam antibiotic metabolite in urine // *Visnyk Lviv Univ. Ser. Chem.* 2024. Vol. 65. P. 155–170. DOI: <https://doi.org/10.30970/vch.6501.155> (in Ukrainian).
3. *Chekman I. S., Gorchakova N. O., Kazak L. I.* et al. Pharmacology: textbook for students of the medical faculties. Vinnytsia: Nova Kniga, 2017. 784 p. (in Ukrainian).
4. *Abounassif M. A., Mian N. A., Mian M. S.* Analytical profile of Ceftazidime: Analytical profile of drug substances. 1990. Vol. 19. P. 95–121. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0099-5428\(08\)60365-2](https://doi.org/10.1016/S0099-5428(08)60365-2)
5. *Alekseev V. G., Golubeva M. V.* Acid-base equilibria in an aqueous solution of ceftazidime. *Vesn TeGU. Series Chem.* 2012. Vol. 14. P. 4–9 (in russian).
6. Ceftazidime (Ceftazidime) (275591) / Ceftazidime instructions for use. [Cit. 2024, November 05]. <https://compendium.com.ua/info/275591/tseftazidim/> (in Ukrainian).
7. *Kozinets G. I.* Interpretation of blood and urine tests and their clinical significance. Moscow: Triada-X, 1998. 104 p. (in russian).
8. *Rodenas V., Garcia M. S., Sanchez-Pedreno C., Albero M. I.* Spectrophotometric methods for the determination of cephradine or ceftazidime in human urine using batch and flow-injection procedures // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1997. Vol. 15, No. 11. P. 1687–1693. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(96\)01963-2](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(96)01963-2)
9. *Siddiqui M. R., Hakami A. A. H., Wabaidur S. M., Alothman Z. A.* et al. UPLC-MS/MS and Dushman reaction based spectrophotometric method for determination of ceftazidime, an antibiotic, in medicinal formulation // *Food Sci. Technol.* 2021. Vol. 41, No. 1. P. 225–231. DOI: <https://doi.org/10.1590/fst.07020>
10. *Salem H., Samir E.* Determination of cefotaxime, cefoperazone, ceftazidime and cefadroxil using surface plasmon resonance band of silver nanoparticles // *Braz. J. Pharm. Sci.* 2018. Vol. 54, No. 3. P. e17565. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s2175-97902018000317565>
11. *Kostiv O., Korkuna O., Sheredko M.* Spectrophotometric determination of ceftazidime in pharmaceutical using resorcinol and 2-methylphenol // *Vopr. Khim. Khim. Tekhn.* 2021. No. 1. P. 35–44. DOI: <http://doi.org/10.32434/0321-4095-2021-134-1-35-44> (in Ukrainian).
12. *Kostiv O. I.* Azo coupling reaction in the analysis of β -lactam and tetracycline antibiotics // PhD (102 Chemistry). Ivan Franko National University. Lviv, 2021. 284 p. (in Ukrainian). https://lnu.edu.ua/wp-content/uploads/2021/09/dis_kostiv.pdf

**SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF CEFTAZIDIME IN URINE
BY THE REACTION OF THE AZO COUPLING WITH RESORCIN****O. Korkuna*, N. Lukashyk**

*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 β -lactam antibiotic of the cephalosporine group, ceftazidime (CEFT). A feature of cephalosporine 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 CEFT is 2 hours, and about 80–90 % of the dose is eliminated after 24 hours, mainly through the kidneys, excreted in the urine unchanged. Chromatographic methods are usually used to quantify the AM amount in biological fluids. Still, enzyme immunoassay method 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 CEFT extraction.

For the ceftazidime determination in the urine, the spectrophotometric method developed by us previously using the reaction of azo coupling with resorcinol (Res) was chosen. The technique is based on the CEFT diazotization by the action of sodium nitrite in a medium of 12.0 M hydrochloric acid and subsequent azo coupling with Res in an alkaline medium with a final NaOH concentration of 0.16 M under the 10-fold excess of the reagent toward CEFT, with the formation of a red-colored azo compound, which is characterized by a new absorbance maximum at $\lambda = 519 \text{ nm}$ ((LOD = 0.84 $\mu\text{g/ml}$).

The results of the study showed that the CEFT azo compound absorbance in the presence of urine is significantly lower, which is due to the ability of diazotated CEFT to react with some urine components (interaction products in the study area do not absorb), resulting in a significant decrease in the yield of CEFT azo compound from resorcinol. In the case of ceftazidime determination, the standard addition method gave worse results than the method of a calibration curve.

Keywords: ceftazidime, resorcinol, urine, azo coupling, spectrophotometry.

Стаття надійшла до редколегії 06.11.2024

Прийнята до друку 21.01.2025