

УДК [543.422.3]: 543.632.6:547.556.3:547.563.1:615.33

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ЦЕФТРІАКСОНУ У СЕЧІ ПРИ АНТИБАКТЕРІАЛЬНІЙ ТЕРАПІЇ ЗА РЕАКЦІЄЮ АЗОСПОЛУЧЕННЯ ІЗ 8-ОКСИХІНОЛІНОМ

О. Коркуна* , А. Футрик

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

Цефтріаксон (ЦЕФТР) – напівсинтетичний β -лактамний антибіотик групи цефалоспоринів, який виводиться головно з сечею в незмінному стані. Для спектрофотометричного визначення цефтріаксону у сечі було обрано розроблену нами спектрофотометричну методику з використанням реакції азосполучення із 8-оксихіноліном (8-Окс) ($C_{\min} = 5,92 \cdot 10^{-7}$ М). Проведено апробацію методики визначення ЦЕФТР на модельних розчинах сечі здорової людини. Результати досліджень показали, що величина світлопоглинання азосполуки ЦЕФТР за наявності сечі має значно нижче значення, що зумовлене здатністю діазотованого ЦЕФТР вступати в реакцію із деякими компонентами сечі (продукти взаємодії в досліджуваній ділянці не поглинають), внаслідок цього вихід азопродукту ЦЕФТР із 8-Окс суттєво зменшується. Метод добавок у випадку визначення цефтазидиму у сечі дав гірші результати, ніж метод градуйованого графіка на фоні сечі.

Ключові слова: цефтріаксон, 8-оксихінолін, сеча, азосполучення, спектрофотометрія.

DOI: <https://doi.org/10.30970/vch.6701.113>

1. Вступ

Завдяки стрімкому розвитку медицини, хімії та біології зростає використання різноманітних лікарських засобів, зокрема антибіотиків, які вибірково пригнічують ріст та розмноження живих клітин мікроорганізмів. Їх широко використовують у лікарській практиці та ветеринарній медицині. Цефалоспорини – ряд природних та напівсинтетичних β -лактамних антибіотиків, які є біциклічними сполуками, що складаються з β -лактамного і дигідротіазинового кілець, які утворюють спільну для молекул усіх цефалоспоринів 7-аміноцефалоспоринову кислоту. Існує понад 60 оригінальних представників антибіотиків цефалоспоринового ряду, проте лише 16 препаратів зареєстровано в Україні, зокрема до них належить представник третього покоління цефалоспоринів цефтріаксон (ЦЕФТР). Механізм дії ЦЕФТР пов'язаний з порушенням біосинтезу пептидоглікану клітинної стінки мікроорганізмів та пригніченням активності ферменту траспептидази. Цефтріаксон володіє бактерицидним ефектом проти великої кількості грампозитивних, грамнегативних, аеробних та облігатних анаеробних бактерій [1]. ЦЕФТР застосовують при інфекціях ЛОР-органів, дихальної системи, кісток і суглобів, травного тракту, сечових шляхів, шкіри і м'яких тканин, черевної порожнини і жовчних шляхів, важких інфекціях (менінгіті, септицемії). Варто зауважити, що цефтріаксон є одним з найбільш часто застосовуваних у лікарській практиці антибіотиків у світі [2].

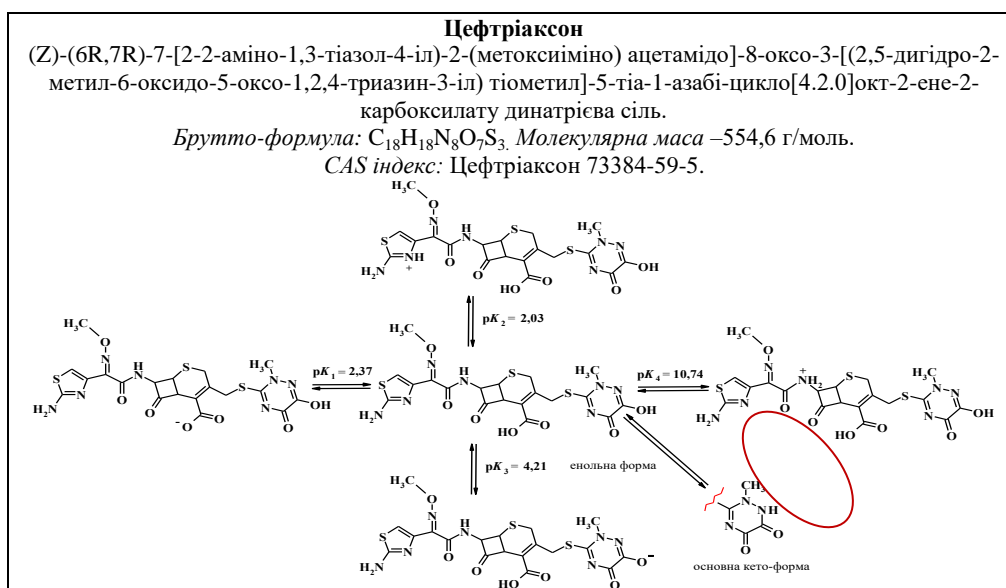
Структуру та детальнішу інформацію про ЦЕФТР наведено у табл. 1. У водних розчинах ЦЕФТР існує у двох таутомерних формах, хоча основна його кількість перебуває в кето-формі і лише незначна – в енольній таутомерній формі [3–5]. Через наявність первинної ароматичної аміногрупи ЦЕФТР може бути діазоскладовою у реакціях азосполучення.

Таблиця 1

Фізико-хімічні характеристики цефтріаксону [6]

Table 1

Physicochemical characteristics of ceftriaxone [6]



ЦЕФТР не застосовують внутрішньо, тому що він швидко руйнується під впливом шлункового соку та ферментів. Цефтріаксон після внутрішньом'язового введення всмоктується швидко і повно, біодоступність становить близько 100 %. Препарат має високий ступінь стабільності в організмі і тривалий період напіввиведення, стабільна концентрація препарату досягається через 4 год. Період напіввиведення цефтріаксону у дорослих при введенні препарату становить 5,8–8,7 год. 50–60 % цефтріаксону виводиться у незміненому вигляді нирками протягом 48 год і 40–50 % – у незміненому вигляді з жовчю. У кишечнику під впливом мікробної флори препарат перетворюється у неактивний метаболіт, а не піддається системному метаболізму. Мінімальні антимікробні концентрації є в крові понад 24 год. ЦЕФТР володіє найдовшим часом напіввиведення серед усіх цефалоспоринів [1]. Період напіввиведення подовжується в осіб віком старше 75 років (до 16 год), у дітей (до 6,5 діб), у немовлят (до 8 днів). За недостатньої функції нирок і печінки виведення цефтріаксону уповільнюється, можлива кумуляція.

Визначення концентрації цефтріаксону у сечі є важливим у ситуаціях, коли у пацієнта порушена функція нирок чи печінки і можливе накопичення препарату з підвищенням ризику побічних ефектів; при лікуванні інфекцій сечовивідних шляхів, де ефективність залежить від досягнення достатніх концентрацій у сечі; у випадках підозри на змінену екскрецію чи фармакокінетику – наприклад, у критично хворих, дітей або пацієнтів з гіпоальбумінемією, оскільки цефтріаксон сильно зв'язується з білками [8]; також під час проведення фармакодинамічних та мікробіологічних досліджень, де визначення рівня ЦЕФТР у сечі допомагає оцінити достатність виділення препарату для впливу на інфекційні збудники й резистентні штами [9].

Сеча – це рідкий продукт виділення, який утворюється в нирках у процесі фільтрації крові та виведення з організму продуктів обміну речовин. Хімічний склад сечі – це суміш води, органічних і неорганічних речовин, що є продуктами обміну речовин і виводяться нирками. Сеча на 95 % складається з води, а сухий залишок становить у середньому 50–70 г на добу; до органічних компонентів належать сечовина (20–35 г/добу), креатинін (1,0–2,0 г/добу), сечова кислота (0,2–1,0 г/добу), аміак (0,6–1,0 г/добу), амінокислоти (0,5–1,0 г/добу), органічні кислоти (1–2 г/добу) та метаболіти гормонів. Серед неорганічних речовин основними є натрій (80–220 ммоль/добу), калій (25–125 ммоль/добу), хлориди (110–250 ммоль/добу), фосфати (15–40 ммоль/добу), сульфати (20–40 ммоль/добу), кальцій (2,5–7,5 ммоль/добу), магній (3–5 ммоль/добу) та бікарбонати (0,03–0,1 г/добу). Також у сечі містяться пігменти (урохроми 50–100 мг/добу), мікроелементи та поодинокі клітини. У нормі не повинно бути значущих кількостей білка (до 150 мг/добу), глюкози, кетонових тіл, білірубину чи крові, а їх наявність свідчить про патологію [10]. Вона є важливим діагностичним матеріалом у клінічній практиці, бо її склад відображає стан нирок, обмін речовин та функцію внутрішніх органів.

Складна матриця сечі потребує попередньої пробопідготовки для вилучення ЦЕФТР, що ускладнює процес проведення аналізу. Головними та найбільш поширеними методами визначення цефтріаксону в сечі є високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), зокрема з УФ-детектуванням (HPLC–UV) або мас-спектрометрією (HPLC–MS/MS), завдяки їхній високій чутливості та селективності [11–13]. Також застосовують швидші методи: ультраефективну рідинну хроматографію (UPLC), спектрофотометрію як простішу альтернативу [13, 14], поверхнево-посилену раман-спектроскопію (SERS) для швидкого аналізу [15], а в деяких випадках – мікробіологічні методи для оцінки антибактеріальної активності [16].

Раніше ми публікували результати визначення амоксициліну [17] та цефтазидиму [18] в сечі методом спектрофотометрії за допомогою реакції азосполучення. У цій роботі свою увагу ми сконцентрували на визначенні цефтріаксону у сечі.

Для своїх досліджень ми обрали розроблену попередньо спектрофотометричну методику визначення цефтріаксону за допомогою реакції азосполучення із 8-оксихіноліном (8-Окс), яка є досить чутливою. Цефалоспориновий антибіотик ЦЕФТР 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 цефтріаксону перешкоджає утворенню цього продукту. У процесі досліджень було виявлено, що під час взаємодії діазосоли цефтріаксону з лужним розчином

8-оксихіноліну (8-Окс) утворюється забарвлена, відповідно, у вишневий колір сполука, яка характеризується появою нового максимуму світлопоглинання за $\lambda_{\max} = 550$ нм (рис. 1) [6, 19].

У табл. 2 наведено умови максимального виходу забарвленої сполуки діазосолі цефтріаксону з фенольним реагентом, 8-оксихіноліном та її спектрофотометричні характеристики.

З'ясовано, що аналітичний сигнал у розчинах азосполук в системі ЦЕФТР–8-Окс під час визначення цефтріаксону лінійно залежить від концентрації аналіту у розчині [6, 19]. У табл. 3 наведено метрологічні характеристики спектрофотометричного визначення ЦЕФТР за допомогою 8-оксихіноліну.

Таблиця 2

Умови максимального виходу забарвленої сполуки цефтріаксону з 8-оксихіноліном та її спектрофотометричні характеристики

Table 2

Conditions for the maximum yield of the ceftriaxone colored compound with 8-hydroxyquinoline and its spectrophotometric characteristics

λ_{\max} , нм	$\varepsilon \cdot 10^{-3}$, л·моль ⁻¹ ·см ⁻¹	Ант: Реаг, стабільність аналітичного сигналу	Умови	
			Діазотування	Азосполучення
550	6,80±0,19	1:1 1 год	C(HCl) = 12 М, (≥ 10-кратний надл. NaNO ₂ до ЦЕФТР) t _{діазот.} = 5 хв при 20 °С	7-кратний надл. 8-Окс*

*Розчини реагенту готували на 4М NaOH для того щоб в кінцевому об'ємі C(NaOH) становила 0,16 М.

Таблиця 3

Метрологічні характеристики спектрофотометричного визначення ЦЕФТР з використанням 8-Окс, $n = 5$, $P = 0,95$. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 12,0$ М, $C_{\text{NaNO}_2} = 2,1 \cdot 10^{-3}$ М, $t_{\text{діазот.}} = 5$ хв. Умови азосполучення: $C_{8\text{-Окс}} = 1,2 \cdot 10^{-3}$ М, $C_{\text{NaOH}} = 0,16$ М; $l = 1$ см

Table 3

Analytical characteristics of CEFTR spectrophotometric determination using 8-HOQ, $n = 5$, $P = 0.95$. Diazotization conditions: $C_{\text{HCl}} = 12.0$ M, $C_{\text{NaNO}_2} = 3.6 \cdot 10^{-3}$ M, $t_{\text{diazot.}} = 5$ min.

Conditions for azo coupling: $C_{8\text{-HOQ}} = 1.2 \cdot 10^{-3}$ M, $C_{\text{NaOH}} = 0.16$ M; $l = 1$ cm

Лінійність $C_{\text{ЦЕФТ}}$ мкг/мл	Рівняння графіка C мкг/мл	C_{\min} , М (мкг/мл)	C_{H} , М (мкг/мл)	R
0,35–31,05	$\Delta A_{550} = 0,083 + 0,028 \cdot C$	$5,92 \cdot 10^{-7}$ (0,33)	$1,79 \cdot 10^{-6}$ (0,99)	0,9993
31,05–94,28	$\Delta A_{550} = 0,846 + 0,012 \cdot C$			0,9993

2. Матеріали та методика експерименту

Реагенти

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

Стандартний розчин цефтріаксону готували розчиненням точної наважки антибіотика (USP Reference Standards, Швейцарія, вміст основної речовини не менше 99 %) в дистильованій воді. Розчини зберігали за кімнатної температури в захищеному від світла місці не більше двох днів.

Стандартний вихідний розчин 8-оксихіноліну 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 луку кваліфікації “х.ч.” у дистильованій воді.

Об'єкт досліджень

У роботі використовували сечу здорового добровольця для дослідження впливу компонентів сечі на визначення цефтріаксону за реакцією азосполучення із 8-оксихіноліном, а також для виготовлення модельних сумішей із антибіотиком.

Апаратура

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

У роботі використовували аналітичну вагу 2-го класу точності марки XAS 100/C (RADWAG, Польща), Max = 100 г, Min = 10 мг; T = -100 г; d = 0,1 мг.

Методика спектрофотометричного визначення цефтріаксону за реакцією азосполучення із 8-оксихіноліном

До мірної колби об'ємом 25,0 мл додають аліквоту досліджуваного розчину цефтріаксону в межах 0,35–94,28 мкг/мл (кінцева концентрація), вносять 0,5 мл 12,0 М HCl та 1,5 мл 0,06 М розчину NaNO₂, додають 2,5 мл 3,0·10⁻² М розчину 8-оксихіноліну, приготованого на 4,0 М натрій гідроксиді. Доводять розчин до мітки дистильованою водою. Вимірювання інтенсивності світлопоглинання досліджуваного розчину відносно холостого розчину проводять за $\lambda_{\text{макс}} = 550$ нм, $l = 1$ см. Концентрацію цефтріаксону знаходять способом добавок, або за допомогою градувального графіка [6, 19].

Адаптована методика спектрофотометричного визначення цефтріаксону за реакцією азосполучення із 8-оксихіноліном методом градуйованого графіка на фоні сечі

До мірної колби об'ємом 25,0 мл додають аліквоту досліджуваного розчину цефтріаксону в межах (7,5–90,0)·10⁻⁶ М (кінцева концентрація), вносять 0,25 мл сечі, додають 0,5 мл 12,0 М хлоридної кислоти, 1,9 мл 0,1 М розчину натрій нітриту, чекають 5 хвилини, додають 2,5 мл 6,3·10⁻³ М розчину 8-оксихіноліну приготованого на 4,0 М натрій гідроксиді. Доводять розчин до мітки дистильованою водою. Вимірювання інтенсивності світлопоглинання досліджуваного розчину відносно холостого розчину проводять за $\lambda = 550$ нм, $l = 1$ см. Концентрацію цефтріаксону знаходять методом градувального графіка.

3. Результати досліджень та їх обговорення

Зважаючи на те, що період напіввиведення цефтріаксону у дорослих за введення препарату становить 5,8–8,7 год, а також відомості, що 50–60 % ЦЕФТР виводиться у незміненому вигляді із сечею впродовж 48 год, ми зробили розрахунок можливого вмісту цефтріаксону у сечі, керуючись даними фармакокінетики та дозування препарату (1000,0 мг). Було розраховано, що в добовій сечі концентрація цефтріаксону може становити $4,51 \cdot 10^{-4}$ М. Для досліджень ми обрали таку концентрацію ЦЕФТР, яку ми можемо мати в реакційній колбі з урахуванням невеликої аліквоти сечі.

Першим етапом наших досліджень було порівняти, який вигляд мають спектри світлопоглинання азопродукту із 8-оксихіноліном на основі стандартного розчину цефтріаксону, ЦЕФТР за наявності сечі та чистого розчину сечі. Результати досліджень зображено на рис. 1.

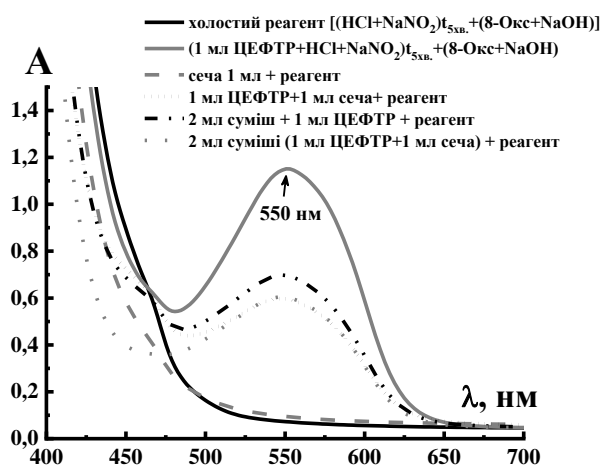


Рис. 1. Електронні спектри світлопоглинання розчинів 8-оксихіноліну та продуктів його азосполучення із діазотованим цефтріаксоном, сечею та модельним розчином ЦЕФТР на фоні сечі.

Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 12,0$ М, $C_{\text{ЦЕФТР}} = 1,875 \cdot 10^{-3}$ М ($C_{\text{ЦЕФТР}} = 7,5 \cdot 10^{-5}$ М в колбі на 25,0 мл), $C_{\text{NaNO}_2} = 1,0 \cdot 10^{-3}$ М, $t_{\text{діазот.}} = 5$ хв. Умови азосполучення: $C_{8\text{-Окс}} = 7,0 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{NaOH}} = 0,16$ М; $l = 1$ см

Fig. 1. Absorption spectra of solutions of 8-hydroxyquinoline and its azo coupling products with diazotized ceftriaxone, urine and a model solution of CEFTR at the urine presence.

Diazotization conditions: $C_{\text{HCl}} = 12.0$ M, $C_{\text{CEFTR}} = 1.875 \cdot 10^{-3}$ M ($C_{\text{CEFTR}} = 7.5 \cdot 10^{-5}$ M in a 25.0 ml flask), $C_{\text{NaNO}_2} = 1.0 \cdot 10^{-3}$ M, $t_{\text{diazot.}} = 5$ min.

Conditions for azo coupling: $C_{8\text{-HOQ}} = 7.0 \cdot 10^{-4}$ M, $C_{\text{NaOH}} = 0.16$ M; $l = 1$ cm

Як бачимо з рис. 1, компоненти сечі не утворюють ніяких сполук із 8-оксихіноліном у лужному середовищі за умов нашого експерименту згідно зі спектрами світлопоглинання в діапазоні довжин хвиль 500–600 нм, де є максимум світлопоглинання азосполуки 8-Окс із ЦЕФТР. Однак величина світлопоглинання на максимумі за $\lambda = 550$ нм, характерного для азосполуки ЦЕФТР за наявності сечі, має значно нижче значення, що може свідчити про те, що діазотований ЦЕФТР може

вступати в реакцію із якимось із компонентів сечі (утворені продукти взаємодії в досліджуваній ділянці не поглинають), внаслідок чого суттєво зменшується активна кількість діазосолей і, відповідно, вихід азопродуктів ЦЕФТР із 8-Окс. Впливати на цей процес ми не можемо, оскільки ЦЕФТР є аналітом, який міститься у сечі. Єдиний вихід – це застосувати метод добавок, щоб урахувати взаємодію ЦЕФТР із компонентами сечі. Результати визначення ЦЕФТР у сечі за методом добавок наведено на рис. 2.

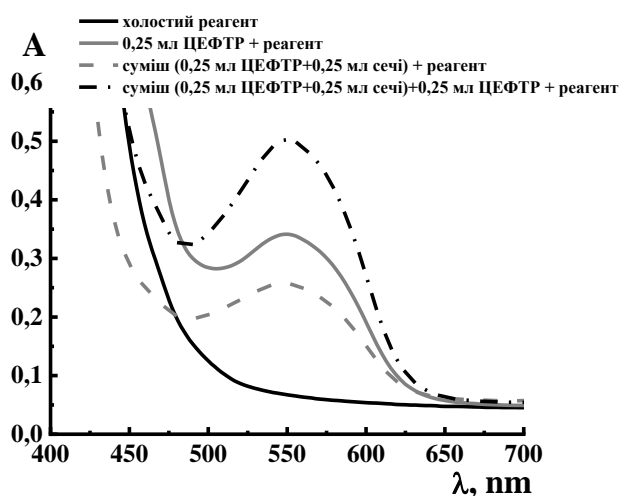


Рис. 2 Електронні спектри світлопоглинання розчинів 8-оксихіноліну та продуктів його взаємодії із діазотованим цефтріаксоном, модельним розчином (ЦЕФТР + сеча) та модельним розчином (ЦЕФТР + сеча) з добавкою ЦЕФТР.

Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 12,0 \text{ M}$, $C_{\text{CEFTR}} = 1,875 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ($C_{\text{CEFTR}} = 7,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ в колбі на 25,0 мл), $C_{\text{NaNO}_2} = 3,6 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $t_{\text{діазот.}} = 5 \text{ хв}$. Умови азосполучення: $C_{8\text{-Окс}} = 3,2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{NaOH}} = 0,16 \text{ M}$; $l = 1 \text{ см}$

Fig. 2 Absorption spectra of solutions of 8-hydroxyquinoline and its azo coupling products with diazotized ceftriaxone, a model solution (CEFTR + urine) and a model solution (CEFTR + urine) with the addition of standard CEFTR solution. Diazotization conditions: $C_{\text{HCl}} = 12.0 \text{ M}$, $C_{\text{CEFTR}} = 1.875 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ($C_{\text{CEFTR}} = 7.5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ in a 25.0 ml flask), $C_{\text{NaNO}_2} = 3.6 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $t_{\text{diazot.}} = 5 \text{ min}$.

Conditions for azo coupling: $C_{8\text{-HOQ}} = 3.2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{NaOH}} = 0.16 \text{ M}$; $l = 1 \text{ cm}$

Як бачимо зі спектрів на рис. 2, добавка ЦЕФТР до модельної суміші на основі сечі веде до збільшення аналітичного сигналу. Зробивши відповідні розрахунки на основі результатів дослідження, отримали такі результати. Під час визначення амоксициліну у сечі у реакційну суміш було введено 0,259 мг цефтріаксону, а знайдено, за методом добавок, 0,272 мг, що є завищеним результатом, однак набагато кращим, ніж у випадку застосування методу порівняння.

Маючи попередню інформацію, що компоненти сечі взаємодіють із діазотованим ЦЕФТР, і беручи до уваги інформацію про активність у реакціях із діазосолями таких компонентів сечі, як сечова кислота та сечовина, ми дослідили їхній вплив на світлопоглинання азопродукту діазосолей ЦЕФТР із 8-оксихіноліном.

Розрахунки концентрації компонентів сечі робили на основі того, що здорова людина виділяє 0,8–1,5 л сечі на добу та з їхньої середньодобової кількості у сечі згідно з [10]. Концентрація сечової кислоти у сечі може становити $1,2 \cdot 10^{-2}$ М, а сечовини – 0,5 М. Було досліджено такі співвідношення ЦЕФТР:Речовина, які ми матимемо у сечі, оскільки ЦЕФТР потраплятиме у реакційну суміш разом із сечею. Результати дослідження впливу сечовини та сечової кислоти наведено на рис. 3.

Як бачимо зі спектрів світлопоглинання на рис. 3, ні сечовина, ні сечова кислота не взаємодіють із 8-оксихіноліном у лужному середовищі. Аналогічно компоненти холостого розчину усіх реагентів, що використовують для діазотування ЦЕФТР і подальшого азосполучення із 8-оксихіноліном у лужному середовищі, також не взаємодіють із сечовиною та сечовою кислотою, що відображають спектри світлопоглинання в межах довжин хвиль 500–600 нм. Однак і сечова кислота, і сечовина впливають на спектри світлопоглинання азосполуки діазотованого ЦЕФТР та 8-оксихіноліну; вони знижують аналітичний сигнал, причому сечовина більшою мірою. Це свідчить про те, що вони взаємодіють із діазосіллю ЦЕФТР, як ми раніше припускали. Сечовина руйнує нітрит, який використовують для отримання діазосоли, а сечова кислота сама реагує із діазосіллю ЦЕФТР, однак продукт взаємодії в досліджуваній ділянці спектра не поглинає. Та яка б не була причина, кількість діазосоли ЦЕФТР, доступної для взаємодії із 8-оксихіноліном, зменшується. Під час визначення ЦЕФТР у сечі можна спробувати збільшити кількість натрій нітриту для діазотування, щоб нівелювати вплив сечовини.

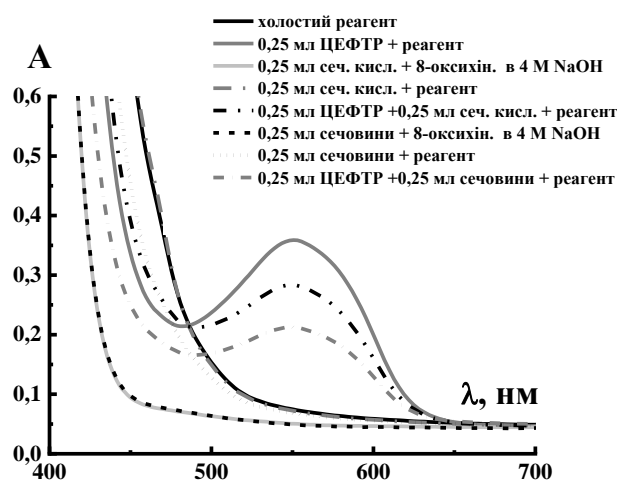


Рис. 3. Електронні спектри світлопоглинання розчинів 8-оксихіноліну та продуктів його взаємодії із діазотованим цефтріаксоном за наявності компонентів сечі. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 12,0$ М, $C_{\text{NaNO}_2} = 3,6 \cdot 10^{-3}$ М, $C_{\text{ЦЕФТР}}^0 = 1,875 \cdot 10^{-3}$ М, $C_{\text{сеч. кисл.}} = 1,12 \cdot 10^{-2}$ М, $C_{\text{сечов.}} = 5,0 \cdot 10^{-3}$ М, $t_{\text{діазот.}} = 5$ хв. Умови азосполучення: $C_{8\text{-Окс}} = 3,2 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{NaOH}} = 0,16$ М; $l = 1$ см

Fig. 3. Absorption spectra of solutions of 8-hydroxyquinoline and its azo coupling products with diazotized ceftriaxone at the presence of urine components.

Diazotization conditions: $C_{\text{HCl}} = 12.0$ М, $C_{\text{CEFTR}}^0 = 1.875 \cdot 10^{-3}$ М, $C_{\text{uric acid}} = 1.12 \cdot 10^{-2}$ М, $C_{\text{urea}} = 5.0 \cdot 10^{-3}$ М, $C_{\text{NaNO}_2} = 3.6 \cdot 10^{-3}$ М, $t_{\text{diazot.}} = 5$ min.

Conditions for azo coupling: $C_{8\text{-HOQ}} = 3.2 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{NaOH}} = 0.16$ М; $l = 1$ cm

Щоб з'ясувати, чи справді наше припущення правильне, ми досліджували утворення продуктів азосполучення за різної кількості натрій нітриту як діазотуючого агента. Як показали результати досліджень (рис. 4), незважаючи на різну кількість використаного нітриту, світлопоглинання розчинів азосполуки збігаються, що може свідчити про складнішу взаємодію у цій системі, ну або банально про те, що треба ще збільшити кількість натрій нітриту в реакційному середовищі.

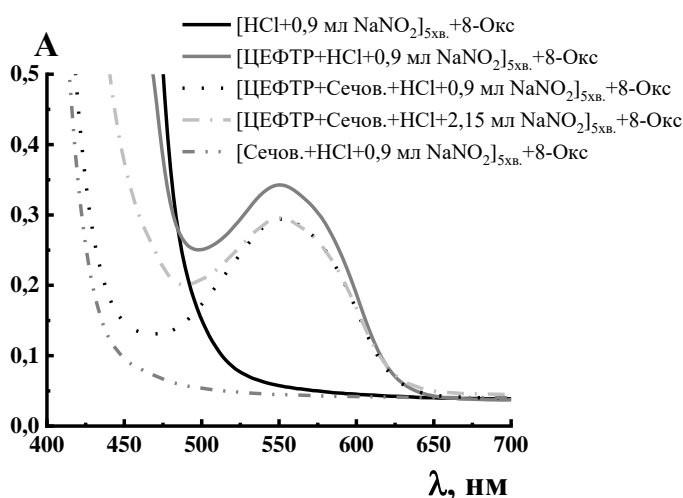


Рис. 4. Електронні спектри світлопоглинання холостого розчину 8-оксихіноліну та продуктів його взаємодії із діазотованим цефтріаксоном без та за наявності сечовини. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 12,0 \text{ M}$, $C_{\text{ЦЕФТР}} = 1,875 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{Сечовини}} = 5,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2}^0 = 0,1 \text{ M}$, $t_{\text{діазот.}} = 5 \text{ хв.}$ Умови азосполучення: $C_{8\text{-Окс}} = 1,09 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $C_{\text{NaOH}} = 0,16 \text{ M}$; $l = 1 \text{ см}$

Fig. 4. Absorption spectra of solutions of a blank solution of 8-hydroxyquinoline and its azo coupling products with diazotized ceftriaxone without and at the presence of urea. Diazotization conditions: $C_{\text{HCl}} = 12.0 \text{ M}$, $C_{\text{CEFTR}}^0 = 1.875 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{urea}} = 5.0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 0.1 \text{ M}$, $t_{\text{diazot.}} = 5 \text{ min.}$ Conditions for azo coupling: $C_{8\text{-HOQ}} = 1.09 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $C_{\text{NaOH}} = 0.16 \text{ M}$; $l = 1 \text{ cm}$

Сечова кислота, як ми з'ясували, може взаємодіяти лише із цефтріаксоном. Тому ми дослідили вплив більшої кількості цефтріаксону стосовно тої самої кількості сечової кислоти (рис. 5).

Як бачимо з рис. 5, незважаючи на різне співвідношення між сечовою кислотою та цефтріаксоном, сечова кислота значно знижує аналітичний сигнал. Ідея була така, щоб додати таку кількість цефтріаксону, щоб її вистачило і на взаємодію 1:1 з сечовою кислотою, і на ще таку саму кількість, яку використовували у розчині стандартного зразка для азосполучення із 8-оксихіноліном. Однак з'ясовано, що продукт взаємодії сечової кислоти із цефтріаксоном ніяк себе не проявляє на спектрах світлопоглинання, причому утворений продукт не вступає у реакцію азосполучення із 8-оксихіноліном. Про це свідчить значне зниження виходу азопродукту в обох випадках. На жаль, не маючи відомостей щодо стехіометрії продукту взаємодії сечової кислоти та ЦЕФТР, важко проводити якісь розрахунки щодо надлишків.

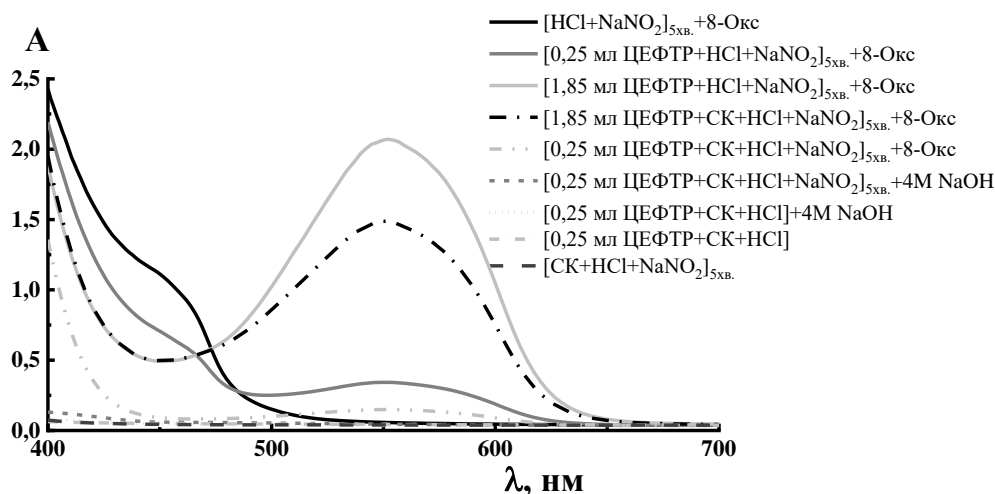


Рис. 5. Електронні спектри світлопоглинання холостого розчину 8-оксихіноліну та продуктів його взаємодії із діазотованим цефтріаксоном без та за наявності сечової кислоти.

Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 12,0 \text{ M}$, $C_{\text{ЦЕФТР}}^0 = 1,875 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $C_{\text{сеч. кисл.}} = 1,2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 3,6 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $t_{\text{діазот.}} = 5 \text{ хв.}$ Умови азосполучення: $C_{8\text{-Окс}} = 1,09 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $C_{\text{NaOH}} = 0,16 \text{ M}$; $l = 1 \text{ см}$

Fig. 5. Absorption spectra of solutions of a blank solution of 8-hydroxyquinoline and its azo coupling products with diazotized ceftriaxone without and at the presence of uric acid.

Diazotization conditions: $C_{\text{HCl}} = 12,0 \text{ M}$, $C_{\text{CEFTR}}^0 = 1,875 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $C_{\text{uric acid}} = 1,2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 3,6 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $t_{\text{diazot.}} = 5 \text{ min.}$

Conditions for azo coupling: $C_{8\text{-HOQ}} = 1,09 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $C_{\text{NaOH}} = 0,16 \text{ M}$; $l = 1 \text{ cm}$

Ми також досліджували селективність визначення цефтріаксону за наявності інших компонентів сечі, таких як натрій оксалат ($3,3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$), кальцій хлорид ($7,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) та глюкози ($8,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$). Як бачимо із рис. 6, досліджувані компоненти не заважають визначенню цефтріаксону за реакцією азосполучення із 8-оксихіноліном за таких співвідношень стосовно цефтріаксону, які можуть траплятися у сечі. Та й у вищих кількостях вони також не заважають (натрій оксалат ($1,2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$), кальцій хлорид ($2,2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$) та глюкози ($1,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$)).

Наступним етапом наших досліджень було з'ясувати характер залежності світлопоглинання розчину азопродукту ЦЕФТР–8-Окс від концентрації цефтріаксону на фоні сечі (рис. 7) і за отриманим градуированим графіком зробити визначення ЦЕФТР у модельних сумішах на основі сечі. Варто зазначити, що в процесі діазотування цефтріаксону за наявності сечі ми використали більший, ніж оптимальний 10-кратний надлишок NaNO_2 , користуючись даними, що концентрація сечовини у сечі становить $0,5 \text{ M}$.

Як бачимо з рис. 7, нам вдалося отримати прямолінійний графік залежності світлопоглинання розчинів азосполук діазосоли ЦЕФТР із 8-оксихіноліном на фоні сечі від концентрації цефтріаксону. Результати визначення ЦЕФТР за цим графіком наведено в табл. 4.

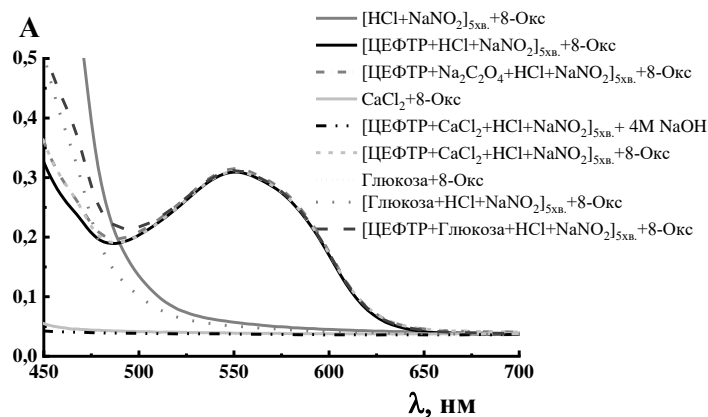


Рис. 6. Електронні спектри світлопоглинання холостого розчину 8-оксихіноліну та продуктів його взаємодії із діазотованим цефтріаксоном за наявності компонентів сечі. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 12,0 \text{ M}$, $C_{\text{CEFTR}} = 1,875 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4} = 3,3 \cdot 10^{-8} \text{ M}$, $C_{\text{CaCl}_2} = 7,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{Глюкоза}} = 8,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 3,6 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $t_{\text{діазот.}} = 5 \text{ хв}$.

Умови азосполучення: $C_{8\text{-Окс}} = 1,09 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $C_{\text{NaOH}} = 0,16 \text{ M}$; $l = 1 \text{ см}$

Fig. 6. Absorption spectra of solutions of a blank solution of 8-hydroxyquinoline and its azo coupling products with diazotized ceftriaxone at the presence of urine components.

Diazotization conditions: $C_{\text{HCl}} = 12.0 \text{ M}$, $C_{\text{CEFTR}}^0 = 1.875 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4} = 3.3 \cdot 10^{-8} \text{ M}$,

$C_{\text{CaCl}_2} = 7.5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{glucose}} = 8.0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 3.6 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $t_{\text{diazot.}} = 5 \text{ min}$.

Conditions for azo coupling: $C_{8\text{-HOQ}} = 1.09 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $C_{\text{NaOH}} = 0.16 \text{ M}$; $l = 1 \text{ cm}$

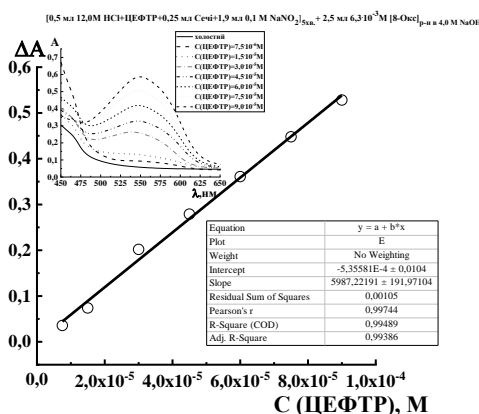


Рис. 7. Графік лінійної залежності аналітичного сигналу від концентрації ЦЕФТР на фоні сечі ($V_{\text{сечі}} = 0,25 \text{ мл}$; $V_{\text{к-би}} = 25,0 \text{ мл}$).

Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 12,0 \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 7,6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $t_{\text{діазот.}} = 5 \text{ хв}$.

Умови азосполучення: $C_{8\text{-Окс}} = 6,3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{NaOH}} = 0,16 \text{ M}$; $l = 1 \text{ см}$, $n = 5$; $P = 0,95$

Fig. 7. Calibration curve for CEFTR determination on the urine background

($V_{\text{urine}} = 0.25 \text{ ml}$; $V_{\text{flask}} = 25.0 \text{ ml}$).

Diazotization conditions: $C_{\text{HCl}} = 12.0 \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 7.6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $t_{\text{diazot.}} = 5 \text{ min}$.

Conditions for azo coupling: $C_{8\text{-HOQ}} = 6.3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{NaOH}} = 0.16 \text{ M}$; $l = 1 \text{ cm}$, $n = 5$; $P = 0.95$

Таблиця 4

Спектрофотометричне визначення цефтріаксону у модельних розчинах із додаванням сечі методом градуйованого графіка на фоні сечі ($V_{\text{сечі}} = 0,25$ мл; $V_{\text{к-би}} = 25,0$ мл).
 Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 12,0$ М, $C_{\text{NaNO}_2} = 7,6 \cdot 10^{-4}$ М, $t_{\text{діазот.}} = 5$ хв.
 Умови азосполучення: $C_{8\text{-Окс}} = 6,3 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{NaOH}} = 0,16$ М; $l = 1$ см, $n = 5$; $P = 0,95$

Table 4

Results of ceftriaxone spectrophotometric determination in model solutions with the addition of urine by the calibration curve method on the urine background ($V_{\text{urine}} = 0.25$ ml; $V_{\text{flask}} = 25.0$ ml), $n = 5$; $P = 0.95$.
 Diazotization conditions: $C_{\text{HCl}} = 12.0$ M, $C_{\text{NaNO}_2} = 7.6 \cdot 10^{-4}$ M, $t_{\text{diazot.}} = 5$ min.
 Conditions for azo coupling: $C_{8\text{-HOQ}} = 6.3 \cdot 10^{-4}$ M, $C_{\text{NaOH}} = 0.16$ M; $l = 1$ cm, $n = 5$; $P = 0.95$

Введено ЦЕФТР, М	Знайдено ЦЕФТР, М $\bar{x} \pm \frac{S \cdot t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$ Sr	Знайдено ЦЕФТР в суміші, М $\bar{x} \pm \frac{S \cdot t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$ Sr
$3,75 \cdot 10^{-5}$	$(3,76 \pm 0,05) \cdot 10^{-5}$ 0,009	$(3,79 \pm 0,07) \cdot 10^{-5}$ 0,013

Як бачимо з табл. 4, вони вийшли дещо завищеними у наперед виготовленій модельній суміші та задовільні в аналогічних умовах, за яких будувався градуювальний графік. Однак загалом метод градуювального графіка на фоні сечі дав кращі результати, ніж метод добавок, хоча великим його недоліком є те, що хімічний склад сечі не є сталим і залежить від стану здоров'я пацієнта та їжі, яку він споживає.

Однак, все ж таки, зважаючи на те, що кращі результати було отримано методом градуювального графіка на фоні сечі, то пропонуємо адаптовану методику визначення цефтріаксону у сечі за реакцією азосполучення із фенольним реагентом 8-оксихіноліном.

4. Висновки

Для спектрофотометричного визначення β -лактамного антибіотику цефтріаксону у біологічній рідині сечі було обрано реакцію азосполучення із 8-оксихіноліном. Обрана методика характеризується достатньою чутливістю, що передбачає можливе її застосування для визначення малих кількостей ЦЕФТР у сечі. Проведено апробацію методики визначення ЦЕФТР на модельних розчинах сечі здорової людини. Результати досліджень показали, що величина світлопоглинання азосполуки ЦЕФТР за наявності сечі має значно нижче значення, що зумовлене здатністю діазотованого ЦЕФТР вступати в реакцію із деякими компонентами сечі (продукти взаємодії в досліджуваній ділянці не поглинають), внаслідок цього вихід азопродуктів ЦЕФТР із 8-Окс суттєво зменшується. Метод добавок у випадку визначення цефтріаксону дав гірші результати, ніж метод градуйованого графіка на фоні сечі. Недоліком останнього є залежність хімічного складу сечі від стану здоров'я пацієнта та їжі, яку він споживає.

5. Подяки

Роботу частково підтримано Фондом Сімонса ("President Directed-Ukraine Support Grants"; ID: SFI-PD-Ukraine-00014574).

1. *Arumugham V. B., Cascella M.* Third Generation Cephalosporins. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing; 2019 Jan. – [Cit. 2025, November 08]. https://www.researchgate.net/publication/337838339_Third_Generation_Cephalosporins
2. *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).
3. *Jenke D. R.* Drug binding by reservoirs in elastomeric infusion devices // *Pharm. Res.* 1994. Vol. 11, No. 7. P. 984–989. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1018927118863>
4. *El-Shaboury S. R., Saleh G. A., Mohamed F. A.* [et al.]. Analysis of cephalosporin antibiotics. Review // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007. Vol. 45, No. 1. P. 1–19. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2007.06.002>
5. *Owens H. M., Dash A. K.* Ceftriaxone Sodium: Comprehensive Profile // *Profiles Drug Subst. Excip. Relat. Methodol.* 2003. Vol. 30. P. 21–57. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0099-5428\(03\)30002-4](https://doi.org/10.1016/S0099-5428(03)30002-4)
6. *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
7. *Golubeva M. V., Alekseev V. G.* Ionic Equilibria in Aqueous Ceftriaxone Solution // *Fundam. Res.* 2012. Vol. 6, No. 2. P. 494–497 (in russian). <https://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=30020>
8. *Schleibinger M., Steinbach C. L., Töpper Ch.* et al. Protein binding characteristics and pharmacokinetics of ceftriaxone in intensive care unit patients // *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2015. Vol. 80, No. 3. P. 525–533. DOI: <https://doi.org/10.1111/bcp.12636>
9. *Chastain D. B., S. King T., Stover K. R.* Rethinking urinary antibiotic breakpoints: analysis of urinary antibiotic concentrations to treat multidrug resistant organisms // *BMC Res. Notes.* 2018. Vol. 11:497. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3599-8>
10. Normal Constituents of Urine / AlliedGuru. – [Cit. 2025, November 08]. <https://alliedguru.com/normal-constituents-of-urine>
11. *Ascalone V., Dal Bò L.* Determination of ceftriaxone, a novel cephalosporin, in plasma, urine and saliva by high-performance liquid chromatography on an NH_2 bonded-phase column // *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 1983. Vol. 273, No. 2. P. 357–366. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)80956-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)80956-1)
12. *Demotes-Mainard F. M., Vinçon G. A., Jarry C. H.* et al. Micromethod for determination of ceftriaxone in plasma and urine by high-performance liquid chromatography // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1988. Vol. 6, No. 4. P. 407–413. DOI: [https://doi.org/10.1016/0731-7085\(88\)80006-2](https://doi.org/10.1016/0731-7085(88)80006-2)
13. *da Trindade M. T., Salgado H. R. N.* A Critical Review of Analytical Methods for Determination of Ceftriaxone Sodium // *Critical Reviews in Analytical Chemistry.* 2018. Vol. 48, No. 2. P. 95–101. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408347.2017.1398063>
14. *Zhao W., Zhang Ya., Li Q.* Indirect spectrophotometric determination of sodium ceftriaxone with n-propyl alcohol-ammonium sulfate–water system by extraction flotation of copper(II) // *Clin. Chim. Acta.* 2008. Vol. 391, No. 1–2. P. 80–84. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2008.02.010>
15. *Markina N. E., Goryacheva I. Y., Markin A. V.* Sample pretreatment and SERS-based detection of ceftriaxone in urine // *Anal. Bioanal. Chem.* 2018. Vol. 410. P. 2221–2227. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0888-y>

16. Masood S. H., Aslam N. In vitro susceptibility test of different clinical isolates against ceftriaxone // *Oman Med. J.* 2010. Vol. 25, No. 3. P. 199–202.
DOI: [10.5001/omj.2010.56](https://doi.org/10.5001/omj.2010.56)
17. 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. Iss. 65. P. 155–170 (in Ukrainian). DOI: <http://dx.doi.org/10.30970/vch.6501.155>
18. Korkuna O., Lukashyk N. Spectrophotometric determination of ceftazidime in urine by the reaction of the azo coupling with resorcin // *Visnyk Lviv Univ. Ser. Chem.* 2025. Iss. 66. P. 157–167 (in Ukrainian). DOI: <https://doi.org/10.30970/vch.6601.157>
19. Kostiv O., Korkuna O., Ornat M. Azocoupling reaction of cephalosporin antibiotics with 8-hydroxyquinoline and its application in the analysis of medicinal products // *Methods Objects Chem. Anal.* 2020. Vol. 15, No. 3. P. 144–155 (in Ukrainian).
DOI: [10.17721/moca.2020.144-155](https://doi.org/10.17721/moca.2020.144-155)

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF CEFTRIAXONE IN URINE DURING ANTIBACTERIAL THERAPY BY THE REACTION OF THE AZO COUPLING WITH 8-HYDROXYQUINOLINE

O. Korkuna*, A. Futryk

*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.

Ceftriaxone (CEFTR) is a semi-synthetic β -lactam antibiotic belonging to the cephalosporin group. It is mainly excreted in the urine in an unchanged state. Determining the concentration of ceftriaxone in urine is important in situations where renal or hepatic impairment is present, as this can lead to drug accumulation and an increased risk of side effects. It is also important in the treatment of urinary tract infections, where efficacy depends on achieving sufficient concentrations in the urine. Furthermore, it is important in cases of suspected altered excretion or pharmacokinetics, for example in critically ill patients, children, or patients with hypoalbuminaemia, since ceftriaxone is highly protein-bound. It is also important during pharmacodynamic and microbiological studies, where determining the level of ceftriaxone in urine helps to assess the adequacy of drug excretion in affecting infectious agents and resistant strains.

The elimination half-life of ceftriaxone in adults following administration is 5.8–8.7 hours. Between 50 and 60 % of the drug is excreted unchanged by the kidneys within 48 hours, and between 40 and 50 % is excreted unchanged in bile. The most common methods for determining ceftriaxone in urine are high-performance liquid chromatography (HPLC), particularly with UV detection (HPLC–UV), and mass spectrometry (HPLC–MS/MS), due to their high sensitivity and selectivity. Other faster methods are also employed, such as ultra-performance liquid chromatography (UPLC), spectrophotometry as a simpler alternative, surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) for rapid analysis, and, in some cases, microbiological methods to assess antibacterial activity. The complex

nature of the urine matrix requires pretreatment for CEFTR extraction, which complicates the analysis process. For the ceftriaxone determination in the urine, the spectrophotometric method developed by us previously using the reaction of azo coupling with 8-hydroxyquinoline (8-HOQ) was chosen. The technique is based on the CEFTR diazotization by the action of sodium nitrite in a medium of 12.0 M hydrochloric acid and subsequent azo coupling with 8-HOQ in an alkaline medium with a final NaOH concentration of 0.16 M under the 10-fold excess of the reagent toward CEFTR, with the formation of a cherry-colored azo compound, which is characterized by a new absorbance maximum at $\lambda = 550 \text{ nm}$ ($\text{LOD} = 5.92 \cdot 10^{-7} \text{ M}$).

The CEFTR determination method was tested on model urine solutions from a healthy person. The results of the study showed that the light absorption value of the azo compound ceftriaxone in urine is significantly lower, due to its ability to react with some urine components (interaction products in the studied area do not absorb). Consequently, the yield of the azo product ceftriaxone with 8-HOQ is significantly reduced. The standard addition method gave worse results than the method of a calibration curve when determining the ceftriaxone against a urine background.

Keywords: ceftriaxone, 8-hydroxyquinoline, urine, azo coupling, spectrophotometry.

Стаття надійшла до редколегії 14.11.2025

Після доопрацювання 12.01.2026

Прийнята до друку 12.02.2026

Оприлюднена онлайн 29.05.2026