

## Análisis Simultáneo de Mezclas de Trimetoprima y Sulfametoxazol por el Método de Ceros Cruzados

HECTOR A. ANDREETTA, RUBEN S. RIMADA y NOELIA T. GIMENEZ

Laboratorios BAGO S.A.,  
calle 4 N° 1429, (1900) La Plata, Argentina

**RESUMEN.** Fue utilizada la espectroscopía derivativa de orden uno, con el empleo de la técnica de "Ceros cruzados", para la cuantificación simultánea de mezclas de sulfametoxazol y trimetoprima. Se informa acerca de la validación de esta técnica para dichos compuestos, así como la aplicación de la misma a productos de origen farmacéutico. También se comparan en este trabajo los resultados encontrados entre el método espectrofotométrico desarrollado y las técnicas conocidas de cuantificación de sulfametoxazol y trimetoprima (métodos volumétricos)<sup>1</sup>.

**SUMMARY.** "Simultaneous Analysis of Trimethoprim and Sulphamethoxazole Mixtures by the Zero Crossing Method". Quantification of sulphamethoxazole and trimethoprim mixtures were made by derivative spectroscopy and "Zero Crossing" methods. Application and validation of these methods with pharmaceutical samples are reported. Comparison of results obtained by spectrophotometric methods and usual quantification techniques (volumetric methods)<sup>1</sup> of sulphamethoxazole and trimethoprim are also given.

### INTRODUCCION

La eficacia, simplicidad del tratamiento, el amplio espectro antibacteriano, la rareza y benignidad de las habituales intolerancias, hacen de la combinación sulfametoxazol y trimetoprima una mezcla ampliamente utilizada. Por lo tanto también son numerosos los métodos de análisis que se refieren a ellos. Dentro de los más utilizados, se pueden mencionar procedimientos por HPLC, que determinan ambos componentes a la vez <sup>2-4</sup>, o bien aquéllos que los determinan por separado con extracción de solventes, como por ejemplo para la trimetoprima

(TMP) y titulación amperométrica para el sulfametoxazol (SMZ) <sup>5</sup>.

Generalmente estos métodos tropiezan con inconvenientes tales como preparación de las muestras, ajustes de variables experimentales: pH, concentración, eluyentes, temperatura, materiales de relleno de columnas en el caso de HPLC, etc., que implican un esfuerzo en el análisis que muchas veces no se ven reflejados en los resultados obtenidos y además requieren un excesivo consumo de horas de laboratorio cuando se quieren usar estas técnicas para controlar un número grande de muestras.

**PALABRAS CLAVE:** Sulfametoxazol y Trimetoprima; Determinación por Ceros Cruzados.

**KEY WORDS:** Sulphamethoxazole and Trimethoprim; Zero Crossing Determination.

Los métodos espectrofotométricos son una posibilidad cierta frente a las dificultades anteriormente mencionadas. Sin embargo la determinación de componentes en una mezcla con absorbancias solapadas a las longitudes de onda de medida en un espectro "normal", involucra forzosamente la utilización de técnicas auxiliares matemáticas<sup>6,7</sup>, colorimétricas<sup>8,9</sup>, espectrofotometría diferencial<sup>10,11</sup>, etc.

Otro de los métodos espectrofotométricos es transformar los mismos en sus respectivas derivadas. En esta técnica la absorbancia de una muestra en solución o estado gaseoso es diferenciada respecto a la longitud de onda, generando derivadas de primero, segundo u órdenes más altos.

Los espectros derivados conducen por lo general a perfiles de bandas características, donde son observados sustanciales cambios en los gradientes y curvaturas, así como un comportamiento bipolar de los mismos.

La primera derivada de un espectro de absorción UV-visible es empleada frecuentemente para detectar picos solapados o escondidos, constituyéndose en una característica identificatoria del analito en cuestión<sup>12,13</sup>. No obstante, la segunda derivada (describe la curvatura de la banda original) es analíticamente importante<sup>14,15</sup>, dado que tanto la medida de la pendiente (derivada de orden uno) o la curvatura de un espectro resaltan las características más sutiles del solapamiento; de este modo bandas sin resolver pueden ser separadas y cuantificadas.

Una propiedad importante de los procesos derivativos es que las bandas anchas tienden a enangostarse o hacerse agudas cuando se incrementa el orden de la derivada, debido a que la amplitud (altura) de una banda considerada como gaussiana es inversamente proporcional al ancho de la banda original (banda de orden cero elevado al orden  $n$  de la derivada). Por lo tanto,

cuanto mayor sea el orden de la derivada más angosta será la banda del espectro derivado. Así por ejemplo, si tenemos dos bandas coincidentes de igual intensidad pero de diferentes anchos espectrales, mediante este procedimiento podemos relacionarlas, dado que las mismas van a tener diferentes amplitudes en el espectro derivado. Esta propiedad puede emplearse para eliminar interferencias espectrales como por ejemplo difracción de luz, turbidez de las muestras, problemas ocasionados por deriva de línea de base, etc., que restan sensibilidad a la detección de los espectros.

En general los métodos para dar derivadas espectrales caen dentro de dos clases: I) Métodos Ópticos, que operan sobre la radiación del mismo haz y II) Métodos Electrónicos o Digitales, que actúan a la salida del detector fotométrico.

El primero se fundamenta en la modulación de la longitud de onda incidente, mientras el segundo mide los cambios de absorción con el tiempo. El mecanismo electrónico genera la derivada en función del tiempo, cuando el espectro es barrido a velocidad constante.

El método de los Ceros Cruzados consiste en medir la absorbancia de un componente en una mezcla, mientras los otros no absorben a esa longitud de onda y en ese orden de derivada espectral.

La aplicación de este caso particular de la espectroscopía derivativa ha posibilitado resolver de manera cuantitativa distintas mezclas de principios activos de interés en la industria farmacéutica<sup>16,17</sup>.

Las ventajas de usar la derivada de primer orden para resolver simultáneamente y en forma cuantitativa SMZ y TMP frente a otros tipos de métodos ya ha sido puntualizado por otros autores<sup>12</sup>. Para este caso en particular se ha utilizado la derivada de orden uno conjuntamente con la técnica de los Ceros Cruzados para la determinación

cuantitativa de la mezcla SMZ y TMP. La aplicación de la misma se efectúa sobre formulaciones farmacéuticas de dicha mezcla.

PARTE EXPERIMENTAL

*Espectro UV*

La SMZ y la TMP fueron determinadas en medio ácido clorhídrico 0,1 N. Las diluciones de las mezclas y de los patrones puros se prepararon a partir de soluciones stock de SMZ y TMP. Las relaciones de concentraciones para SMZ y TMP fueron 5 a 1 respectivamente, de manera similar a como se encuentran en distintas formas farmacéuticas.

El equipo utilizado fue un espectrofotómetro UV-VIS Shimadzu UV-160, con celda de cuarzo de 1 cm de camino óptico y 3 ml de capacidad.

El intervalo de longitudes de onda en que se midieron los espectros fueron de 230 a 320 nm.

Para determinar los Ceros Cruzados de ambas drogas activas se procedió de la siguiente forma: a) con la derivada de orden uno de cada espectro de los componentes puros se busca el cero de absorbancia de uno de los componentes; b) a continuación

se mide el valor de absorbancia del otro; c) se repite el procedimiento para el otro componente de la mezcla en forma idéntica al anterior; d) con los valores de absorbancia y los ceros para cada componente puro se miden las mezclas.

Antes de realizar los ensayos con las muestras en estudio, se validó el método de trabajo mediante las siguientes comprobaciones:

a) No interacción de las drogas activas en la mezcla.

b) El Cero Cruzado del espectro derivado de uno de los dos componentes debe ser función solamente de la concentración del otro componente. Es decir que la concentración de los componentes de la mezcla en el Cero Cruzado es función solamente de uno de ellos, aquél que absorbe a esa longitud de onda en el espectro derivado.

c) Linealidad de la respuesta Absorción versus Concentración.

a) *No Interacción de los Componentes en la Mezcla.* La figura 1 muestra los espectros de TMP y SMZ en la mezcla y por separado en medio ácido clorhídrico 0,1 N para un intervalo espectral de 240 a 320

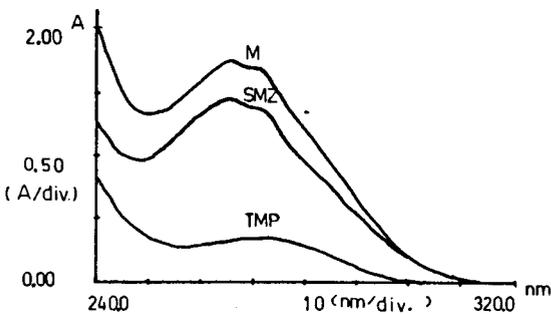


Figura 1. Espectros de absorción en función de la longitud de onda para TMP y SMZ puras y la mezcla de ambos (M), en relación de concentración de 1 en 5 respectivamente. Concentración de TMP pura: 16,60 µg/ml. Concentración de SMZ pura: 80,30 µg/ml. El medio es ácido clorhídrico 0,1 N.

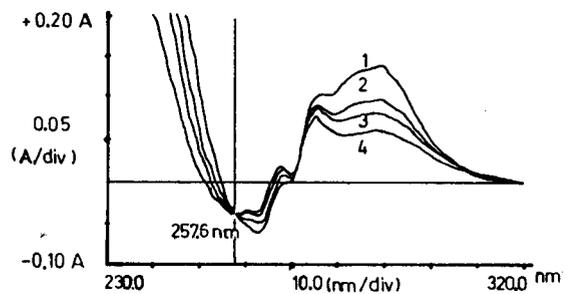


Figura 2. Espectros de las derivadas primeras de SMZ con concentración constante igual a 40,06 µg/ml y TMP variable: 1) 37,50; 2) 22,50; 3) 15,00; 4) 7,50 µg/ml respectivamente. Todas las curvas pasan por 257,6 nm, cero de absorbancia de TMP.

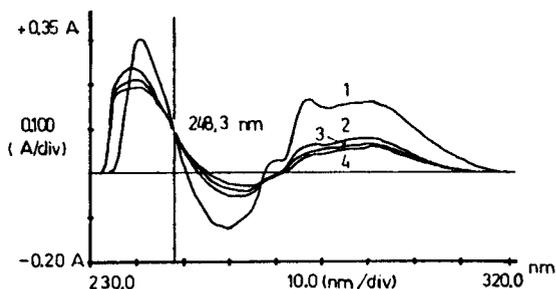


Figura 3. Espectros UV de las derivadas primeras de mezclas con TMP de concentración constante igual a 15,95 µg/ml y SMZ variable: 1) 80,12; 2) 25,64; 3) 19,22; 4) 12,82 µg/ml. El valor cero de absorbancia de la SMZ corresponde a 248,3 nm.

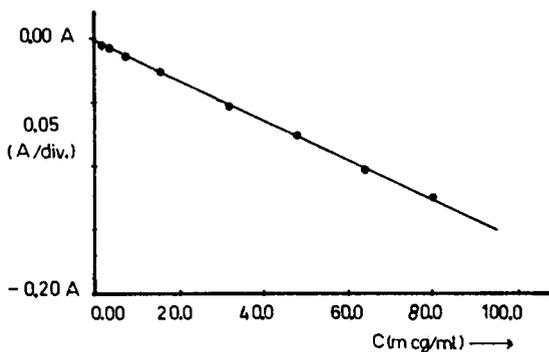


Figura 5. Respuesta de absorción vs. concentración para la SMZ pura a 257,6 nm. Cero de absorción de la derivada primera de TMP. Las concentraciones de sulfa fueron las siguientes: 2,40; 4,01; 8,01; 16,02; 32,05; 48,07; 64,10; 80,12 µg/ml. Valor de la pendiente:  $-0,0016 \pm 0,0001$ . Coeficiente de Corrección: 0,9995.

nm. Se midieron las absorciones de los mismos para intervalos de longitudes de onda de 1 nm.

Para todas las longitudes de onda medidas se encontró que la suma de las absorciones o alturas del espectro de orden cero para SMZ y TMP estaban en perfecta concordancia con las de la mezcla.

*b) Existencia de Cero Cruzado.* Los espectros de las derivadas primeras para las distintas mezclas con concentración de

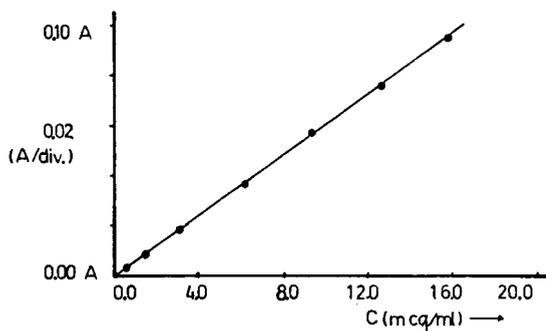


Figura 4. Linealidad de la respuesta absorción vs. concentración de la derivada primera de TMP pura, medidas a 248,3 nm (cero de la SMZ). Las concentraciones preparadas fueron siete: 0,80; 1,60; 3,19; 6,38; 9,57; 12,76; 15,95 µg/ml. Valor de la pendiente:  $0,059 \pm 0,0001$ . Coeficiente de Corrección: 0,9999.

SMZ constante (40,06 µg/ml) y TMP variable están representados en la figura 2, en la que se puede ver que para el valor cero de absorbancia de la TMP (257,6 nm) se tiene igual altura para distintas concentraciones de la TMP. Por lo tanto la TMP no absorbe a esa longitud de onda en la mezcla.

Igualmente se procedió para el caso inverso, es decir manteniendo la concentración de TMP constante (15,95 µg/ml) y variando la concentración de SMZ.

Las curvas que se obtienen para las diferentes concentraciones están en la figura 3, donde a 248,3 nm (cero de absorbancia de la sulfa), se lee la misma altura de la TMP para diferentes concentraciones de SMZ.

*c) Linealidad de la Respuesta.* Si el espectro normal cumple con la ley de Beer, el espectro derivado también debe hacerlo, a pesar de manejarnos con otras unidades (en este caso unidades de absorbancia expresada en nanómetros).

Las rectas de absorción versus concentración para los espectros derivados de los patrones de SMZ y TMP puros están representados en las figuras 4 y 5.

La figura 4 muestra la recta obtenida para el estándar de TMP pura a 248,3 nm de siete concentraciones que van de 0,8 a 15,95 µg/ml. La pendiente de la curva que pasa por el origen es de  $0,059 \pm 0,0001$ , con un coeficiente de correlación de 0,9999.

Con las sulfas se prepararon ocho concentraciones, desde 2,4 µg/ml hasta 80,12 µg/ml. La pendiente de la recta que pasa por cero es -0,0016 y un coeficiente de correlación de 0,9995 (Fig. 5).

### RESULTADOS Y DISCUSION

Para los ensayos de recuperación se utilizaron las rectas de calibración de las SMZ y TMP puras, dadas en la figura 4 y 5 respectivamente.

Se prepararon una serie de mezclas estándares a diferentes concentraciones, manteniendo la relación de 5 partes de SMZ y 1 parte de TMP. Las tablas 1 y 2 muestran los resultados hallados para la sulfa y la trimetoprima, respectivamente.

De las tablas se puede observar que los mejores porcentajes del recuperado en las

mezclas están en la zona intermedia de los preparados, entre 40,0 y 64,0 µg/ml para la SMZ y entre 8,0 y 12,8 µg/ml para la TMP. Estos intervalos de concentraciones se tuvieron en cuenta cuando se analizan mezclas problemas que respondían a formulaciones farmacéuticas.

El buen comportamiento de la ley de Beer que se observa en las curvas de los espectros derivados para las drogas puras, sumado a los resultados de los incisos a) y b), hacen posible utilizar estas curvas como patrones a las cuales se referirán las mezclas problemas.

La Tabla 3 muestra los resultados encontrados para distintos ensayos (denominados E-1; E-2 y E-3) incluida la cantidad teórica permitida, expresada en mg, que se debería encontrar en cada comprimido.

En la misma tabla se encuentran los valores calculados por los métodos volumétricos: en medio no acuoso para TMP y en medio acuoso para SMZ<sup>1</sup>.

Se realizaron un número de 10 determinaciones equivalentes para cada ensayo. Todos los ensayos efectuados cumplen con las especificaciones.

Teórico µg/ml	Experimental µg/ml	Dife- rencia	% Recuperado
0,00	0,00	0,00	0,00
16,00	14,84	- 1,15	92,80
32,00	31,14	0,86	97,31
40,00	39,19	0,81	98,00
48,00	47,60	0,40	99,20
56,00	54,37	1,63	97,00
64,00	61,07	2,93	95,42
72,00	67,01	4,99	93,07
80,00	72,36	7,64	90,05

Tabla 1. Ensayos de recuperación de SMZ a partir de mezclas sintéticas de SMZ-TMP en la relación 5:1, utilizando las curvas de calibración de SMZ pura a 257,6 nm, cero de absorbancia de TMP.

Teórico µg/ml	Experimental µg/ml	Dife- rencia	% Recuperado
0,00	0,00	0,00	0,00
3,20	3,38	-0,18	105,63
4,80	5,11	-0,31	106,46
8,00	8,35	-0,35	104,38
9,60	10,00	-0,40	104,00
11,20	11,44	-0,24	102,20
12,80	12,70	0,10	99,21
14,40	13,87	0,53	96,30
16,00	14,99	1,01	93,70

Tabla 2. Ensayos de recuperación de TMP a partir de mezclas sintéticas de SMZ-TMP en la relación 5:1, utilizando las curvas de calibración de TMP pura a 248,3 nm, cero de absorbancia de SMZ.

Ensayo N°	Componentes	Cant. Teór. (mg) ± 5%	Cantidad Medida					
			Media	CV	%Error(*)	Media	CV	%Error(*)
E-1	SMZ	760 - 840	784,5	2,63	-1,94	765,9	0,56	-4,25
	TMP	152 - 168	163,0	3,34	1,87	164,7	1,49	2,92
E-2	SMZ	760 - 840	783,1	4,00	-2,13	768,4	0,77	-3,93
	TMP	152 - 168	162,6	2,40	1,63	163,5	1,37	2,13
E-3	SMZ	760 - 840	788,0	1,90	-1,50	770,7	0,84	-3,66
	TMP	152 - 168	166,3	2,20	3,94	161,8	3,41	1,12

Tabla 3. Resultados hallados del análisis de diferentes muestras conteniendo la asociación SMZ y TMP en la forma de comprimidos, mediante métodos volumétricos y espectroscopía de orden uno con Ceros Cruzados y curvas de calibración de SMZ y TMP puras.

(\*) % Error:  $\frac{E-E_0}{E_0} \times 100$ , donde  $E$  es la media de la cantidad medida y  $E_0$  la media de la cantidad teórica permitida. CV: coeficiente de variabilidad.

Los porcentajes de error encontrados para ambos componentes de la mezcla son mayores en el método derivativo. Sin embargo la reproducibilidad y repetitividad de los resultados son mayores para el método de los Ceros Cruzados, según lo demuestran los valores de los coeficientes de variabilidad.

Es interesante observar que los errores que se cometen en las determinaciones de las sulfas son de signo negativo (defecto), tanto para el método volumétrico como para el de Ceros Cruzados. También dan errores por defecto los porcentajes recuperados de las mezclas. El efecto inverso ocurre en el caso de la TMP.

Si bien la exactitud del método de Ceros Cruzados es menor que la de los métodos volumétricos, la rapidez y simplicidad del primero lo hacen preferible.

La reproducibilidad del método posibilitaría, además, usar las curvas de calibración de los patrones puros durante largo tiempo, sin necesidad de tener en cuenta un número grande de variables experimentales tales como temperatura, pH, eluyentes, materiales

de rellenos de columnas, etc., e incluso si el equipo permite hacerlo se puede guardar en los archivos del espectrofotómetro.

Todo esto indica que una vez realizada la inversión de tiempo inicial para poner a punto el método de Ceros Cruzados, se puede obtener de una manera rápida y sencilla la cuantificación de la mezcla de SMZ y TMP.

El empleo de esta técnica se ha extendido también a otras muestras de diferentes composiciones cuali-cuantitativas de sulfa, TMP y otras drogas activas. Los primeros resultados encontrados, que serán objeto de una posterior publicación, son alentadores para continuar con este procedimiento.

En este contexto es importante mencionar que los estudios de cinética de disolución, se pueden hacer directamente sobre el solvente de disolución (HCl 0,1 N) sin tener necesidad de cambiar el disolvente, o bien extraer los componentes y analizarlos en otro medio o ajustar las condiciones de disolución a un medio específico, como por ejemplo HPLC<sup>18</sup>.

## CONCLUSION

El uso de la espectroscopía derivativa de orden uno conjuntamente con el empleo del método de Ceros Cruzados permite resolver cuantitativa y simultáneamente mezclas de SMZ y TMP.

Los resultados que surgen de emplear esta metodología para formulaciones farmacéuticas indican una mayor reproducibilidad que los métodos comunes empleados en nuestro laboratorio (métodos volumé-

tricos), siendo un procedimiento más sencillo, rápido y fácil de aplicar si se trata sobre todo de efectuar un control rutinario de muestras (por ejemplo en Control de Calidad).

**AGRADECIMIENTOS.** Los autores desean expresar su agradecimiento a los Dres. Luis A. Dall y Pablo Lufrano por su estímulo y discusión de los temas desarrollados en el presente trabajo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. *British Pharmacopoeia* (1980) The Pharmaceutical Press, London U.K., pág. 752-3
2. Ballerini, R., M. Chinol, A. Stocchi y A. Cambi (1980) *Il Farmaco*, Ed. Pr. 35: 84-91
3. Weinfeld, R.E. y T.C. Macasieb (1979) *J. Chrom.* 164: 73-84
4. Hung, C.T. y D.G. Perrier (1985) *J. Liq. Chrom.* 8: 521-36
5. *British Pharmacopoeia* (1980) The Pharmaceutical Press, London U.K., págs. 595-6
6. Glenn, A.L. (1963) *J. Pharm. Pharmacol.* 15: 123-30 T Suppl.
7. Wahbi, A.M., H. Abdine, M.A. Korany y F.A. Elyazbi (1978) *J. Pharm. Sci.* 67: 140-1
8. Rao, G.R., M.V.S. Krishnan y C.M.R. Srivastava (1978) *C.A. Appl.* 89: 169175
9. Vachek, J. y B. Kakac (1976) *C.A. Appl.* 85: 198231
10. Doyle, D.T. y F.R. Fazzari (1974) *J. Pharm. Sci.* 63: 1921-6
11. Elsayed, M.A., S.F. Belal, A.M. Elwalily y H. Abdine (1979) *J. Pharm. Sci.* 68: 739-41
12. Korany, M.A., A.M. Wahbi, M.A. Elsayed y S. Mandour (1984) *Anal. Lett.* 17 (B12): 1373-89
13. Olson, E.C. y C.D. Alway (1960) *Anal. Chem.* 32: 370-3
14. Such, V., J. Traveset y R. Gonzalo (1980) *Anal. Chem.* 52: 412-9
15. Murtha, J.L., T.M. Julian y G.W. Radebaugh (1988) *J. Pharm. Sci.* 77: 715-8
16. Morelli, B. (1988) *J. Pharm. Sci.* 77: 615-21
17. Morelli, B. (1988) *J. Pharm. Sci.* 77: 1042-6
18. *United States Pharmacopoeia, U.S.P.* (1985) XXI, pág. 995