

# ESTUDIO ESPECTRAL Y DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE SULFAMETOXAZOL Y TRIMETOPRIM POR ESPECTROFOTOMETRÍA DERIVADA DIGITAL.

*M. INÉS TORAL<sup>(1)</sup>, NELSON LARA<sup>(1)</sup>, A. EUGENIA TAPIA<sup>(2)</sup>,  
CLAUDIO TORRES<sup>(2)</sup>, Y PABLO RICHTER<sup>(3)</sup>.*

<sup>(1)</sup> Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Casilla: 653, Santiago, Chile.

<sup>(2)</sup> Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales, Matemáticas y Medio Ambiente, UTEM. Casilla 9845, Santiago, Chile.

<sup>(3)</sup> Departamento de Química Inorgánica y Analítica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile

(Recibido: Marzo 6, 2002 - Aceptado: Mayo 15, 2002)

## RESUMEN

En este trabajo, se propone un método simple y directo para la determinación simultánea de sulfametoxazol y trimetoprim en formulaciones farmacéuticas por espectrofotometría derivada digital de segundo orden. Se incluye además, un estudio de la conducta espectral de estas drogas en diferentes solventes, con el objeto de seleccionar las condiciones óptimas para su determinación simultánea. Acetonitrilo fue utilizado como solvente para extraer las drogas desde las formulaciones farmacéuticas y luego evaluar directamente las segundas derivadas espectrales. Esta determinación simultánea fue realizada por la aproximación de "zero crossing" a 272,8 nm para la determinación de sulfametoxazol y a 256,0 nm para la determinación de trimetoprim. Se encontró un rango de determinación para sulfametoxazol desde  $6,31 \times 10^{-8}$  a  $1,20 \times 10^{-4}$  mol/L y para trimetoprim desde  $2,47 \times 10^{-7}$  a  $1,20 \times 10^{-4}$  mol/L siendo los límites de detección  $1,89 \times 10^{-9}$  mol/L para sulfametoxazol y  $7,40 \times 10^{-9}$  mol/L para trimetoprim. El método propuesto fue aplicado exitosamente en formulaciones farmacéuticas (tabletas). Además se realizó un estudio de la foto-estabilidad de ambas drogas con soluciones estándares y en formulaciones farmacéuticas reales.

**PALABRAS CLAVES:** Estudio espectral, Espectrofotometría derivada, Foto-estabilidad, Sulfametoxazol y Trimetoprim.

## ABSTRACT

A direct and simple second derivative digital spectrophotometric method has been developed for the simultaneous determination of the sulfamethoxazole and trimethoprim in pharmaceutical formulation. A study of the spectral behavior of these drugs in different solvents is included, in order to select the best conditions for their simultaneous determination. Acetonitrile was used as solvent to extract the drugs from the pharmaceutical formulations and then to evaluate directly by second derivative spectra. This simultaneous determination was carried out by the zero crossing approach, at 272,8 nm for sulfamethoxazole determination and at 256,0 nm for trimethoprim determination. The determination range for sulfamethoxazole was from  $6,31 \times 10^{-8}$  to  $1,20 \times 10^{-4}$  mol/L and for trimethoprim from  $2,47 \times 10^{-7}$  to  $1,20 \times 10^{-4}$  mol/L, and the detection limits for sulfamethoxazole and trimethoprim were  $1,89 \times 10^{-9}$  mol/L and  $7,40 \times 10^{-9}$  mol/L, respectively. The method was applied successfully in pharmaceutical formulations (tablets). Besides a study of photostability of both drugs with standard solutions and real pharmaceutical formulations was performed.

**KEYWORDS:** Spectral study, Derivative spectrophotometry, Pharmaceutical Formulations, Sulfamethoxazole and Trimethoprim.

## INTRODUCCIÓN

Las sulfonamidas fueron las primeras drogas eficaces empleadas para el tratamiento sistémico de infecciones bacterianas en el ser humano. El mecanismo de acción del sulfametoxazol (I) (4 - amino - N - (5 - metil - 3 - isoxazol) bencenosulfonamida), al igual que otras sulfas, es la inhibición competitiva de la transformación del ácido para-aminobenzoico (PABA) en ácido dihidrofólico, teniendo una mayor afinidad por el sistema enzimático bacteriano que produce esta reacción. Las sulfas por si solas son bacteriostáticas, pero combinadas con diaminopirimidinas (trimetoprim), se convierten en un bactericida, comparable a los antibióticos de amplio espectro.

La trimetoprim (II) (2,4-diamino-[3,4,5-trimetoxi-bencil] pirimidina), perteneciente a la familia de las diaminopirimidinas, es un agente antibacteriano y antiprotozoario, que actúa por inhibición competitiva de la dihidrofolato reductasa, fundamental en las células con gran tasa de desarrollo. Las diaminopirimidinas usadas como antibacterianos muestran una gran selectividad y afinidad por las enzimas microbianas, no afectando los sistemas enzimáticos de los animales superiores. El mecanismo de acción de las diaminopirimidinas las hace ideales para su combinación con otras drogas. La combinación entre I y II, origina un antibacteriano de amplio espectro.

Formulaciones farmacéuticas que contienen estas drogas, han sido aprobadas por la Food and Drug Administration (FDA), para su uso en: infección urinaria crónica, neumonía por *pneumocystis carinii*, *shigelosis* y otitis media.

Diferentes técnicas analíticas han sido utilizadas para la determinación individual de sulfametoxazol y trimetoprim, en el caso de I ha sido aplicada la espectrometría de resonancia Raman (1) y la densitometría (2); para el caso de II la electroquímica (3) y HPLC en suero y orina humana (4).

Por otra parte, en «Pharmacopoeia» se ha informado un método para la determinación simultánea de ambas drogas por cromatografía en capa fina (5). La determinación de ambas drogas en combinación con otros analgésicos, ha sido llevada a cabo por HPLC en formulaciones farmacéuticas (6-8), en matrices biológicas (suero y orina) (9-12) y en alimentos (13), y por cromatografía líquida multidimensional (14) en alimentos. Estos métodos, que utilizan HPLC, permiten la determinación de multicomponentes generando resultados exactos, pero que al mismo tiempo requieren cuidados operacionales. Alternativamente, las determinaciones simultáneas de multicomponentes se pueden realizar utilizando aproximaciones quimiométricas. Entre estas aproximaciones, exitosamente aplicadas a señales analíticas espectrales solapadas, están la espectrofotometría derivada y métodos basados en la evaluación de multilongitudes de onda. El último caso, ha sido propuesto por Rossi and Pardue (15) para la resolución de mezclas de PAHs, las que presentan algunos problemas en la separación por cromatografía.

Debido a que los espectros clásicos de Sulfametoxazol y Trimetoprim están fuertemente solapados, se ha propuesto también una determinación de estas drogas junto con fenazopiridina hidrociorhídrica por espectrofotometría derivada de tercer orden, sin embargo las etapas previas son complejas(16). Otros métodos son la aproximación de multivariable (17) y el desarrollo experimental para la determinación de multicomponentes, utilizando espectrofotometría con arreglo de diodos (18). Estas aproximaciones son utilizadas con el objeto de minimizar la incerteza de los resultados producidos por el ruido de fondo.

En este contexto, se propone en el presente trabajo un método simple y de muy fácil operación para la determinación simultánea de Sulfametoxazol y Trimetoprim por espectrofotometría digital, la cual permite minimizar tanto el ruido de fondo e incrementar las señales analíticas, sin necesidad de grandes procesamientos de datos matemáticos por parte del analista.

Además en este trabajo se incluye un estudio de conducta espectral de las drogas individuales en diferentes solventes, estabilidad frente a la luz de las drogas en soluciones estándares y formulaciones farmacéuticas reales. El método desarrollado también fue aplicado a la determinación de ambos compuestos en formulaciones farmacéuticas.

## Aparatos e instrumentos

Las medidas de absorbancia y derivadas de los espectros clásicos, fueron realizadas en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1603PC, empleando celdas de cuarzo de 10 mm de paso óptico. Para cada conjunto de medidas se verifica y corrige la línea base. Diariamente se verifica la escala fotométrica y de la longitud de onda, mediante el programa de utilidades del espectrofotómetro. La incerteza en la medición de la longitud de onda es de  $\pm 0,05$  nm. Para todas las soluciones, se obtuvo la segunda derivada del espectro en un rango de 200 – 400 nm leído contra solvente. Los datos espectrales fueron procesados por un software Shimadzu kit versión 3.7 (P/N 206-60570-04).

Las drogas fueron masadas con una incerteza de  $\pm 0,01$  mg utilizando una Balanza Sartorius R 200 D.

## Materiales y reactivos

Todos los reactivos fueron de grado analítico. Las drogas sulfametoxazol (99,99 % de pureza) y trimetoprim (99,05 % de pureza) fueron proporcionadas por Laboratorio Chile, Santiago, Chile. Las soluciones estándares de concentración  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L de I y II, fueron preparadas disolviendo  $12,66 \pm 0,01$  mg y  $14,52 \pm 0,01$  mg respectivamente, y aforando a 50 mL con acetonitrilo. Otros rangos de concentración entre  $2,0 \times 10^{-7}$  y  $4,0 \times 10^{-4}$  mol/L fueron preparados por diluciones apropiadas, usando el mismo solvente. Las formulaciones farmacéuticas (tabletas) utilizadas fueron Cotrimoxazol y Cotrimoxazol Forte, las cuales contienen 400mg y 800mg de sulfametoxazol y 80 mg y 160 mg de trimetoprim, respectivamente, fueron disueltas utilizando acetonitrilo como solvente. Para llevar a cabo un estudio de la conducta espectral de ambas drogas en distintos solventes, se prepararon soluciones estándar de  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L, disolviéndolas en DMF, DMS, acetonitrilo, metanol, etanol, metanol en NaOH, metanol en HCl, etc. De estas soluciones estándares, otros rangos de concentración fueron obtenidos por diluciones adecuadas, utilizando los solventes respectivos.

## Procedimiento para la curva de calibración de sulfametoxazol y trimetoprim en mezclas

Alícuotas de las soluciones estándar de I y II fueron diluidas simultáneamente en acetonitrilo, en un rango de concentración de  $0,2 - 1,6 \times 10^{-4}$  mol/L. La curva de calibración para I se realizó en presencia de  $6,0 \times 10^{-5}$  mol/L de II, y la de II en presencia de  $6,0 \times 10^{-5}$  mol/L de I. Para cada una de las soluciones se obtuvo la segunda derivada del espectro, graficando los valores de unidades de derivadas a 272,8 nm para I y 256,0 nm para II, versus la concentración respectiva.

## Procedimiento para determinar la exactitud y precisión para la determinación simultánea de I y II en soluciones estándar mixtas en distintas relaciones.

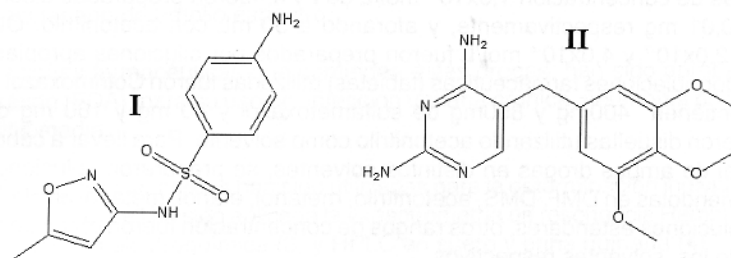
Se prepararon soluciones estándar de I y II disolviendo  $14,00 \pm 0,01$  mg de cada droga en 25 mL de acetonitrilo. Luego se agregaron entre 100  $\mu$ L a 800  $\mu$ L de solución estándar de cada droga en diferentes matraces de aforo de 10 mL. Cada mezcla fue diluida hasta la marca con acetonitrilo. Las mezclas fueron realizadas con distintos volúmenes de I y II con el objeto de obtener diferentes relaciones de masa. Para cada relación de masa se realizaron seis réplicas. Luego se evaluaron las segundas derivadas para cada solución y se determinaron las concentraciones de cada analito en mg/100 mL con el objeto de determinar los porcentajes de recuperación y las desviaciones estándar relativas.

## Procedimiento para la determinación simultánea de sulfametoxazol y trimetoprim en tabletas.

Se pulverizaron individualmente diez tabletas de formulaciones farmacéuticas. En el caso de Cotrimoxazol, se pesó  $10,0 \pm 0,01$  mg de la muestra pulverizada, se diluyó y aforó a 25 mL con acetonitrilo. De acuerdo al contenido nominal, las concentraciones de I y II fueron de  $1,15 \times 10^{-3}$  y  $2,01 \times 10^{-4}$  mol/L respectivamente. El mismo procedimiento se repitió para una nueva formulación farmacéutica, Cotrimoxazol forte, y de acuerdo a sus contenidos nominales sus concentraciones fueron  $1,18 \times 10^{-3}$  mol/L de I y  $2,17 \times 10^{-4}$  mol/L de II. Ambas soluciones se diluyeron 10 veces utilizando el mismo solvente, de tal modo que las concentraciones de I y II, estuviesen dentro del rango de determinación del método. Luego, se evaluaron las segundas derivadas del espectro para cada formulación farmacéutica y se determinaron las concentraciones de cada analito, empleando las ecuaciones de las curvas de calibración.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las estructuras de sulfametoxazol y trimetoprim, mostradas en la Figura 1, son muy diferentes, lo cual debiera traducirse en una diferencia de sus conductas espectrales. Además, considerando la diversa naturaleza de los grupos funcionales y heterociclos que contienen estas moléculas, es posible esperar un efecto solvente en su comportamiento espectral. Con el objeto de seleccionar las condiciones en que la conducta espectral sea mas adecuada para la determinación simultánea de I y II, se trabajo con diferentes solventes y en cada caso se vario la concentración de I y II, respectivamente. De los espectros clásicos obtenidos se puede observar que en dimetilsulfóxido y en dimetilformamida, ambos compuestos presentan una única banda de absorción en la zona de 250 a 310 nm, las cuales aparecen totalmente solapadas. Para ambos solventes, entre 200 y 260 nm, se presenta un alto ruido de fondo, debido a que ambos solventes presentan en esta zona una alta absorción, lo que trae como consecuencia que las primeras bandas de ambos analitos no sean observables.



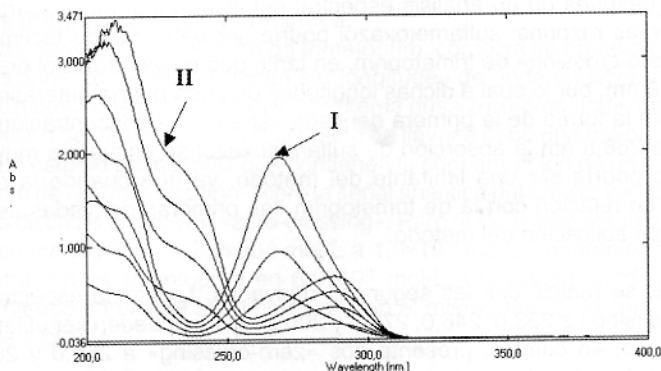
**Fig. 1** Estructura de sulfametoxazol y de trimetoprim en acetonitrilo. I, Sulfametoxazol (4 - amino - N - ( 5 - metil - 3 - isoxazol ) bencenosulfonamida) y II, Trimetoprim (2,4-diamino-[3,4,5-trimetoxi-bencil] pirimidina).

En medios tales como etanol, acetonitrilo, metanol, HCl  $1,0 \times 10^{-2}$  mol/L en metanol y NaOH  $1,0 \times 10^{-2}$  mol/L en metanol, ambas drogas presentan dos bandas de absorción, la primera situada entre 200 y 250 nm y la segunda entre 250 y 310 nm. En todos estos solventes se pudo observar que para trimetoprim, la forma de la primera banda depende de la concentración, por lo cual, esta zona no sería útil para fines analíticos. En cambio, las formas de las bandas presentes entre 250 y 310 nm, en todos los solventes son independientes de la concentración.

En HCl  $1,0 \times 10^{-2}$  mol/L en metanol, las bandas de ambas drogas están tan solapadas, que aún usando espectrofotometría derivada se dificulta su resolución; por lo cual, fue descartado dicho solvente. En metanol, las bandas en esta región son adecuadas para fines analíticos, pero debido al carácter volátil de este solvente, también fue descartado. Etanol, acetonitrilo y NaOH  $1,0 \times 10^{-2}$  mol/L en metanol, resultaron ser solventes adecuados para la determinación simultánea de ambos analitos. En todos estos solventes la conducta espectral es semejante, sin embargo se seleccionó acetonitrilo debido a que las bandas de I y II son ligeramente mas sensibles y la banda de sulfametoxazol presenta un desplazamiento hipsocrómico, favoreciendo la determinación simultánea por espectrofotometría derivada digital.

### Conducta Espectral

Como se puede observar en la Figura 2, las bandas de ambos compuestos se encuentran totalmente solapadas, impidiendo la determinación por espectrofotometría clásica de estos analitos, a menos que se utilice un sistema de ecuaciones. En este contexto, este trabajo propone utilizar la espectrofotometría derivada digital con el objeto de realizar la determinación simultánea de estas drogas.

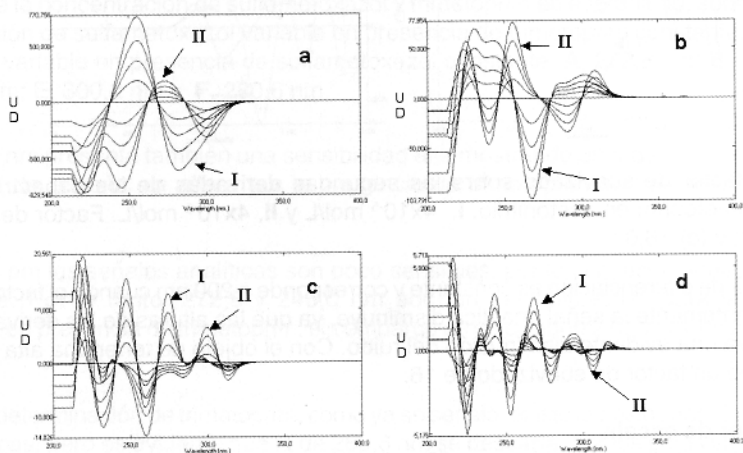


**Fig. 2** Espectros clásicos de sulfametoxazol y trimetoprim en acetonitrilo. I, concentración de sulfametoxazol entre  $2 \times 10^{-5}$  a  $8 \times 10^{-5}$  mol/L y II, concentración de trimetoprim entre  $2 \times 10^{-5}$  a  $8 \times 10^{-5}$  mol/L.

La obtención de las derivadas del espectro clásico puede llevarse a cabo mediante dos modos: primero, la derivada corresponde a  $\Delta A/\Delta \lambda$ , donde el proceso de diferenciación es obtenido computacionalmente usando una tabla de dos columnas. En este tipo de derivada, el valor de  $\Delta \lambda$  puede ser variado, de modo de lograr mayor resolución o aumento de las señales, dependiendo de las condiciones de la derivación. En tanto que en la segunda modalidad, propuesta por Savitzky-Golay (19), la derivada corresponde a  $A/\Delta \lambda$ , donde A es absorbancia, medida en el punto fijo y  $\Delta \lambda$  corresponde al rango de longitud de onda en que los espectros son registrados. En este modo de derivación espectrofotométrica, la derivación y el suavizado de los espectros son realizados también computacionalmente por el método de los mínimos cuadrados. Esta modalidad está destinada a lograr disminuir el ruido, por lo cual es posible obtener altas relaciones señal/ruido. En este trabajo se optó por esta última modalidad, ya que fue posible lograr una excelente resolución de los espectros como también lograr una altísima relación señal/ruido.

### Selección del orden de la derivada

Con el objeto de seleccionar el orden de la derivada, se registraron desde la primera hasta la cuarta derivadas del espectro, para cada analito individual como se observa en la Figura 3. En general, en todas las derivadas de los espectros se encuentran longitudes de onda características para la determinación de cada compuesto. Sin embargo, a medida que aumenta el orden de la derivada, la señal analítica disminuye. En este contexto, se podría asumir en primera instancia que la primera derivada



**Fig. 3** Primeras, segundas, terceras y cuartas derivadas del espectro clásico de sulfametoxazol y trimetoprim en acetonitrilo. I, concentración de sulfametoxazol entre  $2 \times 10^{-5}$  a  $8 \times 10^{-5}$  mol/L y II, concentración de trimetoprim entre  $2 \times 10^{-5}$  a  $8 \times 10^{-5}$  mol/L. (a) Primeras derivadas; (b) Segundas derivadas; (c) Terceras derivadas y (d) Cuartas derivadas.

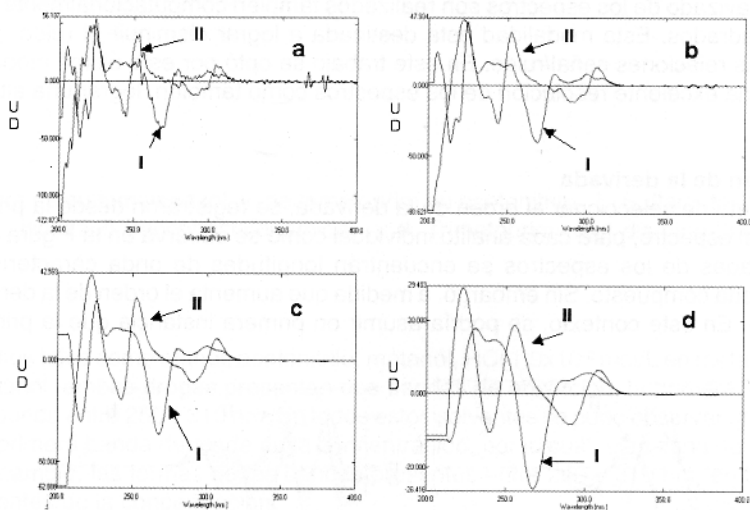


podría ser óptima, pero después de un análisis espectral detallado ésta fue descartada, tomando en consideración las siguientes razones: sulfametoxazol podría ser determinado fácilmente a 286,2 nm correspondiente a un «zero-crossing» de trimetoprim, en tanto que sulfametoxazol presenta dos «zero-crossing» a 238,2 y 268,8 nm, por lo cual a dichas longitudes de onda podría determinarse trimetoprim. Sin embargo, a 238,2 nm la forma de la primera derivada varía con la concentración, por lo cual este punto fue descartado y a 268,8 nm la absorción de sulfametoxazol se encuentra muy cercana a la de trimetoprim. Este hecho podría ser una limitante del método, ya que cuando la concentración de sulfametoxazol sea alta en relación con la de trimetoprim, las primeras derivadas se podrían solapar disminuyendo el campo de aplicación del método.

Un similar análisis se realizó con las segundas derivadas. La banda espectral de trimetoprim presenta cuatro «zero-crossing» a 233,6; 246,0; 272,8 y 300,2 nm que pueden ser útiles para determinar sulfametoxazol. Este último, en cambio, presenta dos «zero-crossing» a 256,0 y 280,6 nm. Para la determinación simultánea de estas drogas todos ellos podrían ser útiles. Por esta razón, se presentará un análisis más detallado en la selección de las longitudes de onda analíticas. En suma, la segunda derivada fue seleccionada, aún cuando se sacrifica la sensibilidad en favor de la precisión del método y exactitud en los resultados.

### Selección del factor de suavizado

Para cada compuesto individual se registraron las segundas derivadas, utilizando factores de suavizado de 2, 4, 8 y 16, respectivamente. Estos valores están definidos por defecto por el software del espectrofotómetro, los cuales están en relación con el rango de longitud de onda en los espectros registrados en la Figura 4.



**Fig. 4** Efecto del factor de suavizado sobre las segundas derivadas de los espectros clásicos de sulfametoxazol y trimetoprim en acetonitrilo. I,  $4 \times 10^{-5}$  mol/L y II,  $4 \times 10^{-6}$  mol/L. Factor de suavizado: (a) 2,0; (b) 4,0; (c) 8,0; y (d) 16,0.

El valor de  $\Delta\lambda$  de diferenciación es constante y corresponde a 200 nm cuando el factor de suavizado aumenta, consecuentemente la señal analítica disminuye, ya que las alturas de las derivadas decrecen, además, se observa una evidente disminución del ruido. Con el objeto de tener una alta relación señal/ruido, se seleccionó un factor de suavizado de 16.

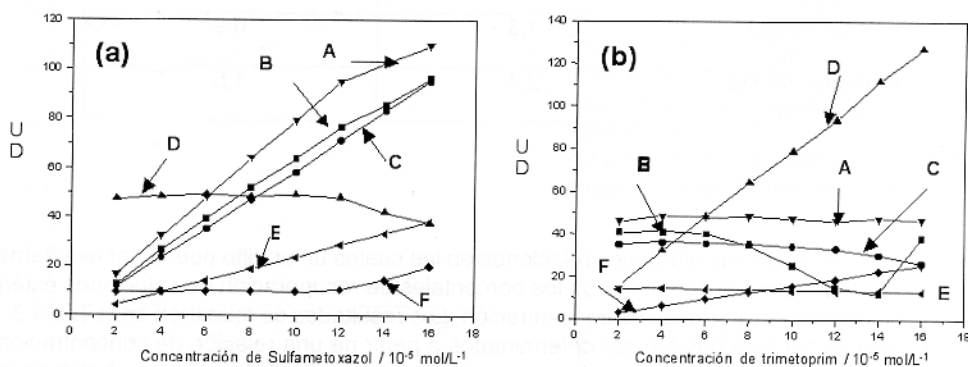
### Selección del factor de escala

Este parámetro solo tiene por objeto amplificar la señal analítica y favorecer su lectura. Sin embargo, éste no puede ser seleccionado en forma indiscriminada, debido a que la amplificación puede ir acompañada de un efecto de distorsión sobre las bandas espectrales. Considerando estos hechos, un factor de escala de  $1,0 \times 10^4$  fue seleccionado, ya que la amplificación es adecuada para obtener una lectura con 3 decimales, sin que se produzcan efectos de distorsión del espectro.

### Selección de las longitudes de onda analítica.

La segunda derivada del espectro de trimetoprim, como ya se mencionó anteriormente, presenta cuatro «zero-crossing», todos ellos podrían ser longitudes de onda analíticas para la determinación de sulfametoxazol. En tanto que sulfametoxazol presenta dos «zero-crossing», los cuales podrían ser útiles para la determinación de trimetoprim. Con el objeto de llevar a cabo una mejor selección de la longitud de onda, se realizó un estudio en mezclas que contienen la concentración de un analito variable y la del otro constante. El efecto de la concentración sobre la señal analítica del analito variable y del analito constante, fue evaluado a los distintos valores de «zero-crossing». Para realizar este estudio se mezcló sulfametoxazol en un rango de concentración de  $2,0 \times 10^{-5}$  mol/L a  $1,6 \times 10^{-4}$  mol/L, manteniendo constante en todos los casos la concentración de trimetoprim en  $6,0 \times 10^{-5}$  mol/L. Un estudio similar se hizo con trimetoprim variable y manteniendo constante sulfametoxazol en el mismo rango de concentración. Los resultados se muestran en la Figura 5.

Según los resultados obtenidos para sulfametoxazol (Figura 5a) se puede observar que a 272,8 nm se encuentra la máxima sensibilidad para la determinación de este compuesto y la linealidad se mantiene hasta  $1,2 \times 10^{-4}$  mol/L, por otro lado se puede observar que la variación de la concentración de trimetoprim no altera la señal de la sulfametoxazol en todo el rango estudiado (Figura 5b). A 233,6 nm la sensibilidad es alta para la determinación de sulfametoxazol, pero a partir de una concentración de trimetoprim mayor que  $6,0 \times 10^{-5}$  mol/L, ésta empieza a interferir sobre la señal de sulfametoxazol, debido probablemente al solapamiento de las derivadas espectrales, por lo cual esta longitud de onda fue descartada.



**Fig. 5** Efecto de la concentración de sulfametoxazol y trimetoprim en acetonitrilo, sobre la señal analítica. (a), concentración de sulfametoxazol variable en presencia de trimetoprim constante. (b), concentración de trimetoprim variable en presencia de sulfametoxazol constante. A, 272,8 nm; B, 233,6 nm; C, 246,0 nm; D, 256,0 nm; E, 300,2 nm y F, 280,6 nm.

A 246,0 nm presenta también una sensibilidad alta mostrando un mayor rango de linealidad, pero la confiabilidad de la señal se altera por la presencia de trimetoprim a una concentración mayor que  $1,2 \times 10^{-4}$  mol/L.

A 300,2 nm las señales analíticas son poco sensibles, por lo cual esta longitud de onda también fue descartada. Por lo tanto, 272,8 y 246,0 nm podrían ser utilizadas para la determinación de sulfametoxazol en presencia de trimetoprim, sin embargo se seleccionó 272,8 nm en favor de incrementar la sensibilidad.

Para la determinación de trimetoprim, como ya se señaló, existe la posibilidad de usar dos longitudes de onda analíticas, pero es evidente que la de 280,6 nm se descarta, por los bajos valores de las señales analíticas en tanto que a 256,0 nm es posible la determinación de trimetoprim sin interferencia de I hasta una concentración no mayor a  $1,2 \times 10^{-4}$  mol/L de I.

En resumen, de acuerdo a este análisis la determinación simultánea de I y II puede llevarse a cabo a 272,8 y 256,0 nm, respectivamente.

## Parámetros analíticos

Las curvas de calibración (n=7) fueron obtenidas graficando el valor absoluto de la segunda derivada para **I** a 272,8 nm y para **II** a 256,0 nm utilizando un valor de  $\Delta\lambda = 200$  nm, factor de suavizado de 16 y factor de escala de  $1,0 \times 10^4$ , versus la concentración de cada analito.

Las ecuaciones de regresión lineal y los coeficientes de correlación, calculados a partir de las mezclas de **I** y **II**, fueron los siguientes:

$$\text{I } h_1 = 7,82 \times 10^5 \pm 3,29 \times 10^3 \cdot C(M) + 1,18 \pm 0,25 \quad r = 0,999$$

$$\text{II } h_2 = 7,88 \times 10^5 \pm 6,98 \times 10^3 \cdot C(M) + 1,99 \pm 0,70 \quad r = 0,999$$

Donde *h*, corresponde a los valores absolutos de unidades de derivadas y *C(M)* corresponde a la concentración del analito expresado en mol/L. Los parámetros analíticos se muestran en la Tabla I.

**Tabla I.** Parámetros analíticos.

	Sulfametoxazol	Trimetoprim
Límite de detección (mol/L)	$1,89 \times 10^{-8}$	$7,40 \times 10^{-8}$
Límite de cuantificación (mol/L)	$6,31 \times 10^{-7}$	$2,47 \times 10^{-7}$
Rango de determinación (mol/L)	$6,31 \times 10^{-7}$ - $1,20 \times 10^{-4}$	$2,47 \times 10^{-7}$ - $1,20 \times 10^{-4}$
Repetibilidad (DER/%)	1,3	0,9
Reproducibilidad (DER/%)	2,1	1,5

Límite de detección: criterio  $3\sigma$

Límite de cuantificación: criterio  $10\sigma$

Con el objeto de definir las diferentes relaciones en las cuales un analito puede ser exactamente medido en presencia del otro, se determinaron los porcentajes de recuperación de soluciones estándar mixtas de **I** y **II**, en diferentes relaciones de concentración. Los resultados se muestran en la Tabla 2. Los contenidos de cada compuesto pueden ser determinados a partir de una relación de concentración de 6:1 a 1:5 para una relación de **I** : **II**. Cabe señalar, que en las formulaciones farmacéuticas, habitualmente **I** y **II**, están en una relación de 5:1, en que se pueden determinar con exactitud y precisión.

## Aplicación del método

Un estudio del efecto de excipientes fue realizado a partir de muestras sintéticas conteniendo aproximadamente de estearato de magnesio + gelatina (3-5%) y de lactosa + almidón (95-97%). Las recuperaciones encontradas (n=6), fueron para **I** de 100,6% y para **II** de 97,4%, con una desviación estándar relativa de 1,7 y 2,0 %, respectivamente. Los resultados obtenidos estarían indicando que los excipientes comunes, no interfirieron en la determinación simultánea propuesta.

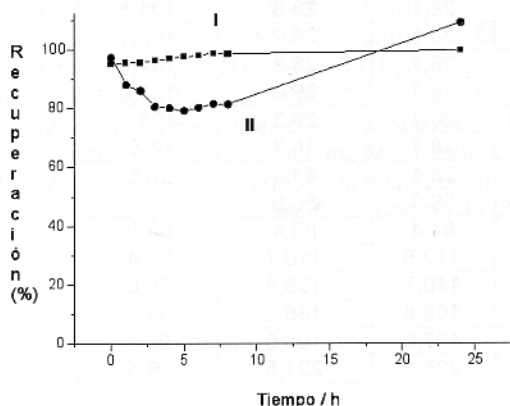
Por otro lado, con el objeto de optimizar todas las variables que puedan influir en la precisión del método y en la exactitud de los resultados, se llevó a cabo un estudio del efecto de la luz sobre las bandas espectrales. Se trabajó en primer término con una mezcla 5:1 de sulfametoxazol y trimetoprim, respectivamente, relación equivalente a la que estas drogas presentan en las formulaciones farmacéuticas. La solución fue expuesta a la luz natural de laboratorio y cada hora se registró la segunda derivada del espectro clásico en las condiciones seleccionadas. Los resultados obtenidos muestran que, dentro de las 24 horas, para ambas drogas, la señal se mantuvo constante con una variación de  $\pm 4\%$ , expresada en unidades de derivada, lo que indicaría que las drogas son prácticamente estables frente a la luz indirecta. Este mismo estudio fue realizado a luz solar directa, encontrándose un resultado similar para sulfametoxazol, en tanto que, la señal analítica de trimetoprim presentó esta misma fluctuación hasta las 5 horas de exposición. A tiempos mayores la recuperación disminuyó en un 10%, por esta razón, todas las determinaciones fueron realizadas en ausencia de luz.



De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede establecer que en ausencia de luz, ambas drogas no se degradan dentro de las 24 horas.

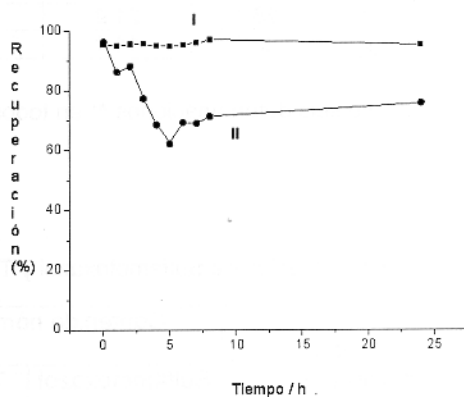
Con el objeto de estudiar la influencia de posibles productos de degradación de los excipientes propios de las formulaciones farmacéuticas a las cuales se aplicará la determinación simultánea propuesta, se realizó el mismo estudio a partir de tabletas comerciales.

El efecto de tiempo de exposición a luz ambiente, luz directa y ausencia de luz se presentan en las Figuras 6, 7 y 8. Como se puede observar en las Figuras 6 y 7, la luz tiene un efecto considerable en la señal analítica de II, lo cual estaría indicando que algún producto de degradación de los componentes de la formulación farmacéutica, estarían interfiriendo en la determinación de trimetoprim. Cabe destacar que las bandas espectrales no cambian en su forma y solo se produce una leve baja de la señal analítica, lo que se traduce en una baja de los porcentajes de recuperación, lo cual podría ser atribuido a la degradación de trimetoprim con la interacción de algunos de los componentes de la formulación farmacéutica comercial. Se puede postular que la estructura química del producto de degradación debería ser similar a la de trimetoprim, ya que de lo contrario se produciría cambios espectrales mas significativos, como por ejemplo, corrimiento o cambios evidentes en forma, posición y altura de las bandas espectrales. En tanto, la señal de sulfametoxazol prácticamente no se ve afectada. Según se puede observar en la Figura 8, en ausencia de luz es posible determinar ambas drogas por un período no mayor de 4 horas, con un alto grado de certeza.

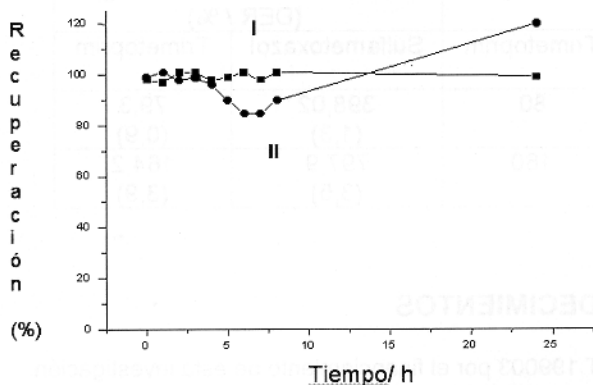


**Fig. 6** Efecto del tiempo de exposición a luz ambiente sobre la recuperación (%) de I y II en acetoneitrilo, en formulación farmacéutica comercial. I, sulfametoxazol,  $1,15 \times 10^{-4}$  mol/L; y II, trimetoprim,  $2,02 \times 10^{-5}$  mol/L.

**Fig. 7** Efecto del tiempo de exposición a luz directa sobre la recuperación de I y II en acetoneitrilo, en formulación farmacéutica comercial. I, sulfametoxazol,  $1,15 \times 10^{-4}$  mol/L; y II, trimetoprim,  $2,02 \times 10^{-5}$  mol/L.



**Fig. 8** Efecto del tiempo, en ausencia de luz, sobre la recuperación de I y II en acetoneitrilo, en formulación farmacéutica comercial. I, sulfametoxazol,  $1,15 \times 10^{-4}$  mol/L; y II, trimetoprim,  $2,02 \times 10^{-5}$  mol/L.



En resumen, los estudios realizados señalan que la determinación simultánea propuesta, debe realizarse en ausencia de luz dentro de las primeras 4 horas de preparada la solución, este tiempo es suficiente para realizar las mediciones necesarias.

El método desarrollado fue aplicado en formulaciones farmacéuticas con diferentes contenidos nominales. Los resultados se presentan en la Tabla III, de donde se puede observar que se obtiene buena concordancia con las cantidades nominales. La repetibilidad y la reproducibilidad expresadas como desviación estándar relativa (Tabla I) son adecuadas para fines analíticos. Este último parámetro, fue obtenido determinando las desviaciones estándar relativa en diferentes experimentos y con diferentes analistas.

**Tabla II.** Porcentajes de recuperación a partir de soluciones estándar mixtas en distintas relaciones, mg/ 100 mL.

Relación I:II	Sulfametoxazol			Trimetoprim		
	Agregado mg	Encontrado mg	Recuperac* %	Agregado mg	Encontrado mg	Recuperac* %
1:1	28,1	28,7	102,1	28,1	27,3	97,0
2:1	56,2	56,7	100,9	28,1	28,6	101,6
3:1	84,3	84,0	99,6	28,1	28,7	102,1
4:1	112,4	110,6	98,4	28,1	28,8	102,3
5:1	140,5	137,2	97,6	28,1	29,0	103,0
6:1	168,5	167,6	99,4	28,1	29,3	104,1
7:1	196,7	189,3	96,2	28,1	18,8	66,9
8:1	224,8	221,7	98,6	28,1	4,65	16,5
1:2	28,1	28,4	101,1	56,3	55,0	97,7
1:3	28,1	28,7	102,1	84,4	83,4	98,9
1:4	28,1	28,7	102,3	112,5	110,7	98,4
1:5	28,1	27,5	97,9	140,7	138,8	98,6
1:6	28,1	25,8	92,0	168,8	166,2	98,4
1:7	28,1	21,9	78,1	197,0	195,9	99,4
1:8	28,1	14,1	50,2	225,1	221,8	98,5

\* Promedio de seis determinaciones \*\* en todos los casos la DER fue menor que 1,5%

**Tabla III.** Determinación de Sulfametoxazol y Trimetoprim en formulaciones farmacéuticas.

Formulación Farmacéutica	Contenido nominal /mg		Contenido encontrado/ mg* (DER / %)	
	Sulfametoxazol	Trimetoprim	Sulfametoxazol	Trimetoprim
Cotrimoxazol	400	80	398,02 (1,3)	79,3 (0,9)
Cotrimoxazol forte	800	160	797,9 (3,5)	164,2 (3,9)

\* Promedio de seis determinaciones

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al proyecto FONDECYT 199003 por el financiamiento de esta investigación.

## REFERENCIAS

1. S. Sato, S. Higuchi, S. Tanaka, *Anal. Chim. Acta*, **120**, 209 - 215 (1980).
2. H. Tomankova, M. Vasatova, J. Zyka. *Anal.-Lett.*, **21 (12)**, 2227-2240 (1988).
3. L. G. Chatten, S. B. Pons, P. McLeod. *Analyst (London)*, **107 (1278)**, 1026-1031 (1982).
4. R. E. Weinfeld, T.C. Macasieb, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, **6 (1 (J. Chromatogr., 164))**, 73-84 (1979).
5. Anon.(1995). *The United States Pharmacopoeia 23. The National Formulary*, 18, 334.
6. H. Yang, K. N. Yang, Yaowu. *Fenxi. Zazhi.*, **15 (6)**, 41-43 (1995).
7. S. C. Laizure , C. L. Holden, R. C. Stevens, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* **93 (1 (J. Chromatogr. 528))**, 235-242 (1990).
8. R. Canals, J. M. Caldero, *Afinidad*, **37 (369)**, 435-438 (1980).
9. A. Avgerinos , G. Athanasiou, S. Malamataris, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **9 (6)**, 507-510 (1991).
10. K. Van der Steuijt, P. Sonneveld , *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, **66 (J. Chromatogr. 422)**, 328-333 (1987).
11. A. Weber, K. E. Opheim, G. R. Siber, J. F. Ericson, A. L. Smith, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, **29 (2 (J. Chromatogr., 178))**, 337-345 (1983).
12. O. Spreux Varoquaux, J.P. Chapalain, P. Cordonnier, C. Advenier, M. Pays, L. Lamine, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, **25 ((J. Chromatogr. 274))**, 187-199 (1983).
13. B. Cancho Grande, M.S. García Falcón, M. Rodriguez Comesaña, and J. Simal Gándara, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 3145 - 3150 (2001).
14. M. J. B. Mengelers, A. M. M. Polman, M. M. L. Aerts, H. A. Kuiper, A. S. J. P. A. M. Van Miert, *J. Liq. Chromatogr.*, **16 (1)**, 257-278 (1993).
15. D. Rossi, H. Pardue, *Anal. Chim. Acta*, **175**, 153-161 (1985).
16. M. H. Abdel Hay, A.M. El Walily, *Spectrosc. Lett.*, **26 (9)**, 1745-1759 (1993).
17. C. Altesor, P. Corbi, I. Dol and M. Knochen, *The Analyst (Londres)*, **118**, 1549, (1993).
18. M.E. Ribone, A.P. Pagani and A.C. Olivieri, *Anal. Lett.*, **32**, 1389 (1999).
19. A. Savitzky y M.J. Golay, *Anal. Chem.*, **36 (8)**, 1627 (1964).