

Trimetoprim ve Sulfametoksazol İçeren Tabletlerde Absorbans Oranı Yöntemi ile Spektrofotometrik Miktar Tayini

Ningur NOYANALPAN (*)

Okan ATAY (*)

Özet: Bu çalışmada, bakterisid amaçla kullanılan sulfametoksazol-trimetoprim tabletlerinde herhangi bir ayırma işlemi yapılmaksızın, direkt spektrofotometrik yöntemle miktar tayini yapılmıştır. Çalışmalar 0.1 N sodyum hidroksitle yapılmış, sulfametoksazol ve trimetoprim için 256 ve 288 nm'deki, isosbestik noktalar için 278.4 ve 240.4 nm'deki absorbans değerlerinden ve bunların absorbans oranından yararlanılmıştır. Piyasa örnekleri üzerinde yapılan miktar tayini çalışmalarında isosbestik nokta olarak yalnız 278.4 nm kullanılmış ve sonuçlar buna göre verilmiştir.

Yöntem, tarafımızdan hazırlanan değişik konsantrasyonlardaki standart karışımlara uygulanmış, duyarlılık ve tekrarlanabilirlik açısından anlamlı bulunmuştur. Yapılan çalışmada lineerite açısından en uygun konsantrasyon aralığının trimetoprim için 0.5 - 3 µg/ml; sulfametoksazol için 2-15 µg/ml olduğu saptanmıştır. Yöntem BP 1980'de önerilen metodla (sulfametoksazol için modifiye edildi) karşılaştırılmış, çabukluk ve tekrarlanabilirlik açısından uygun nitelikte bulunmuştur. Piyasa örneklerinde yapılan çalışmalarda tablet üretiminde kullanılan yardımcı ekspiyan maddelerinin yöntemi etkilemediği gözlenmiştir.

SPECTROPHOTOMETRIC QUANTITATIVE DETERMINATION OF TRIMETHOPRIM-SULPHAMETHOXAZOLE BY ABSORBANCE RATIO METHOD

Summary: Direct spectrophotometric quantitative determinations of sulfamethoxazole-trimethoprim tablets, which are used for bactericidal aims

Başvuru Tarihi: 27.3.1989

Kabul Tarihi: 23.10.1989

(*) Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı,
Etiler-Ankara.

have been realized in this study. Studies were made by using 0.1 N NaOH for sulfamethoxazole and trimethoprim.

Maximum absorbance points were found at 256 and 288 nm for active substances. The absorbance ratio method was applied in this study. Absorbance values (256 and 288 nm), isosbestic points (278.2 and 240.2 nm) and their ratios had been used. In quantitative determinations of the marketed preparations, only 278.4 nm is used for the isosbestic point and the results have been given accordingly.

The procedure used standard mixtures at different concentrations and found to be suitable for sensitivity and reproducibility. The best concentration interval has been observed regarding linearity at 0.5-3 µg/ml for trimethoprim, 2-15 µg/ml for sulfamethoxazole in this study. Procedure is compared with the method suggested in BP/1980 (modified for sulfamethoxazole) and found to be suitable, regarding its speed and reproducibility. The excipients have no interference with the method.

Keywords: Trimethoprim, Sulfamethoxazole, spectrophotometry, absorbance ratio method.

GİRİŞ:

Trimetoprim - sulfametoksazol kombinasyonları, bakterinin yaşamı için gerekli olan purin bazlarının sentezlenmesi sırasında iki farklı kademede engelleme yaparak (sulfametoksazol, dihidrofolat sentetaz; trimetoprim dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe eder) bakterisid etki gösterirler.

Optimal bakterisid etki trimetoprim-sulfametoksazol (1:5) oranında görüldüğünden, oluşturulan tüm farmasötik preparatlarda bu oran muhafaza edilmiştir. Halen ülkemizde tablet, süspansiyon ve ampul formlarında üretilen bu kombinasyon, en fazla tüketilen kemoterapötikler arasında yer almaktadır.

IMS (International Marketing Service)'in 1984-1987 yıllarında yayınladığı raporlarda, Türkiye'de en

fazla tüketilen 5 ilaç arasında anılan etken maddeleri taşıyan bir tablet'de yer almaktadır.

Yapılan literatür incelemede; trimetoprim ve sulfametoksazol'un tek veya kombine haldeki preparatlarının ve bunların biyolojik sıvılarda tespitine ait spektrofotometrik (1, 3, 4) dansitometrik ve spektrofotometrik (2), kolorimetrik (5, 6) susuz ortamda titrasyon (7), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (8, 9, 10, 11), yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (12) yöntemleri ile yapılan çalışmalara rastlanmıştır.

Bilindiği üzere kombine preparatlar, farmakopelerde sıklıkla yer almazlar. Buna mukabil trimetoprim-sulfametoksazol kombinasyonları Co-trimoxazol adıyla BP 1980 (British Pharmacopeia) ve USP XXI farmakopelerinde yer almaktadır.

BP 1980, trimetoprim için spektrofotometrik, sulfametoksazol için 0.1 M NaNO₂ ile yapılan amperometrik titrasyon yöntemi önermektedir. USPXXI'de ise her iki etken maddenin tayinleri de UV dedektörlü yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile yapılmaktadır.

Bu çalışmada önerilen absorbans oranları yönteminin teorisi matematiksel olarak ilk defa Pernarowski (13) tarafından ortaya atılmıştır. Bu yöntemden yararlanılarak aspirin-kafein (14), tiyamin-piridoksin (15), propilfenazon-kafein (16) kombinasyonlarında miktar tayini gerçekleştirilmiştir.

Materyal-Yöntem:

Çalışmalarda Shimadzu-UV-120, ve Shimadzu-UV-160 (Kaydedicili) model spektrofotometre kullanılmıştır.

Standart çalışmalarda kullanılan sulfametoksazol ve trimetoprim, Roche İlaçları A.Ş. İstanbul firmasından sağlanmıştır. Kullanılan diğer kimyasal madde ve çözücüler analitik kalitede olup Merck A.G. kökenlidir.

Standart Kalibrasyon Çalışmaları:

- Stok Sulfametoksazol Çözeltisi (Çözelti-S)

100 mg Sulfametoksazol 100 ml metanolde çözülür, 5 ml alınır. 0.1 N NaOH ile 100 ml'ye tamamlanır. (50 µg/ml)

- Stok Trimetoprim Çözeltisi (Çözelti-T)

50 mg trimetoprim 50 ml metanolde çözülür, 5 ml alınır. 0.1 N NaOH ile 100 ml'ye tamamlanır. (50 µg/ml)

Regresyon denkleminin hesaplanmasında çözelti-S ve çözelti-T'den Tablo 1'de gösterilen miktarlarda çözelti alınır. Karıştırılır ve çözeltiler 0.1 N NaOH ile 50 ml'ye tamamlanır. Oluşturulan standart karışımların 256, 288, 278.4 ve 240.4 nm'deki absorbans değerleri saptanır.

Numunenin Hazırlanması:

20 tablet duyarlı biçimde tartılır. Toz edilir. Homojen bir toz karışımı elde edilinceye kadar karıştırılır. 1/2 tablet ağırlığına eşdeğer toz duyarlı biçimde tartılır. 30 ml metanol ilave edilir ve manyetik karıştırıcıda 30 dakika tutulur. Süzülür; süzünüden 10 ml alınır. 50 ml'ye 0.1 N NaOH ile tamamlanır. Bu çözeltiden hareketle trimetoprim için 0.5-3 µg/ml; sulfametoksazol için 2.5-15 µg/ml konsantrasyonda olacak biçimde 0.1 N NaOH ile dilüsyonlar yapılır.

BP 1980'de Önerilen Yöntemin Numunelere Uygulanması:

Trimetoprim: 20 tablet duyarlı biçimde tartılır. Homojen bir toz karışımı elde edilinceye kadar karıştırılır. 50 mg trimetoprime eşdeğer toz duyarlı biçimde tartılır. 30 ml 0.1 N NaOH ilave edilir. Karışım 4x50 ml kloroform ile ekstre edilir. Her ekstraksiyondan sonra kloroformlu faz 10 ml 0.1 N NaOH ile yıkanır. Sulu faz atılır. Kloroformlu faz 4x50 ml 1 M asetik asitle ekstre edilir. Asetik asitli faz her defasında 5 ml kloroform ile yıkanır. Asetik asitli faz

dikkatle alınır. 1 M asetik asit ile 250 ml'ye tamamlanır. Bu çözeltiden 10 ml alınır, üzerine 10 ml 1 M asetik asit ilave edilir. Su ile 100 ml'ye tamamlanır. Aynı yöntemle ve aynı konsantrasyonda hazırlanmış standart çözelti ile birlikte 271 nm'deki absorpsanları ölçülür.

Sulfametoksazol: Homojen hale getirilmiş tablet tozundan 500 mg etken maddeye eşdeğer toz duyarlı biçimde tartılır. Üzerine 100 ml su ve 10 ml % 25'lik HCl çözeltisi ilave edilir. 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılır. Dışarıdan soğutulmuş 0.1 M NaNO₂ ile titre edilir.

Hesaplama:

Sulfametoksazol ve trimetoprimin 0.1 N NaOH'da UV Spektrumu

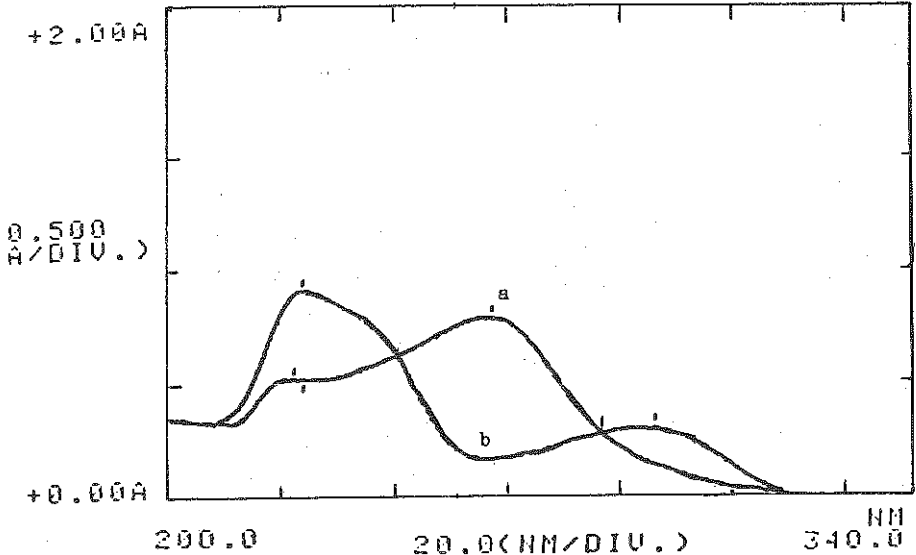
alındığında, $\lambda = 256$ ve $\lambda = 288$ 'de maksimum absorpsan verdikleri saptanmıştır. Aynı spektrum incelendiğinde, 278.4 ve 240.4 nm'de iki ayrı kesişim (isosbestik) noktası görülmektedir.

Çalışmada, maddenin kendine ait maksimum absorpsan değerinin kesişim noktasında saptanan absorpsan değerine oranından yararlanılmıştır.

Piyasa örneklerine uygulanan bu çalışmada kesişim noktası olarak yalnız 278.4 nm kullanılmış ve sonuçlar buna göre verilmiştir.

Miktar tayini çalışmalarında aşağıdaki formülden yararlanılmıştır (13):

$$C_x (\mu\text{g/ml}) = \frac{Q - b}{a} \times \frac{A_{278.4}}{a_{278.4}} \times 1000$$



16 3/31 '89

340.0NM 0.010A

a-Sulfametoksazol 0,1N NaOH ml/10 μ g
b-Trimetoprim 0,1N NaOH ml/10 μ g

Burada Q değeri sulfametoksazol için 256/278.4, trimetoprim için 288/278.4'deki absorbands oranlarıdır. a ve b değeri sulfametoksazol ve trimetoprim için 278.4 nm'de ayrı ayrı bulunan regresyon denklemlerindeki eğim ve kesişim değerleridir. A_{278.4} kesişim noktasında saptanan absorbands değeri, a_{278.4} ise yine kesişim noktasında hesaplanan absorbtivite değeridir. 278.4 nm'de bu değer 21.9 olarak bulunmuştur.

Bulgular:

Etken maddelerin farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış standart kısımlarından en küçük kareler yöntemi ile 278.4 ve 240.4 nm'deki kesişim noktaları için ayrı ayrı regresyon denklemleri oluşturulmuştur. Regresyon denklem çalışmaları için kullanılan standart çözelti karışımlarına ait değerler Tablo-1'de; bulunan sonuçlar Tablo-2'de verilmiştir.

Yöntemin duyarlılığı ve tekrarlanabilirliğini saptamak amacı ile yapılan çalışmaların sonuçları Tablo-3'de; piyasa örnekleri üzerinde yapılan kantitatif çalışmaların sonuçları Tablo-4'de verilmiştir.

Sonuç ve Tartışma:

Önerilen absorbands oranı yöntemi, herhangi bir ayırma işlemi yap-

maksızın etken maddelerin kantitatif değerlendirilmesine imkân vermektedir.

BP 1980 farmakopesinde yer alan yöntem nazaran daha çabuk ve tekrarlanabilir sonuçlar alınmaktadır. BP 1980'de önerilen yöntemde özellikle trimetoprimin miktar tayini için sekiz defa ekstraksiyon işlemi yapılmakta ve fazla miktar kloroform kullanılmaktadır. Konuya zaman ve solvent israfı ve uygulama zorluğu açısından bakıldığında, önerilen yöntem avantajlı görülmektedir.

Piyasa örnekleri ile yapılan çalışmalarda tüm sonuçlar BP 1980'de Co-trimoksazol tablet için verilen % 92.5-%107.5 kabul hudutları içinde bulunmuştur.

Absorbans oranı yönteminde dikkat edilecek en önemli husus, etken maddelerin birbirine olan oranıdır. Bu oranın belirli bir değerde olması gerekmektedir. Bu oran 1/10 veya daha büyük olursa, düşük orandaki maddenin analiz sonuçlarındaki yüzde bağlı sapma değerleri büyümekte, analizin duyarlılığı azalmaktadır. Trimetoprim-sulfametoksazol oranı (1:5) olduğundan yapılan çalışmada herhangi bir sorunla karşılaşılmamıştır.

Yöntemin, tablet üretiminde kullanılan yardımcı maddelerden etkilenmemesi de bir avantaj olarak görülmektedir.

Tablo - 1

Karışımdaki Miktar (ml)		St. Karışımdaki Miktar ($\mu\text{g/ml}$)		Karışım Oranları		Absorbans Oranları			
ÇÖZELTİ S	ÇÖZELTİ T	Trimet.	Sulfamet.	Sulfamet.	Trimet.	Sulfametoksazol		Trimetoprim	
						$\frac{256}{278.4}$	$\frac{256}{240.4}$	$\frac{288}{278.4}$	$\frac{256}{240.4}$
10	2	2	10	0.833	0.166	2.535	1.168	0.600	0.279
9	3	3	9	0.750	0.250	2.363	1.068	0.656	0.294
8	4	4	8	0.666	0.333	2.124	0.967	0.715	0.324
6	6	6	6	0.500	0.500	1.706	0.772	0.823	0.365
4	8	8	4	0.333	0.666	1.283	0.566	0.939	0.416
3	9	9	3	0.250	0.750	1.062	0.468	0.992	0.434
2	10	10	2	0.166	0.833	0.842	0.367	1.054	0.461

Tablo - 2

	Sulfametoksazol		Trimetoprim	
	278.4	240.4	278.4	240.4
Eğim (a)	2.58	1.21	0.678	0.272
Kesişim (b)	0.416	0.162	0.487	0.231
Korelasyon Katsayı (r)	0.999	0.998	0.997	0.991
Determinasyon Katsayısı r ²	0.997	0.995	0.993	0.982
Regresyon Denklemi y = b+ax	y = 0.416+2.58x	y = 0.162+1.21x	y = 0.487+0.678x	y = 0.231 + 0.272x

Tablo - 3

Standart Karışım µg/ml		Bulunan µg/ml	
Trimetoprim	Sulfametoksazol	Trimetoprim	Sulfametoksazol
1.28	6.4	1.33	6.48
1.92	9.6	1.97	9.45
2.56	12.8	2.49	12.9
2.88	14.4	2.85	13.9
3.2	16	3.30	16.4

Sonuçlar, Yapılan 3 Deneyin Ortalaması Olarak Verilmiştir.

Tablo - 4

NUMUNE	TRİMETOPRİM		SULFAMETOKSAZOL	
	Absorbans oranı Yönt.	BP-1980 Yöntemi	Absorbans oranı Yönt.	BP-1980 Yönt. (Modifiye)
TABLET-A	82.3	81.5	410	416
Trimet. 80 mg	84.0	83.8	404	409
Sulfamet. 400 mg	80.8	78.0	402	410
ORTALAMA (X)	82.3	80.9	405	411
ST. SAPMA	1.6	2.8	4	4
% Bağlı Sapma	2.00	3.48	1.06	0.918
% 95 Olasılıklı Güven Aralığı t = 0.05	± 2.8	± 4.7	± 7	± 6
TABLET-B	167	162	809	840
Trimet. 160 mg	161	158	821	830
Sulfamet. 800 mg	163	165	806	818
ORTALAMA (X)	164	161	812	829
ST. SAPMA	3	3	8	11
% Bağlı Sapma	1.92	2.09	1.01	1.36
% 95 Olasılıklı Güven Aralığı t = 0.05	± 5	± 6	± 14	± 19
TABLET-C	41.2	40.7	206	210
Trimet. 40 mg	38.7	42.1	200	215
Sulfamet. 200 mg	38.9	41.0	206	213
ORTALAMA (X)	39.6	41.3	204	212
ST. SAPMA	1	0.7	3	3
% Bağlı Sapma	3.46	1.77	1.47	1.57
% 95 Olasılıklı Güven Aralığı t = 0.05	± 2.3	± 1.2	± 9	± 6

Kaynaklar

1. Joshi, H.N. Chaudhari, G.N., Tipnis, H.P., Spectrophotometric determination of sulphamethoxazole and trimethoprim in co-trimoxazole tablets, *Indian Drugs.*, 19 (11), 446-450, 1982.
2. Schlobe, R., Thijssen, H.H.W., Quantitative TLC of trimethoprim and tetroxoprim using fluorescence densitometry, *J. Chromatogr.*, 230 (1), 212-215, 1982.
3. Korany, M.A., Wahbi, A.M., El Sayed, M.A., Mandour, S., First-derivate spectrophotometric determination of certain in two component mixture, *Anal Lett.*, 17 (B 12) 1373-1389, 1987.
4. Sharma, S.C., Das, S., Talwar, S.K., pH-induced spectrophotometric estimation of sulphamethoxazole and trimethoprim, *Indian Drugs*, 22 (6), 314-316, 1985.
5. Sadana, G.S., Parikh G.G., Karandikar, M.M., Karandikar, J.V., Simple colorimetric determination of sulpha drugs. *Indian Drugs*, 25 (1), 28-30, 1987.
6. Sanyal, A.K., Laha, D., Rapid colorimetric assay of trimethoprim and sulphamethoxazole in pharmaceuticals *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 66 (6), 1447-1449, 1983.
7. Yu, R., Wu, Q, Xu. H., Non-aqueous titration of sulphadiazine, sulphamethoxazole and trimethoprim in compound preparations. Nanjing Yaouxueyan. *Xuebao* 16 (1), 52-56, 1985. *Anal. Abstr.*, Vol. 48, 10E76, 1986.
8. Cairnes, D.A., Evans, W.E., H.P.L.C., 4 amino-4-deoxy N¹⁰-methyl pteric acid and sulphamethoxazole in serum, urine and cerebrospinal fluid. *J. Chromatogr. Biomed Appl.* 20 (1), 103-110, 231, 1982.
9. Spreux-Varoquaux, O., Chapalain, J.P., Corderier, P., Advenier, C., Pays, M., Lamine, L., Determination of trimethoprim, sulphamethoxazole and its N⁴ acetyl metabolite in biological fluids by HPLC. *J. Chromatogr. Biomed Appl.* (25), 187-189, 274, 1983.
10. Hung, C.T., Perrier, D.G., Determination of trimethoprim and sulphamethoxazole in serum by reverse-phase and ion-pair HPLC. *J. Liq. Chromatogr.* 8 (3), 521-523, 1985.
11. United States Pharmacopeia XXI, 12-601 Twinbrook Parkway Rockville Md 20852-1985.
12. Tammiletho, S.A., High-performance thin-layer chromatographic determination of trimethoprim and sulphamethoxazole in pharmaceutical dosage form. *J. Chromatogr.* 323 (2), 456-461, 1985.
13. Pernarowski, M., Knevcil, A.M., Chistian, J.E., Application of absorbancy to the analysis of pharmaceuticals. Theory of the analysis of binary mixtures. *J. Pharm. Sci.*, 50 (11), 943-957, 1961.
14. Atay, O., Bulut, P., Aspirin-Kafein Karışımının absorbans oranları tekniği ile spektrofotometrik tayini. *Türk Hij. Den. Biyol. Derg.* 44 (1), 91-97, 1987.
15. Atay, O., Çakır, B., Spectrophotometric quantitative determinations of thiamin HCl and pyridoxine HCl in vitamin combinations using absorbance ratio method. *J. Fac. Pharm. Gazi* 5 (2), 147-156, 1988.
16. Atay, O., Gümüş. F., Isopropilfenazon-kafein içeren analjezik ilaçlarda absorbans oranları yöntemi ile spektrofotometrik miktar tayini çalışmaları. *Fabad Farm. Bil. Der.* 13, 500-508, 1988.