



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

**Estudio para la determinación de mefloquina en compuestos
comerciales**

Autor: Daniel Quevedo Hedo

Tutor/es: Dr. Luis Deban Miguel (Departamento de Química Analítica)

INDICE

CARACTERÍSTICAS E INCIDENCIAS SOBRE EL TRABAJO.....	3
RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1 Características principales.....	6
1.2 Antecedentes bibliográficos.....	7
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS	10
2.1 Espectroscopía ultravioleta-visible.....	10
2.2 Espectroscopía Raman.....	10
2.3 Cromatografía líquida de alto rendimiento.....	10
3. OBJETIVOS.....	11
4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	12
4.1 Equipos, materiales y reactivos.....	12
4.2 Medidas y Resultados.....	
4.2.1 Espectroscopía Raman.....	14
4.2.2 Espectroscopía UV-Visible.....	16
4.2.2.1 Influencia del tiempo.....	17
4.2.2.2 Influencia de la concentración.....	17
4.2.3 Cromatografía líquida de alto rendimiento.....	21
5. CONCLUSIONES.....	31
6. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	32
6.1 Índice de figuras.....	32
6.2 Índice de tablas.....	33
7. BIBLIOGRAFÍA.....	34

CARACTERÍSTICAS E INCIDENCIAS SOBRE EL TRABAJO

El Trabajo de Fin de Grado (TFG) que se presenta se establece dentro de una actividad académica mayoritariamente experimental de 12 créditos.

Para su desarrollo se planificó, al inicio del curso 2019-2020, en distintas etapas:

La primera etapa se basa en una revisión bibliográfica sobre el principio activo causa del estudio, la mefloquina y su determinación en distintos tipos de muestras. A continuación, se procedió a elegir la muestra objeto de nuestro estudio que por las características del trabajo, *“materia en la que el alumno se enfrenta a un problema real”*; se decidió con el tutor el análisis en un producto comercial *“Lariam”*.

La segunda etapa, la etapa experimental, comenzó a partir de la segunda quincena del mes de enero, una vez finalizada la evaluación ordinaria del curso, continuándose en sesiones de mañana y tarde hasta el comienzo del segundo cuatrimestres en el mes de febrero, en este caso en sesiones de tarde. Esta parte experimental se interrumpió por la declaración del estado de alarma a partir del 12 de marzo.

Por último en base a los datos de que se disponía se procedió a la discusión de los mismos y la elaboración de la correspondiente memoria.

RESUMEN

La mefloquina es un compuesto empleado en la prevención y el tratamiento del paludismo. En este trabajo se realiza un estudio empleando diferentes técnicas por espectroscopía de absorción UV-Vis, Raman, y cromatografía de líquidos HPLC, para su detección, identificación y cuantificación en el producto comercial *Lariam*. Con espectroscopía de UV-Visible se determinan las longitudes de onda de máxima absorción y se estudia la variación de la absorbancia con la influencia del tiempo y de la concentración. Con espectroscopía Raman se procede a identificar y asignar los picos que mejor definen sus movimientos vibracionales lo que permite identificar el principio activo en el producto comercial. La cromatografía de líquidos HPLC con detector de UV-Visible (223nm) permite determinar cuantitativamente el clorhidrato de mefloquina. Se obtiene un pico característico aproximadamente a 1.3 minutos a velocidad de flujo 1mL/min y fase móvil compuesta por: 10% de agua, 50% de acetonitrilo y 40% de metanol. En estas condiciones el límite de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) son respectivamente de 1.22 y 3.71 ppm. Con los parámetros establecidos, se utiliza el método para aplicarlo a la determinación de clorhidrato de mefloquina en el producto comercial.

ABSTRACT

Mefloquine is a compound used in the prevention and treatment of malaria. For its detection, identification and quantification in the commercial product *Lariam*, a study was carried out using different techniques: UV-Vis absorption spectroscopy and HPLC liquid chromatography, Raman spectroscopy and HPLC liquid chromatography. UV-Visible absorption spectroscopy determines the wavelength with the highest absorption (223 nm) and studies the influence of time and concentration. Raman spectroscopy identifies the active ingredient in the commercial product and assigns the best defined peaks to their corresponding vibrational movements. HPLC liquid chromatography with UV-Vis detector (223 nm) allows quantitative determination of mefloquine hydrochloride. A characteristic peak is obtained at approximately 1.3 minutes at a flow rate of 1 ml/ min and a mobile phase composed of 10% water, 50% acetonitrile and 40 % methanol. Under these conditions, the limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) are 1.22 and 3.71 ppm. With the established parameters, the method is used to apply it to the determination of mefloquine hydrochloride in the commercial product.

1. INTRODUCCIÓN

La mefloquina, comercializada bajo el nombre de *Lariam*, se emplea como medicamento en el tratamiento de la malaria, una enfermedad provocada por el parásito unicelular *Plasmodium*, transmitido comúnmente a través de mosquitos del género *anopheles*. Este compuesto no permite el crecimiento del parásito en los glóbulos rojos del cuerpo humano. Esta sustancia fue desarrollada en el Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR), Estados Unidos de América en el año 1970 como un análogo sintético de la quinina (Peters,1970) y aceptada por la Food and Drug Administration (FDA) para su uso profiláctico a partir de 1989.

1.1. Características principales

El clorhidrato de mefloquina (*Lariam*) se encuentra disponible, como medicamento, en tabletas de 250 mg, equivalente a 228.0 mg de la base libre para administración oral.

El clorhidrato de mefloquina es un derivado de 4-quinolinmetanol con el nombre químico específico de (±) - α -2-piperidinil-2,8-bis (trifluorometil) -4-quinolinmetanol. Se clasifica dentro del grupo de los arilaminoalcoholes.

El compuesto es cristalino blanco o casi blanco, de pH ácido (por la presencia de HCl) de gran solubilidad en disolventes orgánicos polares como el metanol y el etanol entre otros y ligeramente soluble en agua. Tiene un peso molecular de 414.78 g/mol. y responde a la siguiente fórmula estructural: $C_{17}H_{17}ClF_6N_2O$.

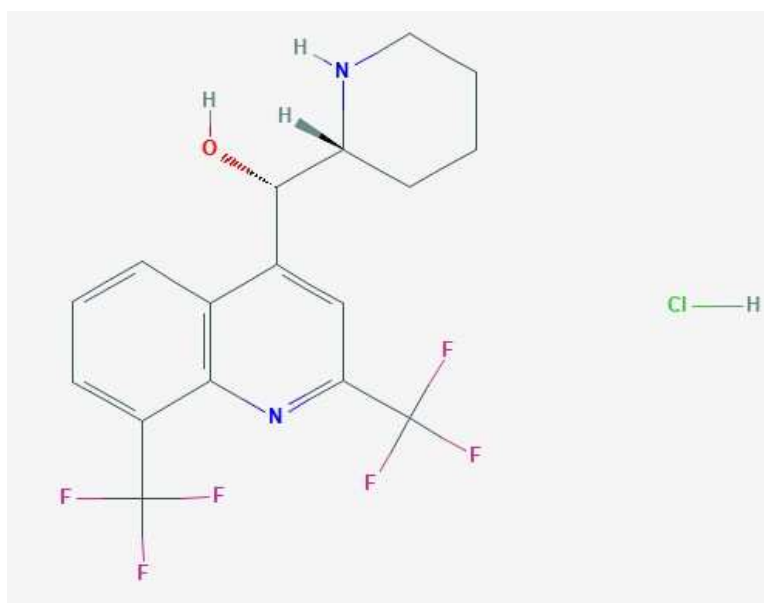


Figura 1.1. Estructura química del clorhidrato de mefloquina (PubChem).

1.2. Antecedentes bibliográficos

A medida que se ha ido avanzando en el estudio sobre el compuesto, las técnicas por las cuáles se determina e identifica la mefloquina han ido variando, dependiendo del tipo de muestras en las que se realiza el análisis. Una de las más utilizada para la identificación y el análisis tanto cualitativo como cuantitativo de mefloquina es la cromatografía de líquidos HPLC. De este modo se desarrolló y validó un ensayo para la determinación de mefloquina y su metabolito carboxi en plasma, suero y sangre mediante extracción en fase sólida y cromatografía de líquidos HPLC. Se compararon los resultados obtenidos entre columnas de octadecilsilica con alta y baja actividad de silanol. Aunque ambas columnas son muy similares en sus características hidrofóbicas, las actividades del silanol las hace diferentes en función del pH de fase móvil lo que influye en los tiempos de retención entre ambas columnas. En base a esto, la fase móvil elegida consiste en una mezcla de acetonitrilo y disolución acuosa KH_2PO_4 0.1 M en proporción (45:35). Los resultados así obtenidos permiten una buena separación de la mefloquina con respuesta alrededor de 7.5 min y de su metabolito carboxi cuyo pico aparece entre 4.0-4.5 min. En el trabajo, se calcula el límite de determinación para mefloquina, en sangre, plasma y suero, obteniéndose como resultados: 80, 70 y 60 ng/ml, respectivamente. Para su metabolito carboxi, el límite de determinación, en las mismas muestras fue de 70, 50 y 60 ng/ml (Green et al., 1999).

Por otra parte, dadas las características quirales del compuesto, se desarrolló un método de HPLC enantioselectivo para la determinación de enantiómeros de mefloquina en orina y sangre. El ensayo incluyó la extracción líquido-líquido de mefloquina de fluidos biológicos con una mezcla de hexano e isopropanol, empleando como reactivo de derivatización quiral (+)-(S)-naftiletilisocianato. La separación de los diastereoisómeros se realizó en una columna de sílice en fase normal empleando como fase móvil: cloroformo: hexano: metanol (25: 74: 1), con un flujo de 1 ml/min. El límite de determinación con detector de UV fue de 0.2 $\mu\text{g/ml}$ en sangre para ambos enantiómeros y de 0.08 $\mu\text{g/ml}$ en orina (Souri, Farsam y Jamali, 1997).

Posteriormente, debido a la utilización de distintos medicamentos (la combinación de artesunato y mefloquina es eficaz para combatir las cepas resistentes de la enfermedad en áreas de baja transmisión de paludismo), se desarrolló la combinación de dos métodos de cromatografía líquida de fase inversa para la determinación de artesunato, su metabolito activo dihidroartemisinina y mefloquina en plasma humano. La extracción en fase sólida de las muestras de plasma se realizó en cartuchos Supelclean LC-18. La separación cromatográfica de artesunato y su metabolito se obtuvo en una columna Hypersil C4 con fase móvil de acetonitrilo:ácido acético 0,05M (42:58) en flujo de 1,50 ml/min. La determinación de mefloquina se realizó en columna Inertsil C8-3 usando como fase móvil metanol:acetonitrilo:fosfato de hidrógeno de potasio 0.05M (50:8:42) con un flujo de 1.0 ml/min y con detección ultravioleta a 284 nm. El límite de detección para el artesunato y su metabolito fue de 8 ng/ml y para la mefloquina de 30 ng/ml. El límite de cuantificación para artesunato y su metabolito fue de 20 ng/ml y de 50 ng/ml para la mefloquina. Los resultados obtenidos muestran que el método es adecuado para su uso en estudios clínicos y farmacológicos (Lai et al., 2007).

También se ha empleado para el análisis de mefloquina en muestras de sangre, la cromatografía de fluido supercrítico (SFC) con detector de captura electrónica. Las condiciones de SFC incluyen una columna revestida de vidrio con gel de sílice y una fase móvil de 0,15% de n-butilamina y 1% de metanol en n-pentano supercrítico. El método aplicado a muestras de sangre de voluntarios que recibieron dosis de clorhidrato de mefloquina de 15 mg por kg de peso corporal, tiene un límite de detección de 7,5 ng/ml, presentando buena linealidad y precisión (Mount, Parchen y Churchill, 1990).

Otra técnica empleada para la determinación de clorhidrato de mefloquina es la espectroscopía de UV-Vis. Un sencillo método espectrofotométrico (Ashwin, Rao y Murthy, 2002) para la determinación de cloruro de mefloquina en metanol, se desarrolló por esta técnica, el estudio revela máximos de absorción a 222, 283 y 317 nm. y los resultados se comparan con los obtenidos mediante mediadas espectrofotométrica realizadas en ácido clorhídrico 0,1 N (Lim, Florey, 1985). La absorptividad molar a 222 nm era de $44731.7 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

El clorhidrato de mefloquina en ácido clorhídrico 0.1 N produce una curva característica en el rango de longitud de onda ultravioleta comprendido entre 200 y 400 nm, con máximos de absorción a 221, 281 y 318 nm.

En base a los resultados obtenidos, ambos métodos pueden utilizarse como alternativa a otros métodos no espectrofotométricos existentes para el análisis del clorhidrato de mefloquina.

La espectroscopía Raman y la espectroscopía de IR son técnicas no solo capaces de identificar el principio activo en muestras comerciales sino también de proporcionar información acerca de las vibraciones del compuesto. En un estudio realizado (Frosch, Schmitt y Popp, 2007) se investigó la mefloquina utilizando espectroscopía de infrarrojo cercano con transformada de Fourier (FT NIR) y espectroscopía Raman. Las bandas más características de NIR y Raman a 1363 cm^{-1} y 1434 cm^{-1} se deben al estiramiento C=C (en la parte de quinolina de la mefloquina) y a las vibraciones de CH₂. En IR, los picos más intensos se observan a 1314 cm^{-1} ; 1147 cm^{-1} ; y 1109 cm^{-1} y consisten principalmente en respiraciones en anillo y δCH (quinolina); C-F estiramientos; respiraciones de anillo asimétrico, estiramiento C-O, así como torsión/balanceo de CH₂ ubicados en el resto de piperidina. Dado que el agente activo generalmente está presente en concentraciones muy bajas dentro de las muestras biológicas, se registraron espectros de resonancia UV Raman de soluciones fisiológicas de mefloquina. Al emplear la asignación detallada de modo no resonante, también fue posible identificar inequívocamente los modos resonantemente mejorados a 1619 cm^{-1} , $1,603 \text{ cm}^{-1}$ y $1,586 \text{ cm}^{-1}$ en los espectros UV Raman como altas vibraciones de estiramiento simétrico C = C en la parte de quinolina de la mefloquina.

Además de las ya mencionadas, otra técnica empleada para la determinación del clorhidrato de mefloquina es la cromatografía de gases de ionización con detección de captura de electrones. El método (Neal et al., 1994) se desarrolla en ayuda de estudios de biodisponibilidad que implican la ingesta conjunta de diferentes formulaciones en tabletas del medicamento y una solución acuosa de su análogo marcado con ¹³C permitiendo la cuantificación de ambas formas. El análisis cuantitativo de las muestras de plasma se realizó en el derivado O-terc.butildimetilsililo (t-BDMS) mediante monitorización de los iones seleccionados empleando un espectrómetro de masas

cuadrupolo VG Trio 2000 y monitorizando los iones [M-tBDMSOH] de los analitos. El método añade la mefloquina [H] como estándar interno y demostró precisión en el intervalo de 1-200 ng/ml, con coeficientes superiores a 0.990 para todas las curvas de calibración. Además, el análisis por duplicado de las muestras de plasma durante un periodo de 90 días mostró una variación media entre días menor al 4.5-5.5%. La gran estabilidad y sensibilidad mostrada en el ensayo junto a la selectividad de la detección de masas, hacen que el método sea muy adecuado para este tipo de estudios.

En otro estudio llevado a cabo mediante cromatografía de gases con detección de captura electrónica (Churchill, Mount, 1988), se determina la mefloquina en muestras de sangre completa, plasma y sangre capilar sobre papel de filtro, por derivatización con fosfeno. La preparación de muestras para sangre completa y plasma requiere de un paso de precipitación de proteínas, seguido de una extracción simultánea con cloruro de metileno y derivatización con fosfeno a un pH de 9.50. Se sumergen el papel de filtro con las manchas en ácido clorhídrico 0.1 M entre 12 y 24 h y a continuación, se realiza la extracción y derivatización.

Realizadas las evaporaciones de la fase orgánica y la reconstitución con acetato de etilo, se inyecta 1,0 ml del extracto en una columna capilar. Gracias a la gran sensibilidad del método, las concentraciones de mefloquina que se determinan llegan hasta 9,5 µg/l con una desviación estándar relativa del 12%. Se obtiene, tanto en plasma como en sangre total y capilar una buena precisión en el rango de concentración comprendido entre 45-1100 µg/l.

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS EMPLEADAS

2.1. Espectroscopía ultravioleta-visible.

Técnica cuya base reside en el proceso de absorción de la radiación por un analito de interés en un intervalo de longitudes de onda comprendido entre 200 y 850 nm. Se realizan medidas de la transmisión o absorción de la radiación que deja pasar la disolución que se encuentra en una celda transparente. Aunque la espectroscopía ultravioleta-visible suele proporcionar información, no es una técnica específica y requiere de otras con las que pueda complementarse a fin de caracterizar un determinado analito.

2.2. Espectroscopía Raman.

La espectroscopía Raman se considera una técnica espectroscópica molecular que emplea la interacción de la luz con la materia para obtener información acerca de la composición o características de un material. A diferencia de la espectroscopía de infrarrojo, la información proviene de un proceso de dispersión de la luz. Proporciona un espectro característico de las vibraciones específicas de una molécula, una especie de huella molecular que permite identificar sustancias. Una de las mayores ventajas que tiene la técnica es que no es destructiva debido a que se realiza directamente sobre el material sin necesidad de ningún tipo de tratamiento previo.

2.3. Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una de las técnicas de separación de mayor uso debido a su versatilidad y numerosas aplicaciones. Los componentes de la muestra, en disolución, se inyectan y se separan en función de su interacción con la columna y la fase móvil. La separación se ve reflejada en los tiempos de retención de cada uno de los componentes presentes en la muestra inyectada, constituyendo lo que se denomina *cromatograma* . Se va a utilizar para poner a punto un método capaz de determinar, mediante esta técnica, clorhidrato de mefloquina en muestras comerciales de *Lariam* .

3 .OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son:

- 1- Realizar un estudio de mefloquina mediante diferentes técnicas analíticas, concretamente por: espectroscopía absorción molecular, espectroscopía Raman y cromatografía de líquidos HPLC
- 2- Poner a punto un método para la determinación cualitativa y cuantitativa del principio activo en muestras comerciales, mediante HPLC.
- 3- Discutir los resultados obtenidos

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.1. Equipos, materiales y reactivos

Equipos y material:

- Balanza Sartorius Entris 2241-1S (precisión de 0.1 mg)
- Balanza Precisa 40SM-20^a (precisión de 0.01 mg)
- Espectrofotómetro UV-Vis: Agilent 8453 UV-Visible System
- Espectrofotómetro Raman: Portable Raman Spectrometer BW 5415 i-Raman de B&W TEK inc. Láser de 784.92 nm
- Cromatógrafo HPLC: Agilent Technologies 1200 series equipado con:
 - Desgasificador G1322A
 - Bomba cuaternaria G1311A
 - Termostato G1316A
 - Detector UV-Vis G1314B
 - Inyector manual G1328B
- Columna cromatográfica Kromophase de 150 x 4.6 mm; tamaño de partícula 5 μ m; fase estacionaria C18
- Material de vidrio y plástico

Reactivos:

-Patrón de clorhidrato de mefloquina $\geq 98\%$ (HPLC) Sigma-Aldrich, a partir del mismo, se preparan disoluciones de clorhidrato de mefloquina de aproximadamente 1000 ppm, empleando agua desionizada y metanol como disolventes.

-Patrones en agua: Se pesan 0.1100 ± 0.0001 g de clorhidrato de mefloquina, se disuelven en agua desionizada, se llevan a un matraz aforado y se enrasa a 100.0 ml., obteniéndose una concentración de 1100 ppm, a partir de esta disolución se preparan por dilución otros patrones de menor concentración que se utilizan en los posteriores estudios.

-Patrones en metanol: Se pesan 0.02724 ± 0.00001 g de CMQ, se disuelven en metanol y se llevan a un matraz aforado, enrasando con metanol a 25.0 ml., la concentración obtenida fue de 1089,6 ppm., a partir de ella se preparan otros patrones de menor concentración.

-Muestra: Lariam comprimidos, según folleto informativo, cada comprimido ranurado contiene: “*Principio activo: 274,09 mg de clorhidrato de mefloquina racémico, equivalente a 250 mg de mefloquina base. Excipientes: Poloxámero 3800, celulosa microcristalina, lactosa monohidrato, almidón de maíz, crospovidona, alginato de calcio y amonio, talco y estearato de magnesio*”.

-Metanol: $>99,9\%$ de Sigma-Aldrich con ref.34860

-Agua desionizada

-Ácido acético: $>99,8\%$ ACS,ISO,Ph.Eur. de Sigma-Aldrich

-Acetonitrilo: Scharlan ref. ACO3292500

4.2. Medidas y Resultados

4.2.1. Espectroscopía Raman.

A partir del patrón sólido de clorhidrato de mefloquina puro, se realiza un estudio por espectroscopia Raman con el fin de obtener su espectro para posteriormente poderlo comparar con el obtenido para el producto comercial *Lariam*.

Se colocó una pequeña cantidad de sustancia patrón sobre una superficie metálica pulida, haciendo incidir la radiación laser (784.92 nm) sobre la muestra, obteniéndose el correspondiente espectro fig. (4.1). Previamente se realizó un blanco para detectar y eliminar señales correspondientes al ruido de fondo.

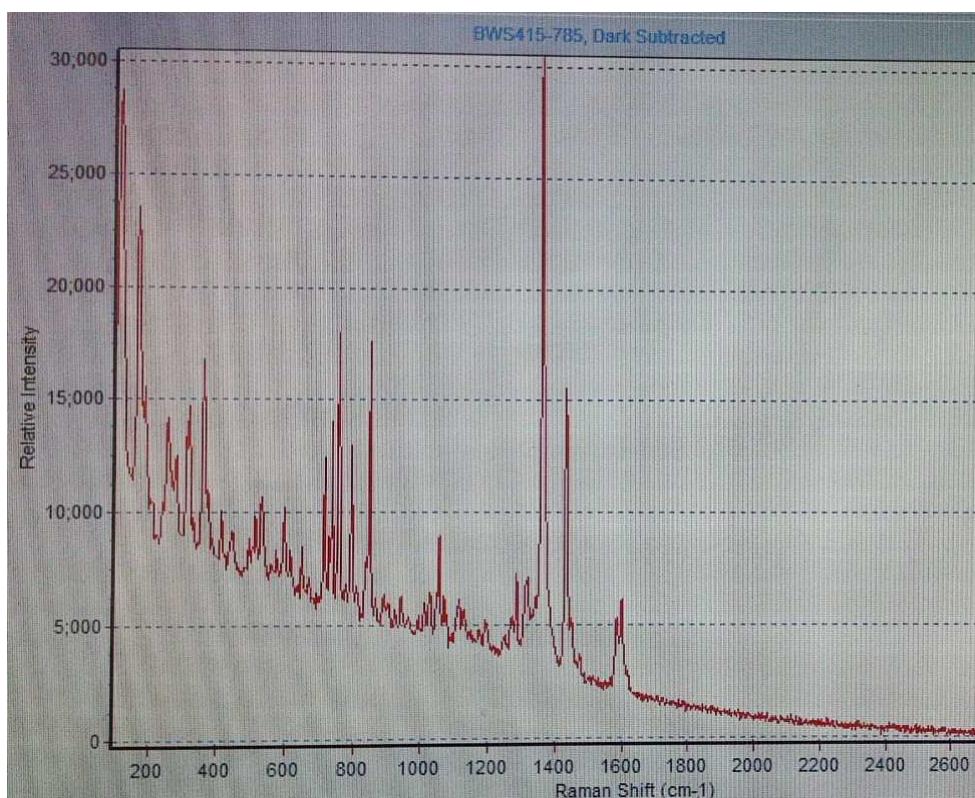


Figura 4.1 . Espectro Raman de sustancia patrón CMQ.

A continuación, se realizaron distintas medidas correspondientes a comprimidos de *Lariam* previamente pulverizados (azul) y sustancia patrón (rojo). Los espectros obtenidos se reflejan en la figura 4.2.

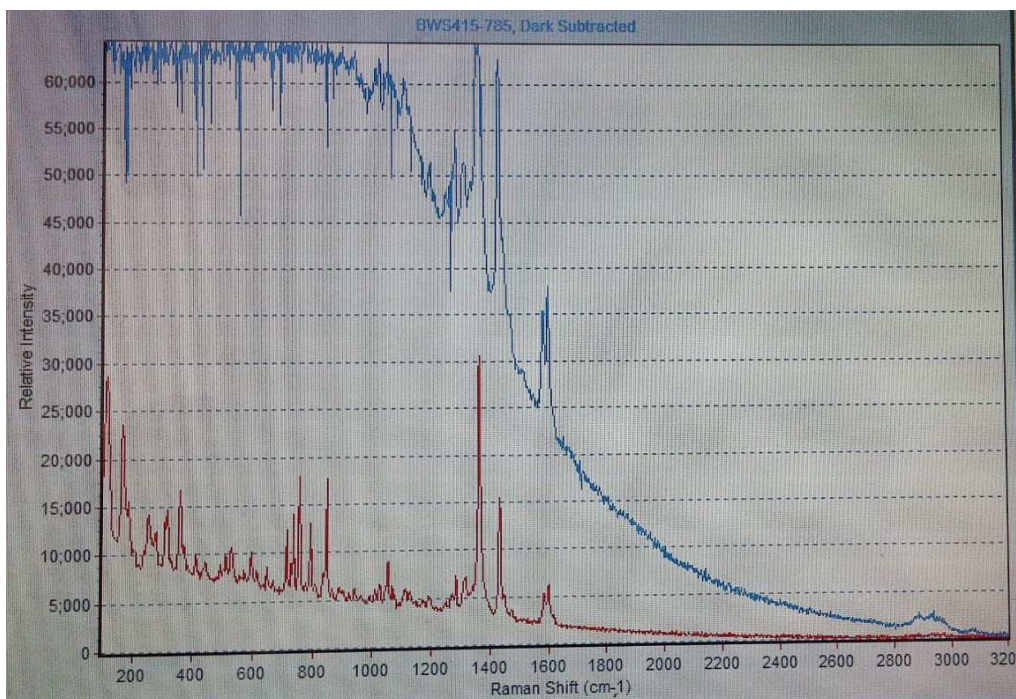


Figura 4.2. Espectro Raman de patron CMQ (rojo) y Lariam pulverizado (azul)

El espectro Raman de una sustancia es la “*huella dactilar*” de la misma. Al realizar una observación comparativa de la figura anterior, se comprueba que los dos espectros, en las bandas más características, son idénticos salvando los valores de intensidad.

Además de la capacidad de identificar la sustancia patrón en el producto comercial, también se encuentra la posibilidad de asignar los picos que se diferencian con mayor claridad. El pico con mayor intensidad aparece a 1360 cm^{-1} aproximadamente. La banda corresponde a una muy fuerte tensión del enlace C=C presente en la quinolina. Otros picos también se asignan principalmente a ese movimiento de tensión C=C (1420 , 1580 y 1610 cm^{-1} aproximadamente). La otra zona característica se encuentra en el intervalo comprendido entre 700 y 850 cm^{-1} . Esos picos se relacionan con los movimientos de flexión de los enlaces C-F, O-H y N-H, con el movimiento de tensión asimétrico de los enlaces C-C y con el movimiento de los anillos de quinolina y piperidina. Los valores obtenidos se recogen en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Asignación de los movimientos de vibración por Raman

Longitud de onda (cm ⁻¹)	Vibración asignada
1610	v C=C fuerte
1580	v _{sim} C=C fuerte
1420	v C=C fuerte
1360	v C=C muy fuerte
700	v _{asim} C-C
730	δCF
760	δOH
790	δNH
815	movimiento asociado a los anillos de quinolina y piperidina

A la hora de comparar con la muestra, se aprecian los picos situados a longitudes de onda comprendidas entre 1400-1600 cm⁻¹. Sin embargo, se observa que los picos inferiores a 1200 cm⁻¹ no se detectan del mismo modo que en el patrón. La razón es el elevado fondo fluorescente que presenta el comprimido.

De este sencillo estudio, se comprueba la viabilidad de llevar a cabo la determinación directa cualitativa del principio activo, clorhidrato de mefloquina, en comprimidos de *Lariam*.

4.2.2. Espectroscopia de Uv-Visible.

Se realizó un barrido entre 200 y 800 nm con el fin de determinar las longitudes de onda de máxima absorción del clorhidrato de mefloquina. Para ello se emplearon patrones de diferentes concentraciones (desde 1.1 hasta 22.2 ppm) disueltos en agua desionizada y metanol preparados a partir del patrón inicial de 1100 y 1089,6 ppm, respectivamente.

En ambos casos se obtuvieron como resultado, espectros similares al recogido en la figura 4.3., donde se aprecia que la longitud de onda de máxima absorción del clorhidrato de mefloquina corresponde a 223 nm. A mayores longitudes de onda, aparece una zona de absorción de menor intensidad con un máximo a 282 nm. Esta segunda zona de absorción podría ser de utilidad cuando aparezcan interferencias derivadas de otros analitos presentes en la muestra con longitudes de onda de absorción próximas a 223 nm.

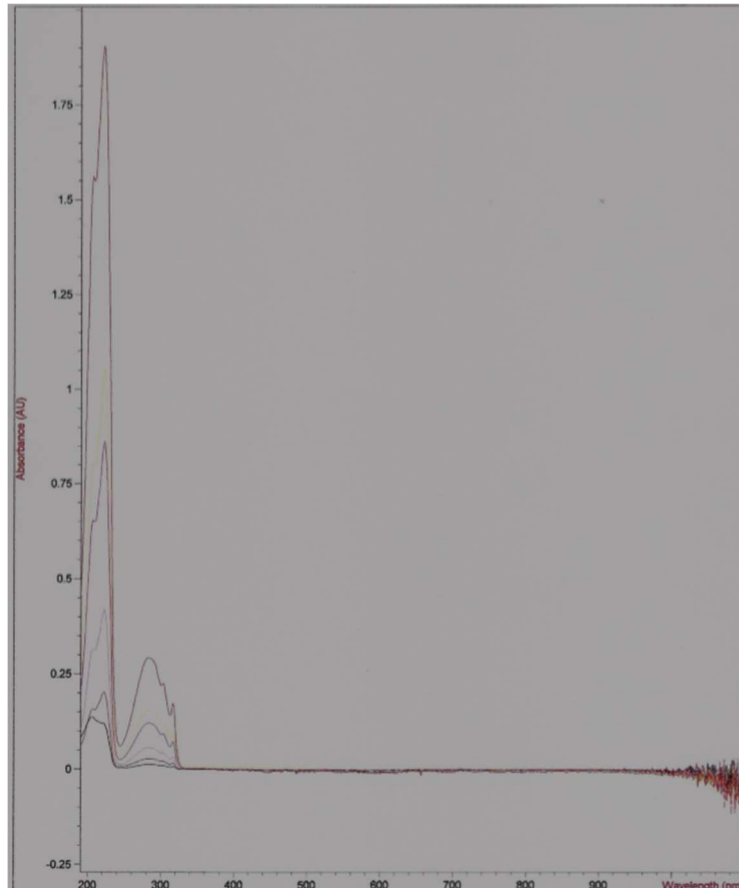


Figura 4.3. Barrido para seleccionar longitud de onda de máxima absorción CMQ.

4.2.2.1. Influencia del tiempo.

Se realizaron medidas de los patrones mantenidos en frascos de plástico, en ausencia de luz y a una temperatura de 4°C al cabo de treinta días de su preparación. No se apreció una variación considerable en su absorbancia, por lo que consideramos que los patrones permanecen estables en estas condiciones.

4.2.2.2. Influencia de la concentración.

Se realiza un estudio de la variación de la absorbancia con respecto a la concentración, mediante la medida de diferentes patrones de clorhidrato de mefloquina en agua entre 1,1 y 22,2 ppm, a 223 y 282 nm. Los valores se recogen en la tabla 4.2 y se obtienen las líneas de calibrado correspondientes en las figuras 4.4 y 4.5.

Tabla 4.2. Datos de concentración y absorbancia de patrones UV – Vis.

$\lambda = 223 \text{ nm}$		$\lambda = 282 \text{ nm}$	
Concentración(ppm)	Absorbancia (A)	Concentración(ppm)	Absorbancia (A)
1.1	0.11710	1.1	0.01194
2.2	0.20274	2.2	0.02681
4.4	0.41786	4.4	0.05580
6.6	0.64626	6.6	0.08579
8.8	0.86212	8.8	0.11967
11.1	1.05200	11.1	0.15382
22.2	1.90190	22.2	0.29108

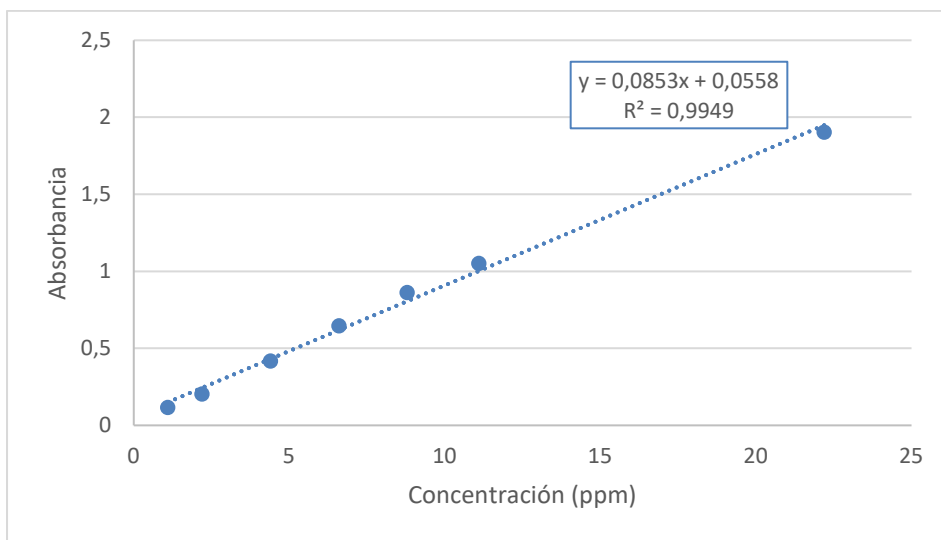


Figura 4.4. Representación gráfica de la absorbancia frente a la concentración (223 nm).

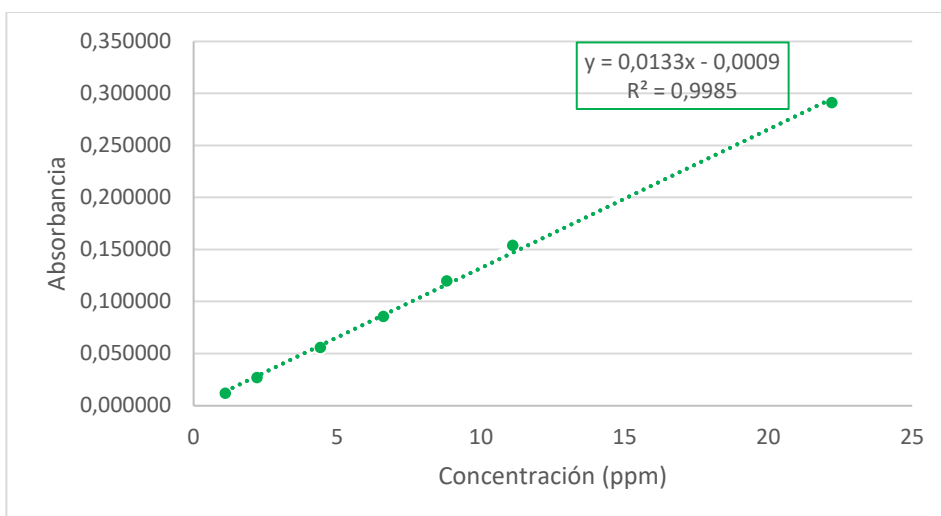


Figura 4.5. Representación gráfica de la absorbancia frente a la concentración (282 nm)

La ley de Lambert-Beer relaciona la absorbancia (A) y la concentración (c) mediante la expresión $A = a \cdot b \cdot c$, donde a es la absorptividad específica definida en términos de concentraciones expresadas en [mg/l] y b es el camino óptico o anchura de la cubeta (en este caso de 1cm), o bien $A = \epsilon \cdot b \cdot c$, donde ϵ es la absorptividad molar, para c expresada en mol/L.

El valor de la absorptividad viene dado por la pendiente de las líneas de calibrado a cada una de las longitudes de onda. Realizando un cambio de unidades en el que se encuentra involucrada la masa molar del clorhidrato de mefloquina, se obtienen valores tanto para la absorptividad específica (a) como para la absorptividad molar (ϵ)

A longitud de onda de 223 nm: $a = 0.0853 \text{ L/mg.cm}$ y $\epsilon = 35379.881 \text{ L/mol.cm}$

A longitud de onda de 282 nm: $a = 0.0133 \text{ L/mg.cm}$ y $\epsilon = 5516.441 \text{ L/mol.cm}$

Para determinar el intervalo de máxima precisión en las líneas de calibrado, se aplica el método de Ringbom. En las figuras 4.6 y 4.7 se representan las respuestas aplicando este método para las longitudes de onda de 223 nm y 282 nm respectivamente. En ellas se representa la absorbancia (100-%T) frente al logaritmo de la concentración en ppm. La absorbancia se calcula a partir del % de transmitancia (T)

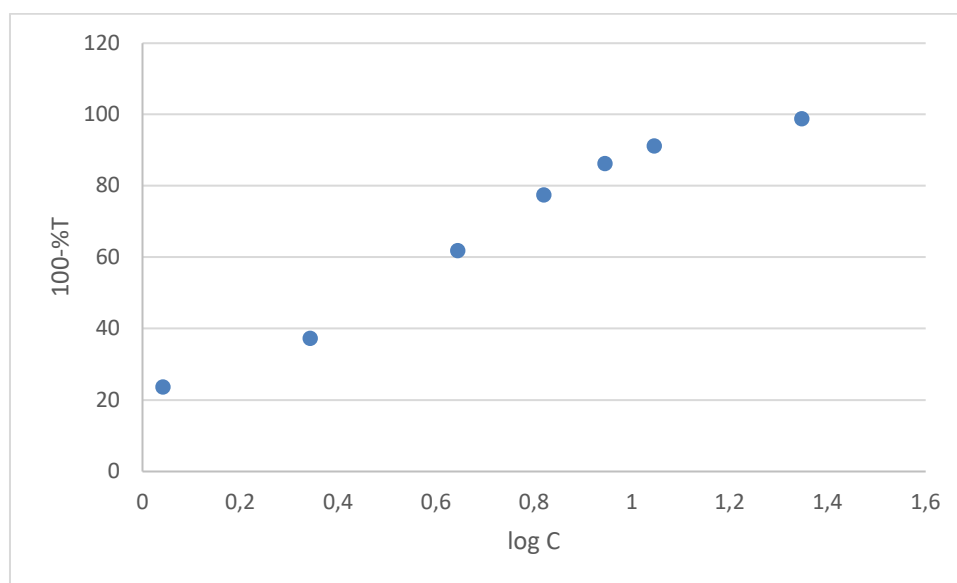


Figura 4.6. Representación gráfica de Ringbom (223 nm).

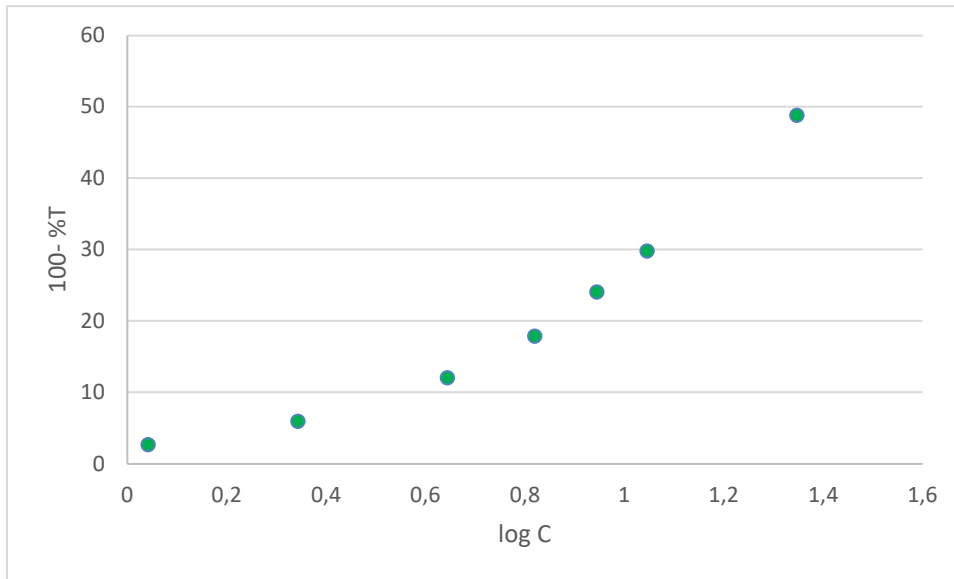


Figura 4.7. Representación gráfica de Ringbom. 282 nm.

A partir de las gráficas anteriores se obtienen los intervalos lineales de mayor precisión. En la figura 4.8 se observa que para 223 nm, el intervalo de mayor precisión se encuentra comprendido entre 2,2 y 11,1 ppm.

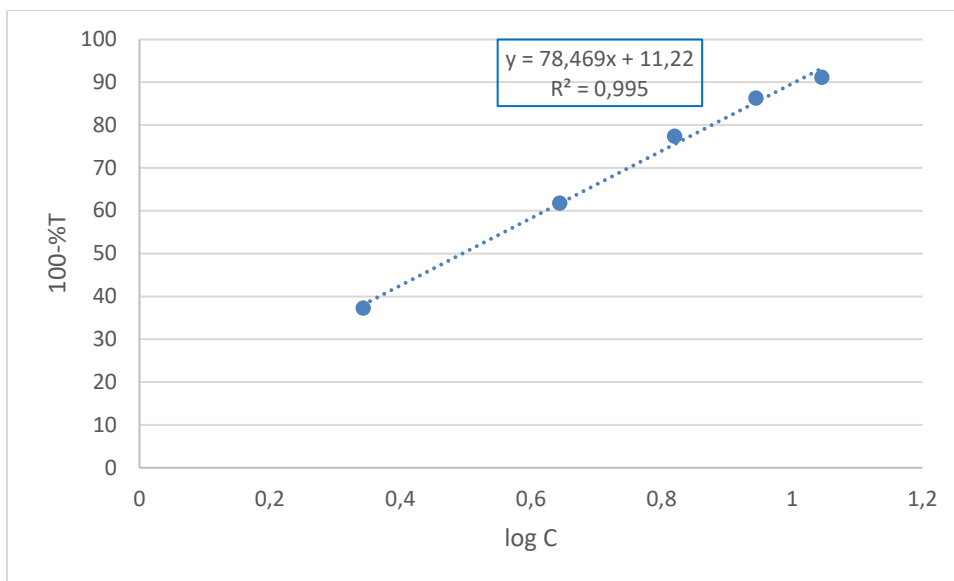


Figura 4.8. Representación del intervalo lineal de máxima precisión (223nm).

En la figura 4.9, se determina que el intervalo de máxima precisión para la longitud de onda de 282 nm se encuentra comprendido entre los valores de 4,4 y 22,2 ppm.

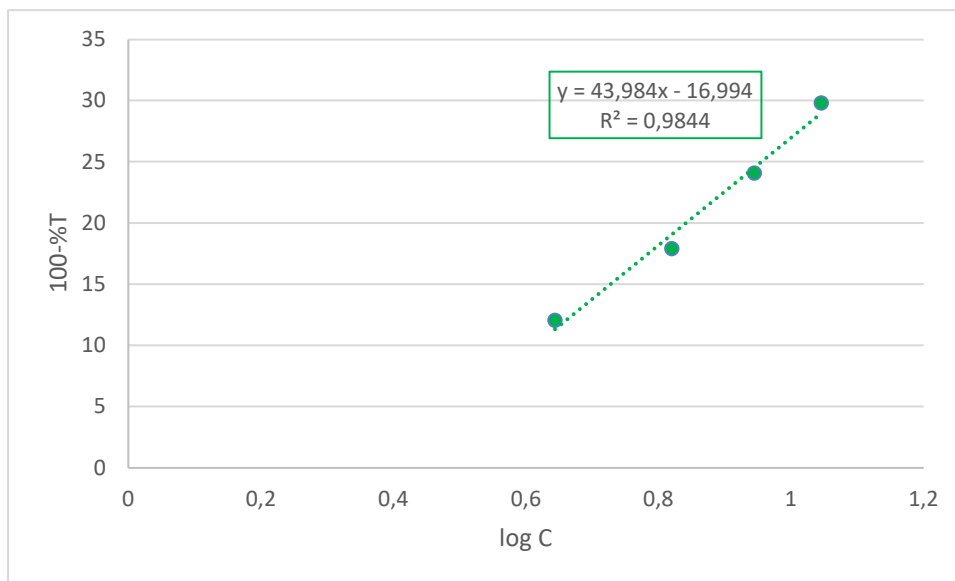


Figura 4.9. Representación del intervalo lineal de máxima precisión (282 nm)

A partir de la expresión $\frac{\Delta c/c}{(\Delta T)} = \frac{2,3\Delta \log c}{\Delta T}$ en la gráfica, es posible calcular el %error cometido ($\Delta C/C$), para un error fotométrico del equipo (ΔT) de 1%, y conocidas las pendientes de los tramos rectos ($\frac{\Delta \log c}{\Delta T}$) se obtiene el error relativo cometido en las medidas para ambas longitudes de onda en la zona de máxima precisión:

A longitud de onda de 223 nm: % Error Relativo = 2,93

A longitud de onda de 282 nm: % Error Relativo = 5,22

Para la longitud de onda de máxima absorción y mínimo error de método (223 nm), los límites de detección (menor concentración que es posible detectar en un determinado nivel de confianza) y de cuantificación (mínima concentración de clorhidrato de mefloquina en este caso que puede ser determinada con un cierto nivel de incertidumbre) obtenidos son: LOD 1,85 ppm y LOQ 5,61 ppm

4.2.3. Cromatografía líquida de alto rendimiento.

Se procede a realizar un estudio para la determinación de clorhidrato de mefloquina en muestras comerciales *Lariam*, por cromatografía de líquidos HPLC con detector ultravioleta visible.

En primer lugar, se fijó la longitud de onda de medida en la correspondiente a la máxima absorción del analito, 223 nm.

Para el análisis por HPLC se utilizaron diferentes patrones en metanol dadas las características de la fase móvil a utilizar.

Se realizó un estudio a efectos de la elección de la fase móvil, para lo cual se probaron distintas mezclas con porcentajes diferentes de agua, acetonitrilo y metanol. Los resultados inicialmente fueron poco satisfactorios, así una fase móvil de: 80% agua y 20% acetonitrilo permitía la identificación de un pico correspondiente al analito a un tiempo próximo al minuto (figura 4.10), pero como se puede comprobar al observar el cromatograma, dicho pico no permitía una adecuada integración del área, pues aparecía solapada con otro. Problemas similares se plantearon con otras fases móviles. (Figuras 4.11 a 4.14):

- a) 10% agua/50% acetonitrilo/40% metanol.
- b) 30% agua/50% acetonitrilo/20% metanol.
- c) 25% agua/50% acetonitrilo/ 25% metanol.
- d) 20% agua/50% acetonitrilo/ 30% metanol.
- e) 15% agua/50% acetonitrilo/ 35% metanol.

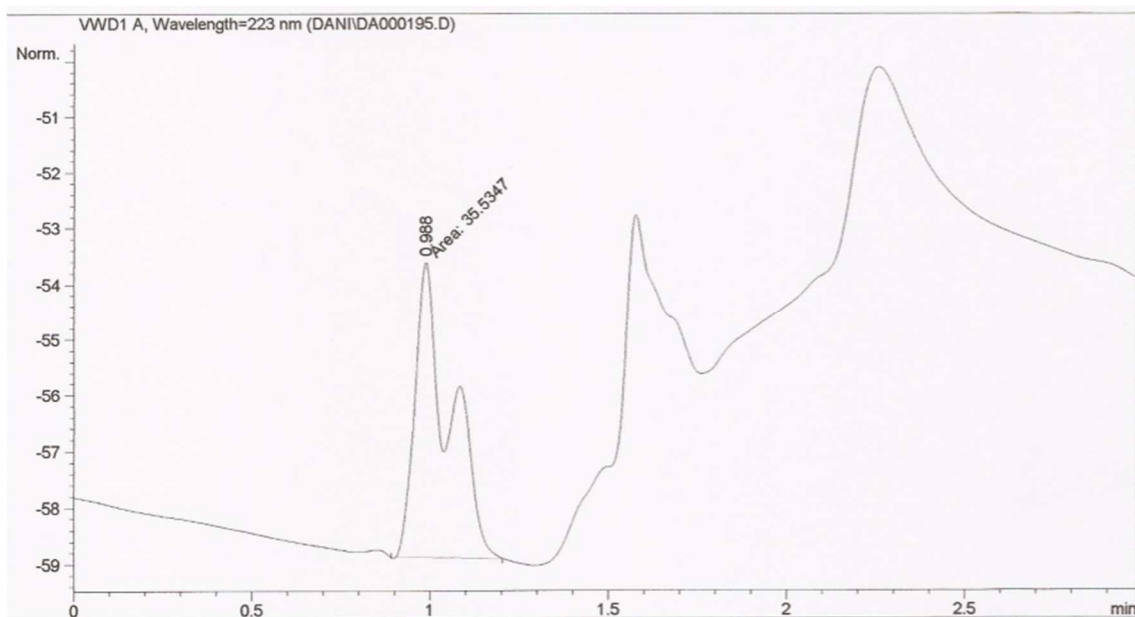


Figura 4.10. Cromatograma HPLC fase móvil 80%agua 20%metanol.

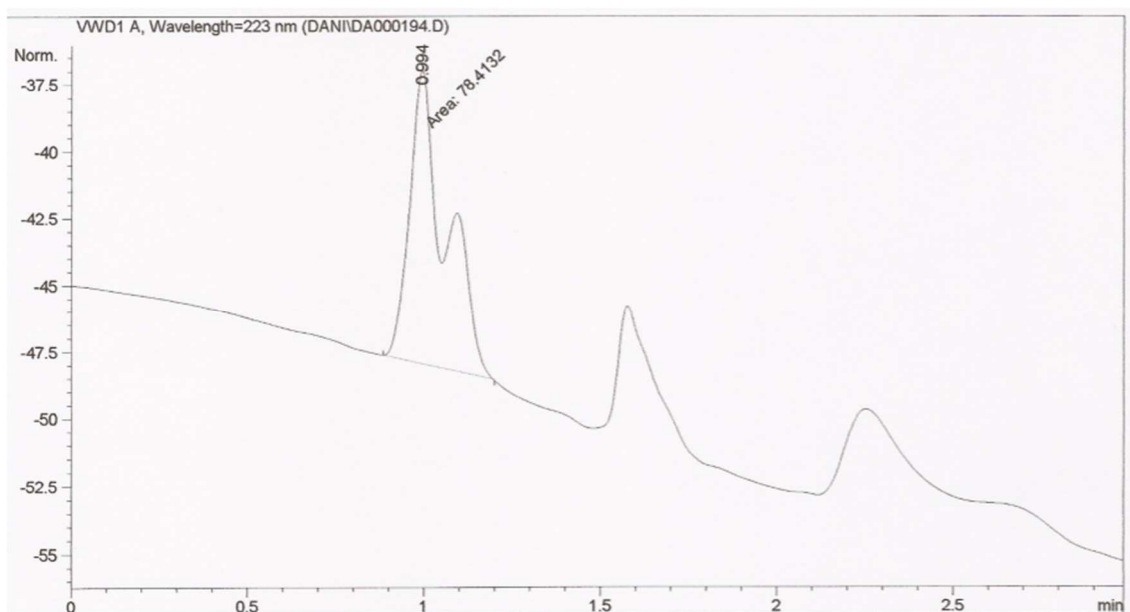


Figura 4.11. Cromatograma HPLC CMQ fase móvil 30%agua, 50%acetonitrilo, 20%metanol.

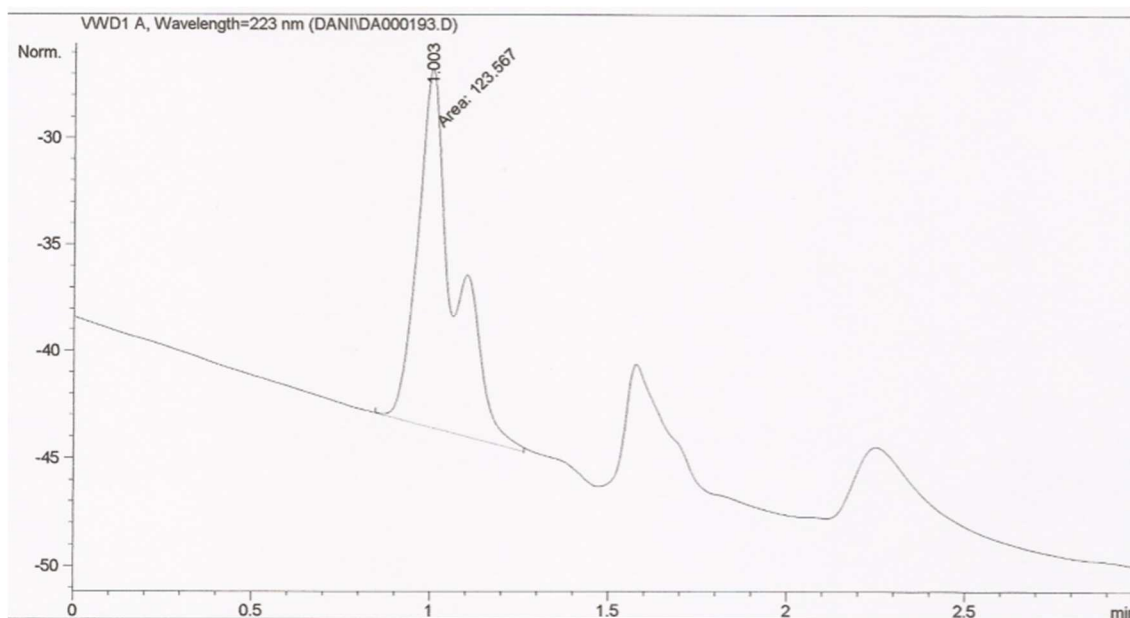


Figura 4.12. Cromatograma HPLC CMQ fase móvil 25%agua, 50%acetonitrilo, 25%metanol.

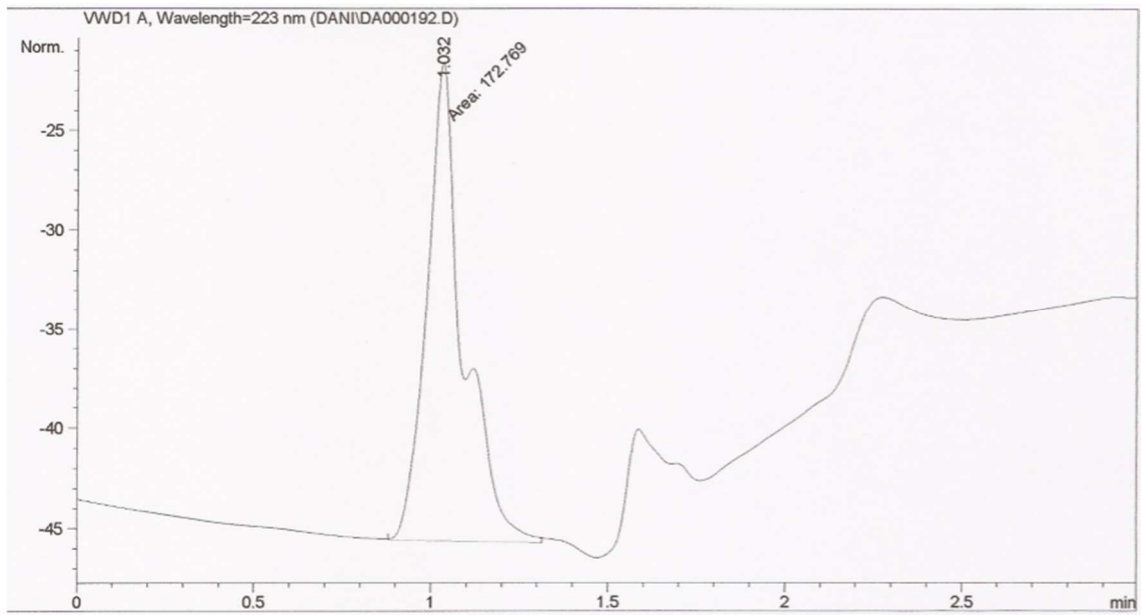


Figura 4.13. Cromatograma HPLC CMQ fase móvil 20%agua, 50%acetonitrilo, 30%metanol.

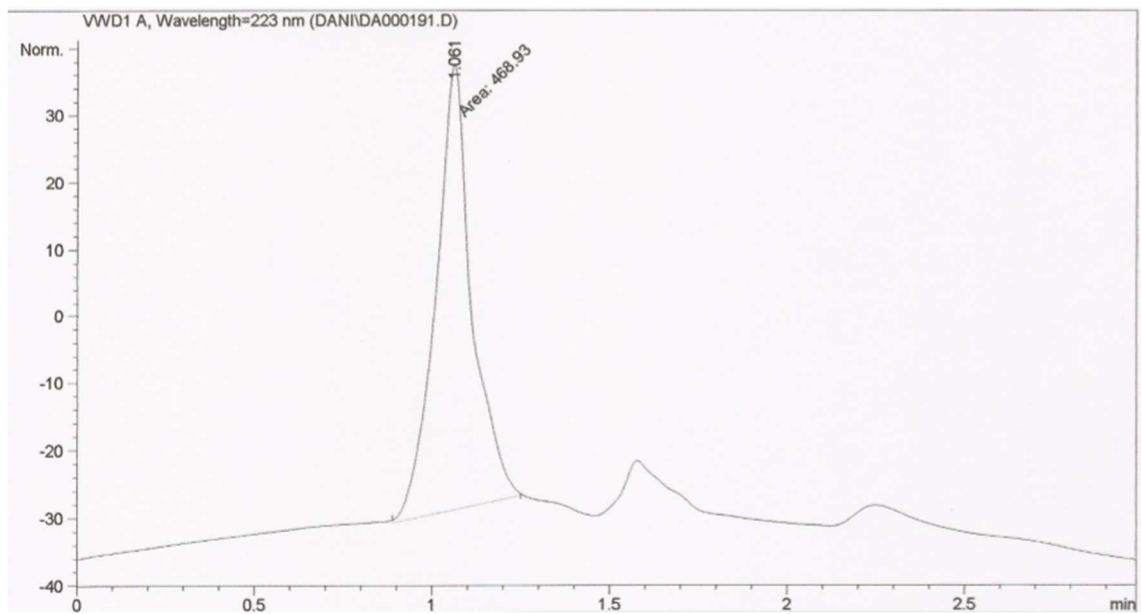


Figura 4.14. Cromatograma HPLC CMQ fase móvil 15%agua, 50%acetonitrilo, 35%metanol.

Como se puede apreciar a medida que disminuye el % en agua y aumenta el metanol el pico que se obtiene está más definido. Por ultimo para la fase móvil: 10% agua / 50%acetonitrilo / 40%metanol, el pico aparece perfectamente definido para diferentes concentraciones. (Figuras 4.15 a 4.17).

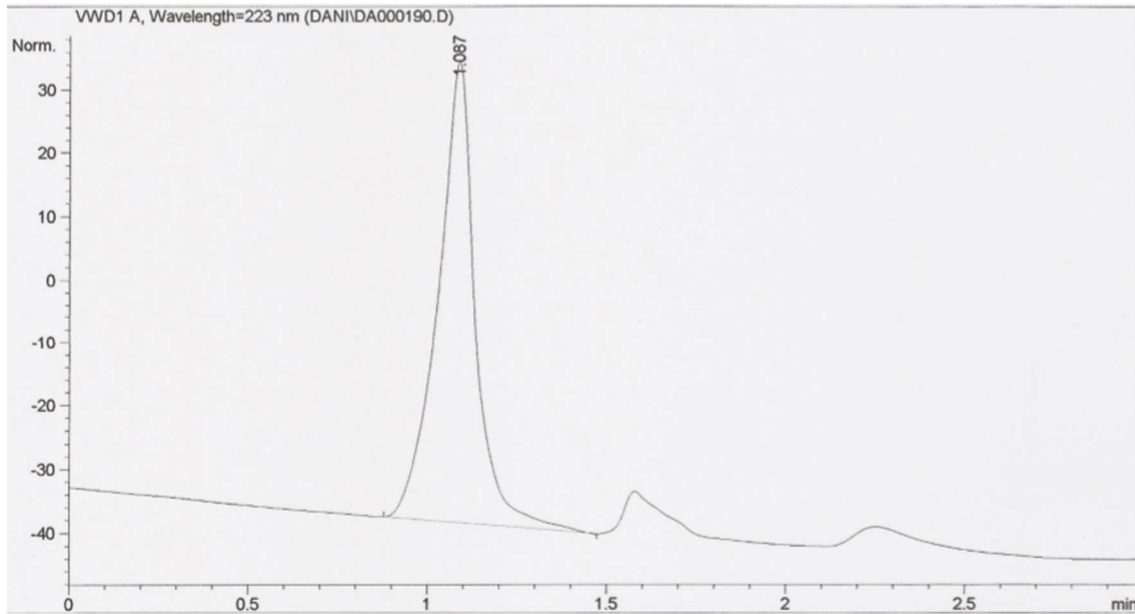


Figura 4.15. Cromatograma HPLC CMQ 27,3 ppm fase móvil 10%agua, 50%acetonitrilo, 40%metanol.

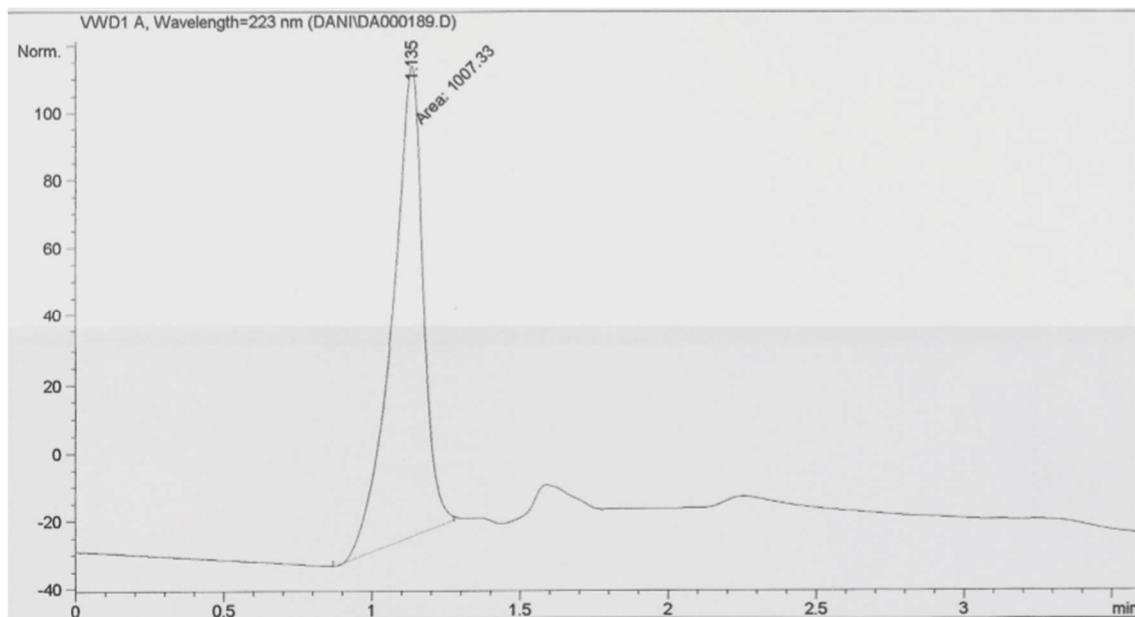


Figura 4.16. Cromatograma HPLC CMQ 54,8 ppm fase móvil 10%agua, 50%acetonitrilo, 40%metanol.

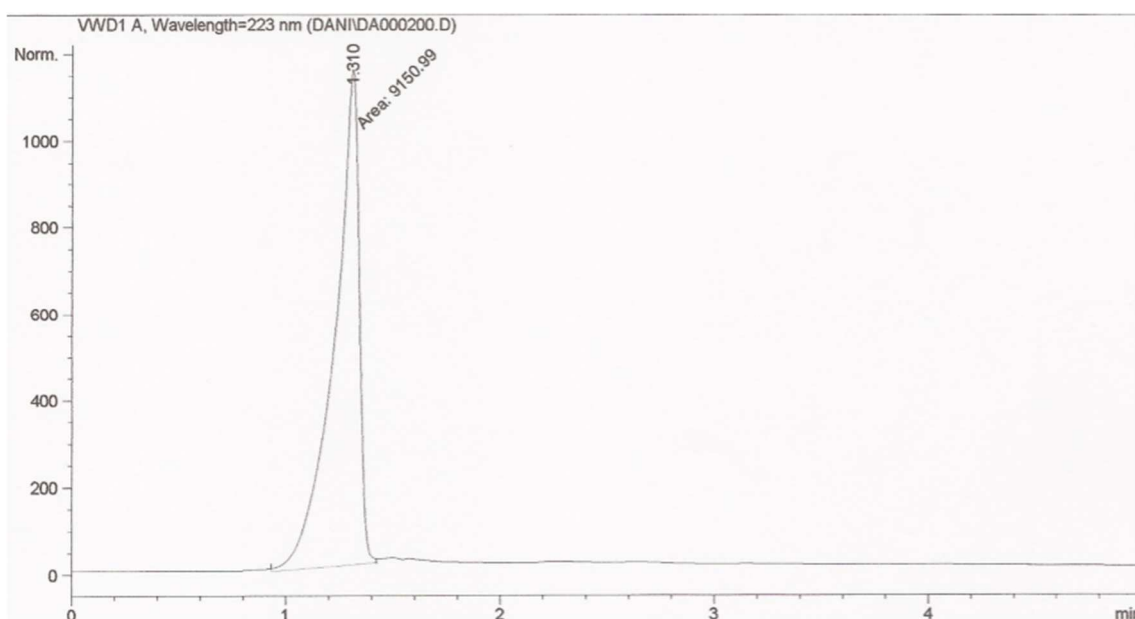


Figura 4.17. Cromatograma HPLC CMQ 544,8 ppm fase móvil 10%agua, 50%acetonitrilo, 40%metanol.

A continuación, se procedió a realizar la correspondiente línea de calibrado, fijando como condiciones de medida: longitud de onda 223nm; flujo de fase móvil 1ml/min; volumen de inyección 0,5 ml; tiempo de análisis 3 minutos; y fase móvil 10% agua/ 50% acetonitrilo/40% metanol.

Las disoluciones patrón inyectadas entre 1.7 ppm y 544.8 ppm fueron preparadas a partir de la disolución de 1089,6 ppm en metanol. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.3 y su representación gráfica, en la figura 4.18.

Tabla 4.3 : Datos de concentración y área de pico de patrones HPLC

Concentración/ ppm	Área
1,7	78,4132
3,4	123,567
6,8	172,769
27,3	530,22601
54,8	1007,33
544,8	9150,99

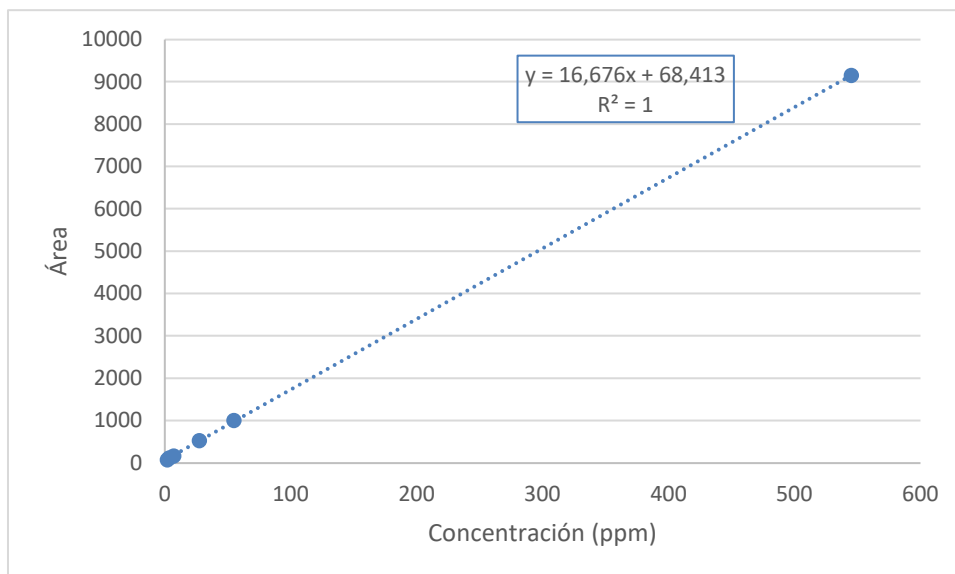


Figura 4.18. Representación gráfica del área del pico frente a la concentración HPLC.

Como existe una diferencia considerable entre el valor de 54,8 ppm y el de 544,8 ppm, se realiza una nueva representación gráfica, excluyendo el valor de 544,8 ppm. (Figura 4.19).

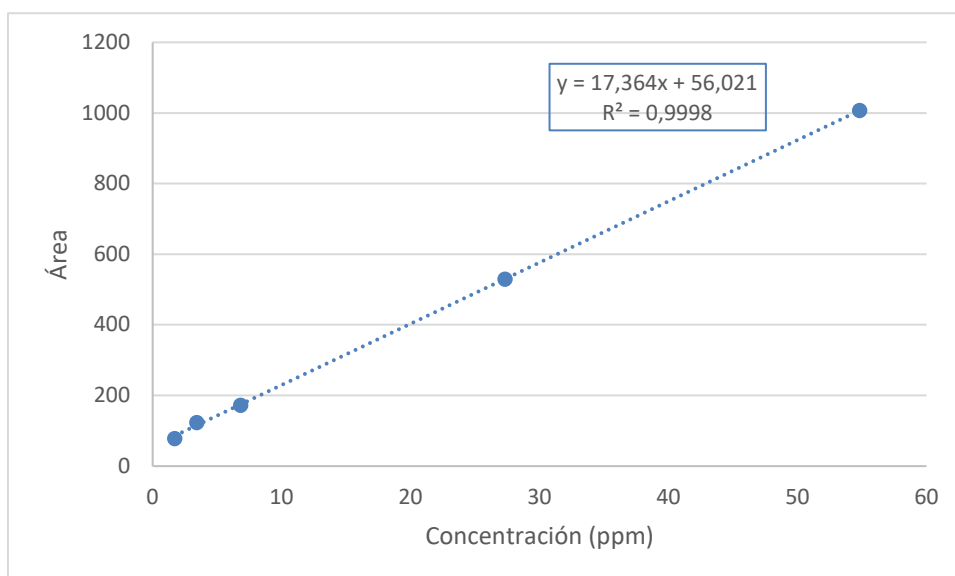


Figura 4.19. Representación gráfica del área del pico frente a la concentración HPLC.

En este caso, los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) obtenidos son: LOD: 1.22 ppm; LOQ: 3.71 ppm.

Siguiendo el mismo procedimiento que en los análisis de los patrones, se realizó un estudio de una muestra del producto comercial. Para ello, se pesa un comprimido, 0.4984 ± 0.0001 g, se tritura, se toma una parte del mismo y se vuelve a pesar 0.1470 ± 0.0001 g. Esta parte de la muestra se disolvió en metanol y se llevó a un matraz aforado, enrasando a 250.0 ml. En primer lugar, se midió la disolución sin diluir. Se obtuvo el resultado recogido en la figura 4.20.

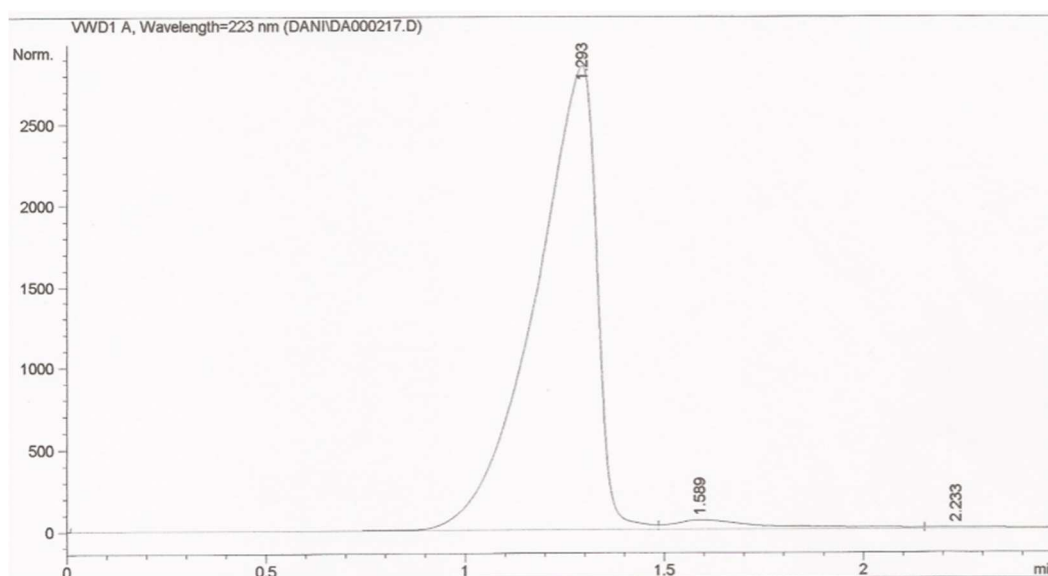


Figura 4.20. Cromatograma HPLC Lariam fase móvil 10%agua, 50%acetonitrilo, 40%metanol.

Como el valor del área del pico obtenido no se encuentra dentro de la línea de calibrado, se realizaron dos diluciones a fin de obtener respuesta en zonas óptimas de medida. Para la primera, 1:2, se toman 5.0 ml de la disolución inicial y se enrasa con metanol en matraz aforado de 10.0 ml. De esta disolución se prepara una segunda, tomando 1.0 ml de la misma y enrasando con metanol en un matraz de 10.0 ml, lo que implica una dilución 1:20 respecto a la inicial. En las figuras 4.21 y 4.22 se muestran los resultados obtenidos y los valores del área en la tabla 4.4.

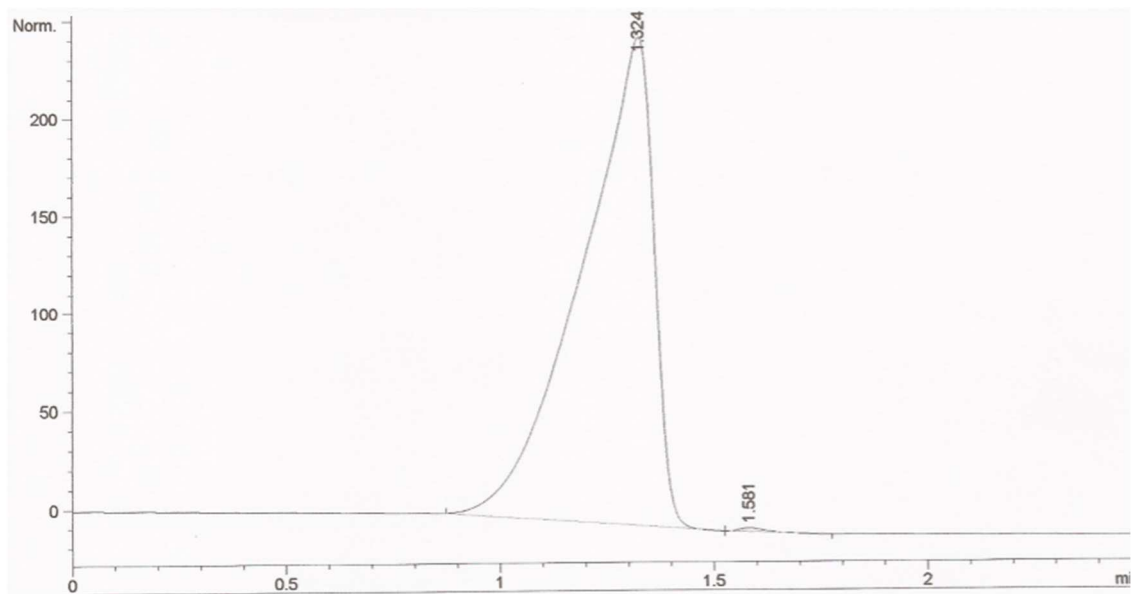


Figura 4.21. Cromatograma HPLC Lariam 1: 2 fase móvil 10%agua, 50%acetoniitrilo, 40%metanol.

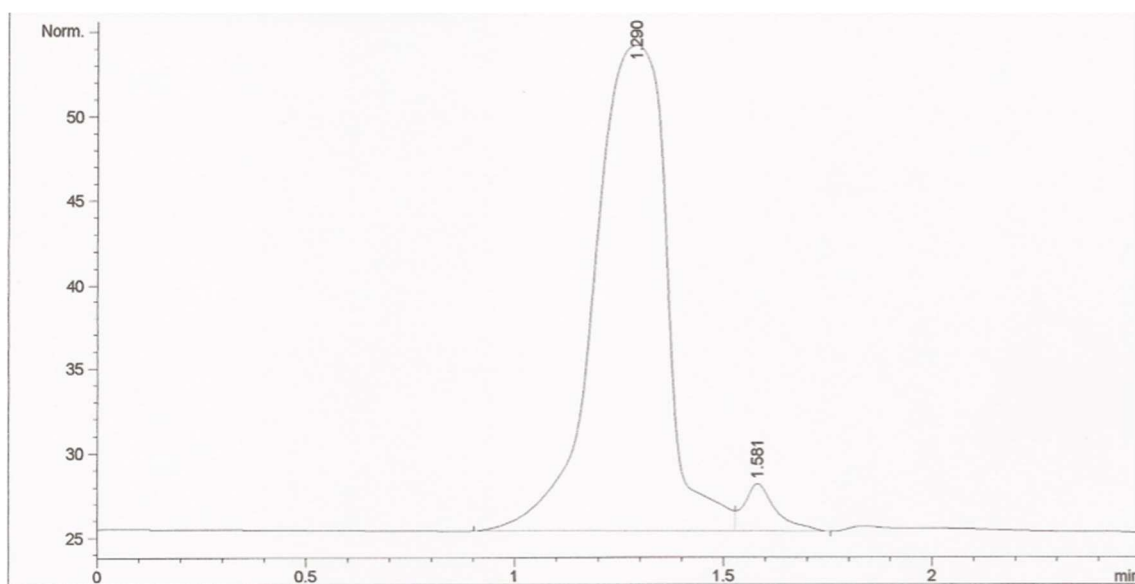


Figura 4.20. Cromatograma HPLC Lariam 1: 20 fase móvil 10%agua, 50%acetoniitrilo, 40%metanol.

Tabla 4.4. Datos de área de pico de las muestras de Larium HPLC.

Muestras	Área
1:2	2921.25806
1:20	346.35324

Realizando los cálculos pertinentes con ayuda de las líneas de calibrado obtenidas y teniendo en cuenta la dilución realizada en cada uno de los casos, se obtuvieron los valores de la concentración de clorhidrato de mefloquina, en la primera y segunda dilución, lo que representa un contenido de principio activo en el fármaco de 290.01 mg y 283.44 mg, respectivamente. Se considera que las variaciones respecto a la cantidad que especifica el producto son debidas a problemas derivados de la integración del pico y a las pocas medidas de la muestra que se pudieron realizar.

5. CONCLUSIONES

1) Se ha realizado un estudio por espectroscopia de absorción molecular UV-Vis del clorhidrato de mefloquina para determinar su espectro a partir del cual elegir las longitudes de onda de mayor absorción, 223 nm máxima y 282 nm, para su posterior aplicación en el análisis por HPLC del producto comercial Lariam. Se ha utilizado esta técnica para comprobar la estabilidad, mediante el seguimiento de la variación de la absorbancia con respecto al tiempo de disoluciones acuosas de clorhidrato de mefloquina. Se observa que durante un periodo de treinta días no existe una variación apreciable de la absorbancia. Se ha realizado un estudio de la variación de la absorbancia con la concentración encontrándose que para longitud de onda de 223 nm se obtiene un intervalo óptimo de medida, con % de error inferior al 3%, entre 2,2 y 11,1 ppm.

2) Se ha estudiado mediante espectroscopia Raman, la posibilidad de identificación del cloruro de mefloquina en el producto comercial, *Lariam*. Se detectan en el patrón picos característicos a 1360, 1420, 1580 y 1610 cm^{-1} que coinciden con el espectro del producto comercial en estado sólido.

3) Se ha puesto a punto un método para la determinación de cloruro de mefloquina en el producto comercial (*Lariam*) por HPLC, obteniéndose un pico de respuesta bien definido hacia 1.3 minutos. Las condiciones idóneas de medida para las que se obtienen límites de detección de 1.2 ppm y de cuantificación de 3.7 ppm son: longitud de onda de detección 223 nm y fase móvil formada por 10% agua, 50% acetonitrilo y 40% metanol.

6. INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

6.1 Índice de figuras

- Figura 1.1 Estructura química del clorhidrato de mefloquina (Pubchem, cita).
- Figura 4.1 Espectro Raman de sustancia patrón CMQ.
- Figura 4.2 Espectro Raman de patrón CMQ (rojo) y *Lariam* pulverizado (azul).
- Figura 4.3 Barrido para seleccionar longitud de onda de máxima absorción CMQ.
- Figura 4.4 Representación gráfica de la absorción frente a la concentración (223 nm)
- Figura 4.5 Representación gráfica de la absorción frente a la concentración (282 nm)
- Figura 4.6 Representación gráfica de Ringbom (223 nm).
- Figura 4.7 Representación gráfica de Ringbom (282 nm).
- Figura 4.8 Representación del intervalo lineal de máxima precisión (223 nm).
- Figura 4.9 Representación del intervalo lineal de máxima precisión (282 nm).
- Figura 4.10 Cromatograma HPLC fase móvil 80% agua 20% metanol.
- Figura 4.11 Cromatograma HPLC fase móvil 30% agua, 50% acetonitrilo, 20% metanol.
- Figura 4.12 Cromatograma HPLC fase móvil 25% agua, 50% acetonitrilo, 25% metanol.
- Figura 4.13 Cromatograma HPLC fase móvil 20% agua, 50% acetonitrilo, 30% metanol.
- Figura 4.14 Cromatograma HPLC fase móvil 15% agua, 50% acetonitrilo, 35% metanol.
- Figura 4.15 Cromatograma HPLC CMQ 27,3 ppm fase móvil 10% agua, 50% acetonitrilo, 40% metanol.
- Figura 4.16 Cromatograma HPLC CMQ 54,8 ppm fase móvil 10% agua, 50% acetonitrilo, 40% metanol.
- Figura 4.17 Cromatograma HPLC CMQ 544,8 ppm fase móvil 10% agua, 50% acetonitrilo, 40% metanol.
- Figura 4.18 Representación gráfica del área del pico frente concentración (HPLC)

- Figura 4.19 Representación gráfica del área del pico frente concentración (2) (HPLC)
- Figura 4.20 Cromatograma HPLC *Lariam* fase móvil 10% agua, 50% acetonitrilo, 40% metanol.
- Figura 4.21 Cromatograma HPLC *Lariam* 1:2 fase móvil 10% agua, 50% acetonitrilo, 40% metanol.
- Figura 4.22 Cromatograma HPLC *Lariam* 1:20 fase móvil 10% agua, 50% acetonitrilo, 40% metanol.

5.2 Índice de tablas

- Tabla 4.1 Asignación de los movimientos de vibración por Raman.
- Tabla 4.2 Datos de concentración y absorbancia de patrones UV-Vis.
- Tabla 4.3 Datos de concentración y área de pico de patrones HPLC.
- Tabla 4.4 Datos de área de pico de las muestras de *Lariam* HPLC.

7.BIBLIOGRAFÍA

ASHWIN, B.; RAO & Murthy, R. S. R. (2002). *A rapid spectrophotometric method for the determination of mefloquine hydrochloride*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis; 27, 959-965.

CHURCHILL, F.C. & MOUNT, D.L. (1988). *Determination of mefloquine by electron-capture gas chromatography after phosgene derivatization in biological samples and in capillary blood collected on filter paper*. Journal of Chromatography; 428, 281-290.

FROSCH, T.; SCHMITT, M. & POPP, J. (2007). *Raman spectroscopic investigation of the antimalarial agent mefloquine*. Analytical and Bioanalytical Chemistry; 387, 1749-1757.

GREEN, M. D.; BERGQVIST Y.; MOUNT, D. L.; CORBETT, S. & D'SOUZA, M. J. (1999). *Improved validated assay for the determination of mefloquine and its carboxy metabolite in plasma, serum and whole blood using solid-phase extraction and high performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography; 727, 159-165.

KATHZUNG, B. G. *Farmacología básica y clínica*. México: Editorial Manual Moderno; 1999: 997-998.

LAI, C-S.; NAIR, N. K.; MANSOR, S. M.; OLLIARO, P. L. & NAVARATNAM, V. (2007). *An analytical method with a single extraction procedure and two separate high performance liquid chromatographic systems for the determination of artesunate, dihydroartemisinin and mefloquine in human plasma for application in clinical pharmacological studies of the drug combination*. Journal of Chromatography; 857, 308-314.

LIM, P. & FLOREY, K. (1985). *Analytical Profiles of Drug Substances*. Academic Press. Florida, vol. 14, 157-180.

MOUNT, D. L.; PATCHEN, L. C. & CHURCHILL, F. C. (1990). *Determination of mefloquine in blood by supercritical fluid chromatography with electron-capture detection*. Journal of Chromatography; 527, 51-58.

NEAL, J.M.; HOWALD, W.N.; KUNZE, K.L.; LAWRENCE, R.F.; TRAGER, W.F.; (1994). *Application of negative-ion chemical ionization isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry to single-dose bioavailability studies of mefloquine*. Journal of Chromatography; 661, 263-269

PETERS, W. *Chemotherapy and Drug resistance in malaria*. London: Academic Press; 1970: 1-22.

SOURI, E.; FARSAM, H. & JAMALI, F. (1997). *Stereospecific determination mefloquine in biological fluids by high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography; 700, 215-22.