



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

**Estudio y determinación del principio activo antipalúdico
hidrocloruro de proguanil**

Autora: Yayan Li

Tutor/es: Dr. Luis Mariano Deban Miguel/Dra. M^a Isabel Campos Labadie

Departamento de Química Analítica

AGRADECIMIENTOS

El presente Trabajo Fin de Grado es realizado por la alumna YAYAN LI del Grado en Química en la Facultad de Ciencias en el Departamento de Química Analítica bajo la dirección del Dr. Luis Mariano Deban Miguel y Dra. M^a Isabel Campos Labadie.

Quiero agradecer especialmente a mi tutor académico por el continuo apoyo y consejo que me ha ofrecido durante la realización de este trabajo y, también, a lo largo de mi carrera profesional.

A M^a Rosario Gómez y a Francisco de la Rosa, técnicos de laboratorio, por enseñarme a manejar los equipos y proporcionarme todos los materiales y reactivos necesarios.

Sin olvidar, por supuesto, a todos los profesores que han impartido clase durante mis cuatro años de carrera, por estar ahí siempre disponibles de solucionarme las dudas que me han ido surgiendo a lo largo del trabajo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	6
RESUMEN/ ABSTRACT	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	13
3. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.....	17
3.1. Planteamiento	17
3.2. Objetivos	17
4. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	18
4.1. Espectroscopia Raman e IR.....	18
4.2. Espectroscopia de absorción molecular UV-Visible	19
4.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	19
5. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS EMPLEADOS	21
6. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA COMERCIAL (MALARONE).....	23
7. EXPERIMENTACIÓN Y RESULTADOS.....	24
7.1. Espectrofotometría de absorción molecular UV-Vis.....	24
7.1.1. Preparación de disoluciones patrón	24
7.1.2. Obtención de espectros de absorción molecular UV-Vis	24
7.1.3. Calibrado lineal. Gráfico de Ringbom. Límites de detección y cuantificación	26
7.1.4. Estudio de la influencia del tiempo, la luz y la temperatura	35
7.1.5. Preparación de muestras.....	39
7.1.6. Determinación directa de proguanil por absorción molecular.....	40
7.1.7. Método de adiciones patrón (MAP)	42
7.2. Cromatografía líquida de alta resolución con detector UV/Vis (HPLC-UV/Vis)	44
7.2.1. Preparación de muestras y patrones.....	44
7.2.2. Búsqueda de condiciones cromatográficas óptimas con columna apolar C ₁₈	45
7.2.3. Calibrado lineal. Determinación de proguanil por HPLC	50
7.2.4. Calibrado lineal de proguanil en orina artificial.....	53
7.2.5. Calibrado lineal para la determinación simultánea de PG y MQ en orina artificial.....	53
7.2.6. Ensayos de fase móvil con columna polar ciano	55

7.3. Espectroscopia Raman	58
7.3.1. Procedimiento experimental.....	58
7.3.2. Resultados obtenidos y discusión.....	58
7.4. Espectroscopia IR.....	64
7.4.1. Procedimiento experimental.....	64
7.4.2. Resultados obtenidos y discusión.....	64
8. CONCLUSIONES	67
9. BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS.....	68
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	73
ANEXOS	77
A) Espectroscopia de absorción molecular UV-Vis.....	77
B) Cromatografía líquida de alta resolución con detector UV-Vis (HPLC/UV-Vis).....	78
C) Espectroscopia Raman	88
D) Espectroscopia IR.....	89
E) Resonancia magnética nuclear (RMN)	92

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

4-CPB	4-Clorofenilbiguanida
OPA	Ácido ortofosfórico
ATQ	Atovacuna
CG	Cicloguanil
HPTLC	Cromatografía de capa fina de alto rendimiento
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
DMF	Dimetilformamida
CE	Electroforesis capilar
FTIR	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier
SPE	Extracción en fase sólida
FM	Fase móvil
IR	Infrarrojo
LQ	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
MQ	Mefloquina
MAP	Método de adiciones patrón
OMS	Organización Mundial de la Salud
PI	Patrón interno
PG	Proguanil
ATR	Reflectancia total atenuada
RMN	Resonancia magnética nuclear
SDS	Sulfato de lauril sódico
THF	Tetrahidrofurano
TEA	Trietanolamina
UV-Vis	Ultravioleta-visible

RESUMEN/ ABSTRACT

En este trabajo se realiza un estudio para la determinación de hidrocloreto de proguanil, uno de los principios activos del medicamento antipalúdico Malarone. Dicho estudio se lleva a cabo por diferentes técnicas con el fin de proponer métodos sencillos, rápidos y relativamente económicos para su determinación en muestras comerciales y biológicas (se estudia la influencia de componentes presentes en la orina).

De las experiencias realizadas, se concluye que los mejores resultados para la determinación de este compuesto son los obtenidos por espectrofotometría de absorción molecular UV-Vis en muestras comerciales y por cromatografía líquida de alta resolución, HPLC, en muestras biológicas. En este último caso, también se proponen las condiciones óptimas de análisis para la detección y cuantificación simultánea de hidrocloreto de proguanil y otro principio activo antipalúdico, hidrocloreto de mefloquina.

Finalmente, se llevó a cabo, sobre muestras comerciales, la identificación de hidrocloreto de proguanil por espectroscopia Raman e IR, analizando también las posibilidades de diferenciar este compuesto del hidrocloreto de mefloquina.

Palabras claves: Proguanil, UV-Vis, HPLC, Raman

In this work, a study is carried out to determine proguanil hydrochloride, one of the active principles of the antimalarial drug Malarone. This study is carried out by different techniques in order to propose simple, fast and relatively inexpensive methods for its determination in commercial and biological samples (the influence of components present in urine is studied).

From the experiments carried out, it is concluded that the best results for the determination of this compound are those obtained by UV-Vis molecular absorption spectrophotometry in commercial samples and by high-performance liquid chromatography, HPLC, in biological samples. In the latter case, the optimal analytical conditions for the simultaneous detection and quantification of proguanil hydrochloride and another antimalarial active principle, mefloquine hydrochloride, are also proposed.

Finally, the characterization of proguanil hydrochloride by Raman and IR spectroscopy was carried out on commercial samples, also analyzing the possibilities of differentiating this compound from mefloquine hydrochloride.

Keywords: Proguanil, UV-Vis, HPLC, Raman

1. INTRODUCCIÓN

La malaria, o paludismo, es “una enfermedad potencialmente mortal causada por parásitos del género *Plasmodium* que se transmiten al ser humano por la picadura de mosquitos hembra infectados del género *Anopheles*, llamados vectores de transmisión” [1]. Existen cinco especies de parásitos causantes de la malaria en el ser humano: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. Malariae*, *P. Ovale* y *P. Knowlesi* [2]. Sin embargo, *P. falciparum* es el más peligroso y el único capaz de producir malaria cerebral. En 2018, este parásito fue el causante del 99,7% de los casos estimados del paludismo en África [1].

Según el último informe de la OMS en 2019, a nivel mundial, hubo del orden de 229 millones de personas infectadas de malaria y unas cuatrocientas mil muertes. Desde el año 2000 hasta dicha fecha sólo se ha reducido en un 4% el número de casos de personas afectadas. El porcentaje total de muertes en niños menores de 5 años fue del 67% [2]. Los niños pequeños, mujeres embarazadas y personas no inmunes que viajan a regiones endémicas son los más vulnerables [3]. Aunque la mayoría de los casos letales se registraron en África, los habitantes de los países desarrollados no están tampoco libres de amenazas. Los países donde se ha identificado la malaria son visitados anualmente por unos 125 millones de personas de todo el mundo, de las que cada año, unas treinta mil se ven afectadas [4].

La malaria causada por *P. falciparum* puede presentarse sin complicaciones o en forma grave desarrollando complicaciones potencialmente mortales [5]. Debido principalmente a las características del parásito, hasta ahora no se han conseguido desarrollar vacunas o fármacos que permitan erradicar la enfermedad. La primera y única vacuna que existe es, RTS, S/AS01 (RTS,S), ha permitido reducir significativamente la incidencia de la enfermedad causada por *P. falciparum* en niños africanos [1]. Por otro lado, sólo existe un número limitado de fármacos que pueden prevenir o tratar la malaria [5]. En la **Tabla 1.1** se indican algunos de los fármacos antipalúdicos comercializados en Europa.

Tabla 1.1. Fármacos antipalúdicos [6].

Principio activo	Nombre comercial
Cloroquina	Dolquine®
	Resochin®
Quinina	Sulfato de quinina (fórmula magistral)

	Quinina sulfato tablets® 300 mg Quinimax®
Piperaquina + dihidroartemisina	Eurartesim®
Artesunato + amodiaquina	Artesun-Plus®
Clorhidrato de mefloquina	Lariam®
Atovacuona + clorhidrato de proguanil	Malarone®
Proguanil	Paludrine® Savarine® (combinación con cloroquina)
Doxiciclina	Varias marcas comerciales
Clindamicina	Varias marcas comerciales

La cloroquina, pertenece al grupo de las 4-aminoquinolinas, ha sido el compuesto más recetado para la quimioterapia profilaxis y tratamiento de malaria durante más de 50 años. El clorhidrato de proguanil se ha utilizado desde 1946 [7]. Sin embargo, debido a la aparición de cepas de *P. falciparum* resistentes a la cloroquina fue necesario coadministrar los medicamentos para conseguir una protección adecuada contra la malaria.

Hoy en día, en base a su eficiencia y a su disponibilidad en el mercado español [2][6], el medicamento más popular es Malarone (GlaxoSmithKline), producido desde 2000, que contiene 250 mg de atovacuona y 100 mg de hidroclicloruro de proguanil. La combinación de estos dos principios activos se utiliza tanto en el tratamiento como en la prevención de la malaria no complicada causada por *P. falciparum* [4]. Se ha demostrado que esta combinación es de gran importancia en áreas donde otros fármacos antipalúdicos presentan tasas de fracaso importantes [8].

La atovacuona (ATQ, trans-2-[4-(4-clorofenil)ciclohexil]-3-hidroxi-1,4-naftalenodiona), derivado de 2-hidroxi-1,4-naftoquinona, es un sólido amarillo con carácter ácido débil, altamente lipofílico y químicamente similar a la ubiquinona. Por su estructura, este principio activo es un inhibidor competitivo de la ubiquinona, inhibe la cadena de transporte de electrones mitocondrial en el complejo bc1 que conduce a la pérdida de función mitocondrial [9]. El hidroclicloruro de proguanil o clorguanida (PG, N¹-(4-clorofenil)-N⁵-isopropilbiguanida), un sólido blanco con carácter fuertemente básico e hidrofílico, es un profármaco que es convertido por la isoenzima del citocromo P-450 hepático en su metabolito activo, cicloguanil

(CG), y metabolito inactivo, 4-clorofenilbiguanida (4-CPB). El PG mejora notablemente la capacidad de la atovacuona para colapsar el potencial de transmembrana mitocondrial [10]. En la **Tabla 1.2** se recogen las propiedades físico-químicas y farmacocinéticas y en la **Figura 1.1** las estructuras moleculares de ambos compuestos.

Tabla 1.2. Propiedades físico-químicas y farmacocinéticas de la ATQ y PG. ¹Datos recuperados de SciFinder.

	Atovacuona	Proguanil
Nombre sistemático (IUPAC)	<i>trans</i> -2-[4-(4-clorofenil)ciclohexil]-3-hidroxi-1,4-naftalenodiona	N ¹ -(4-clorofenil)-N ⁵ -isopropilbiguanida
Fórmula molecular	C ₂₂ H ₁₉ ClO ₃	C ₁₁ H ₁₆ ClN ₅ ·HCl
Peso molecular (g/mol)	366,84	290,19
Estado	Sólido	Sólido
Color	Amarillo	Blanco
Punto de fusión (°C)	216 - 219 ¹	129 ¹
Punto de ebullición (°C)	535 ¹	325 ± 44 ¹
pK_a	8,4	10,6; 12,6
Solubilidad (mg/mL)	H ₂ O: <0,001 NaOH 0,1M: 4,6 [11] MeOH: soluble	H ₂ O: soluble ACN-H ₂ O (60:40): 1,0 Metanol: 1,0
λ_{max} absorción (nm)	203, 220, 253, 284	204, 232, 254
Unión proteica	>99%	75%
Metabolismo	No detectado	Sí detectado
Vida media	2,2 - 3,2 días	~ 20 h
Excreción	Heces >90% Orina <1%	Vía renal ~ 40% como PG ~ 30% como CG
C_{max} (mg/L)/ orina después de 3 días	2,8 [12]	0,24 (PG) [13] 0,04 (CG)

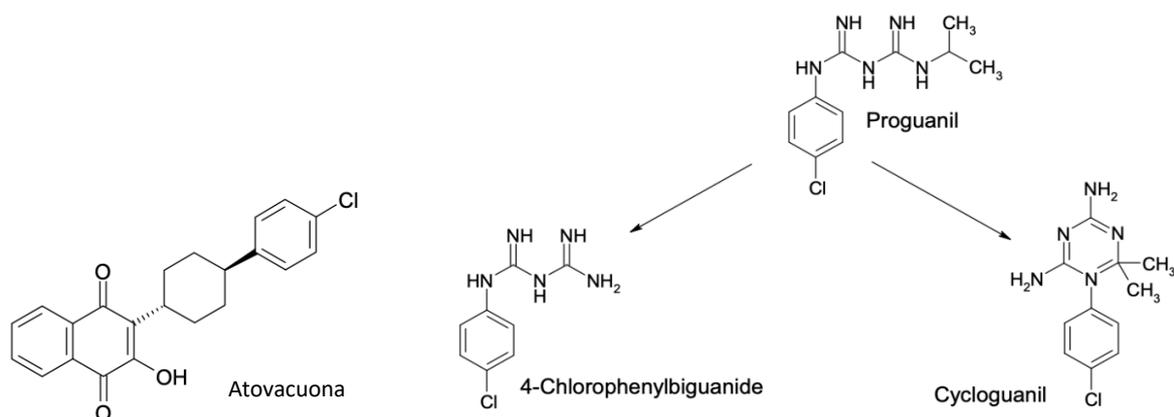


Figura 1.1. Estructura molecular de atovaquona, proguanil, cicloguanil y 4-clorofenilbiguanida [14].

La mefloquina (Lariam®), un derivado de quinolina, era uno de los fármacos quimioprolácticos más utilizado, disponible en Europa desde 1985 [13]. Sin embargo, su uso ha disminuido durante los últimos 10 años, debido a sus efectos secundarios neuropsiquiátricos [15][16]. En la **Tabla 1.3** se recogen las propiedades físico-químicas y farmacocinéticas de este producto y en la **Figura 1.2** se representan las estructuras moleculares de mefloquina (MQ) y su metabolito inactivo.

Tabla 1.3. Propiedades físico-químicas y farmacocinéticas de mefloquina. ¹Datos recuperados de PubChem NCBI.

	Mefloquina
Nombre sistemático (IUPAC)	[(R, S)-2,8-bis(trifluorometil)quinolin-4-il]-(2-piperidil)metanol
Fórmula molecular	C ₁₇ H ₁₆ N ₂ F ₆ O·HCl
Peso molecular (g/mol)	414,81
Estado	Sólido
Color	Blanco
pK_a	9,46 (amino); 13,79 (hidroxi) ¹
Solubilidad (mg/mL)	Agua: 6,2 DMSO: 20,7 MeOH: 41,5
λ_{max} absorción (nm)	222, 283, 304, 318
Metabolismo	Sí detectado Metabolito principal inactivo

Vida media	2-4 semanas
Excreción	Principalmente biliar y heces fecales, urinaria (9% como fármaco sin cambios, 4% como metabolito primario)

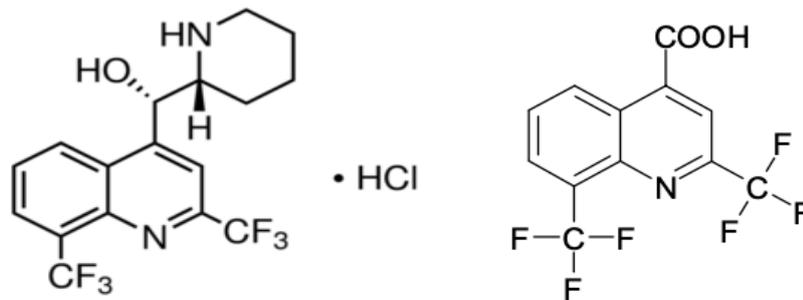


Figura 1.2. Estructura molecular del clorhidrato de mefloquina (izquierda) y su metabolito inactivo (derecha). Recuperadas de Sigma-Aldrich.

Los antipalúdicos se encuentran entre los medicamentos más consumidos en países tropicales, por lo que se considera de interés proponer métodos de identificación y cuantificación que puedan aplicarse tanto en el análisis rutinario de fármacos como para constatar su presencia en muestras biológicas. Pero también debe considerarse la posibilidad de la venta de productos falsificados o deficientes que pudieran incluirse en preparados elaborados y comercializados sin las suficientes garantías sanitarias. [17]

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

En la revisión bibliográfica realizada, se ha encontrado diferentes métodos para la determinación de hidrocloruro de proguanil en muestras comerciales y biológicas.

Las técnicas analíticas más utilizadas son la espectroscopia UV-Vis, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y espectrometría de masas (MS) [18], aunque también se han aplicado otras técnicas como la voltamperometría [4], potenciometría [19], electroforesis capilar (CE) [20] y cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HPTLC) [21].

En 1980, R.R. Moody y R.B. Taylor propusieron un método de HPLC con detector UV-Vis a 254 nm para la determinación de proguanil en tabletas de Paludrine. La columna que emplearon era un octadecilsilano (C_{18}) y la fase móvil consistía en un 55% de acetonitrilo y 45% de disolución acuosa de ácido fosfórico y dihidrogenofosfato de sodio, pH 1-2. Utilizaron como patrón interno el benzoato de fenilo. Bajo estas condiciones, el tiempo de retención para el patrón interno fue 3,5 min y proguanil 5,5 min. El coeficiente de correlación obtenido para la línea de calibración fue de 0,9936 [22]. Posteriormente, J.A. Kelly y col. determinaron proguanil y su metabolito activo, cicloguanil, en plasma y orina mediante la cromatografía de par iónico en fase reversa empleando formiato de amonio como contraion y metoprina como patrón interno. La detección se realizaba a 252 nm. La columna que emplearon fue una columna ciano S5CN, la fase móvil consistía en una mezcla de ACN-MeOH-H₂O (9:2:89, v/v) que contenía formiato de amonio 0,05 M (pH 4,0), flujo 2,0 ml/min y temperatura ambiente. En estas condiciones, el tiempo de retención para cicloguanil, proguanil y metoprina fue 3,9; 5,0 y 6,1 min, respectivamente [23].

En 1990, R.B. Taylor y col., basándose en su publicación del año 1979 [24], determinaron simultáneamente proguanil, cloroquina y sus metabolitos en plasma y orina por HPLC de par iónico en fase reversa con detector UV-Vis. Previamente, usaron la extracción en fase sólida (SPE) con cartuchos C_{18} para pretratar las muestras de sangre. La fase móvil consistió en una mezcla de acetonitrilo-disolución de ácido fosfórico/dihidrogenofosfato 10 mM pH 2,0 (50:50) conteniendo 230 mM de sulfato de lauril sódico (SLS) y 10 mM de trietanolamina (TEA) y un flujo de 0,4 ml/min [25].

A. Paci y col. propusieron un procedimiento de HPLC con “gradiente de modo dual” (el sistema de elución incluye la programación tanto de la concentración como del caudal) para

la simultánea determinación de cloroquina y proguanil. El método también se basaba en HPLC de par iónico en fase reversa (columna C₁₈) con detección ultravioleta a 254 nm. La columna fue termostatada a 25°C durante todo el análisis. La fase móvil consistió en una mezcla de formiato de amonio 0,5 M, ácido fosfórico 0,075 M y metanol. El pH de la fase acuosa se ajustó a 4,0. La proporción inicial de la FM fue H₂O-MeOH (60:40, v/v) y el gradiente de elución usado durante el análisis (60:40 a 45:55, v/v). El flujo se incrementó durante el análisis desde 0,7 a 1,0 ml/min después de 7 min. Este método permitió la determinación simultánea de ambos principios activos y la separación de sus principales intermedios de síntesis y productos de degradación. [26]

En cuanto a la propuesta de métodos para la simultánea separación y cuantificación de atovacuona y proguanil, la mayor dificultad cromatográfica fue establecer las condiciones cromatográficas para la separación simultánea de ATQ, PG y sus dos metabolitos con un patrón interno adecuado por una fase estacionaria hidrófoba C₁₈ común, debido a las grandes diferencias en las propiedades químicas de los analitos. En el año 2000, Y. Bergqvist y col. optimizaron un método de HPLC para el análisis simultáneo de ATQ, PG y sus dos metabolitos principales usando una columna de modo mixto con una fase estacionaria compuesta por un 50% de fase C₁₈ hidrófoba y un 50% de intercambiador catiónico fuerte. La ATQ y el patrón interno interactúan con la fase hidrófoba y sus tiempos de retención podrían modificarse por la cantidad de acetonitrilo y el pH de la FM. En cambio, el PG y sus metabolitos interactúan principalmente con el intercambiador de cationes fuerte y, por tanto, sus tiempos de retención podrían modificarse por el tipo y concentración de contraiones en la FM. Mediante una combinación de estos componentes de la FM, se logró una separación de línea base para estos cinco analitos. Las disoluciones patrón de ATQ y el patrón interno fueron preparadas en MeOH-DMF (99:1, v/v) y las disoluciones patrón de PG, CG y 4-CPB en agua. Con una fase móvil de composición acetonitrilo-fosfato (60:40, v/v) pH 6,8; 50,7 mM de K⁺ y 10 mM de NaClO₄, la separación se logró en un tiempo de ejecución inferior a 17 min. El perclorato de sodio se añadió a fin de lograr la eliminación de las interferencias de otros medicamentos antipalúdicos. Los límites de detección para ATQ fue 3 pmol y para PG, CG y 4-CPB, 5 pmol. [27]

Se ha encontrado también un par de artículos publicados que describen procedimientos para la determinación de PG y ATQ en tabletas comerciales. En el año 2012,

varios investigadores publicaron un método HPLC de fase reversa simple, exacto y preciso para determinar los dos componentes de Malarone. Utilizaron una columna C_8 (150 x 4,6 mm, 5 μ m), un flujo de 2,0 ml/min y detección UV-Vis a 254 nm. Probaron dos fases móviles: La FM (A) consistió en agua (pH 2,0 con ácido perclórico) y FM (B) ACN-MeOH en la relación 50:50 v/v. En estas condiciones, los tiempos de retención fueron 6,0 y 12,0 min para PG y ATQ, respectivamente. Debido a las diferentes propiedades físico-químicas de ambos compuestos, para disolver la muestra de Malarone usaron una mezcla de THF-MeOH-H₂O (40:50:10) [28]. Más recientemente, en 2017, A. Lakshmana Rao and col., en lugar de una columna C_8 , usaron una columna C_{18} (150 x 4,6 mm, 5 μ m) y una fase móvil compuesta por 50:50 v/v de ácido fosfórico 0,1% y acetonitrilo, desgasificado por ultrasonificación. El flujo se ajustó a 1,0 ml/min y la longitud de onda de detección a 287 nm. Trabajando en condiciones isocráticas, los tiempos de retención para PG y ATQ fueron 2,15 y 2,48 min, respectivamente. El método fue validado en términos de linealidad, precisión, exactitud y especificidad, límite de detección y cuantificación. La linealidad estuvo en el rango de 25 – 150 ppm para PG y 62,5 – 375 ppm para ATQ. [29]

Otros autores llevaron a cabo la determinación simultánea de ATQ y PG en formulaciones farmacéuticas mediante métodos espectrofotométricos de derivada de primer orden, coeficiente de absorbancia y espectrofotometría bivariada. Los resultados obtenidos tenían una exactitud y precisión aceptables y sin ninguna interferencia de los excipientes y aditivos de uso común. La linealidad se estableció en el rango de concentraciones de 1,0 – 10 μ g/ml para ATQ y 0,5 – 8,0 μ g/ml para PG por los tres métodos. El LD y el LQ de los métodos variaron de 0,252 a 0,270 μ g/ml y de 0,764 a 0,825 μ g/ml para ATQ y de 0,119 a 0,156 μ g/ml y de 0,361 a 0,472 μ g/ml para PG, respectivamente. [30]

Por otro lado, Nandini R. Pai y col. desarrollaron un método cromatográfico HPLC en fase reversa para la determinación individual de proguanil en tabletas comerciales. El análisis cromatográfico fue realizado en régimen isocrático a 30°C con una columna Kromasil C_{18} (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m), fase móvil 55:45 v/v de metanol-disolución (4,0 g de sal sódica del ácido hexano-1-sulfónico en 790 ml de agua más 10 ml de ácido acético glacial), flujo 1,2 ml/min con detección a 254 nm y volumen de inyección de 20 μ L. En estas condiciones, el pico del fármaco y los picos de las impurezas se lograron separar. El tiempo total de ejecución fue de 30 min y el PG se encontró a un tiempo de retención de 7,2 min. El método fue validado por

su especificidad, linealidad, exactitud, robustez y precisión. Además, los resultados obtenidos indicaron que el método es selectivo en el análisis de proguanil en presencia de productos de degradación formados bajo diversas condiciones. [31]

Finalmente, en cuanto a los métodos propuestos para la determinación de mefloquina, está el método de HPLC en fase reversa desarrollado y validado por N. B. Tembhurkar y col.. Las condiciones cromatográficas comprendieron una columna C₁₈ (250 x 4,6 mm); fase móvil que consistió en una mezcla de ACN-H₂O-MeOH-TEA (pH 3,2 con ácido ortofosfórico) (50:40:10:0,1 v/v/v/v); el caudal fue de 1,0 ml/min y la detección se llevó a cabo a 288 nm. En dichas condiciones, el tiempo de retención de mefloquina fue 4,5 min. El gráfico de la regresión lineal muestra una buena relación lineal en el rango de concentración de 10 – 50 ppm con un coeficiente de correlación de 0,999. [32]

3. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

3.1. Planteamiento

Este trabajo se enfoca sobre la realización de un estudio para la determinación de uno de los principios activos del medicamento Malarone. Como se comentó anteriormente, este medicamento, recomendado para la prevención y tratamiento del paludismo no complicado, contiene dos principios activos en cantidades fijas: 100 mg de hidroclicloruro de proguanil y 250 mg de atovacuona, por lo que se considera de interés proponer métodos sencillos y rápidos para la identificación y determinación de los principios activos tanto en el análisis rutinario del fármaco como en muestras de tipo biológico de personas que lo hayan consumido. Sin embargo, debido al elevado coste de cada uno de estos patrones, unos 260€ los 50 mg, solo se ha procedido a la adquisición del patrón de hidroclicloruro de proguanil (Pharmaceutical Secondary Standard; Certified Reference Material).

3.2. Objetivos

El principal objetivo de este trabajo es proponer métodos de identificación y cuantificación del hidroclicloruro de proguanil en tabletas comercializadas en farmacias, pero también en otros productos antipalúdicos de dudosa composición comercializados al margen de controles institucionales que puedan llevar otros principios activos como el hidroclicloruro de mefloquina. Además, se hace un estudio para su posible determinación en muestras de tipo biológico preparadas de forma sintética. El esquema de trabajo se resume en lo siguiente:

- Preparación de disoluciones patrón en: agua, metanol y mezcla de ACN-H₂O (60:40)
- Estabilidad del compuesto en función del tiempo, la luz y la temperatura
- Estudio por espectroscopia de absorción molecular UV-Vis y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)
- Propuesta de condiciones cromatográficas óptimas para la determinación por HPLC
- Determinación cuantitativa de proguanil por espectrofotometría UV-Vis y HPLC
- Estudio de posibles interferencias por los excipientes de uso común en comprimidos, así como de la influencia de urea y ácido úrico presentes en muestras biológicas (orina)
- Caracterización del principio activo por espectroscopia Raman e IR
- Discusión de los resultados obtenidos y conclusiones

4. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

4.1. Espectroscopia Raman e IR

La espectroscopia Raman e IR son dos tipos de espectroscopia de vibración, es decir, estudian las transiciones entre los niveles de energía vibracionales de las moléculas. Se basan en procesos diferentes, dispersión y absorción, respectivamente, por ello, son dos técnicas complementarias. Así, por ejemplo, las vibraciones totalmente simétricas son invisibles en IR, pero se detectan en Raman.

La espectroscopia Raman permite obtener en pocos segundos información química y estructural de casi cualquier material o compuesto orgánico y/o inorgánico permitiendo así su identificación. El análisis mediante espectroscopia Raman se basa en hacer incidir un haz de radiación monocromática de frecuencia ν_0 sobre una muestra, cuyas características moleculares se desean determinar, y examinar la radiación dispersada por dicha muestra. La mayor parte de la radiación dispersada presenta la misma frecuencia que la radiación incidente, pero una fracción muy pequeña presenta un cambio en la frecuencia, resultado de la interacción de la radiación con la materia. La radiación que tiene la misma frecuencia ν_0 que la luz incidente se conoce como dispersión Rayleigh y no aporta ninguna información sobre la composición de la muestra analizada. La luz dispersada que presenta frecuencias distintas a la de la radiación incidente, conocida como dispersión Raman, es la que proporciona información sobre la composición molecular de la muestra. Las nuevas frecuencias $+\nu_r$ (anti-Stokes) y $-\nu_r$ (Stokes) son las frecuencias Raman, características de la naturaleza química y el estado físico de la muestra e independientes de la radiación incidente. Se trata de una técnica de análisis que se realiza directamente sobre el material a analizar sin necesitar éste ningún tipo de preparación especial y no conlleva ninguna alteración de la superficie sobre la que se realiza el análisis, es decir, es una técnica no-destructiva.

La espectroscopia IR se basa en la absorción de la radiación IR por las moléculas en vibración. Una molécula absorberá la energía de un haz de luz infrarroja cuando dicha energía incidente sea igual a la necesaria para tener lugar una transición vibracional de la molécula. Se puede aplicar al análisis de sustancias en estado gaseoso, líquido o sólido, tanto cristalinas como amorfas, mediante su espectro de absorción en el rango IR del espectro electromagnético, permitiendo así la identificación de compuestos químicos a través de la

determinación de la frecuencia a la que los distintos grupos funcionales presentan bandas de absorción en la región IR. La región más utilizada es la comprendida entre 4000 a 670 cm^{-1} (IR medio).

4.2. Espectroscopia de absorción molecular UV-Visible

El origen de la absorción UV-Vis está en que las radiaciones de las zonas UV-Vis tienen energías del orden de eV y provocan transiciones de los electrones de las capas externas a longitudes de ondas características de la estructura molecular de un compuesto.

La espectroscopia por absorción molecular en las regiones ultravioleta y visible del espectro electromagnético se usa ampliamente en la identificación y determinación cuantitativa de una gran cantidad de especies inorgánicas, orgánicas y biológicas. Se basa en la medición de la transmitancia T o de la absorbancia A de disoluciones contenidas en celdas de material transparente a la radiación monocromática que incide sobre el analito. La concentración del analito se relaciona con la absorbancia según la ley de Lambert-Beer: $A = -\log T = \varepsilon \cdot b \cdot C$

Donde A es la absorbancia; T la transmitancia; ε la absorptividad molar ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$); b el camino óptico (cm) y C la concentración del analito absorbente ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

Cuando la concentración se expresa en unidades distintas de molaridad (ppm), la expresión de la ley de Beer sería $A = a \cdot b \cdot C$, donde a es la absorptividad específica ($\text{L} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

4.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución es una de las técnicas analíticas de separación más ampliamente empleada debido a su sensibilidad, su idoneidad para automatizarse, su capacidad para separar especies no volátiles o termolábiles, pero, sobre todo, su amplia aplicabilidad (p.ej. aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, fármacos, plaguicidas, antibióticos, etc.). Consiste en separar los componentes de una mezcla en función de los diferentes tipos de interacciones químicas o físicas entre los analitos, la fase estacionaria de la columna y la fase móvil utilizada como portador de la muestra.

La muestra a analizar se inyecta, en cantidad pequeña, a través del portal de inyección y los componentes se separan dependiendo de las interacciones con la fase estacionaria y la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto en ser eluido de la columna es su tiempo de

retención y es característico de cada compuesto en unas determinadas condiciones cromatográficas establecidas. Los componentes más utilizados en la fase móvil son: metanol, acetonitrilo y agua. Este último puede llevar en disolución compuestos reguladores de pH o que ayuden a mejorar la separación de los analitos. Uno de los detectores más habituales es el de absorción UV-Vis, ya que la mayoría de las moléculas orgánicas absorben radiación en la región UV-Vis. Los detectores de fluorescencia son menos usuales en los laboratorios puesto que son mucho más selectivos. Otros detectores son de tipo refractométricos, conductimétricos y electroquímicos. Actualmente se está implantando, aunque de forma minoritaria por su coste, la cromatografía de líquidos y gases acoplada a espectrometría de masas, combinando así la cromatografía como técnica de separación con la espectrometría de masas como técnica de detección, identificación y cuantificación.

5. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS EMPLEADOS

- **Materiales de laboratorio fungibles**

- Material de vidrio de uso general (vaso de precipitados, matraces, pipetas, etc.)
- Botes de plástico
- Tubos Falcon de 50 ml
- Embudo cónico
- Soporte metálico
- Filtros de papel (PRAT DUMAS France, Flat Filter Diam. 110 mm for quantitative analysis)
- Mortero de vidrio
- Cubetas de cuarzo
- Filtros de jeringa de 0,45 μm
- Columna HPLC KromaPhase C₁₈ 5 μm 150 x 4,6 mm
- Columna HPLC PRONTOSIL 120-5-CN 250 x 4,6 mm

- **Reactivos**

- Patrón de hidrocloreuro de proguanil secundario farmacéutico (290,19 g/mol), material de referencia certificado, $\geq 95\%$ (HPLC) de Sigma Aldrich. Lot: LRAC2694
- Patrón de hidrocloreuro de mefloquina secundario farmacéutico (414,81 g/mol), material de referencia certificado, $\geq 98\%$ (HPLC) de Sigma Aldrich. Lot: LRAA6971
- Agua desionizada
- Metanol para HPLC $>99,9\%$ de Sigma Aldrich
- Acetonitrilo, grado HPLC y UV-Vis de Scharlau
- Ácido fosfórico (98 g/mol) $\geq 85\%$, reactivo ACS de Sigma Aldrich
- Dihidrógeno fosfato de potasio (136,09 g/mol) para análisis $>99\%$ pureza de Panreac
- Ácido acético glacial (60,05 g/mol) ACS reagent $\geq 99,8\%$ de Sigma Aldrich
- Acetato de sodio anhidro (82,03 g/mol) para análisis $>99\%$ de Merck
- Urea (60,06 g/mol) para análisis $>99\%$ de Panreac
- Ácido úrico (168,11 g/mol) para análisis químicamente puro de PRO-BYS
- Cloruro potásico (74,56 g/mol) para análisis $>99,5\%$ de Panreac
- Cloruro sódico (58,44 g/mol), ACS $>99,5\%$ de Panreac

- **Equipos**

- Desionizador PURELAB Classic
- Agitador magnético con calefacción VELP Scientifica
- Baño de ultrasonidos P-SELECTA
- Balanza Sartorius Entris 2241-1S (precisión de 0,0001 g)
- Balanza Precisa 40SM-20^a (precisión de 0,00001 g)
- pH-metro GLP-21 CRISON
- Espectrómetro Raman: Portable Raman Spectrometer BW5415 i-Raman de B&W TEK inc. Láser de excitación de 785 nm (láser rojo)
- Espectrómetro Raman portátil BWTEK modular, equipado con un cabezal de microscopía BAC151C-785, un detector BWTEK Exemplar-PRO (CCD BTC675N) y una fuente de excitación BWTEK CleanLaze de 785 nm (láser rojo)
- Espectrofotómetro IR de transformada de Fourier (FTIR): modelo Bruker Tensor 27 (método de reflectancia total atenuada, ATR) con accesorio MKII Golden-Gate
- Espectrofotómetro UV-Vis: Diodo Array HP HEWLETT PACKARD 8453, CHEM STATION
- Cromatógrafo HPLC de Agilent Technologies 1200 series equipado con:
 - ⇒ Inyector manual G1328B
 - ⇒ Desgasificador G1322A
 - ⇒ Bomba cuaternaria G1311A
 - ⇒ Termostato G1316A
 - ⇒ Detector UV-Vis G1314B
 - ⇒ Columna Kromaphase C₁₈ 5 µm, 150 x 4,6 mm. También, se empleó la columna PROTONSIL 120-5-CN 250 X 4,6 mm
 - ⇒ Sistema informático HPCHEM

6. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA COMERCIAL (MALARONE)

Malarone de GlaxoSmithKline son comprimidos de 250 mg atovaquona y 100 mg hidrocloreuro de proguanil recubiertos con película. Los comprimidos tienen un color rosáceo por la hipromelosa y una forma redonda biconvexa.

En la lista de excipientes incluyen:

- En el núcleo del comprimido: Celulosa monocristalina (E460), povidona (K30), crospovidona tipo A, poloxamer 188, esterato de magnesio (E572) e hidroxilpropilcelulosa.
- En la cubierta pelicular: Hipromelosa (E464), macrogol 400, dióxido de titanio (E171), lactosa monohidrato, óxido de hierro rojo (E172) y polietilenglicol 8000.



Figura 6.1. Imagen de Malarone comprimidos de 250 mg ATQ/100 mg PG.

7. EXPERIMENTACIÓN Y RESULTADOS

7.1. Espectrofotometría de absorción molecular UV-Vis

7.1.1. Preparación de disoluciones patrón

Se preparan 100 ml de disoluciones patrón madre de proguanil en distintos disolventes. Para ello, se pesa una cantidad de patrón comercial, se disuelven en el disolvente correspondiente y se enrasan a 100 ml. Las masas tomadas y las concentraciones de los patrones en cada disolvente se resumen en la **Tabla 7.1**.

Tabla 7.1. Concentraciones de las disoluciones patrón madre de PG en distintos medios.

Disolvente	m_{PG}/g	$C_{patrón\ PG\ madre}/ppm$
Metanol	0,05071	507,1
Acetonitrilo-agua (60:40)	0,05038	503,8
Agua desionizada	0,05080	508,0

Se preparan 100 ml de disolución patrón de mefloquina del orden de 1000 ppm en agua desionizada. La cantidad pesada es 0,02535 g de patrón, se disuelven en agua desionizada y se enrasan a 25 ml. La concentración final resultante es de 1014 ppm.

7.1.2. Obtención de espectros de absorción molecular UV-Vis

A partir de las disoluciones madre de PG en los distintos medios, se preparan otros patrones por dilución y se realizan, con estos últimos, barridos por el espectrofotómetro UV-Vis entre 200 – 800 nm, empleando cubetas de cuarzo, con el fin de encontrar las longitudes de onda de máxima absorción de proguanil. Previamente, se efectúa un barrido del blanco correspondiente en cada caso.

En las figuras siguientes (**Figuras 7.1 – 7.3**) se recogen los espectros de proguanil en diferentes medios. Se observa que el PG presenta tres máximos de absorción: 204, 232 y 254 nm. Las bandas de absorción sobre 204 y 254 nm se deben a la presencia del anillo de benceno en la estructura del compuesto. Y el máximo a 232 nm por la presencia de grupos nitrogenados.

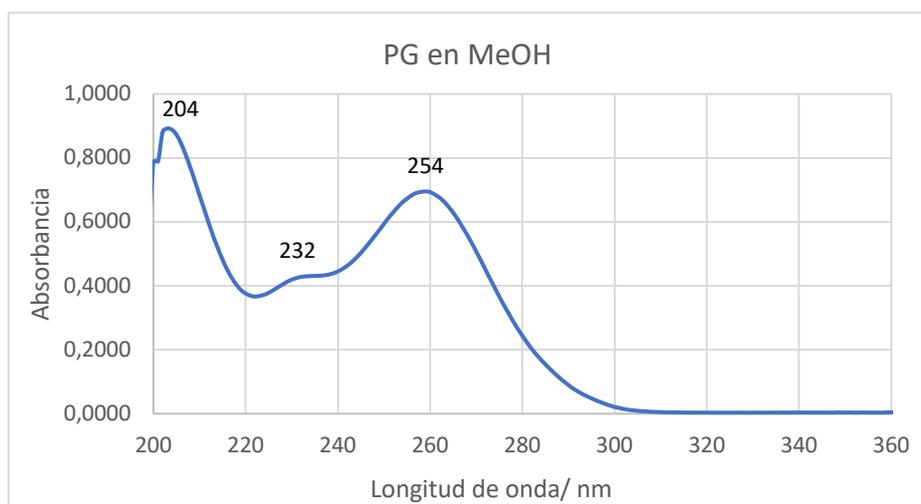


Figura 7.1. Espectro de absorción molecular de PG en metanol de 10 ppm.

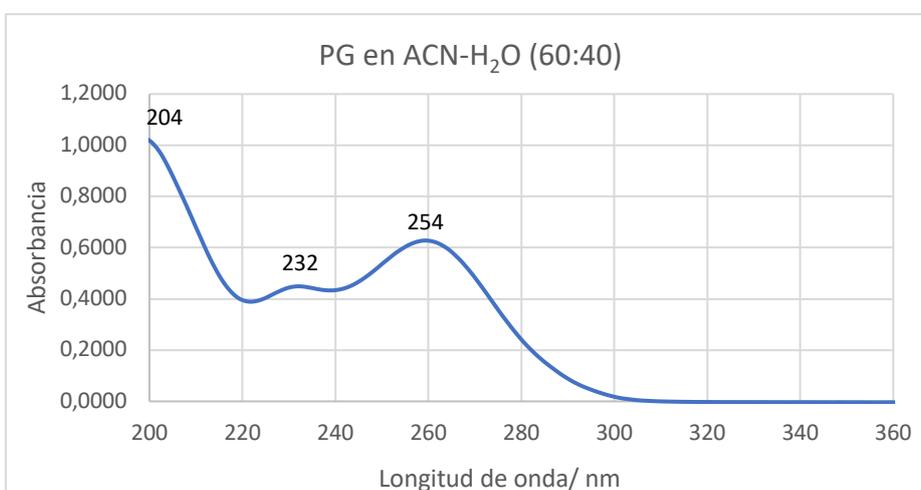


Figura 7.2. Espectro de absorción molecular de PG en ACN-H₂O (60:40) de 10 ppm.

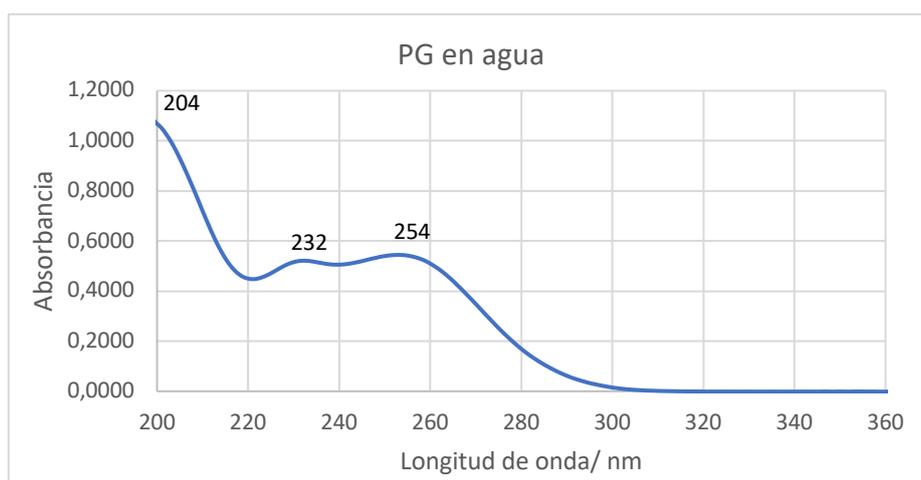


Figura 7.3. Espectro de absorción molecular de PG en agua desionizada de 10 ppm.

En la **Figura 7.4** se recoge el espectro de absorción molecular de mefloquina obtenido a partir de una disolución de MQ de 10 ppm, preparada mediante la correspondiente dilución del patrón madre de 1014 ppm.

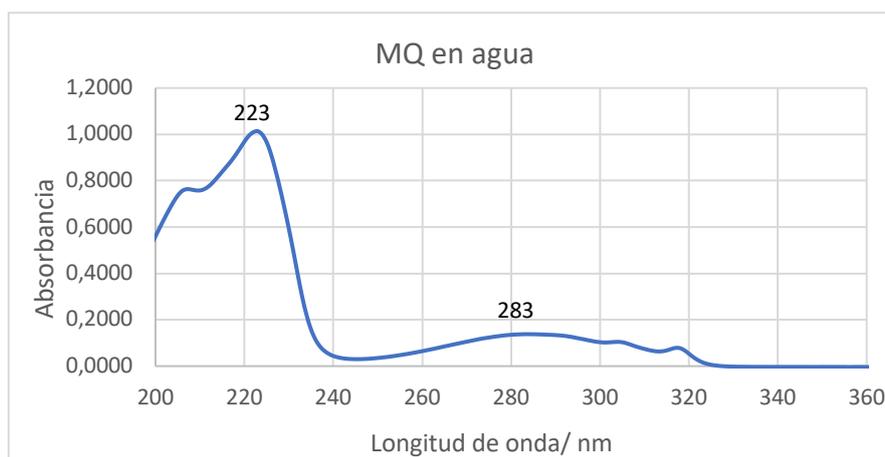


Figura 7.4. Espectro de absorción de MQ en agua desionizada de 10 ppm.

La mefloquina presenta un máximo de absorción de mayor intensidad a 223 nm y otro máximo menos intenso a 283 nm. Estas dos longitudes de onda de absorción (λ_{\max}) corresponden a la presencia de anillo de quinolina en la estructura.

7.1.3. Calibrado lineal. Gráfico de Ringbom. Límites de detección y cuantificación

- Medio metanol

A partir de la disolución patrón madre de PG en MeOH de 507,1 ppm se preparan otros patrones en un amplio rango de concentraciones, comprendidas entre 0,1 – 50,0 ppm, y se aplica el método de Ringbom con el fin de determinar el intervalo lineal de mínimo error. Para ello, se miden las absorbancias de todos los patrones diluidos en el espectrofotómetro UV-Vis con cubetas de cuarzo y haciendo un blanco previo con el medio correspondiente. Después, se representa el porcentaje de absorbancia ($100 - \%T$) frente al logaritmo de la concentración. Este análisis se realiza para las longitudes de onda de 232 y 254 nm.

En la **Figura 7.5** se muestra los espectros de absorción molecular de los patrones de proguanil en metanol.

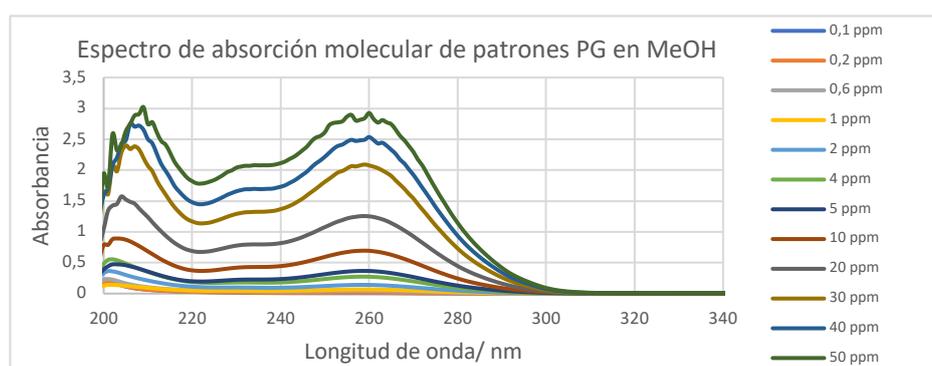


Figura 7.5. Espectros de absorción molecular de los patrones de proguanil en metanol.

De las representaciones de los valores recogidos en la **Tabla 7.2**, reflejadas en las **Figuras 7.6 y 7.7**, se obtiene que a 232 nm el intervalo de máxima pendiente está comprendido entre 4,1 – 30,4 ppm. Mientras que a 254 nm el tramo de máxima pendiente se encuentra entre 2,0 – 10,1 ppm.

Mediante la expresión $\frac{\%Error\ relativo}{\%Error\ fotométrico} = \frac{230,3}{pendiente\ tramo\ recto} \rightarrow \frac{100 \cdot \Delta C / C}{\%E_T} = \frac{230,3 \Delta \log C}{\Delta \%T}$ y para un error fotométrico (%E_T) del 1%, se puede calcular el porcentaje de error relativo cometido en las medidas en esa zona de mínimo error. Para ello, se sacan las pendientes de los tramos rectos a 232 y 254 nm a partir de los gráficos de Ringbom y se obtienen porcentajes de errores relativos mínimos para esas zonas. Los resultados obtenidos se resumen en la **Tabla 7.3**.

Tabla 7.2. Datos del gráfico de Ringbom y del calibrado lineal de PG en metanol a 232 y 254 nm.

Concentración/ ppm	232 nm			254 nm		
	A	%T	(100 – %T)	A	%T	(100 – %T)
0,1	0,014	96,8	3,2	0,007	98,4	1,6
0,2	0,016	96,3	3,7	0,013	97,0	3,0
0,6	0,037	91,8	8,2	0,044	90,4	9,6
1,0	0,045	90,2	9,8	0,064	86,4	13,6
2,0	0,098	79,8	20,2	0,135	73,3	26,7
4,1	0,180	66,1	33,9	0,262	54,8	45,2
5,1	0,227	59,3	40,7	0,349	44,8	55,2
10,1	0,428	37,3	62,7	0,661	21,8	78,2
20,3	0,792	16,1	83,9	1,192	6,4	93,6
30,4	1,317	4,8	95,2	1,987	1,0	99,0
40,6	1,690	2,0	98,0	2,415	0,4	99,6
50,7	2,070	0,9	99,1	2,793	0,2	99,8

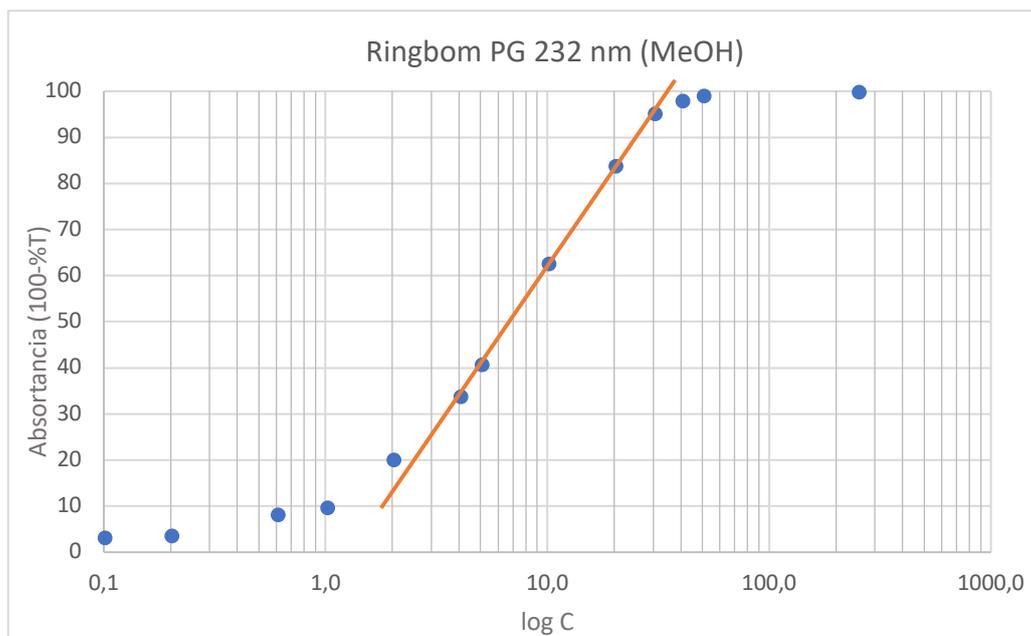


Figura 7.6. Gráfico de Ringbom de PG a 232 nm en metanol.

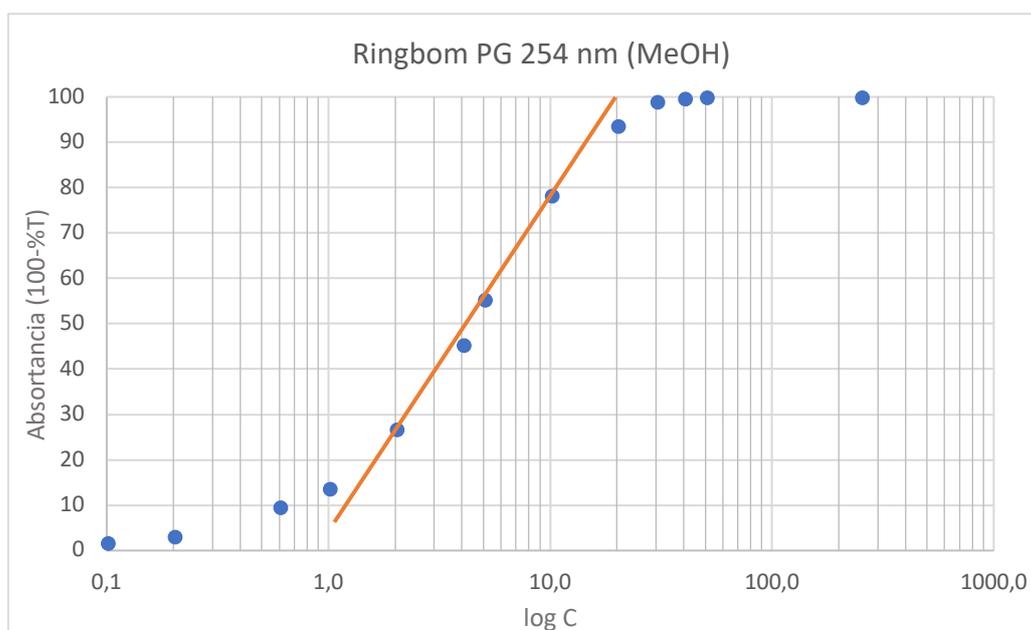


Figura 7.7. Gráfico de Ringbom de PG a 254 nm en metanol.

Tabla 7.3. Pendientes y porcentajes de error relativo del tramo recto a 232 y 254 nm en MeOH.

Metanol	Pendiente máxima	% Error relativo
232 nm	70,0	3,3
254 nm	73,7	3,1

Una vez conocido el tramo de máxima precisión, se construyen, en este intervalo, las líneas de calibración para ambas longitudes de onda representadas en las Figuras 7.8 y 7.10.

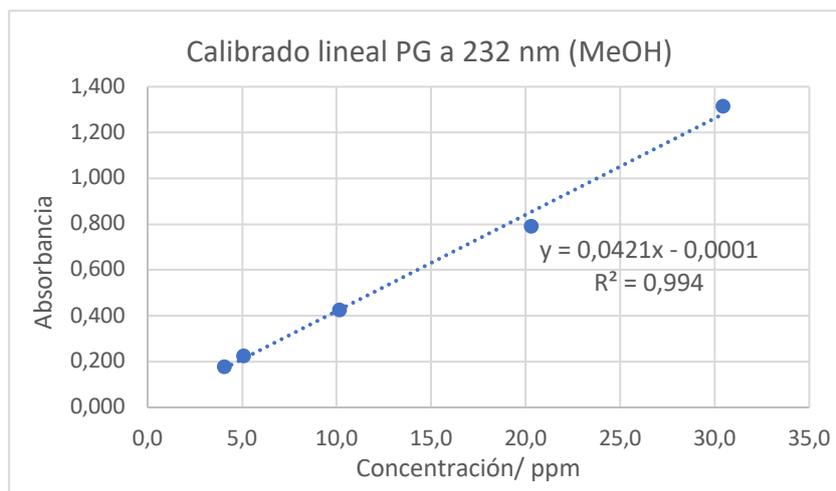


Figura 7.8. Calibrado lineal de proguanil en metanol a 232 nm.

Para el calibrado lineal de PG en MeOH a 232 nm, el error típico de ajuste (s_e) del tramo de máxima pendiente es 0,0422 y en la **Tabla 7.4** se recogen los parámetros de dicho calibrado, que son empleados después para estimar los límites de detección y cuantificación.

Tabla 7.4. Parámetros de la regresión lineal a 232 nm (MeOH).

Parámetros	Coeficientes	Error típico	Intervalo de confianza	
			Inferior 95%	Superior 95%
Ordenada, b_0	-0,0001	0,0324	-0,1032	0,1030
Pendiente, b_1	0,0421	0,0019	0,0361	0,0481

La bondad del calibrado lineal se comprueba observando el valor del coeficiente de determinación (R^2) que sea próximo a la unidad; el intervalo de confianza de la ordenada que tiene que incluir a 0 para obtener una recta que pase por el origen de coordenadas; y el gráfico de los residuales donde tiene que mostrar residuos pequeños y aleatorios (ver **Tablas 7.5 y 7.7; Figuras 7.9 y 7.11**). En este caso, se cumplen los tres requisitos.

Tabla 7.5. Residuales de la regresión lineal a 232 nm (MeOH).

Conc/ ppm	Residuos
4,1	0,009
5,1	0,014
10,1	0,001
20,3	-0,061
30,4	0,037



Figura 7.9. Gráfico de los residuales (MeOH, 232 nm).

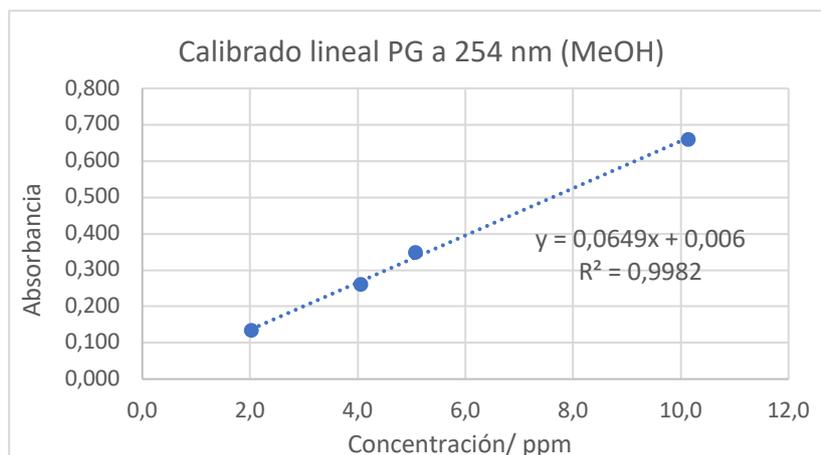


Figura 7.10. Calibrado lineal de proguanil en metanol a 254 nm.

Para el calibrado lineal a 254 nm, el error típico del ajuste (s_e) es 0,0117 y en la **Tabla 7.6** se recogen los parámetros del ajuste lineal. Se puede observar que el intervalo de la ordenada incluye a 0, lo cual justifica que el blanco no proporciona señal analítica.

Tabla 7.6. Parámetros de la regresión lineal a 254 nm (MeOH).

Parámetros	Coeficientes	Error típico	Intervalo de confianza	
			Inferior 95%	Superior 95%
Ordenada, b_0	0,0060	0,0119	-0,0454	0,0573
Pendiente, b_1	0,0649	0,0020	0,0565	0,0733

Tabla 7.7. Residuales de la regresión lineal a 254 nm (MeOH).

Conc/ ppm	Residuos
2,0	-0,003
4,1	-0,008
5,1	0,014
10,1	-0,003

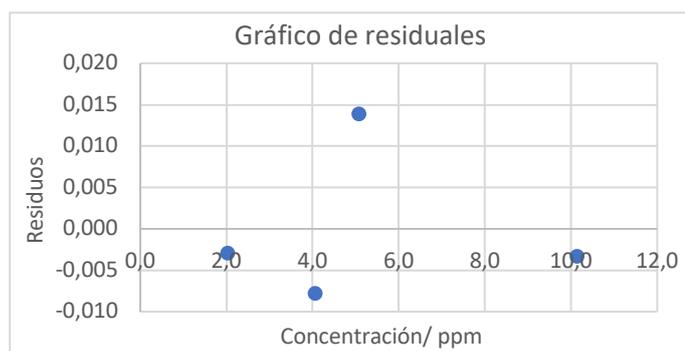


Figura 7.11. Gráfico de los residuales (MeOH, 254 nm).

A partir de la ecuación de la recta obtenida mediante un ajuste de mínimos cuadrados, se determina la absorptividad específica de proguanil, que es la pendiente de la recta correspondiente al representar A frente a C (ley de Beer). A partir de este valor y la masa molecular de proguanil se obtiene también su absorptividad molar. Los resultados se recogen en la **Tabla 7.8**.

Tabla 7.8. Absortividad específica y molar de proguanil en MeOH.

Metanol	$a/ L mg^{-1} cm^{-1}$	$\epsilon/ L mol^{-1} cm^{-1}$
232 nm	0,0421	12217
254 nm	0,0649	18833

Los límites de detección y cuantificación se definen como: $LD = \bar{y}_{bl} + 3,29s_{bl}$; $LQ = \bar{y}_{bl} + 10s_{bl}$.

Para determinar los LD y LQ a través del calibrado lineal, se consideran que b_0 y s_e son estimadores de y_{bl} y s_{bl} , respectivamente. Los valores calculados de señal analítica (y) para cada uno de los límites se transforman en valores de concentración (x) por interpolación en la ecuación de la línea de calibrado. Obteniéndose que $LD = b_0 + 3,29s_e = b_0 + b_1x_{LD} \rightarrow x_{LD} = \frac{3,29s_e}{b_1}$; $LQ = b_0 + 10s_e = b_0 + b_1x_{LQ} \rightarrow x_{LQ} = \frac{10s_e}{b_1}$. En la **Tabla 7.9** se muestran los resultados de los límites de detección y cuantificación obtenidos a ambas longitudes de onda.

Tabla 7.9. Límites de detección y cuantificación a 232 y 254 nm (MeOH).

Metanol	LD/ ppm	LQ/ ppm
232 nm	0,37	1,11
254 nm	0,14	0,44

- Medio acuoso

Para los patrones de PG preparados en agua desionizada se hace un análisis similar. En la **Figura 7.12** aparece los espectros de absorción molecular de los patrones entre 1 – 60 ppm y en la **Tabla 7.10** los datos del gráfico Ringbom y del calibrado lineal a 232 y 254 nm.

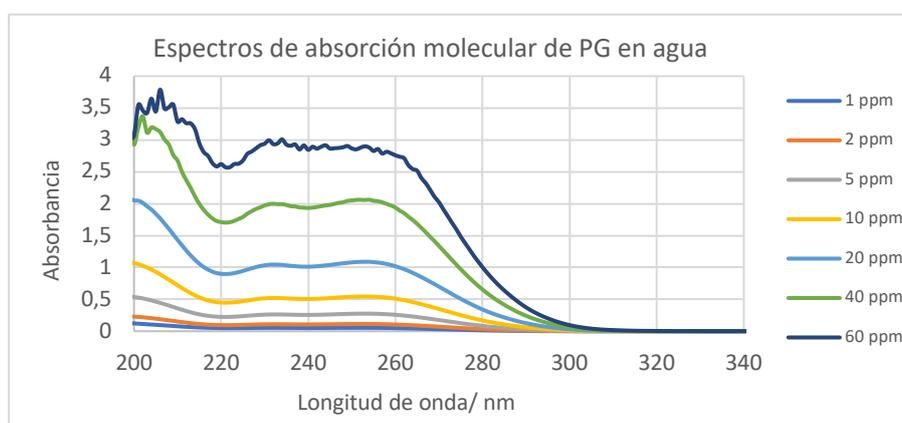


Figura 7.12. Espectros de absorción molecular de patrones de proguanil en agua desionizada.

Tabla 7.10. Datos del gráfico de Ringbom y del calibrado lineal de PG en agua desionizada a 232 y 254 nm.

Concentración/ ppm	232 nm			254 nm		
	A	%T	(100-%T)	A	%T	(100-%T)
1,0	0,053	88,5	11,5	0,053	88,4	11,6
2,0	0,109	77,7	22,3	0,113	77,0	23,0
5,1	0,263	54,5	45,5	0,276	53,0	47,0
10,2	0,521	30,1	69,9	0,544	28,6	71,4
20,3	1,045	9,0	91,0	1,089	8,2	91,8
40,6	1,998	1,0	99,0	2,063	0,9	99,1
61,0	2,933	0,1	99,9	2,881	0,1	99,9

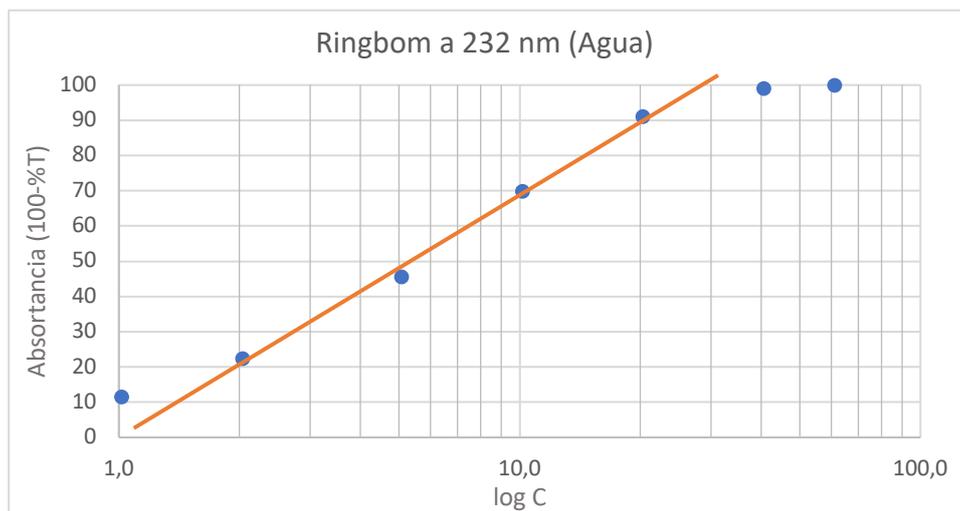


Figura 7.13. Gráfico de Ringbom de PG a 232 nm en agua desionizada.

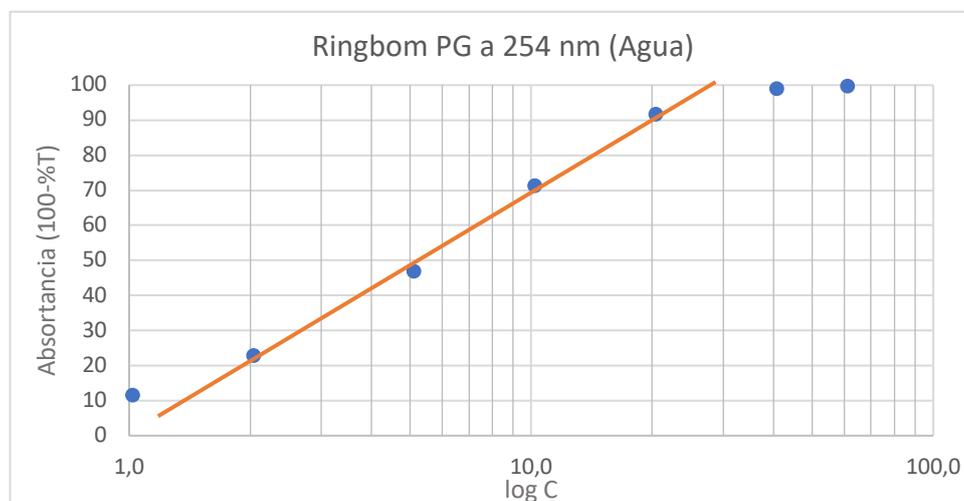


Figura 7.14. Gráfico de Ringbom de PG a 254 nm en agua desionizada.

Según los gráficos anteriores (**Figuras 7.13 y 7.14**), en medio acuoso, tanto a 232 como a 254 nm, el intervalo lineal de máxima pendiente comprende patrones de concentración entre 2,0 – 20,3 ppm. Se calcula la pendiente de estos tramos rectos y, empleando la expresión indicada anteriormente, se determinan los porcentajes de error relativo asociado (**Tabla 7.11**).

Tabla 7.11. Pendientes y porcentajes de error relativo del tramo recto a 232 y 254 nm en agua desionizada.

Agua desionizada	Pendiente máxima	% Error relativo
232 nm	68,7	3,4
254 nm	68,8	3,3

Se construyen las rectas de calibrado (A frente a C) a 232 y 254 nm (**Figuras 7.15 y 7.17**) con las concentraciones del tramo lineal de mínimo error estimado. Estas líneas de calibración serán empleadas después para interpolar la concentración de hidrocóloruro de proguanil en comprimidos de Malarone.

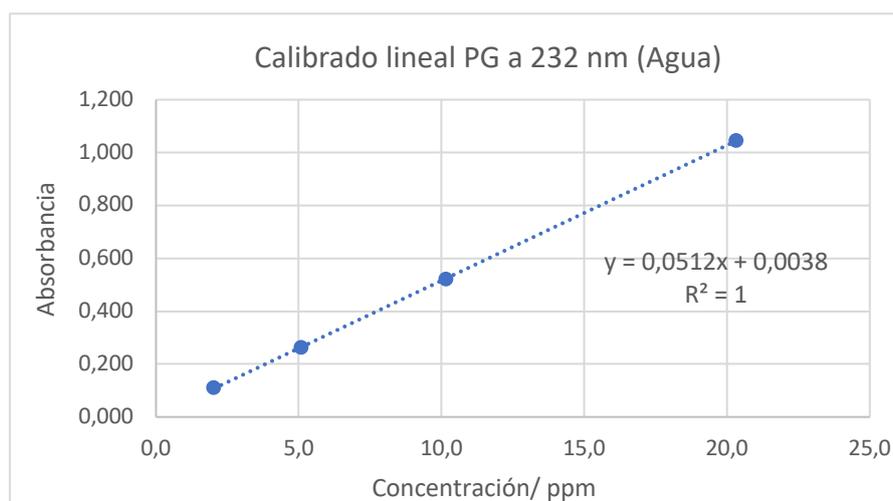


Figura 7.15. Calibrado lineal de proguanil en agua desionizada a 232 nm.

En la **Tabla 7.12** se recopilan los parámetros del calibrado lineal de PG en agua a 232 nm y el error típico de ajuste (s_e) obtenido es 0,0022. Estos datos son utilizados después para estimar los límites de detección y cuantificación.

Tabla 7.12. Parámetros de la regresión lineal a 232 nm (Agua).

Parámetros	Coeficientes	Error típico	Intervalo de confianza	
			Inferior 95%	Superior 95%
Ordenada, b_0	0,0038	0,0019	-0,0043	0,0119
Pendiente, b_1	0,0512	0,0002	0,0505	0,0519

Tabla 7.13. Residuales de la regresión lineal a 232 nm (Agua).

Conc/ ppm	Residuos
2,0	0,0017
5,1	-0,0004
10,2	-0,0024
20,3	0,0011

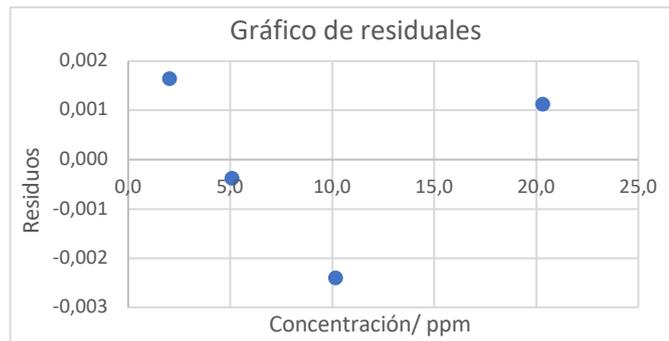


Figura 7.16. Gráfico de los residuales (Agua, 232 nm).

De nuevo, se comprueba que el coeficiente de determinación (R^2) es próximo a la unidad, el intervalo confianza de la ordenada incluye a 0 y los residuos son pequeños y aleatorios, justificándose la bondad del calibrado lineal obtenido. Los datos de los residuales se muestran en las **Tablas 7.13** y **7.15** y los gráficos correspondientes en las **Figuras 7.16** y **7.18**.

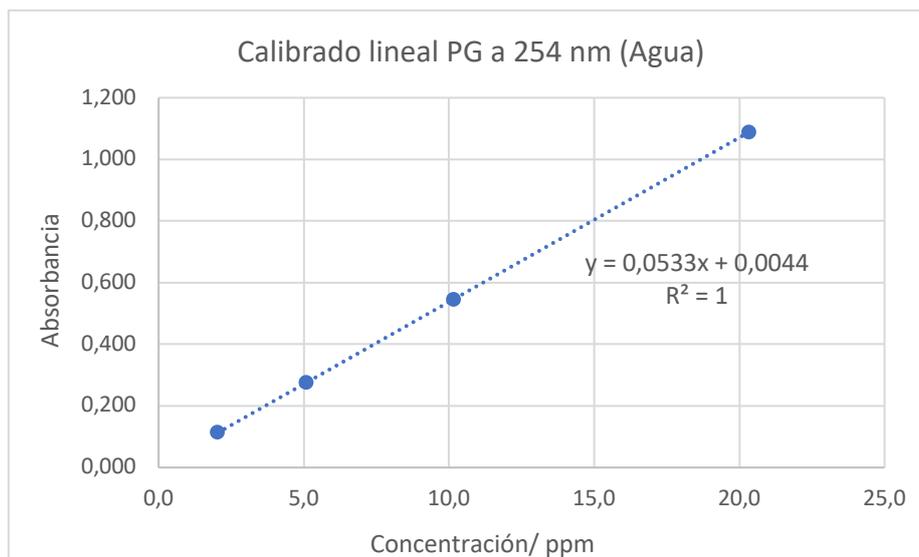


Figura 7.17. Calibrado lineal de proguanil en agua desionizada a 254 nm.

El error típico de ajuste (s_e) de este calibrado lineal a 254 nm es 0,0016 y los parámetros de la regresión, necesarios para estimar los LD y LQ a esta longitud de onda, quedan recogidos en la **Tabla 7.14**.

Tabla 7.14. Parámetros de la regresión lineal a 254 nm (Agua).

Parámetros	Coefficientes	Error típico	Intervalo de confianza	
			Inferior 95%	Superior 95%
Ordenada, b_0	0,0044	0,0013	-0,0014	0,0102
Pendiente, b_1	0,0533	0,0001	0,0528	0,0538

Tabla 7.15. Residuos de la regresión lineal a 254 nm (Agua).

Conc/ ppm	Residuos
2,0	0,0008
5,1	0,0003
10,2	-0,0019
20,3	0,0008

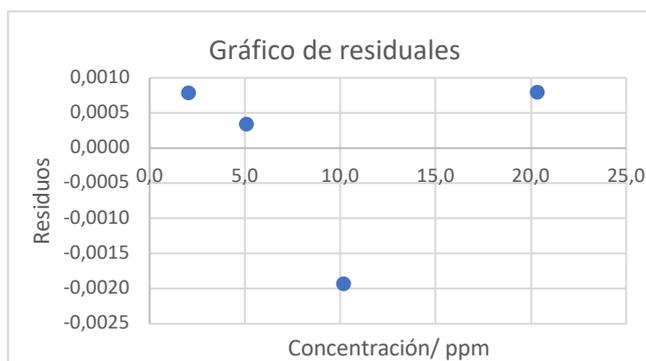


Figura 7.18. Gráfico de los residuales (Agua, 254 nm).

A partir de las pendientes de las rectas de calibrado a 232 y 254 nm, se sacan las absorptividades específicas y, mediante la correspondiente conversión, las absorptividades molares de proguanil a ambas λ estudiadas mostradas en la **Tabla 7.16**.

Tabla 7.16. Absorptividad específica y molar de proguanil en agua desionizada a 232 y 254 nm.

Agua desionizada	$a/ L\ mg^{-1}\ cm^{-1}$	$\epsilon/ L\ mol^{-1}\ cm^{-1}$
232 nm	0,0512	14858
254 nm	0,0533	15467

De la misma manera que en medio metanol, se estiman los límites de detección y de cuantificación a partir del calibrado lineal. Los resultados obtenidos a las dos longitudes de onda se resumen en la **Tabla 7.17**.

Tabla 7.17. Límites de detección y cuantificación de PG en agua a 232 y 254 nm.

Agua	LD/ ppm	LQ/ ppm
232 nm	0,14	0,44
254 nm	0,10	0,30

7.1.4. Estudio de la influencia del tiempo, la luz y la temperatura

Con la finalidad de conocer la estabilidad del principio activo, se realiza un estudio en función del tiempo, la luz y la temperatura de almacenaje en distintos disolventes. Para ello, se preparan patrones de PG en mezcla de ACN-H₂O (60:40) entre 1,0 – 50,0 ppm. Éstos, junto con los patrones de PG en MeOH preparados anteriormente en el mismo intervalo de concentraciones, se guardan a temperatura ambiente en tubos Falcon en presencia y en

ausencia de luz. Y se miden por espectrofotometría de absorción molecular UV-Vis a diferentes intervalos de tiempo: 1; 4; 8 y 50 días.

A continuación, se muestran en las **Figuras 7.19 y 7.20** los resultados correspondientes a la variación de la absorbancia frente al tiempo para cada concentración en función de la presencia o ausencia de luz en diferentes disolventes.

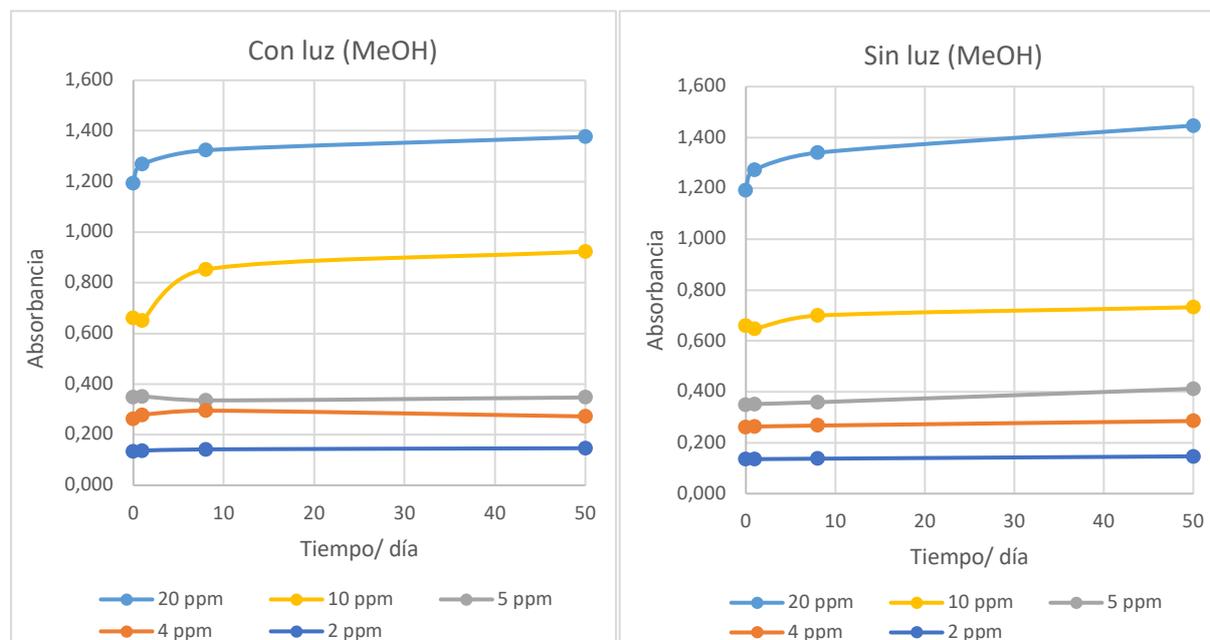


Figura 7.19. Representaciones gráficas de absorbancia frente al tiempo a concentración constante en presencia y en ausencia de luz (MeOH, 254 nm).

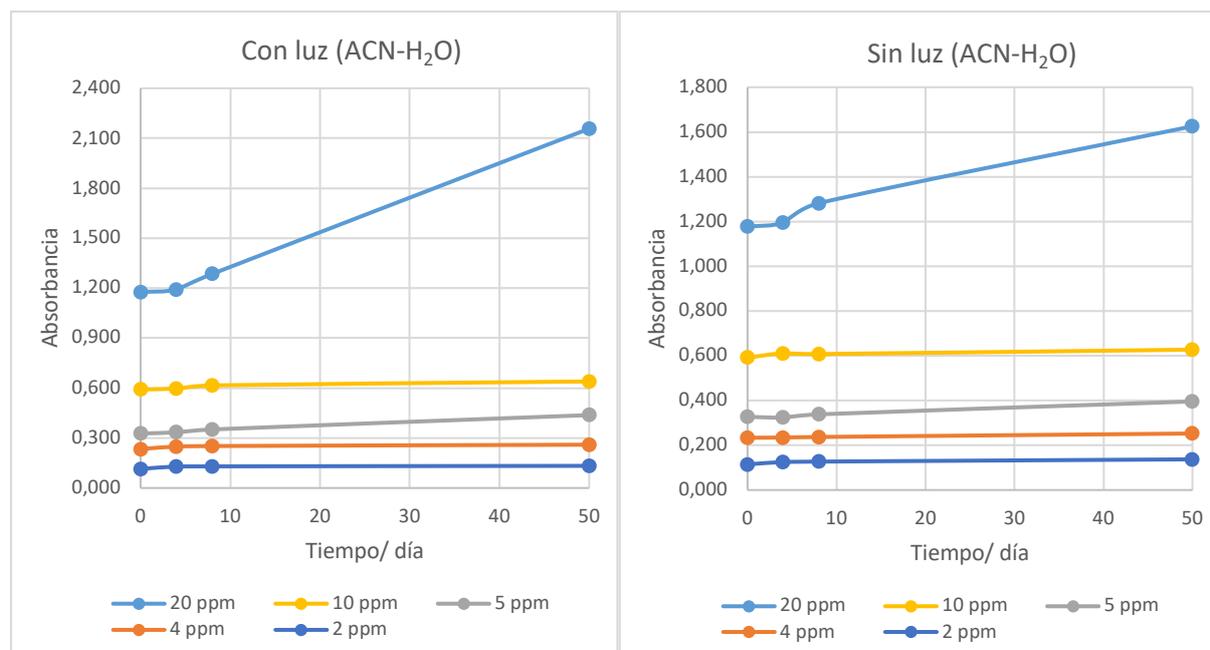


Figura 7.20. Representaciones gráficas de absorbancia frente al tiempo a concentración constante en presencia y en ausencia de luz (ACN-H₂O 60:40, 254 nm).

Analizando los gráficos anteriores, se puede observar que para concentraciones inferiores a 10 ppm no se produce una influencia notable en la modificación de la absorbancia del compuesto, aunque se aprecia, ligeramente, una mayor estabilidad en ausencia de luz. Dado que se observa un aumento de pendiente para los patrones de mayor concentración, se estudia estadísticamente si ese aumento es significativo a un nivel de confianza del 95%. Como las concentraciones varían en un amplio rango, se realiza una prueba de comparación de pares de valores a través de una regresión. Los valores del eje x son las absorbancias del día 0, que se toman como referencia, y los valores del eje y, los que se desean comparar. Se puede aplicar una prueba t de dos colas o calculando los intervalos de confianza de la ordenada y la pendiente.

Las hipótesis nula y alternativa son:

H0: $b_0 = 0$ y $b_1 = 1$. Los valores de absorbancia no difieren significativamente.

H1: $b_0 \neq 0$ y/o $b_1 \neq 1$; Los valores de absorbancia sí difieren significativamente.

En las **Tablas 7.18 – 7.19** se resumen los valores de *p a posteriori* obtenidos de la prueba estadística t. Se comprueba que todos los *p a posteriori* son mayores que α ($= 0,05$), con lo cual se aceptan la hipótesis nula de que las absorbancias no difieren significativamente. Con esto se comprueba estadísticamente que las disoluciones de proguanil son estables, dado que no hay alteraciones significativas de absorbancia ni por la influencia de la luz ni por el tiempo (hasta 50 días).

Tabla 7.18. Los valores de *p a posteriori* de la prueba estadística t (MeOH, 254 nm).

Metanol		254 nm						
		0 día	1 día		8 días		50 días	
Con luz	Ordenada	Referencia	H0	0,7474	H0	0,3811	H0	0,7182
	Pendiente			0,2806		0,4697		0,9068
Sin luz	Ordenada	Referencia	H0	0,7529	H0	0,5336	H0	0,8303
	Pendiente			0,2849		0,0602		0,1401

Tabla 7.19. Los valores de *p a posteriori* de la prueba estadística t (ACN-H₂O 60:40, 254 nm).

ACN-H ₂ O (60:40)		254 nm						
		0 día	4 día		8 días		50 días	
Con luz	Ordenada	Referencia	H0	0,3310	H0	0,8910	H0	0,5713

	Pendiente			0,4263		0,2974		0,5210
Sin luz	Ordenada	Referencia	H0	0,9385	H0	0,6716	H0	0,3485
	Pendiente			0,3528		0,0765		0,7898

Por otro lado, con los patrones de PG en agua entre 1 – 60 ppm, conservados a 4°C, se realiza el mismo estudio.

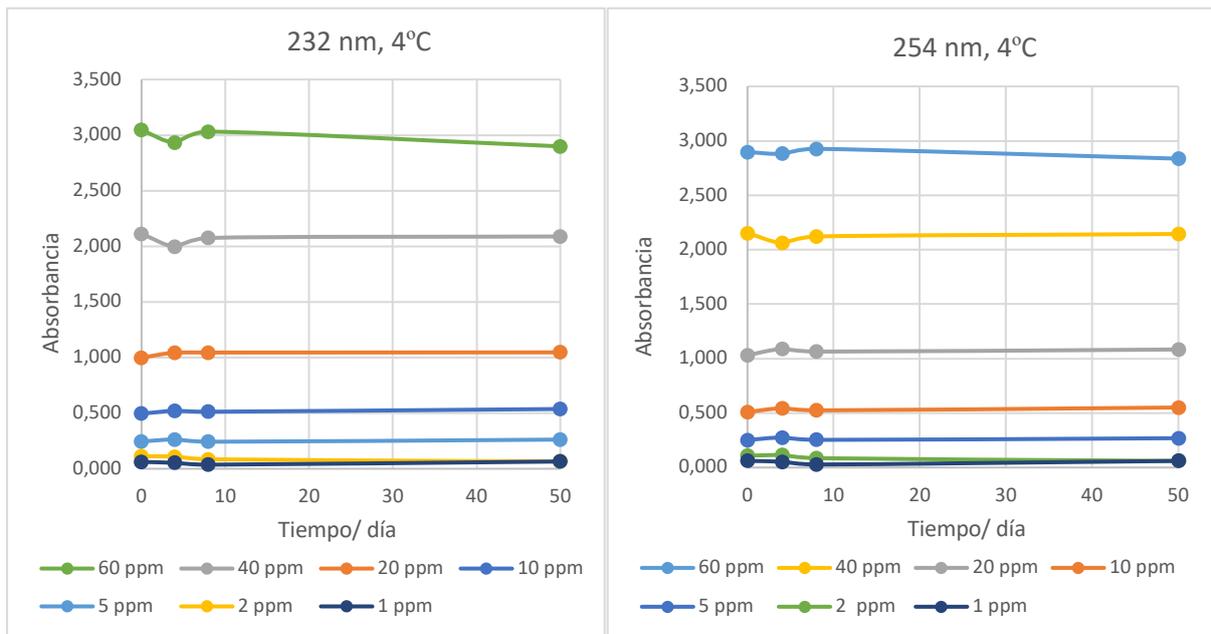


Figura 7.21. Representaciones gráficas de absorbancia frente al tiempo a concentración constante de patrones en agua conservados en el frigorífico (4°C).

Las representaciones de la **Figura 7.21** ilustran claramente que los patrones conservados a temperatura de 4°C, en todo el rango de concentraciones, presentan una mayor estabilidad que los patrones de proguanil conservados a temperatura ambiente. También, de forma estadística, se puede comprobar en la **Tabla 7.20** que las absorbancias no difieren significativamente en el intervalo de tiempo estudiado ($p > \alpha$, se acepta H0).

Tabla 7.20. Los valores de p a posteriori de la prueba estadística t (PG en agua).

Agua		4°C (en frigorífico)						
		0 día	4 días	8 días	50 días			
254 nm	Ordenada	Referencia	H0	0,2917	H0	0,7452	H0	0,8492
	Pendiente			0,1882		0,9431		0,8068
232 nm	Ordenada	Referencia	H0	0,3339	H0	0,8987	H0	0,7302
	Pendiente			0,1232		0,8885		0,9076

7.1.5. Preparación de muestras

Las muestras de Malarone para determinar el hidrocloreto de proguanil por absorción molecular UV-Vis y por HPLC se preparan de la siguiente manera:

Se toma un comprimido de Malarone y se pesa ($m_{\text{comprimido}} = 475,07 \text{ mg}$). A continuación, el comprimido se tritura en un mortero de vidrio, obteniéndose un producto pulverulento de color amarillo intenso debido a la coloración de la atovacuona presente también en el comprimido (ver **Figura 7.22**). La muestra triturada se conserva en un frasco de cristal.

El proguanil tiene un carácter hidrofílico que no posee la atovacuona ($<0,001 \text{ mg/ml H}_2\text{O}$), por lo que se puede conseguir disolver selectivamente el proguanil en medio acuoso. Por consiguiente, se preparan dos disoluciones, una en agua desionizada donde es soluble el proguanil y otra en metanol donde son solubles tanto el proguanil como la atovacuona. Para ello, se toman unos 10 mg de muestra triturada y se añaden sobre agua desionizada, se mantiene unos minutos en agitación, se filtra y el líquido filtrado se lleva a un matraz aforado de 100 ml y se enrasa con agua. Después, se toman otros 10 mg de Malarone triturado, se añaden sobre metanol siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente. Para cada caso, se realizaron tres réplicas y las masas tomadas se recogen en la **Tabla 7.21**.



Figura 7.22. Preparación de las muestras de Malarone en agua y en metanol.

Tabla 7.21. Masas tomadas y el volumen final enrasado en la preparación de las muestras de Malarone.

Disolvente	$m_{\text{muestra tomada}}/ \text{mg}$		$V_{\text{muestra}}/ \text{ml}$
Agua desionizada	Réplica 1	10,98	100
	Réplica 2	11,73	100
	Réplica 3	11,18	100

Metanol	Réplica 1	11,08	100
	Réplica 2	10,31	100
	Réplica 3	9,79	100

7.1.6. Determinación directa de proguanil por absorción molecular

Al realizar el espectro de absorción molecular de la muestra correspondiente al comprimido de Malarone en agua (**Figura 7.23**), se observa que se corresponde con el espectro de patrón de PG en agua, indicando la disolución selectiva de proguanil en medio acuoso.

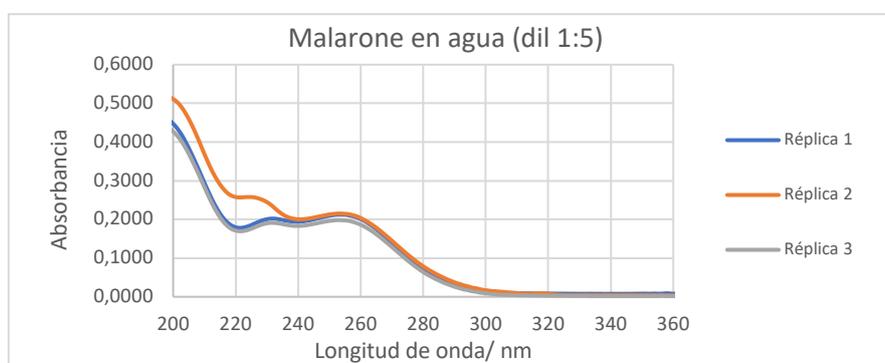


Figura 7.23. Espectro de absorción molecular UV-Vis de muestras Malarone en agua.

A continuación, se procede a las medidas de absorbancia de las muestras (dilución 1:5) y, mediante interpolación en las correspondientes líneas de calibrado de PG en medio acuoso del **Apartado 7.1.3**, se determinan los miligramos de hidrocóloruro de proguanil presentes en el comprimido de Malarone. Los resultados obtenidos a ambas longitudes de onda (232 y 254 nm) se recogen en las **Tablas 7.22 y 7.23**.

Tabla 7.22. Determinación de proguanil en muestras de Malarone preparadas en agua desionizada por interpolación directa en la recta de calibrado de 232 nm.

232 nm	b_0	0,0038	b_1	0,0512		
Dilución 1:5						
	A	C_{dil} / ppm	mg PG/ comprimido	Media/ mg	Desviación estándar/ mg	% RSD
Réplica 1	0,2021	3,9	83,8	84,1	6,4	7,7
Réplica 2	0,2329	4,5	90,6			
Réplica 3	0,1912	3,7	77,8			

Tabla 7.23. Determinación de proguanil en muestras de Malarone preparadas en agua desionizada por interpolación directa en la recta de calibrado de 254 nm.

254 nm	b_0	0,0044	b_1	0,0533		
Dilución 1:5						
	A	C_{dil}/ ppm	mg PG/ comprimido	Media/ mg	Desviación estándar/ mg	% RSD
Réplica 1	0,2122	4,1	88,1	84,1	3,8	4,5
Réplica 2	0,2149	4,1	83,5			
Réplica 3	0,1979	3,8	80,6			

La cantidad de hidrocóloro de proguanil por comprimido de Malarone determinada a 232 y 254 nm es $(84,1 \pm 6,4)$ mg y $(84,1 \pm 3,8)$ mg, respectivamente. Por lo tanto, la determinación de PG en estos comprimidos se puede realizar a ambas longitudes de onda estudiadas. Los resultados no difieren significativamente, aunque la variabilidad (expresada como desviación estándar) es mayor para 232 nm.

Cabe comentar que los miligramos de PG determinados en el comprimido de Malarone difieren, por defecto, en un 16% respecto a la cantidad indicada por la casa comercial (cada comprimido contiene 100 mg de PG y 250 mg de ATQ). Esta diferencia puede atribuirse a posibles errores de preparación de muestra y medida, así como al almacenaje y fecha de caducidad (ampliamente sobrepasada) de las muestras del medicamento proporcionado. Aunque también pudieran derivarse del efecto matriz, cuyo estudio se refleja en el **Apartado 7.1.7**.

Por otro lado, comparando el espectro UV-Vis de la muestra de Malarone disuelta en metanol con el espectro de atovacuona referido en la bibliografía [33], se observa un perfil (**Figura 7.24, izquierda**) que incluye a este segundo principio activo del medicamento. Las bandas de absorción del proguanil se solapan con las de la atovacuona.

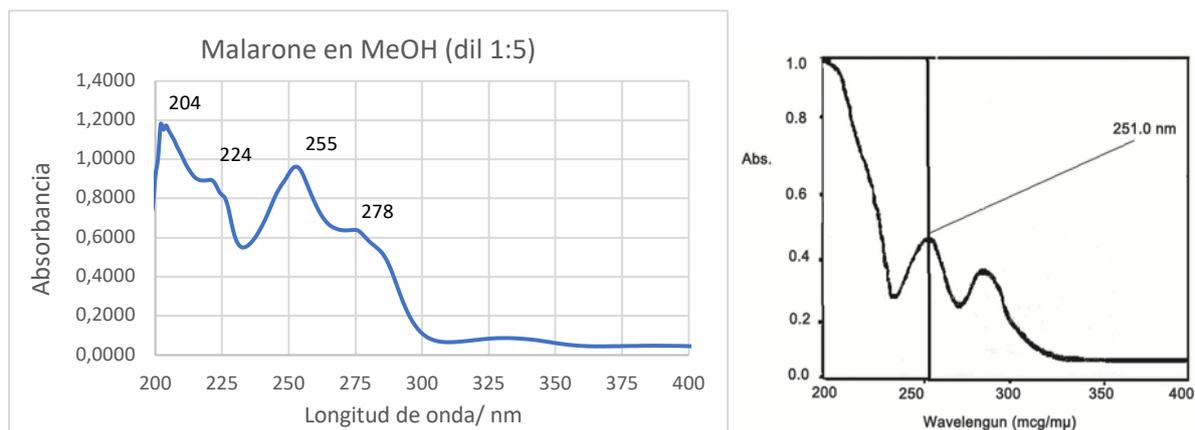


Figura 7.24. Espectro UV-Vis de Malarone en MeOH (izquierda) y de ATQ bibliográfico (derecha) [33].

La cantidad de ATQ se determina de forma indirecta tomando el valor de su absorptividad molar a 278 nm, $\epsilon = 19809 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, encontrado en la bibliografía [34], que se corresponde con una absorptividad específica de $0,054 \text{ L}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

A partir del valor de absorbancia total y la absorbancia de PG correspondiente a la disolución de Malarone en agua, se determina la cantidad de ATQ presente en el comprimido. Los resultados de las tres réplicas se recogen en la **Tabla 7.24**, obteniéndose una cantidad de $(200,2 \pm 8,5)$ mg de atovacuona por comprimido de Malarone. De nuevo, por las razones comentadas anteriormente, esta cantidad difiere en un 20%, por defecto, respecto al valor de referencia (250 mg ATQ/comprimido).

$$A_{total}(278 \text{ nm}) = A_{PG}(278 \text{ nm}) + A_{ATQ}(278 \text{ nm}) = A_{PG}(278 \text{ nm}) + a_{ATQ}(278 \text{ nm}) \cdot b \cdot C_{dil(ATQ)}$$

Tabla 7.24. Estimación de cantidad de atovacuona presente en el comprimido de Malarone a 278 nm.

Metanol	Dilución 1:5			mg ATQ/ comprimido	Media/ mg	Desviación estándar/ mg	% RSD
	A_{total}	$A_{PG}(278 \text{ nm})$	$C_{dil ATQ}/$ ppm				
Réplica 1	0,6120	0,0834	9,8	209,9	200,2	8,5	4,2
Réplica 2	0,5443	0,0902	8,4	193,7			
Réplica 3	0,5140	0,0753	8,1	197,1			

7.1.7. Método de adiciones patrón (MAP)

En base a los resultados anteriormente obtenidos y a la variedad de excipientes que contienen los comprimidos de Malarone, se plantea la determinación de proguanil por el método de adiciones patrón para comprobar si existe efecto matriz.

Se toman seis matraces de 20 ml, se añaden a cada matraz 5,0 ml de la misma muestra de disolución de Malarone en agua y, a continuación, se añaden volúmenes crecientes de una disolución patrón (61,0 ppm) de PG en agua. Se enrasan con agua desionizada y se miden sus absorbancias. De la misma forma, se realiza un MAP del blanco (agua desionizada). Después, se construye la representación gráfica de la señal analítica frente al volumen de patrón añadido. En la **Tabla 7.25** se recogen los datos y en la **Figura 7.25** la representación gráfica correspondiente.

Tabla 7.25. Datos del método de adiciones patrón para la muestra de Malarone en agua (Réplica 1) y el blanco.

254 nm				
	MAP muestra en agua		MAP blanco	
V _{patrón} 60 ppm/ ml	V _{muestra} / ml	Absorbancia	V _{blanco} / ml	Absorbancia
0,0	5,0	0,2684	5,0	0,0080
0,5	5,0	0,3573	5,0	0,0787
1,0	5,0	0,4283	5,0	0,1531
2,0	5,0	0,5884	5,0	0,3242
3,0	5,0	0,7589	5,0	0,4749
4,0	5,0	0,8999	5,0	0,6379

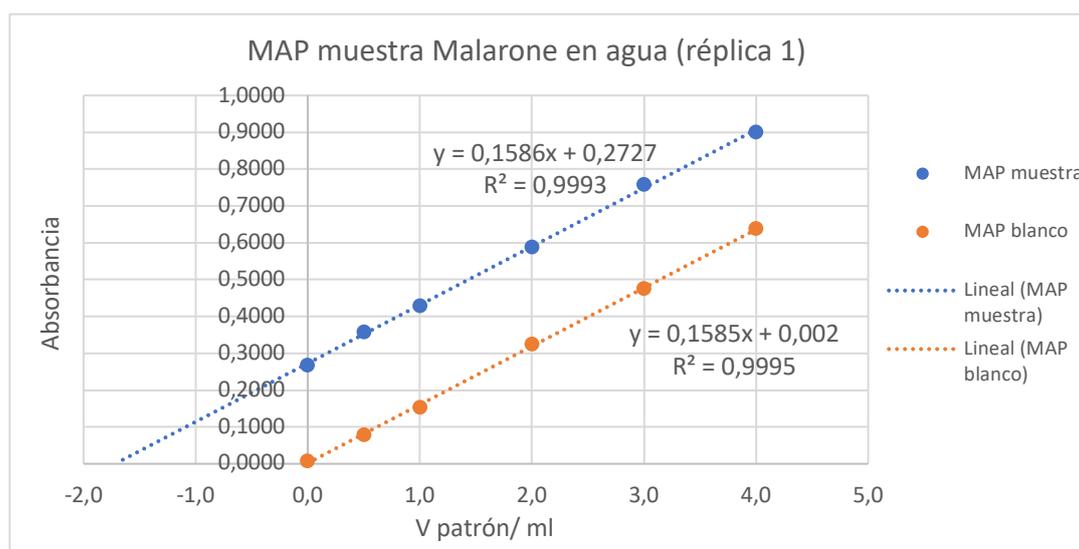


Figura 7.25. Representación de absorbancia frente al volumen de patrón añadido (MAP muestra en agua).

De la representación anterior, se observa que no hay efecto matriz, ya que las pendientes de las dos rectas son prácticamente iguales.

A continuación, se determina también los miligramos de proguanil presentes en el comprimido por este método para comparar con los resultados obtenidos por interpolación directa. Este procedimiento se repite para las réplicas 2 y 3 de muestras de Malarone en agua. Los resultados correspondientes se recogen en la **Tabla 7.26**.

Tabla 7.26. Miligramos de proguanil determinados por el método de adiciones patrón de las muestras de Malarone disueltas en agua desionizada.

	$V_{eq, m}/ ml$	C_m/ ppm	mg PG/ comprimido	Media/ mg	Desviación estándar/ mg	% RSD
Réplica 1	-1,707	20,8	90,0	84,4	5,3	6,3
Réplica 2	-1,694	20,7	83,7			
Réplica 3	-1,535	18,7	79,5			

La cantidad de proguanil determinada en el comprimido de Malarone por este método de adiciones patrón es de $(84,4 \pm 5,3)$ mg. Este resultado no difiere significativamente de la cantidad determinada por interpolación directa, puesto que los valores están incluidos en los respectivos intervalos de confianza.

7.2. Cromatografía líquida de alta resolución con detector UV/Vis (HPLC-UV/Vis)

7.2.1. Preparación de muestras y patrones

- Preparación de muestras de Malarone

Las muestras de Malarone para la determinación de proguanil por HPLC se preparan de la misma manera a partir del mismo comprimido utilizado en el estudio por espectroscopia de absorción molecular UV-Vis.

- Preparación de muestra biológica artificial (orina)

Con el fin de estudiar las posibilidades de determinación de proguanil y mefloquina en orina, se ha procedido a preparar una muestra de orina sintética en la que se ha incluido los componentes mayoritarios de la misma. La orina contiene 95% de agua, 2% de sales minerales (Na^+ , K^+ , etc.), 2% de urea y 0,05% de ácido úrico, por lo que se prepara una disolución de aproximadamente esa composición. Para ello, en 100 ml de agua desionizada se añaden 2 g

de urea; 0,05 g de ácido úrico; 0,5 g de KCl y 0,5 g de NaCl. Se preparan también disoluciones de cada uno de los componentes por separado de la misma concentración.

- Preparación de patrones

Los patrones madre de proguanil, del orden 500 ppm, en distintos medios y de mefloquina de 1000 ppm en agua fueron preparados de forma análoga a los utilizados en las anteriores experiencias reflejadas en la memoria. A partir de estos, los patrones de PG en agua, entre 1 – 60 ppm, se preparan en matraces de 20 ml mediante las correspondientes diluciones. Por otro lado, se preparan patrones de proguanil entre 0,5 – 30 ppm y patrones de mefloquina entre 1 – 60 ppm en el medio biológico artificial anterior. Se preparan también patrones conjuntos de proguanil y mefloquina en dicho medio tomando los volúmenes correspondientes del patrón madre en cada caso.

7.2.2. Búsqueda de condiciones cromatográficas óptimas con columna apolar C₁₈

La columna empleada es una columna de fase estacionaria apolar C₁₈ con tamaño de partícula 5 µm y de dimensión 150 x 4,6 mm. El espectro de absorción molecular UV-Vis del proguanil presenta una longitud de onda de máxima absorción a 254 nm, por lo tanto, el detector UV-Vis se fija a esta λ en las medidas de HPLC. La temperatura del sistema se mantiene constante a 25°C.

Este estudio de condiciones cromatográficas óptimas se centra en la búsqueda de composiciones y flujos de fases móviles idóneas para la determinación de proguanil en muestras de Malarone, determinación de proguanil en el medio biológico “orina” y también para el análisis simultáneo de proguanil y mefloquina en dicho medio biológico. Para la fase móvil, se estudian diferentes mezclas de metanol, acetonitrilo y agua a distintos pH.

- Estudio de FM con patrones de proguanil en agua

En la **Tabla 7.27** se resume algunas de las composiciones de fase móvil y velocidades de flujo ensayadas con patrones de PG preparados en agua desionizada. Los cromatogramas correspondientes a este estudio quedan recogidos en el **Apartado B de Anexos (Figuras B.1 – B.19)**.

Se probó inicialmente con fases móviles de composición variables en {ACN, MeOH y H₂O} a pH neutro. En todos los casos se obtuvieron picos para el proguanil poco definidos, por lo que se procedió a modificar el pH con una disolución acuosa de pH 2,6 preparada por una mezcla de H₃PO₄/H₂PO₄⁻.

Las fases móviles que presentan mejores resultados son: FM **9** de composición {50% ACN, 20% H₂O, 30% disolución pH 2,6} y FM **10** {50% ACN, 10% H₂O, 40% disolución pH 2,6}, donde se obtiene un pico bien definido para el proguanil. Los tiempos de retención a flujos 0,8 y 1,0 ml/min son en ambos casos de 2,1 y 1,7 min, respectivamente. Al sustituir el 10% de H₂O de la FM **10** por 10% de ACN, se observa que el tiempo disminuye de 2,1 a 1,9 min (**Figura B.17 de Anexos**), debido a la modificación de la polaridad de dicha fase.

Tabla 7.27. Fases móviles estudiadas con la columna apolar C₁₈.

Fase móvil	Composición				Flujo (ml/min)
	% ACN	% MeOH	% H ₂ O	% Disolución pH 2,6	
1	30	10	60	-	1,0
2	50	40	10	-	0,8
					1,0
3	60	20	20	-	0,8
4	80	10	10	-	0,8
					1,0
5	80	-	20	-	0,8
6	60	10	20	10	1,0
					0,8
					0,6
7	70	10	10	10	0,6
8	50	-	30	20	0,8
9	50	-	20	30	0,8
					1,0
10	50	-	10	40	0,8
					1,0
11	40	10	10	40	1,0
12	60	-	10	30	1,0

13	60	-	-	40	0,8
14	70	-	-	30	0,8
15	80	-	-	20	0,8

En la **Tabla 7.28**, se estudia el efecto de la velocidad de flujo sobre el tiempo de retención y la anchura del pico para la fase móvil **6**. Los cromatogramas correspondientes son las **Figuras B.7 – B.9 de Anexos**. Se observa que, al disminuir la velocidad de flujo, además de aumentar el tiempo de retención, se ensancha la base del pico.

Tabla 7.28. Distintas velocidades de flujo para la FM 6 {60% ACN, 10% MeOH, 20% H₂O, 10% disolución pH 2,6}.

Flujo (ml/min)	t _R PG/ min
1,0	1,5
0,8	1,9
0,6	2,5
0,4	3,7

También, se estudia la influencia de la naturaleza del ácido sobre el tiempo de retención y la forma del pico. Se probó a usar una disolución acuosa de pH 2,6 preparada con ácido acético en lugar de la mezcla H₃PO₄/H₂PO₄⁻. Los cromatogramas que se obtuvieron eran idénticos y quedan recogidos en el **Apartado B de Anexos (Figuras B.14 y B.15)** y los tiempos de retención están indicados en la **Tabla 7.29**.

Tabla 7.29. Estudio de la naturaleza de la disolución acuosa ácida para la FM 10 {50% ACN, 10% H₂O, 40% disolución acuosa pH 2,6}.

Naturaleza disolución acuosa ácida	Flujo (ml/min)	t _R PG/ min
Ácido fosfórico/dihidrogenofosfato	1,0	1,7
Ácido acético	1,0	1,7

Con estos resultados, se puede afirmar que es la acidez la que juega un papel importante en la determinación de proguanil por HPLC, no la naturaleza de la disolución acuosa ácida.

- Estudio de FM para patrones de proguanil en “orina”

Una búsqueda similar de condiciones cromatográficas se realiza para los patrones de PG preparados en el medio biológico artificial “orina”. En el **Apartado A de Anexos (Figuras**

A.1 – A.3) se incluyen los espectros de absorción molecular UV-Vis de cada uno de los componentes presentes en la orina y en el **Apartado B** de **Anexos (Figura B.22)** el cromatograma de este medio biológico preparado.

Se probaron las fases móviles **10 – 13** de la **Tabla 7.27** para los patrones de PG en “orina” y se encontró una buena resolución entre los picos del ácido úrico y proguanil para las fases móviles **10** {50% ACN, 10% H₂O, 40% disolución pH 2,6} y **11** {40% ACN, 10% MeOH, 10% H₂O, 40% disolución pH 2,6} (ver **Figuras 7.26 – 7.27**). El resto de los cromatogramas están recogidos en **Anexos (Figuras B.20 – B.21)**.

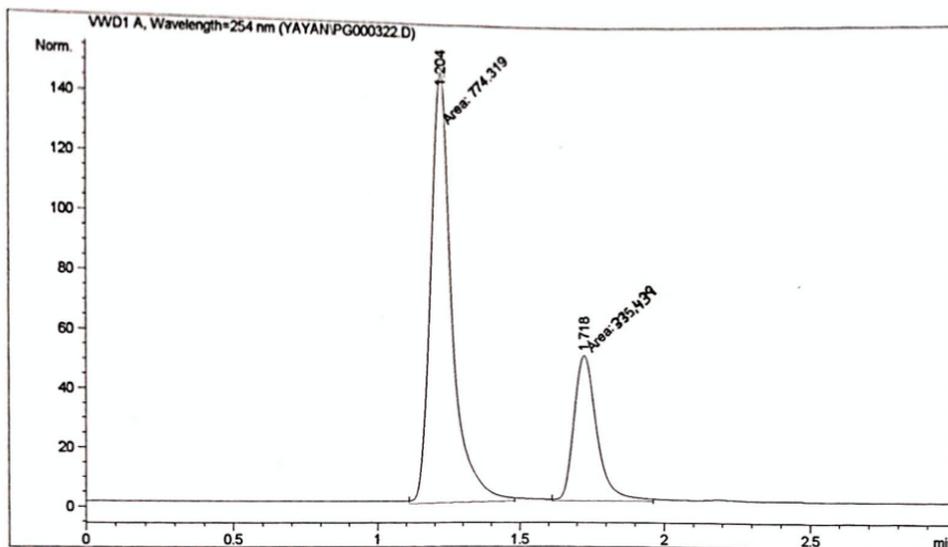


Figura 7.26. Cromatograma del patrón PG en orina de 8 ppm. FM **10** {50% ACN, 10% H₂O, 40% disolución acuosa pH 2,6} y flujo 1,0 ml/min.

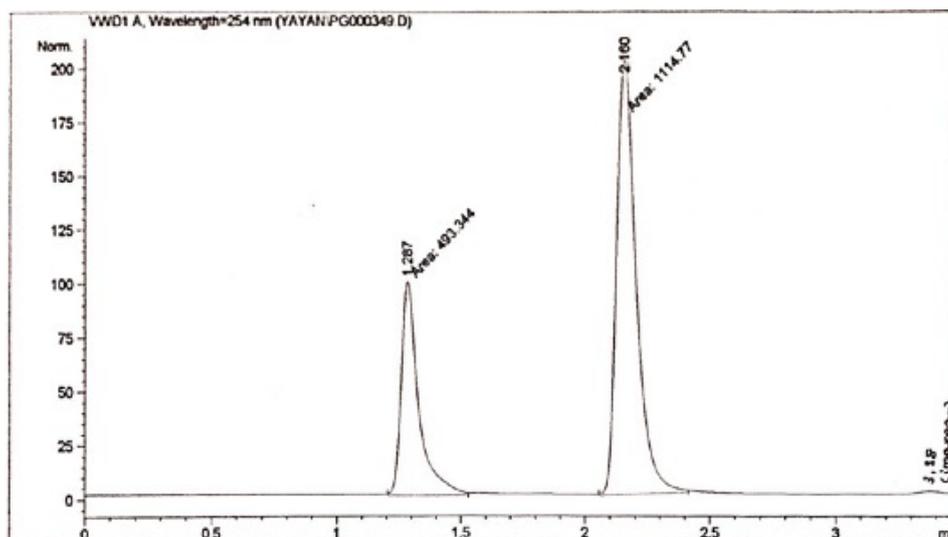


Figura 7.27. Cromatograma patrón PG en orina 30 ppm. FM **11** {40% ACN, 10% MeOH, 10% H₂O, 40% disolución acuosa pH 2,6} y flujo 1,0 ml/min.

- Estudio de FM para patrones conjuntos de PG y MQ en “orina”

Con el objetivo de analizar la posibilidad de determinación de proguanil en “orina” en presencia de otro principio activo antipalúdico como la mefloquina, se realiza también este estudio de fase móvil. Se encontró que la fase móvil más adecuada para la separación simultánea de ácido úrico, proguanil y mefloquina es la FM **11** de composición {40% ACN, 10% MeOH, 10% H₂O, 40% disolución pH 2,6}, ya que con dicha FM el pico de mefloquina se consigue separar del pico que corresponde a una impureza del patrón proguanil. En la **Figura 7.28** se muestra el cromatograma obtenido y en la **Tabla 7.30** se recogen los tiempos de retención de las cuatro componentes en estas condiciones.

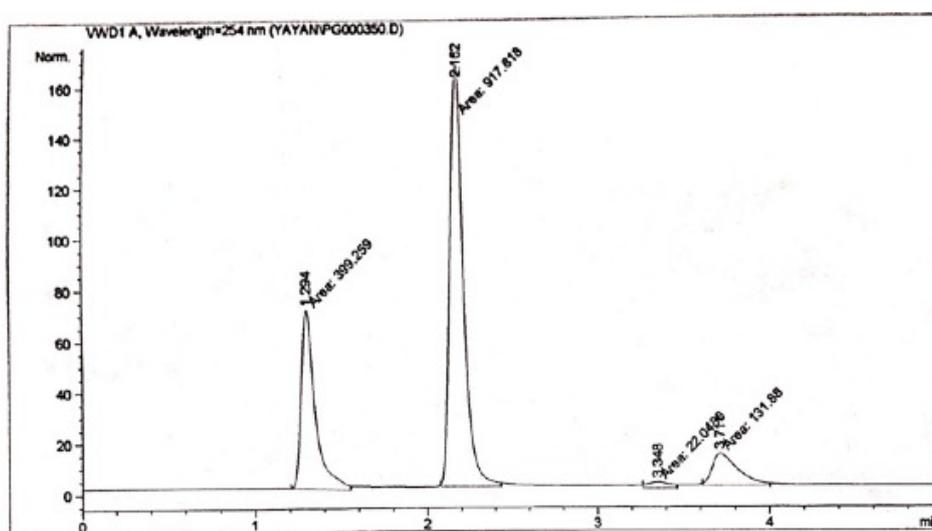


Figura 7.28. Cromatograma del patrón PG 15 ppm + MQ 30 ppm a 254 nm. FM **11** {40% ACN, 10% MeOH, 10% H₂O, 40% disolución acuosa pH 2,6} y flujo 1,0 ml/min.

Tabla 7.30. Tiempos de retención de PG, MQ, ácido úrico e impureza con FM **11** {40% ACN, 10% MeOH, 10% H₂O, 40% disolución acuosa pH 2,6}. Flujo 1,0 ml/min.

Flujo 1,0 ml/min	FM 11 {40% ACN, 10% MeOH, 10% H ₂ O, 40% disolución pH 2,6}
t _R ácido úrico/ min	1,3
t _R proguanil/ min	2,2
t _R impureza/ min	3,4
t _R mefloquina/ min	3,8

El cromatograma anterior (**Figura 7.28**) es obtenido con el detector UV-Vis fijado a 254 nm. La sensibilidad a esta longitud de onda para la MQ es baja, ya que no es su λ_{\max} de absorción. Se puede mejorar la sensibilidad de la MQ realizando las detecciones a 223 nm. En la **Figura 7.29** aparece el cromatograma de una mezcla de PG y MQ obtenido a 223 nm, donde se puede observar que el pico de MQ aumenta notablemente respecto al pico de PG.

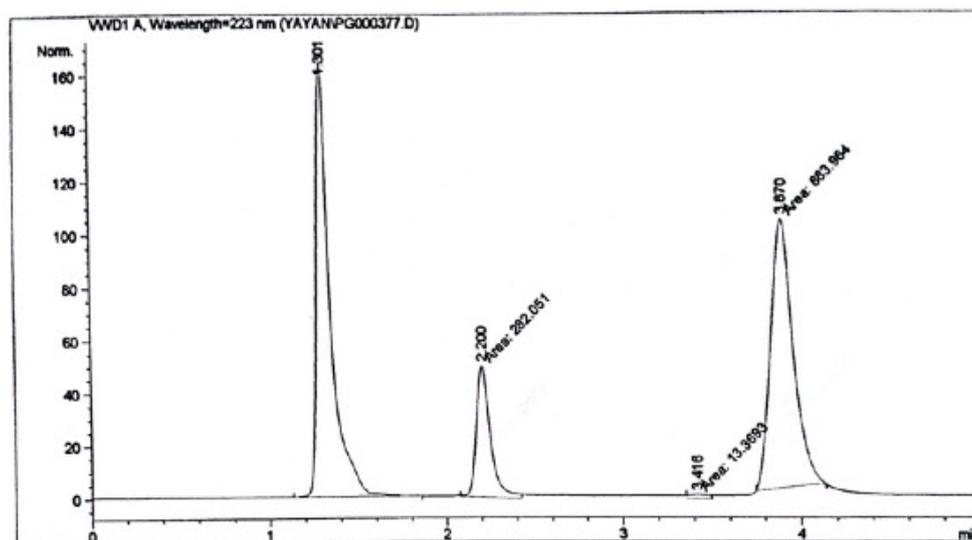


Figura 7.29. Cromatograma del patrón PG 8 ppm + MQ 10 ppm a 223 nm. FM 11 {40% ACN, 10% MeOH, 10% H₂O, 40% disolución acuosa pH 2,6} y flujo 1,0 ml/min.

7.2.3. Calibrado lineal. Determinación de proguanil por HPLC

Con la composición óptima de fase móvil indicada en el **Apartado 7.2.2** para los patrones de proguanil en agua, se construye la línea de calibrado entre 1 – 40 ppm, reflejada en la **Figura 7.31**. Las condiciones cromatográficas son: fase móvil **10** de composición {50% ACN, 10% H₂O y 40% disolución acuosa pH 2,6}, flujo 1,0 ml/min, longitud de onda de detección fijada a 254 nm y temperatura constante a 25°C. Bajo estas condiciones, el proguanil sale a 1,7 min (ver **Figura 7.30**). El cromatograma del blanco (agua desionizada) se corresponde a la **Figura B.23** de **Anexos**.

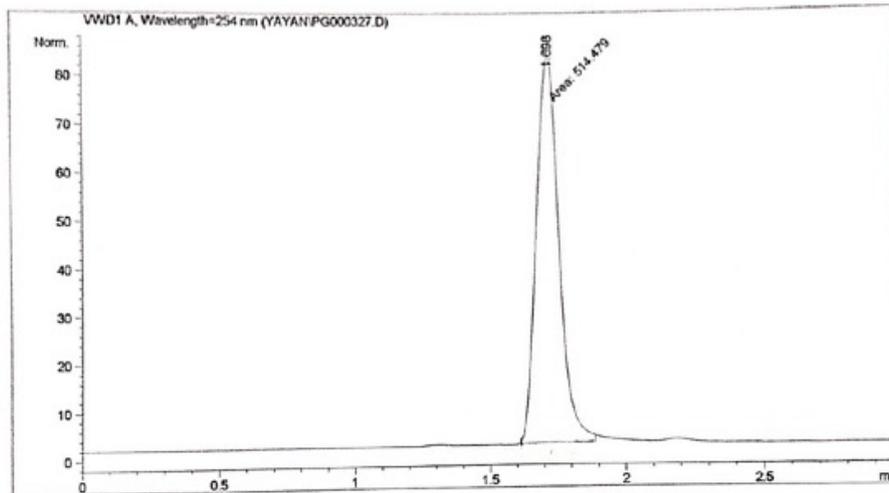


Figura 7.30. Cromatograma patrón PG en agua 10 ppm. Fase móvil **10** {50% ACN, 10% H₂O, 40% disolución acuosa pH 2,6} y flujo 1,0 ml/min. Columna apolar C₁₈.

En la **Tabla 7.31** aparecen las relaciones de concentración y área del pico de los patrones del calibrado.

Tabla 7.31. Resultados de concentración proguanil – área pico.

Concentración/ ppm	Área pico/ u.a.	t _R PG/ min
1,0	33,74	1,7
2,0	90,73	
5,1	250,27	
10,2	514,48	
20,3	966,19	
40,6	1883,90	

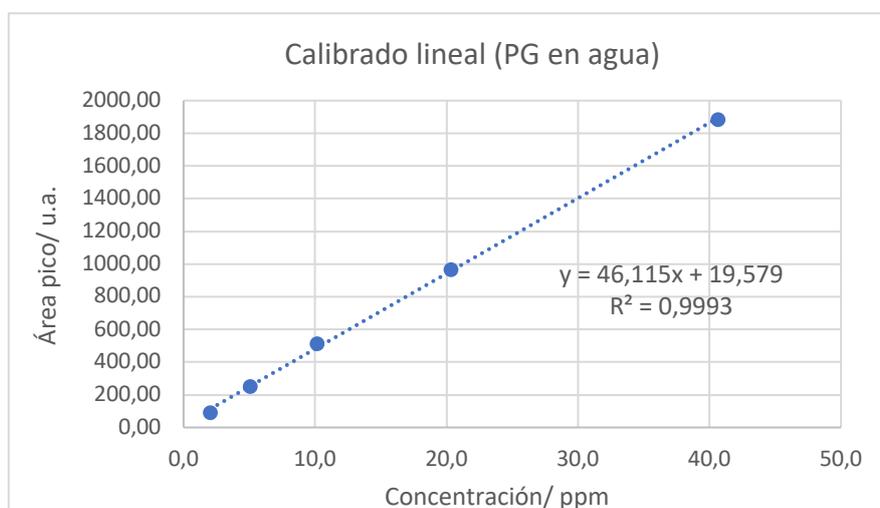


Figura 7.31. Calibrado lineal de proguanil en agua (HPLC).

Las muestras de Malarone diluidas (1:5) preparadas en agua desionizada se inyectan en las mismas condiciones que los patrones, obteniéndose el cromatograma de una de las réplicas de la **Figura 7.32**. El área correspondiente a la muestra se interpola en la recta de calibrado y mediante las adecuadas conversiones se determinan los miligramos de hidrocóloruro de proguanil presentes en un comprimido de Malarone. Los resultados obtenidos se describen en la **Tabla 7.32**.

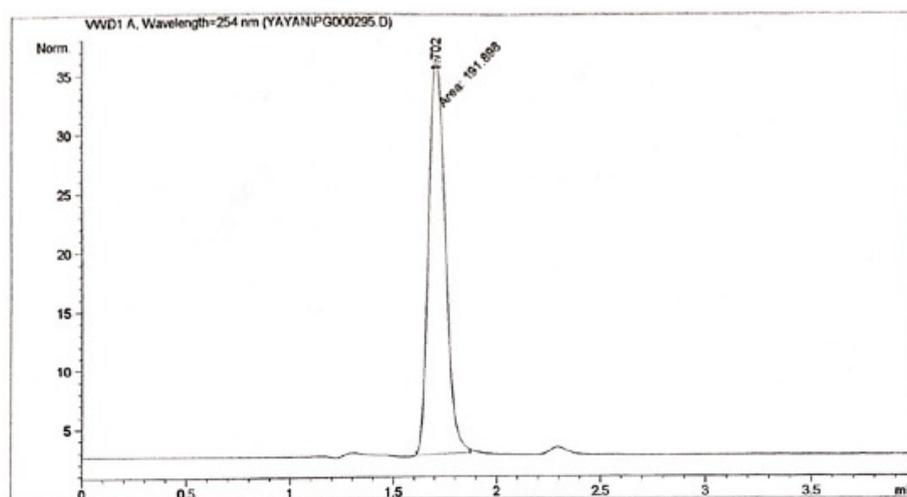


Figura 7.32. Cromatograma de muestra Malarone en agua diluida 1:5 (réplica 2). FM 10 {50% ACN, 10% H₂O, 40% disolución acuosa pH2,6} y flujo 1,0 ml/min.

Tabla 7.32. Determinación de proguanil mediante calibrado directo por HPLC.

Dil 1:5	Área/ u.a.	C _{dil} / ppm	mg PG/ comprimido	Media/ mg	Desviación estándar/ mg	% RSD
Réplica 1	225,57	4,5	96,6	86,6	10,5	12,1
Réplica 2	191,90	3,7	75,8			
Réplica 3	209,59	4,2	87,5			

Mediante este método de HPLC se han determinado (86,6 ± 10,5) mg de hidrocóloruro de proguanil por comprimido de Malarone. Esta cantidad es comparable con la que se ha determinado por espectroscopia de absorción molecular UV-Vis.

Por otro lado, en cromatografía, el límite de detección y cuantificación se definen como 3,29 y 10 veces la relación S/N, respectivamente, obteniéndose en este caso LD = 0,14 ppm y LQ = 0,42 ppm.

7.2.4. Calibrado lineal de proguanil en orina artificial

El ácido úrico absorbe también a 254 nm. Una buena resolución entre los picos del ácido úrico y proguanil se consiguió en las mismas condiciones cromatográficas anteriores, es decir, con la fase móvil **10** de composición {50% ACN, 10% H₂O, 40% disolución acuosa pH 2,6}. Los tiempos de retención para el ácido úrico y proguanil son 1,2 y 1,7 min, respectivamente. El cromatograma del patrón PG en este medio está representado en el **Apartado 7.2.2 (Figura 7.26)**. Se construye un calibrado lineal entre 0,5 – 20,0 ppm que serviría para determinar el proguanil en este medio por interpolación (**Figura 7.33; Tabla 7.33**).

Tabla 7.33. Relación de concentración – área pico de los patrones de PG en orina artificial.

Conc/ ppm	Área pico/ u.a.
0,5	23,61
1,0	57,08
2,0	82,04
4,0	161,73
8,0	335,44
16,0	664,92
20,0	827,35

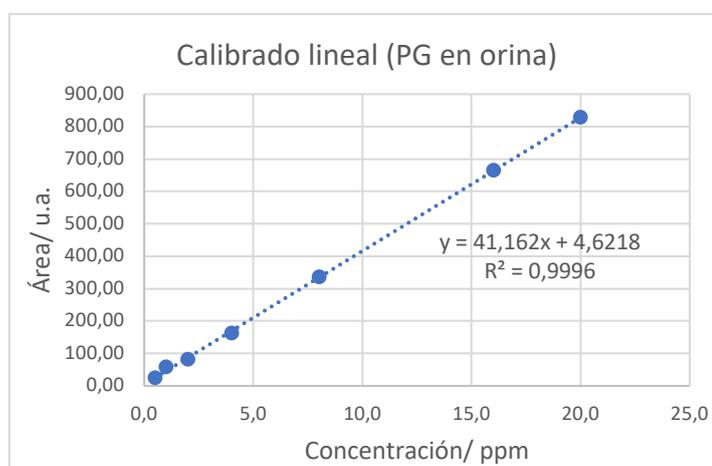


Figura 7.33. Calibrado lineal de proguanil en orina.

Se obtiene una recta de calibración con coeficiente de determinación de 0,9996 y los límites de detección y cuantificación son 0,38 y 1,15 ppm, respectivamente.

7.2.5. Calibrado lineal para la determinación simultánea de PG y MQ en orina artificial

Mediante el estudio de fase móvil anterior, la mejor composición encontrada para la determinación simultánea de proguanil y mefloquina en el medio biológico “orina” es {40% ACN, 10% MeOH, 10% H₂O y 40% disolución acuosa pH 2,6} (FM **11**). El resto de las condiciones cromatográficas se mantiene igual que en las anteriores experiencias. Los tiempos de retención de cada compuesto y los cromatogramas correspondientes estaban reflejados en la **Tabla 7.30 y Figuras 7.28 – 7.29**, respectivamente.

Se ha visto que la sensibilidad de PG y MQ varía en función de la longitud de onda de detección, por ello, se construyen las líneas de calibrado de PG y MQ a 223 y 254 nm (**Figura**

7.34). Los datos del calibrado lineal a las dos longitudes de onda se recogen en las dos tablas siguientes (**Tablas 7.34 y 7.35**):

Tabla 7.34. Datos de concentración – área pico para los patrones conjuntos de PG y MQ a 223 nm.

223 nm			
C_{PG} / ppm	Área pico/ u.a.	C_{MQ} / ppm	Área pico/ u.a.
0,3	13,82	0,5	33,12
0,5	22,27	1,0	64,94
1,0	45,89	2,0	141,04
2,0	72,09	4,0	241,69
4,0	159,98	5,0	444,14
8,0	282,05	10,0	883,96
10,0	439,90	20,0	1635,05
15,0	520,72	30,0	2166,32

Tabla 7.35. Datos de concentración – área pico para los patrones conjuntos de PG y MQ a 254 nm.

254 nm			
C_{PG} / ppm	Área pico/ u.a.	C_{MQ} / ppm	Área pico/ u.a.
0,3	15,8224	0,5	-
0,5	27,3902	1,0	4,92
1,0	52,4914	2,0	10,44
2,0	90,9605	4,0	17,84
4,0	196,662	5,0	28,93
8,0	305,69	10,0	32,04
10,0	366,74	20,0	59,42
15,0	554,44	30,0	96,40

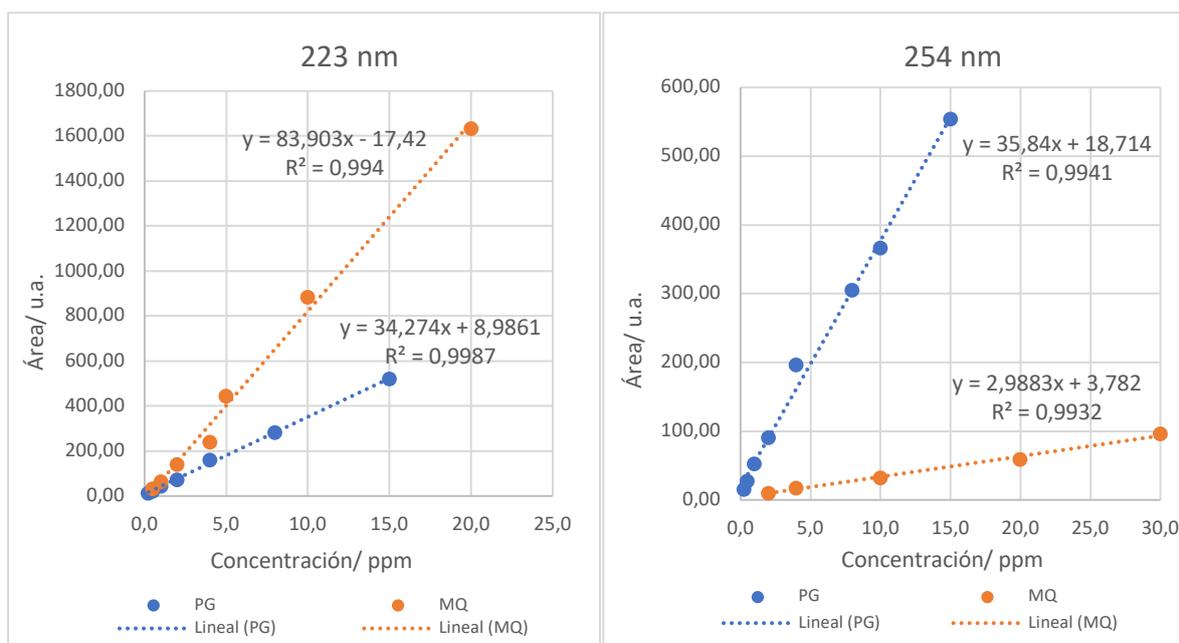


Figura 7.34. Calibrados lineales para PG y MQ en orina artificial a 223 nm y 254 nm.

A la vista de estos gráficos (**Figura 7.34**), se observan claramente que las pendientes del calibrado de proguanil y mefloquina son muy diferentes, siendo más acusada esta diferencia a 254 nm. Por lo tanto, se considera más adecuada para la determinación simultánea de PG y MQ por HPLC realizar las medidas a 223 nm.

Los límites de detección y cuantificación para PG y MQ a ambas longitudes de onda se recogen en la **Tabla 7.36**:

Tabla 7.36. Límites de detección y cuantificación de PG y MQ a 223 y 254 nm.

	PG		MQ	
	LD/ ppm	LQ/ ppm	LD/ ppm	LQ/ ppm
223 nm	0,42	1,29	0,15	0,46
254 nm	0,20	0,61	0,76	2,32

7.2.6. Ensayos de fase móvil con columna polar ciano

Adicionalmente, se han realizado también, con patrones de PG en agua, unos ensayos con una columna polar de ciano de dimensión 250 x 4,6 mm. Las composiciones de fase móvil ensayadas se recogen en la **Tabla 7.37**. El resto de las condiciones se mantiene igual que en la columna apolar. Dado que la columna ciano es más polar y, además, de mayor dimensión que la columna C₁₈, es de esperar que sus tiempos de retención sean mayores. Para esta columna

se ha comprobado que también se requiere de un medio ácido para conseguir eluir el principio activo de la columna. Se puede ver el cromatograma de la **Figura B.24** de **Anexos**, donde no se aprecia ningún pico de área razonable que pueda corresponder al PG para la FM **A** de pH neutro. Con la fase móvil **E** de composición {30% ACN, 60% MeOH, 10% disolución acuosa pH 2,6} se encontró un pico de proguanil definido a 7,6 min (**Figura 7.35**). Sin embargo, esta columna polar no fue factible para la determinación de proguanil en el medio biológico “orina”, debido a que el ácido úrico es muy polar e interacciona muy fuertemente con la columna de ciano (**Figura B.25** de **Anexos**).

Tabla 7.37. Ensayos de fase móvil con la columna polar de ciano.

Fase móvil	Composición				Flujo (ml/min)	t _R PG/min
	% ACN	% MeOH	% H ₂ O	% Disolución pH 2,6		
A	50	50	-	-	1,0	-
B	55	40	-	5	1,0	14,2
C	45	50	-	5	1,0	13,2
D	35	60	-	5	1,0	12,6
E	30	60	-	10	1,0	7,6
F	55	20	20	5	1,0	13,8

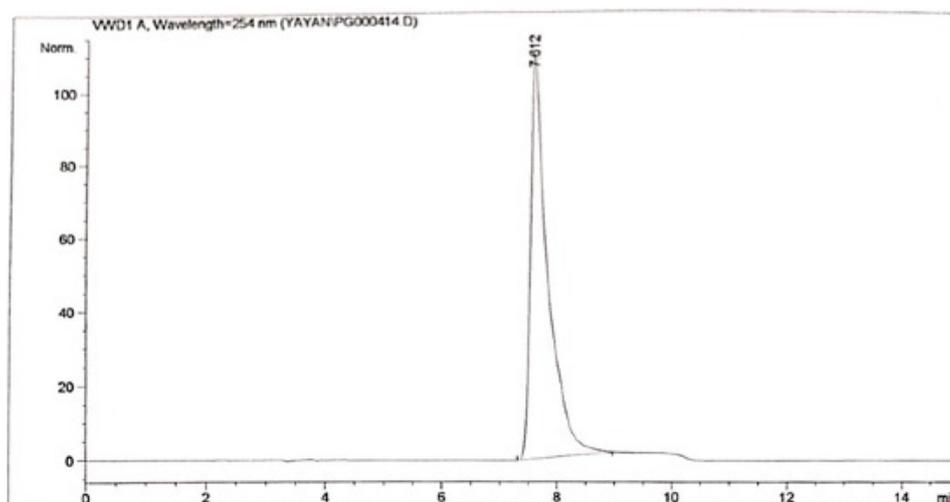


Figura 7.35. Cromatograma patrón PG en agua 40 ppm. Fase móvil **E** {30% ACN, 60% MeOH, 10% disolución acuosa pH 2,6} y flujo 1,0 ml/min. Columna polar ciano.

En esas mismas condiciones, al inyectar la muestra de Malarone (disuelta en metanol) se logró separar dos picos con buena resolución. Los picos a 3,4 y 7,6 min del cromatograma

de la **Figura 7.36** se corresponden a la atovacuna y proguanil, respectivamente. Dado que no se dispone del patrón de ATQ, el pico de este principio activo se identificó al inyectar muestras de Malarone de distinta concentración. Además, al integrar sus áreas, se comprueba que cumplen las proporciones de ATQ y PG presentes en un comprimido de Malarone.

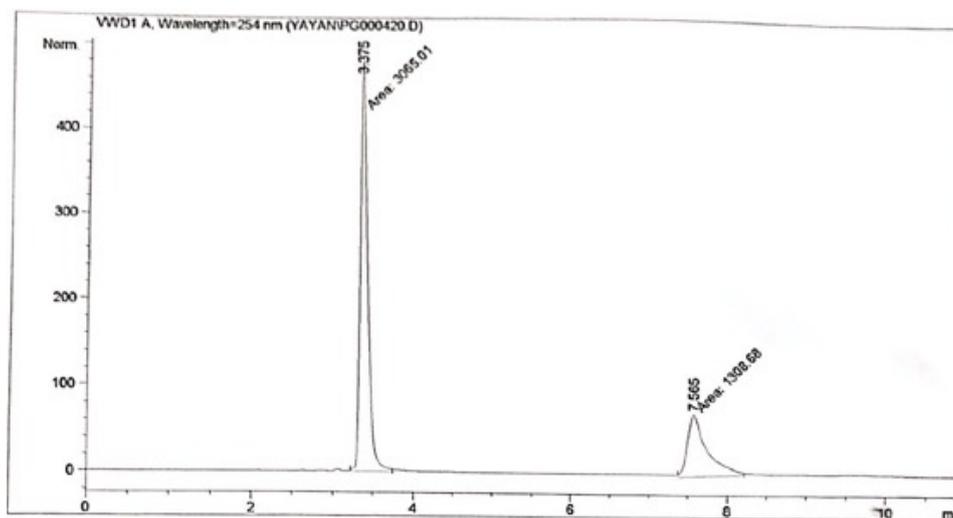


Figura 7.36. Cromatograma muestra Malarone en metanol (réplica 1). Fase móvil E {30% ACN, 60% MeOH, 10% disolución acuosa pH 2,6} y flujo 1,0 ml/min. Columna polar ciano.

El pico de proguanil sale con bastante cola. Se intentó mejorar el aspecto de ese pico cambiando el pH de la disolución acuosa de 2,6 a 3,8 y probando fases móviles con gradiente. Pero las mejoras no fueron apreciables (los cromatogramas correspondientes aparecen en las **Figuras B.26 – B.28 de Anexos**).

Por otro lado, se puede justificar el carácter opuesto de ATQ y PG viendo cómo se modifican los tiempos de retención al aumentar la polaridad de la fase móvil en esta columna ciano. El tiempo de retención de proguanil disminuye, mientras que el de atovacuna aumenta paulatinamente con la polaridad de la FM, indicando por ello el carácter menos hidrofílico de ATQ que PG (ver **Tabla 7.38**).

Tabla 7.38. Influencia de la polaridad de FM sobre los tiempos de retención de ATQ y PG en la columna polar ciano. Aplicado a las muestras de Malarone en metanol.

Composición FM (% ACN, % MeOH, % disolución ácida pH 2,6)	t_R ATQ/ min	t_R PG/ min
(30, 60, 10)	3,4	7,6
(25, 60, 15)	3,5	6,0
(20, 60, 20)	3,7	5,3

7.3. Espectroscopia Raman

7.3.1. Procedimiento experimental

Como se había comentado, una de las ventajas de la espectroscopia Raman es su carácter no destructivo. Además, no requiere preparación adicional de la muestra, puesto que la medida se realiza directamente sobre la muestra en estado sólido.

Se aplica esta técnica al análisis de los patrones de proguanil y mefloquina, así como a los comprimidos comerciales de Malarone y Lariam con principios activos de proguanil y mefloquina, respectivamente, con el fin de observar sus espectros a efectos de su identificación.

El equipo instrumental utilizado para el análisis espectroscópico Raman, en modo macroscópico, es un espectrómetro Raman portátil (BW5415 i-Raman de B&W TEK inc) con láser de excitación de 785 nm. Las medidas se realizaron con un tiempo de integración de 10 segundos.

7.3.2. Resultados obtenidos y discusión

La **Figura 7.37** representa el espectro Raman del patrón hidrocloreto de proguanil donde se puede observar las bandas características de dicho compuesto. Sobre 1600 cm^{-1} aparece una banda intensa y ancha que se asocia con las vibraciones del anillo aromático C=C y de los grupos C=N. Las flexiones de los enlaces C-N se atribuyen a las señales entre $1250 - 1300\text{ cm}^{-1}$. La banda sobre 1100 cm^{-1} es característico de clorobencenos para-sustituídos y las flexiones de los N-H aparecen sobre 750 cm^{-1} . En la **Tabla 7.39** están asignadas las bandas con mayor detalle.

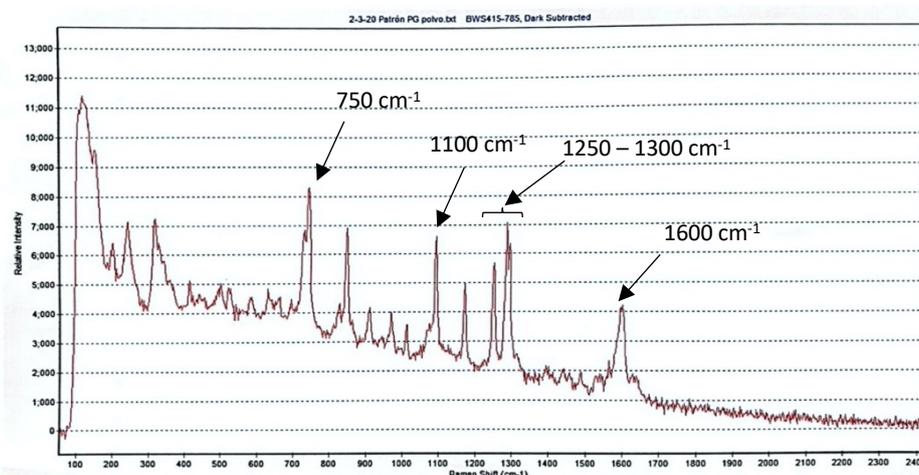


Figura 7.37. Espectro Raman del patrón hidrocloreto de proguanil.

El espectro de Malarone se obtuvo directamente incidiendo el haz láser sobre el comprimido en su envoltorio o fuera de él, triturado. Se puede comprobar que los espectros obtenidos con (**Figura C.1 de Anexos**) y sin envoltorio (**Figura 7.38**) son análogos, sólo se diferencian en sus intensidades de banda causadas por la distinta orientación de los monocristales.

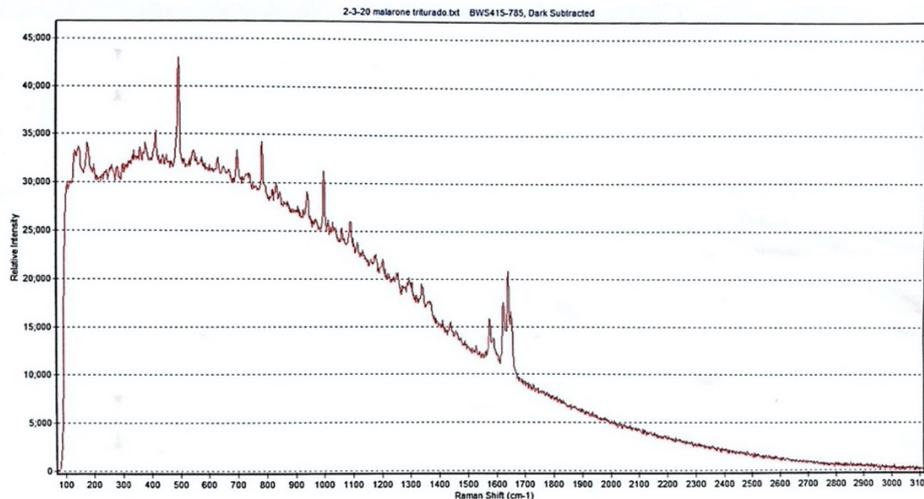


Figura 7.38. Espectro Raman de Malarone sin envoltorio triturado.

Comparando el espectro de patrón proguanil con el espectro de la muestra Malarone (**Figura 7.39**) destacan diferencias en las intensidades de las bandas. Esto se debe en parte a que las muestras son estructuras cristalinas y en función de donde irradia el láser se obtiene patrones de intensidades distintos. Hay que tener en cuenta que los comprimidos de Malarone, además de proguanil, llevan atovacuona y excipientes. Las bandas adicionales más intensas que aparecen en el espectro Raman de Malarone pueden ser atribuidas a la atovacuona y, también, a los excipientes.

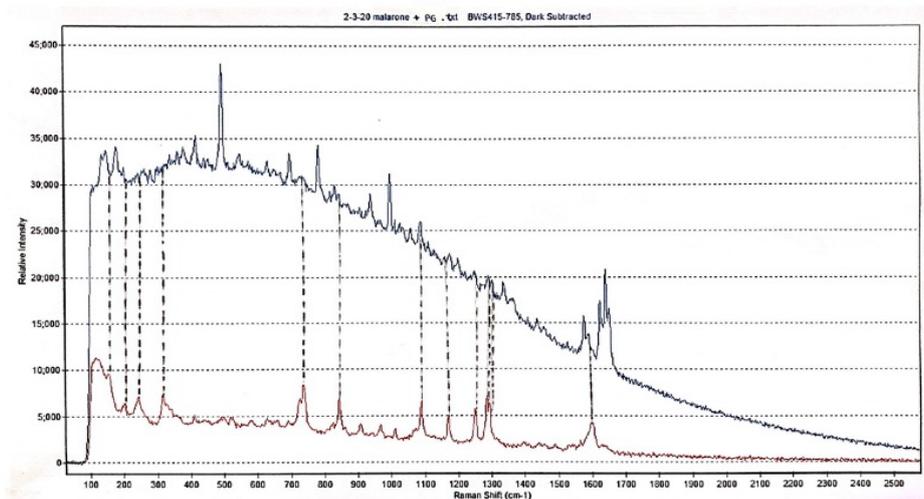


Figura 7.39. Espectros Raman de Malarone triturado (azul) y patrón proguanil (rojo) superpuestos.

Con el fin de lograr una mejor asignación de las bandas correspondientes al proguanil, se repite el análisis para el proguanil y la muestra de Malarone empleando un espectrómetro Raman de mayor resolución. El equipo utilizado es el espectrómetro Raman BWTEK modular, compuesto por un detector BWTEK Exemplar-PRO y una fuente de excitación BWTEK CleanLaze. Se configura el equipo en modo microscópico, con excitación proporcionada por la radiación de un diodo láser de 450 mW de potencia máxima y longitud de onda (λ_0) de 785 nm. La magnificación empleada ha sido de x50, mientras que los tiempos de adquisición utilizados son de 30 segundos y 3 acumulaciones, ajustando la potencia del láser de manera que se asegure la inocuidad de la medida (0,94 A). El haz incidente se dispone perpendicular al plano de la muestra y es focalizado a través del objetivo. Bajo estas condiciones experimentales, se obtiene una resolución espectral máxima entorno a los 4 cm^{-1} . El equipo fue calibrado con el modo de vibración ν (Si-Si) del silicio ($520,7 \text{ cm}^{-1}$). Se tomaron cuatro medidas de diferentes zonas de las muestras para asegurar la repetitividad de las mediciones.

Los siguientes espectros Raman de proguanil (**Figura 7.40**) y Malarone (**Figura 7.41**) han sido estimados mediante substracción de la línea de base polinomial normalizada, utilizando el programa de tratamiento espectral Raman LabSpec 6, ©Horiba.

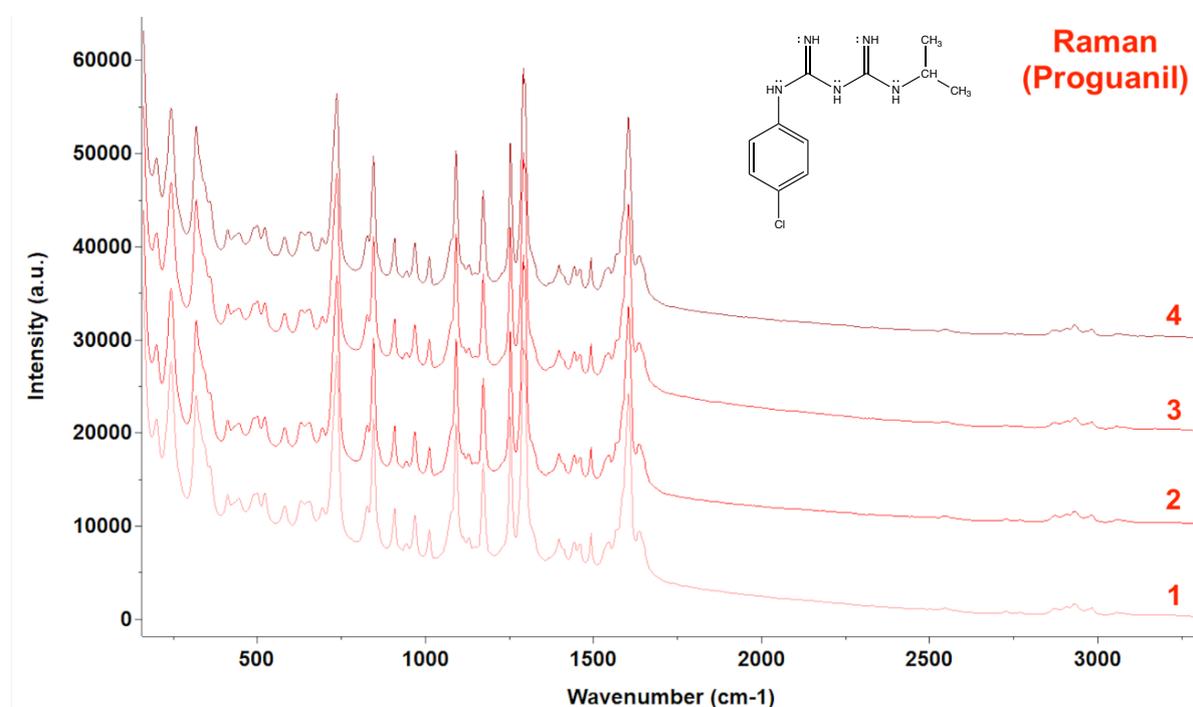


Figura 7.40. Espectros Raman de patrón proguanil obtenidos a modo microscópico.

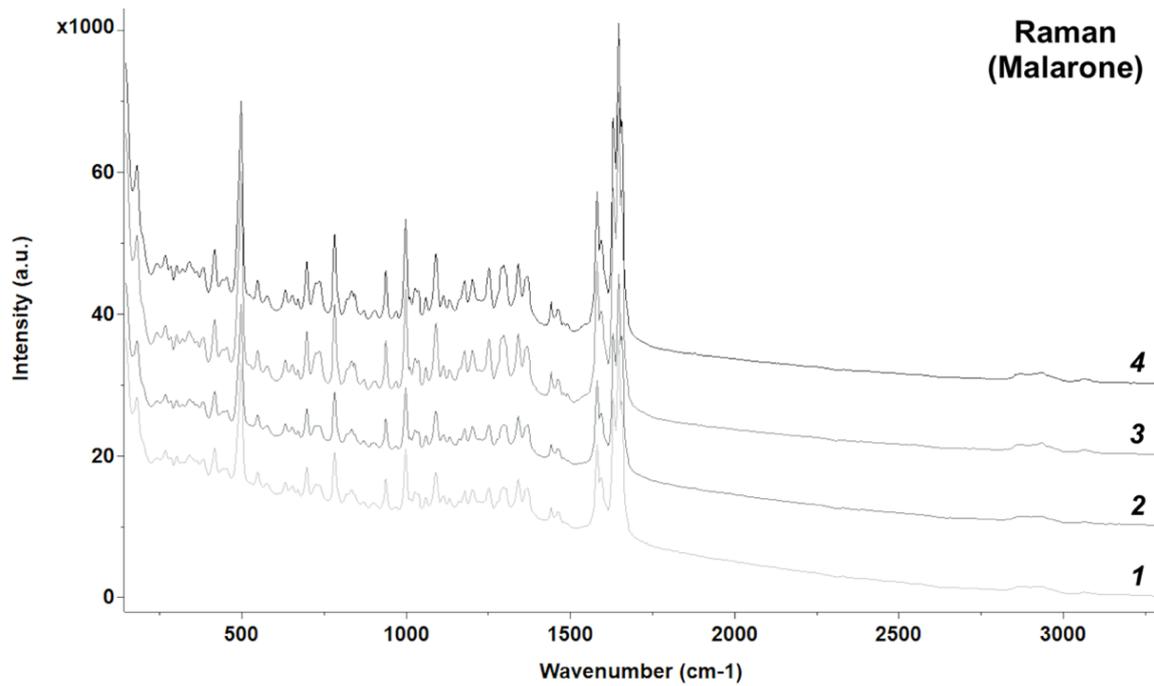


Figura 7.41. Espectros Raman de muestra Malarone obtenidos a modo microscópico.

Con estos resultados, queda comprobado la homogeneidad y repetitividad de las medidas.

A continuación, se muestra el espectro superpuesto (Figura 7.42) de proguanil y Malarone para identificar las bandas correspondientes al proguanil en la muestra y en la **Tabla 7.39** se asignan las bandas más significativas de este principio activo.

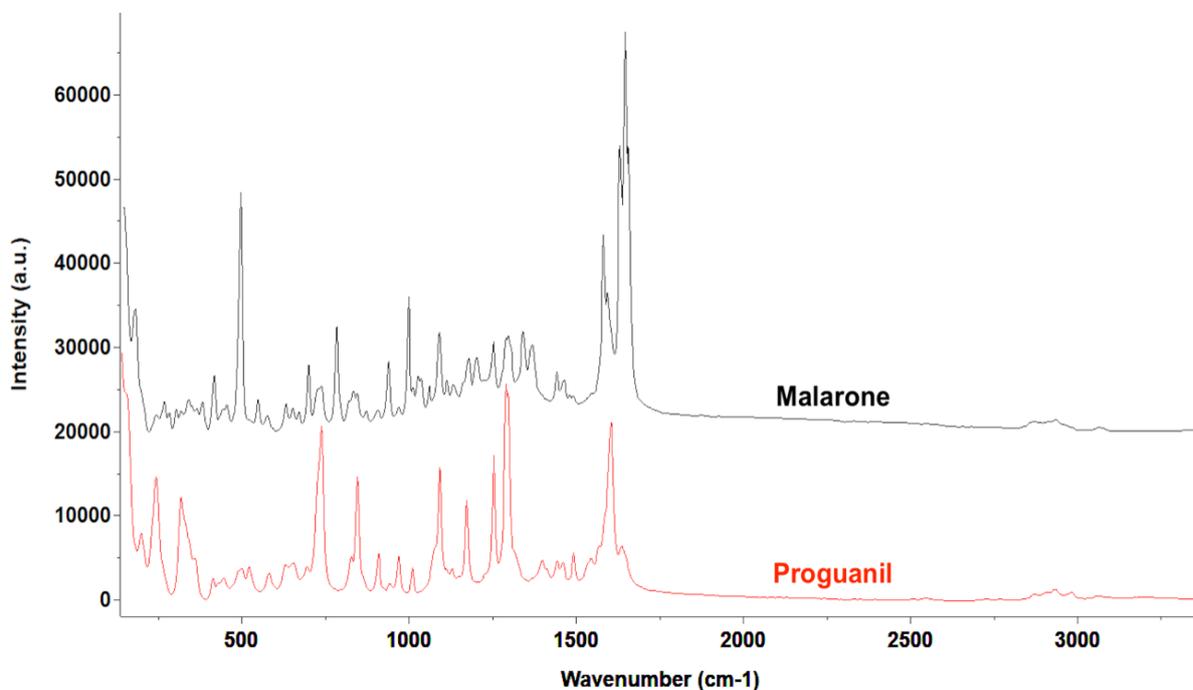


Figura 7.42. Espectros superpuestos de Malarone y proguanil (modo microscópico).

Tabla 7.39. Frecuencias de vibración de proguanil asignadas en Raman.

Malarone	Proguanil	Asignación/Descripción aproximada
$\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$	$\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$	
722 w	722 m	Flexiones C=C
733 w	733 m	Flexión enlaces N-H
846 m	846 m	Flexiones C-H aromáticos
1087 m	1087 s	Tensión C-Cl aromático p-sustituido
1251 w	1251 s	Flexiones C=N-H
1278 m	1278 vs	Tensión C-C, C-N
1646 s	1646 s	Tensión dobles enlaces C=C y C=N

vs, very strong; s, strong; m, medium; w, weak.

En cuanto a la mefloquina, la resolución que proporciona el espectrómetro Raman portátil a modo macroscópico es suficiente para caracterizar los picos más significativos. Como el comprimido de Lariam es de un único componente, los espectros obtenidos de muestra y patrón son análogos (ver Figuras 7.43 – 7.44). Se puede identificar el pico más intenso que aparece sobre 1360 cm^{-1} y el pico sobre 1450 cm^{-1} , que corresponden a las vibraciones de tensión de los enlaces C-F presentes en la estructura. La otra zona característica está comprendida entre $850 - 700\text{ cm}^{-1}$, cuyas señales son atribuibles a las flexiones de los enlaces C-F, N-H, O-H y CH_2 .

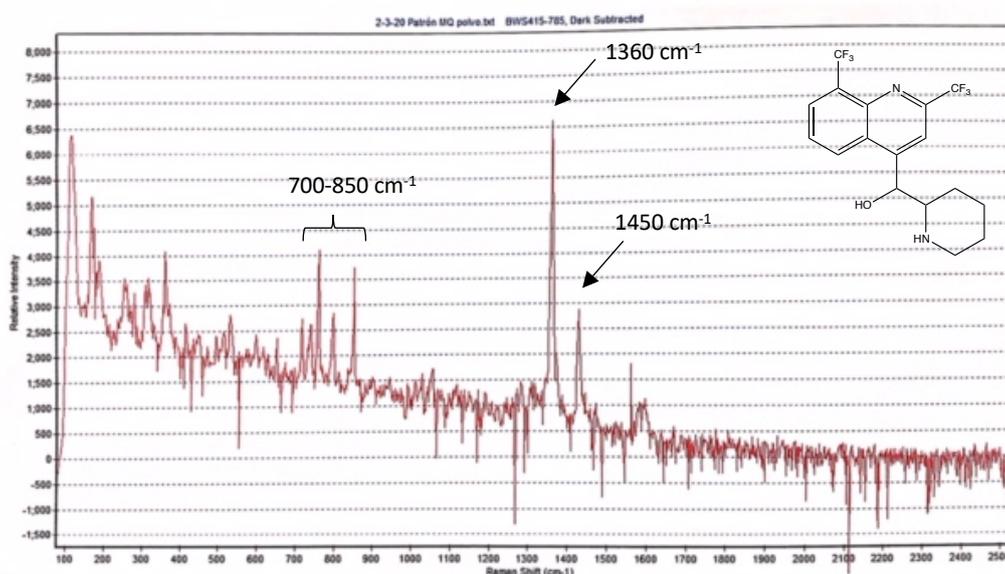


Figura 7.43. Espectro Raman del patrón mefloquina.

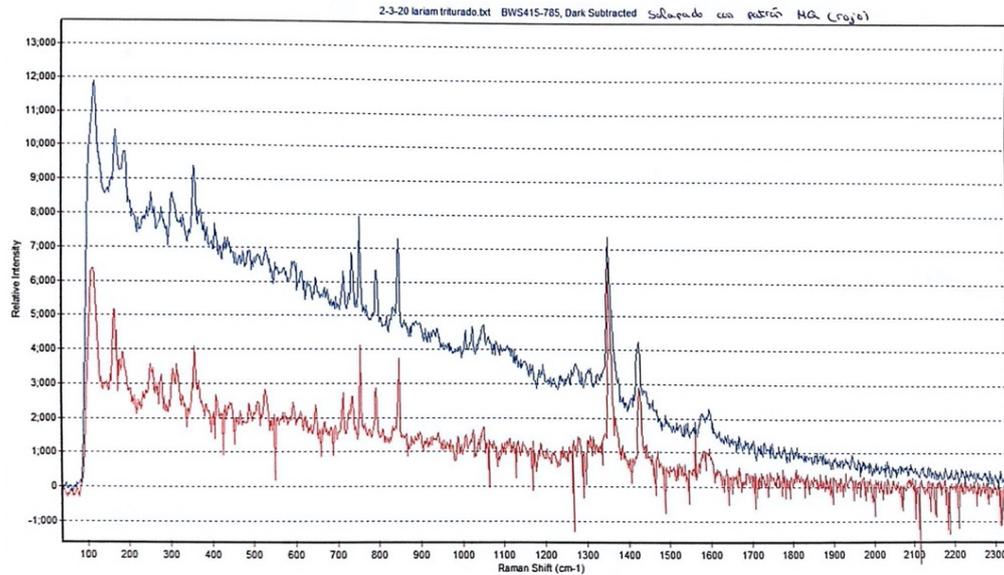


Figura 7.44. Espectro Raman de patrón mefloquina y muestra Larium superpuestos.

Por otro lado, cuando se analizan simultáneamente los espectros de PG y MQ (Figura 7.45), se observa que las señales de la zona entre $850 - 700 \text{ cm}^{-1}$ se superponen, luego esta zona no sirve para identificar estos dos principios activos de forma conjunta. En cambio, la zona comprendida entre $1450 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ sí que serviría para la identificación de las bandas características de ambos compuestos de manera conjunta, puesto que las bandas de cada compuesto se pueden caracterizar sin problema.

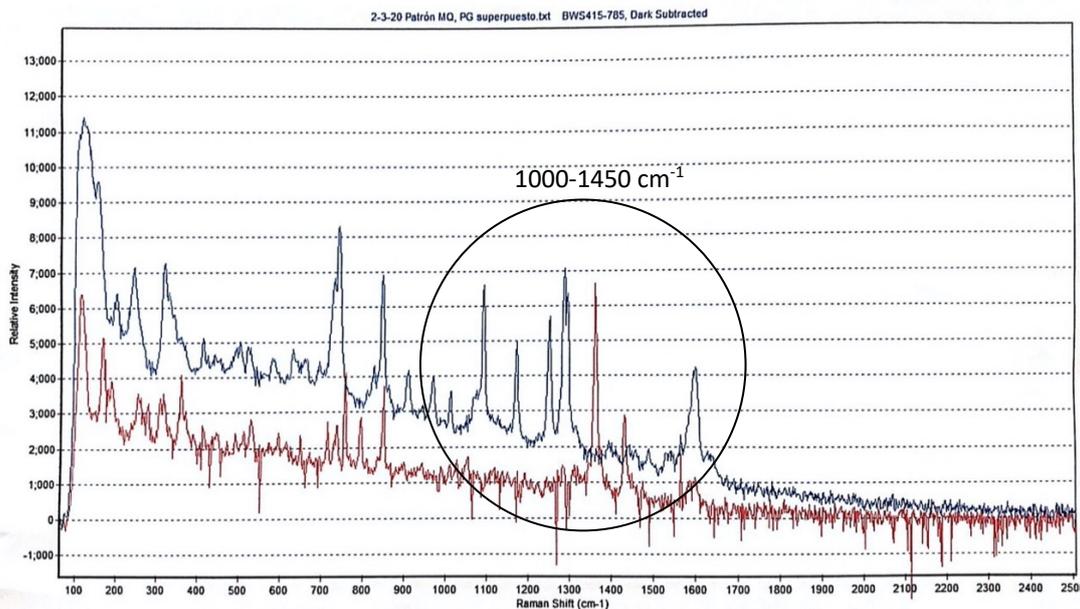


Figura 7.45. Espectros Raman del patrón proguanil (azul) y mefloquina (rojo) superpuestos.

7.4. Espectroscopia IR

7.4.1. Procedimiento experimental

El equipo instrumental empleado es un espectrofotómetro IR de transformada de Fourier (FTIR, modelo Bruker Tensor 27) basado en el método de Reflectancia Total Atenuada (ATR) usando un accesorio MKII Golden-Gate. Cada espectro se obtuvo a temperatura ambiente después de 32 scans, con una resolución de 4 cm^{-1} en el rango de $4000 - 600\text{ cm}^{-1}$. Una de las ventajas de emplear este equipo, es que, al igual que en espectroscopia Raman, no requiere preparación adicional de patrón ni de muestra. Los patrones de PG y MQ y los comprimidos de Malarone y Lariam triturados se depositan en pequeña cantidad directamente sobre el soporte de muestra. Además, es también una técnica no destructiva. Los espectros obtenidos son tratados con el programa Spectragryph.

7.4.2. Resultados obtenidos y discusión

Las frecuencias de vibración que aparecen por debajo de 1500 cm^{-1} son los llamados “huella dactilar” de la molécula. Las vibraciones esqueléticas, que aparecen en el rango de $1500 - 1000\text{ cm}^{-1}$, son una característica individual de cada compuesto.

En la **Figura 7.46** aparecen los espectros IR del patrón PG y la muestra Malarone superpuestos. Comparando con los correspondientes espectros Raman, se observan más señales en la región de $1720 - 1350\text{ cm}^{-1}$. Además, las bandas de la zona comprendida entre $3400 - 3000\text{ cm}^{-1}$ son mucho más intensas en IR. En la **Tabla 7.40** se asignan las bandas características de proguanil identificadas por espectroscopia IR.

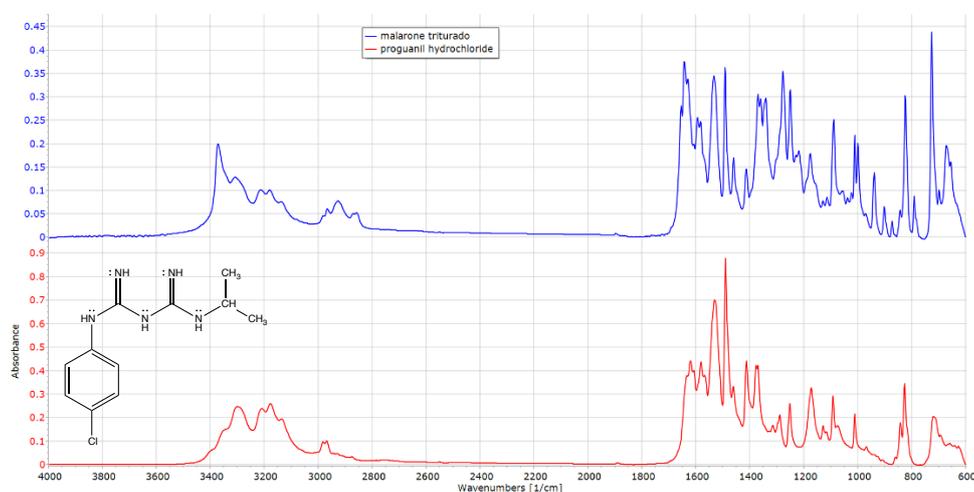


Figura 7.46. Espectros IR de proguanil (rojo) y Malarone (azul) superpuestos.

Tabla 7.40. Frecuencias de vibración de proguanil asignadas en IR.

Proguanil	B3LYP/6-31G*	Asignación/Descripción aproximada
$\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$	$\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$	
721 m	777 w	Flexiones C=C
823 s	900 w	Flexiones C-H aromáticos
1089 m	1111 s	Tensión C-Cl aromático p-sustituido
1249 m	1289 m	Tensión C-C y C-N
1411 s	-	Flexiones CH ₃
1488 vs	1481 vs	Flexiones C=N-H
1581 s	1590 w	Tensión C=C aromático
1622 s	1697 m	Tensión C=N
2950-2990 w	2991 w	Tensión C-H saturado
3100-3200 m	3058 w	Tensión C-H insaturado
3200-3400 m	3322 m	Tensión N-H

vs, very strong; s, strong; m, medium; w, weak

Nota: En la segunda columna aparecen las frecuencias de vibración de proguanil obtenidas computacionalmente a un nivel de cálculo B3LYP/6-31G* en fase gaseosa. El espectro IR correspondiente se adjunta en el **Apartado D** de **Anexos (Figura D.5)**.

En la **Figura 7.47** se muestran los espectros IR de mefloquina y Lariam superpuestos. De nuevo, aquí se observa más señales que en los correspondientes espectros Raman, pero se mejora notablemente la resolución y menor ruido de fondo trabajando con este equipo FTIR.

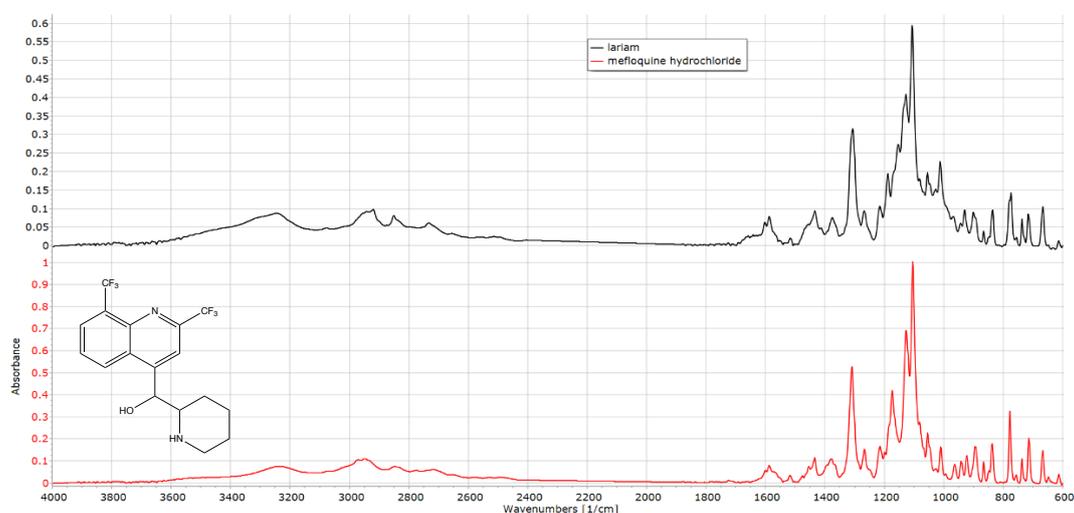


Figura 7.47. Espectros IR de mefloquina (rojo) y Lariam (negro) superpuestos.

Siguiendo el mismo procedimiento de estudio que en espectroscopia Raman, en la **Figura 7.48** se ilustra los espectros IR de PG y MQ superpuestos para visualizar la zona de utilidad para caracterizar de manera conjunta ambos principios activos. Como se puede observar, las zonas marcadas en el espectro servirían para identificar las bandas características de cada principio activo.

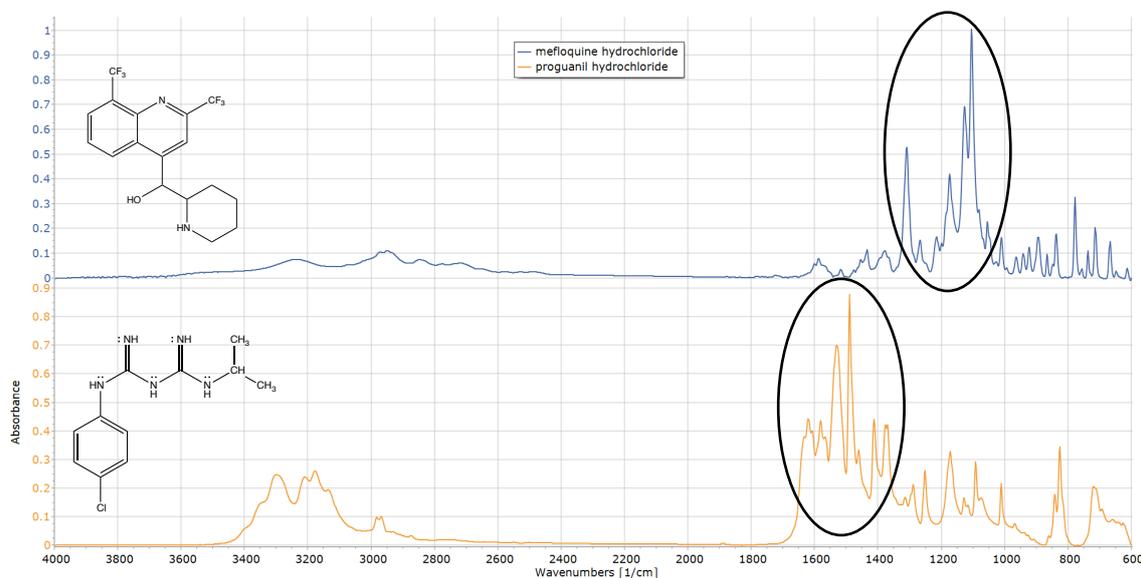


Figura 7.48. Espectros IR de proguanil (naranja) y mefloquina (azul) superpuestos.

Los espectros IR individuales de los patrones PG y MQ y las muestras de Malarone y Lariam están recogidos en las **Figuras D.1 – D.4 de Anexos**.

Después de este análisis comparativo de Raman e IR, se concluye que se puede realizar la caracterización de los principios activos por ambas técnicas, aunque se considera más adecuada la espectroscopia Raman para finalidad analítica (identificación en muestras comerciales), puesto que presenta un menor número de bandas intensas.

Por último, a efectos de caracterización del hidrocloreuro de proguanil, aparte de obtener los correspondientes espectros de Raman e IR, se obtuvo el espectro de RMN (Resonancia Magnética Nuclear) de dicho compuesto. Este espectro de RMN, representado en la **Figura E.1 de Anexos**, se obtuvo con 12 mg de patrón PG comercial en 0,5 ml de DMSO- d_6 . El CD_3SOCD_2H aparece a 2,5 ppm y el agua, en este disolvente, en torno a 3 ppm. Las señales alquílicas del isopropilo a 1,1 ppm (CH_3) y 3,7 ppm (CH) y el sistema AA'BB' del anillo aromático sobre 7,5 ppm se ven bien. El resto de las señales corresponde a los NH y se ven muy anchas debido al intercambio de protones.

8. CONCLUSIONES

- 1) Se propone, como método sencillo y rápido para determinar proguanil en comprimidos de Malarone, la espectroscopia de absorción molecular UV-Vis. El alto carácter lipofílico de la atovacuona permite disolver selectivamente el proguanil de la muestra en medio acuoso. A 254 nm, el rango lineal de máxima pendiente comprende concentraciones entre 2,0 – 20,3 ppm, la línea de calibrado obtenida presenta un coeficiente de determinación de unidad y los límites de detección y cuantificación son, respectivamente, 0,10 y 0,30 ppm.
- 2) Para determinar proguanil en el medio biológico “orina” se considera como método más adecuado la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Las condiciones cromatográficas óptimas encontradas son: columna C₁₈; fase móvil de composición {50%ACN, 10% H₂O y 40% disolución acuosa pH 2,6}; flujo 1,0 ml/min; longitud de onda de detección fijada a 254 nm y temperatura constante a 25°C. En estas condiciones, se identifica el proguanil a 1,7 min, diferenciándolo del ácido úrico con señal a 1,2 min. Los límites de detección y cuantificación obtenidos para el proguanil son 0,38 y 1,15 ppm, respectivamente.
- 3) Se ha conseguido analizar el proguanil en “orina” en presencia de mefloquina con buena resolución empleando la columna C₁₈ y fase móvil de composición {40% ACN, 10% MeOH, 10% H₂O y 40% disolución acuosa pH 2,6}. Los tiempos de retención son 1,3; 2,2 y 3,8 min para el ácido úrico, proguanil y mefloquina, respectivamente. A 223 nm, los límites de detección y cuantificación encontrados para el proguanil son 0,42 y 1,29 ppm, mientras que para la mefloquina son 0,15 y 0,46 ppm, respectivamente.
- 4) Se ha caracterizado el hidrocloreuro de proguanil por espectroscopia IR y Raman, considerando más adecuada esta última técnica, por presentar un menor número de bandas, para la identificación de proguanil en muestras de Malarone y en presencia de mefloquina.

9. BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS

Referencias

- [1] E. Salvador, “Paludismo,” 2020. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/malaria> (accessed Feb. 27, 2021).
- [2] WHO, *World malaria report 2020- WHO*. 2020.
- [3] A. Osei-Akoto, L. C. Orton, and S. Owusu-Ofori, “Atovaquone-proguanil for treating uncomplicated malaria,” *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2005, doi: 10.1002/14651858.cd004529.pub2.
- [4] S. Smarzewska, S. Skrzypek, and W. Ciesielski, “Voltammetric Determination of Proguanil in Malarone and Spiked Urine with a Renewable Silver Amalgam Film Electrode,” *Electroanalysis*, vol. 24, no. 10, pp. 1966–1972, 2012, doi: 10.1002/elan.201200312.
- [5] C. E. Ndikilar, Z. Tasiu, and L. S. Taura, “Molecular dynamics of malaria drug proguanil: Dft and ab initio study,” *African Rev. Phys.*, vol. 8, no. August, pp. 183–189, 2013.
- [6] M. C. Bellón-Munera, M. L. Sánchez Galletero, F. Mateos-Rodríguez, and M. Melero Bascones, “Malaria y babesiosis,” *Med.*, vol. 11, no. 54, pp. 3208–3221, 2014, doi: 10.1016/S0304-5412(14)70759-0.
- [7] J. F. Chaulet, G. Grelaud, P. Bellemin-Magninot, C. Mounier, and J. L. Brazier, “Simultaneous determination of chloroquine, proguanil and their metabolites in human biological fluids by high-performance liquid chromatography,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 12, no. 1, pp. 111–117, 1994, doi: 10.1016/0731-7085(94)80018-9.
- [8] S. Looareesuwan *et al.*, “Malarone(TM) (atovaquone and proguanil hydrochloride): A review of its clinical development for treatment of malaria,” *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 60, no. 4, pp. 533–541, 1999, doi: 10.4269/ajtmh.1999.60.533.
- [9] S. Sharma, R. Sharma, A. Devi, S. Jindal, and K. Goyal, “A review on characteristics and analytical methods of atovaquone – a potent antimalarial agent,” *J. Appl. Pharm. Res.*, vol. 8, no. 3, pp. 31–37, 2020, doi: 10.18231/j.joapr.2020.v.8.i.3.31.37.
- [10] I. K. Srivastava and A. B. Vaidya, “A mechanism for the synergistic antimalarial action of

- atovaquone and proguanil," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 43, no. 6, pp. 1334–1339, 1999, doi: 10.1128/aac.43.6.1334.
- [11] M. S. Bloomfield and W. C. Butler, "Robustness testing, using experimental design, of a flow-through dissolution method for a product where the actives have markedly differing solubility properties," *Int. J. Pharm.*, vol. 206, no. 1–2, pp. 55–61, 2000, doi: 10.1016/S0378-5173(00)00509-3.
- [12] K. McKeage *et al.*, "Atovaquone/proguanil: A review of its use for the prophylaxis of *Plasmodium falciparum* malaria," *Drugs*, vol. 63, no. 6, pp. 597–623, 2003, doi: 10.2165/00003495-200363060-00006.
- [13] P. Schlagenhauf, "Mefloquine for malaria chemoprophylaxis 1992-1998: A review," *J. Travel Med.*, vol. 6, no. 2, pp. 122–133, 1999, doi: 10.1111/j.1708-8305.1999.tb00843.x.
- [14] D. Blessborn, "Development of analytical methods for the determination of antimalarials in biological fluids," 2009.
- [15] S. Thybo, I. Gjørup, A. M. Ronn, D. Meyrowitsch, I. C. Bygberg, and G. Kronborg, "Atovaquone-proguanil (malarone): An effective treatment for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in travelers from Denmark," *J. Travel Med.*, vol. 11, no. 4, pp. 220–224, 2004, doi: 10.2310/7060.2004.19005.
- [16] M. Kimura, M. Koga, T. Kikuchi, T. Miura, and H. Maruyama, "Efficacy and safety of atovaquone-proguanil in treating imported malaria in Japan: The second report from the research group," *Parasitol. Int.*, vol. 61, no. 3, pp. 466–469, 2012, doi: 10.1016/j.parint.2012.03.004.
- [17] B. M. Marson, R. De Oliveira Vilhena, C. R. De Souza Madeira, F. L. D. Pontes, M. S. Piantavini, and R. Pontarolo, "Simultaneous quantification of artesunate and mefloquine in fixed-dose combination tablets by multivariate calibration with middle infrared spectroscopy and partial least squares regression," *Malar. J.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–8, 2016, doi: 10.1186/s12936-016-1157-1.
- [18] S. G. Pingale, K. K. Nerurkar, A. M. Padgaonkar, U. D. Pawar, and K. V. Mangaonkar, "Determination of atovaquone in human plasma by LC-MS-MS and its application to a bioequivalence study," *Chromatographia*, vol. 70, no. 5–6, pp. 947–951, 2009, doi: 10.1365/s10337-009-1220-y.

- [19] F. M. Abdel-Haleem, M. Saad, and M. S. Rizk, "Development of new potentiometric sensors for the determination of proguanil hydrochloride in serum and urine," *Chinese Chem. Lett.*, vol. 27, no. 6, pp. 857–863, 2016, doi: 10.1016/j.ccllet.2016.01.027.
- [20] C. C. Chou, M. P. Brown, and K. A. Merritt, "Capillary zone electrophoresis for the determination of atovaquone in serum," *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, vol. 742, no. 2, pp. 441–445, 2000, doi: 10.1016/S0378-4347(00)00183-3.
- [21] V. D. Chavada, N. M. Bhatt, M. Sanyal, and P. S. Shrivastav, "The first Normal-Phase High-Performance Thin-Layer chromatographic method for the simultaneous determination of the antimalarial drugs atovaquone and proguanil from malarone® tablets," *J. Planar Chromatogr. - Mod. TLC*, vol. 29, no. 2, pp. 140–144, 2016, doi: 10.1556/1006.2016.29.2.8.
- [22] R. R. Moody and R. B. Taylor, "An HPLC assay for the determination of proguanil hydrochloride in tablets," vol. 7, pp. 177–178, 1980.
- [23] J. A. Kelly and K. A. Fletcher, "High-performance liquid chromatographic method for the determination of proguanil and cycloguanil in biological fluids," *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, vol. 381, no. C, pp. 464–471, 1986, doi: 10.1016/S0378-4347(00)83616-6.
- [24] A. B. S. A. R. B. T. R.R. MOODY, "High-performance liquid chromatography of proguanil, cycloguanil and 4-chlorophenylbiguanide using hydrophobic pairing ion and its application to serum assay," *J. Chromatogr.*, vol. 182, pp. 359–367, 1980.
- [25] R. B. Taylor, R. Behrens, R. R. Moody, and J. Wangboonskul, "Assay method for the simultaneous determination of proguanil, chloroquine and their major metabolites in biological fluids," *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, vol. 527, no. C, pp. 490–497, 1990, doi: 10.1016/S0378-4347(00)82136-2.
- [26] A. Paci, A. M. Caire-Maurisier, A. Rieutord, F. Brion, and P. Clair, "Dual-mode gradient HPLC procedure for the simultaneous determination of chloroquine and proguanil," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 27, no. 1–2, pp. 1–7, 2002, doi: 10.1016/S0731-7085(01)00555-6.
- [27] Y. Bergqvist and C. Hopstadius, "Simultaneous separation of atovaquone, proguanil and its metabolites on a mixed mode high-performance liquid chromatographic column," *J.*

- Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, vol. 741, no. 2, pp. 189–193, 2000, doi: 10.1016/S0378-4347(00)00082-7.
- [28] S. Sahoo, P. K. Panda, and S. K. Mishra, “HPLC method development for simultaneous estimation of atovaquone and proguanil in tablet dosage form,” *Indian Drugs*, vol. 50, no. 6, pp. 20–23, 2013.
- [29] A. L. Rao, T. Prasanthi, and F. Thunnisa, “Development and Validation for Simultaneous Estimation of Proguanil and Atovaquone by using RP-HPLC,” *Int. J. Anal. Tech.*, vol. 4, no. 1, pp. 1–10, 2018, doi: 10.15226/2577-7831/4/1/00113.
- [30] V. D. Chavada, N. M. Bhatt, M. Sanyal, and P. S. Shrivastav, “Comparative evaluation of first order, absorbance ratio and bivariate spectrophotometric methods for determination of atovaquone and proguanil in pharmaceutical formulation malarone®,” *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 7, no. 9, pp. 165–171, 2015.
- [31] A. Samala, S. Pawar, S. Manala, S. Chada, and M. Nageshwar, “Development and Validation of RP-HPLC Method for Estimation of Risperidone in Tablet Dosage Form,” *Res. J. Pharm. Technol.*, vol. 6, no. 6, pp. 659–661, 2013.
- [32] S. H. Gatkal, P. R. Mhatre, V. V. Chopade, and P. D. Choudhari, “Development and validation of stability indicating HPLC assay method for determination of mefloquine-HCl in bulk and pharmaceutical formulations,” *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, vol. 20, no. 1, pp. 200–204, 2013, [Online]. Available: <http://jprsolutions.info>.
- [33] K. Patel, J. Patel, M. Patel, and G. Rajput, “A validated method for development of atovaquone as API and tablet dosage forms by UV spectroscopy,” *Pharm. Methods*, vol. 1, no. 1, p. 61, 2010, doi: 10.4103/2229-4708.72234.
- [34] E. S. Kala, K. S. Mala, and K. S. Nataraj, “Research Article UV-SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF,” vol. 3, no. 2, 2013.

Bibliografía

- M. Valcárcel Cases, A. Gómez Hens (1988). *“Técnicas analíticas de separación”*. Editorial Reverté, S.A.
- Rafael Cela, Rosa A. Lorenzo, M.ª del Carmen Casais. *“Técnicas de separación en Química analítica”*. Editorial Sintesis.
- Douglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch (2008). *“Principios de análisis instrumental”*. Sexta edición. CENGAGE learning.
- E. Pretsch, P. Bühlmann, M. Badertscher (2009). *“Structure Determination of Organic Compounds”* Tables of Spectral Data. Fourth, Revised and Enlarged Edition.

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Lista de figuras

Figura 1.2. Estructura molecular de atovacuona, proguanil, cicloguanil y 4-clorofenilbiguanida.

Figura 1.2. Estructura molecular del clorhidrato de mefloquina (izquierda) y su metabolito inactivo (derecha).

Figura 6.1. Imagen de Malarone comprimidos de 250 mg ATQ/100 mg PG.

Figura 7.1. Espectro de absorción molecular de PG en metanol de 10 ppm.

Figura 7.2. Espectro de absorción molecular de PG en ACN-H₂O (60:40) de 10 ppm.

Figura 7.3. Espectro de absorción molecular de PG en agua desionizada de 10 ppm.

Figura 7.4. Espectro de absorción de MQ en agua desionizada de 10 ppm.

Figura 7.5. Espectros de absorción molecular de los patrones de proguanil en metanol.

Figura 7.6. Gráfico de Ringbom de PG a 232 nm en metanol.

Figura 7.7. Gráfico de Ringbom de PG a 254 nm en metanol.

Figura 7.8. Calibrado lineal de proguanil en metanol a 232 nm.

Figura 7.9. Gráfico de los residuales (MeOH, 232 nm).

Figura 7.10. Calibrado lineal de proguanil en metanol a 254 nm.

Figura 7.11. Gráfico de los residuales (MeOH, 254 nm).

Figura 7.12. Espectros de absorción molecular de patrones de proguanil en agua desionizada.

Figura 7.13. Gráfico de Ringbom de PG a 232 nm en agua desionizada.

Figura 7.14. Gráfico de Ringbom de PG a 254 nm en agua desionizada.

Figura 7.15. Calibrado lineal de proguanil en agua desionizada a 232 nm.

Figura 7.16. Gráfico de los residuales (Agua, 232 nm).

Figura 7.17. Calibrado lineal de proguanil en agua desionizada a 254 nm.

Figura 7.18. Gráfico de los residuales (Agua, 254 nm).

Figura 7.19. Representaciones gráficas de absorbancia frente al tiempo a concentración constante en presencia y en ausencia de luz (MeOH, 254 nm).

Figura 7.20. Representaciones gráficas de absorbancia frente al tiempo a concentración constante en presencia y en ausencia de luz (ACN-H₂O 60:40, 254 nm).

Figura 7.21. Representaciones gráficas de absorbancia frente al tiempo a concentración constante de patrones en agua conservados en el frigorífico (4°C).

Figura 7.22. Preparación de las muestras de Malarone en agua y en metanol.

- Figura 7.23.** Espectro de absorción molecular UV-Vis de muestras Malarone en agua.
- Figura 7.24.** Espectro UV-Vis de Malarone en MeOH (izquierda) y de ATQ bibliográfico (derecha).
- Figura 7.25.** Representación de absorbancia frente al volumen de patrón añadido (MAP muestra en agua).
- Figura 7.26.** Cromatograma del patrón PG en orina de 8 ppm. FM **10** {50% ACN, 10% H₂O, 40% disolución acuosa pH 2,6} y flujo 1,0 ml/min.
- Figura 7.27.** Cromatograma patrón PG en orina 30 ppm. FM **11** {40% ACN, 10% MeOH, 10% H₂O, 40% disolución acuosa pH 2,6} y flujo 1,0 ml/min.
- Figura 7.28.** Cromatograma del patrón PG 15 ppm + MQ 30 ppm a 254 nm. FM **11** {40% ACN, 10% MeOH, 10% H₂O, 40% disolución acuosa pH 2,6} y flujo 1,0 ml/min.
- Figura 7.29.** Cromatograma del patrón PG 8 ppm + MQ 10 ppm a 223 nm. FM **11** {40% ACN, 10% MeOH, 10% H₂O, 40% disolución acuosa pH 2,6} y flujo 1,0 ml/min.
- Figura 7.30.** Cromatograma patrón PG en agua 10 ppm. Fase móvil **10** {50% ACN, 10% H₂O, 40% disolución acuosa pH 2,6} y flujo 1,0 ml/min. Columna apolar C₁₈.
- Figura 7.31.** Calibrado lineal de proguanil en agua (HPLC).
- Figura 7.32.** Cromatograma de muestra Malarone en agua diluida 1:5 (réplica 2). FM **10** {50% ACN, 10% H₂O, 40% disolución acuosa pH 2,6} y flujo 1,0 ml/min.
- Figura 7.33.** Calibrado lineal de proguanil en orina.
- Figura 7.34.** Calibrados lineales para PG y MQ en orina artificial a 223 nm y 254 nm.
- Figura 7.35.** Cromatograma patrón PG en agua 40 ppm. Fase móvil **E** {30% ACN, 60% MeOH, 10% disolución acuosa pH 2,6} y flujo 1,0 ml/min. Columna polar ciano.
- Figura 7.36.** Cromatograma muestra Malarone en metanol (réplica 1). Fase móvil **E** {30% ACN, 60% MeOH, 10% disolución acuosa pH 2,6}. Columna polar ciano.
- Figura 7.37.** Espectro Raman del patrón hidrocloreuro de proguanil.
- Figura 7.38.** Espectro Raman de Malarone sin envoltorio triturado.
- Figura 7.39.** Espectros Raman de Malarone triturado (azul) y patrón proguanil (rojo) superpuestos.
- Figura 7.40.** Espectros Raman de patrón proguanil obtenidos a modo microscópico.
- Figura 7.41.** Espectros Raman de muestra Malarone obtenidos a modo microscópico.
- Figura 7.42.** Espectros superpuestos de Malarone y proguanil (modo microscópico).
- Figura 7.43.** Espectro Raman del patrón mefloquina.

Figura 7.44. Espectro Raman de patrón mefloquina y muestra Lariam superpuestos.

Figura 7.45. Espectros Raman del patrón proguanil (azul) y mefloquina (rojo) superpuestos.

Figura 7.46. Espectros IR de proguanil (rojo) y Malarone (azul) superpuestos.

Figura 7.47. Espectros IR de mefloquina (rojo) y Lariam (negro) superpuestos.

Figura 7.48. Espectros IR de proguanil (naranja) y mefloquina (azul) superpuestos.

Lista de tablas

Tabla 4.1. Fármacos antipalúdicos.

Tabla 1.5. Propiedades físico-químicas y farmacocinéticas de la ATQ y PG.

Tabla 1.6. Propiedades físico-químicas y farmacocinéticas de mefloquina.

Tabla 7.1. Concentraciones de las disoluciones patrón madre de PG en distintos medios.

Tabla 7.2. Datos del gráfico de Ringbom y del calibrado lineal de PG en MeOH a 232 y 254 nm.

Tabla 7.3. Pendientes y porcentajes de error relativo del tramo recto a 232 y 254 nm en MeOH.

Tabla 7.4. Parámetros de la regresión lineal a 232 nm (MeOH).

Tabla 7.5. Residuales de la regresión lineal a 232 nm (MeOH).

Tabla 7.6. Parámetros de la regresión lineal a 254 nm (MeOH).

Tabla 7.7. Residuales de la regresión lineal a 254 nm (MeOH).

Tabla 7.8. Absortividad específica y molar de proguanil en MeOH.

Tabla 7.9. Límites de detección y cuantificación a 232 y 254 nm (MeOH).

Tabla 7.10. Datos del gráfico de Ringbom y del calibrado lineal de PG en agua desionizada a 232 y 254 nm.

Tabla 7.11. Pendientes y porcentajes de error relativo del tramo recto a 232 y 254 nm en agua desionizada.

Tabla 7.12. Parámetros de la regresión lineal a 232 nm (Agua).

Tabla 7.13. Residuales de la regresión lineal a 232 nm (Agua).

Tabla 7.14. Parámetros de la regresión lineal a 254 nm (Agua).

Tabla 7.15. Residuos de la regresión lineal a 254 nm (Agua).

Tabla 7.16. Absortividad específica y molar de proguanil en agua desionizada a 232 y 254 nm.

Tabla 7.17. Límites de detección y cuantificación de PG en agua a 232 y 254 nm.

Tabla 7.18. Los valores de *p a posteriori* de la prueba estadística t (MeOH, 254 nm).

Tabla 7.19. Los valores de *p a posteriori* de la prueba estadística t (ACN-H₂O 60:40, 254 nm).

Tabla 7.20. Los valores de *p a posteriori* de la prueba estadística t (PG en agua).

Tabla 7.21. Masas tomadas y el volumen final enrasado en la preparación de las muestras de Malarone.

Tabla 7.22. Determinación de proguanil en muestras de Malarone preparadas en agua desionizada por interpolación directa en la recta de calibrado de 232 nm.

Tabla 7.23. Determinación de proguanil en muestras de Malarone preparadas en agua desionizada por interpolación directa en la recta de calibrado de 254 nm.

Tabla 7.24. Estimación de cantidad de atovacuna presente en el comprimido de Malarone a 278 nm.

Tabla 7.25. Datos del método de adiciones patrón para la muestra de Malarone en agua (Réplica 1) y el blanco.

Tabla 7.26. Miligramos de proguanil determinados por el método de adiciones patrón de las muestras de Malarone disueltas en agua desionizada.

Tabla 7.27. Fases móviles estudiadas con la columna apolar C₁₈.

Tabla 7.28. Distintas velocidades de flujo para la FM 6 {60% ACN, 10% MeOH, 20% H₂O, 10% disolución acuosa pH 2,6}.

Tabla 7.29. Estudio de la naturaleza de la disolución acuosa ácida para la FM 10 {50% ACN, 10% H₂O, 40% disolución acuosa pH 2,6}.

Tabla 7.30. Tiempos de retención de PG, MQ, ácido úrico e impureza con FM 11 {40% ACN, 10% MeOH, 10% H₂O, 40% disolución acuosa pH 2,6}. Flujo 1,0 ml/min.

Tabla 7.31. Resultados de concentración proguanil – área pico.

Tabla 7.32. Determinación de proguanil mediante calibrado directo por HPLC.

Tabla 7.33. Relación de concentración – área pico de los patrones de PG en orina artificial.

Tabla 7.34. Datos de concentración – área pico para los patrones conjuntos de PG y MQ a 223 nm.

Tabla 7.35. Datos de concentración – área pico para los patrones conjuntos de PG y MQ a 254 nm.

Tabla 7.36. Límites de detección y cuantificación de PG y MQ a 223 y 254 nm.

Tabla 7.37. Ensayos de fase móvil con la columna polar de ciano.

Tabla 7.38. Influencia de la polaridad de FM sobre los tiempos de retención de ATQ y PG en la columna polar ciano. Aplicado a las muestras de Malarone en metanol.

Tabla 7.39. Frecuencias de vibración de proguanil asignadas en Raman.

Tabla 7.40. Frecuencias de vibración de proguanil asignadas en IR.

ANEXOS

A) Espectroscopia de absorción molecular UV-Vis

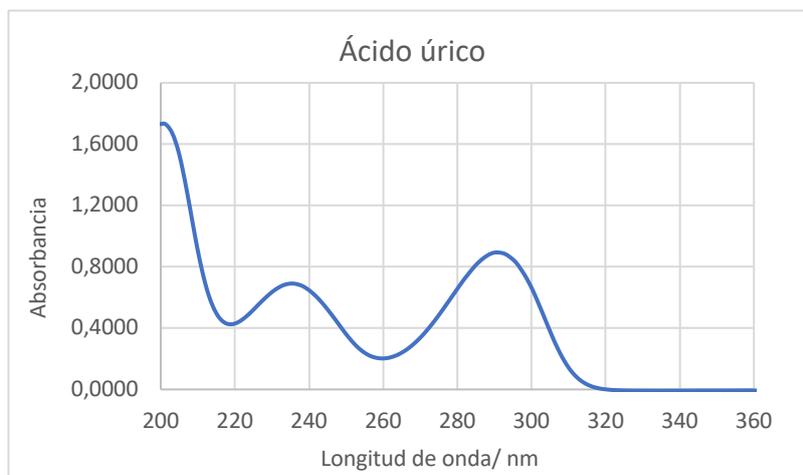


Figura A.1. Espectro de absorción molecular de ácido úrico.

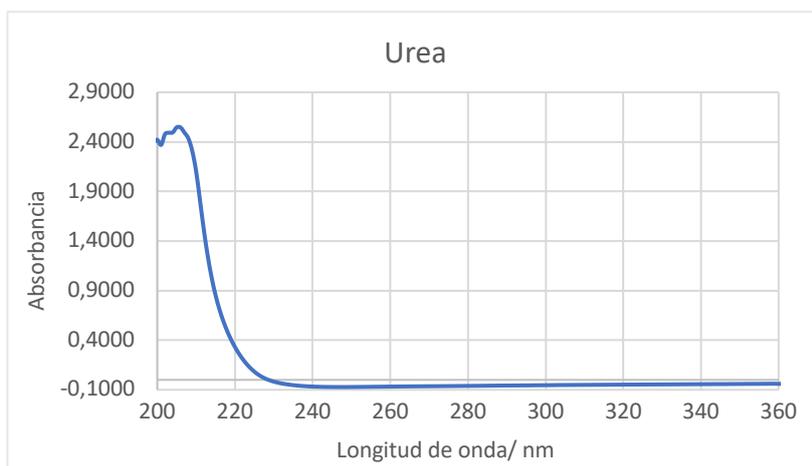


Figura A.2. Espectro de absorción molecular de urea.

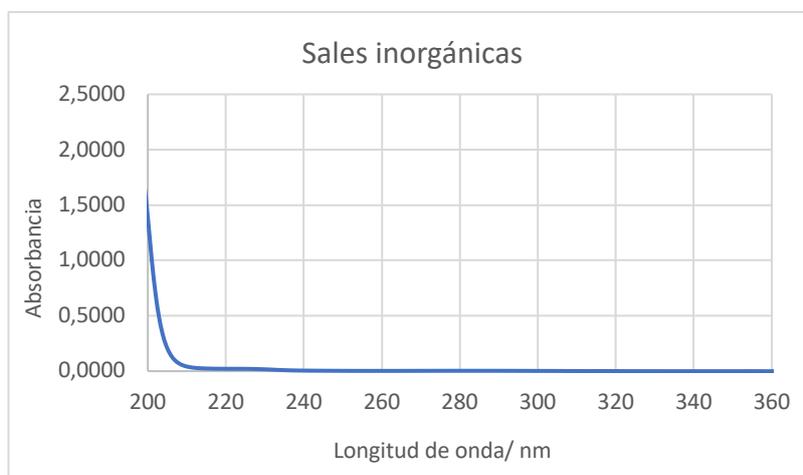


Figura A.3. Espectro de absorción molecular de sales inorgánicas.

B) Cromatografía líquida de alta resolución con detector UV-Vis (HPLC/UV-Vis)

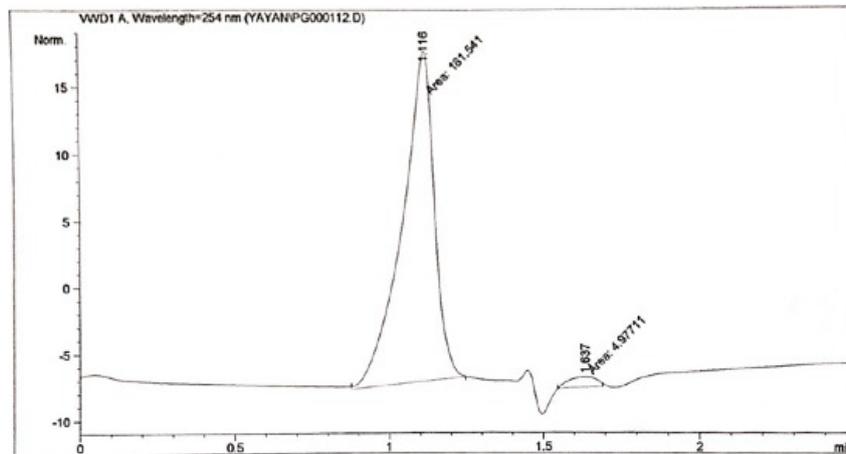
Columna apolar C₁₈

Figura B.1. Cromatograma del patrón PG/H₂O 60 ppm a 254 nm. FM 1 {30% ACN, 10% MeOH, 60% H₂O}. Flujo 1,0 ml/min.

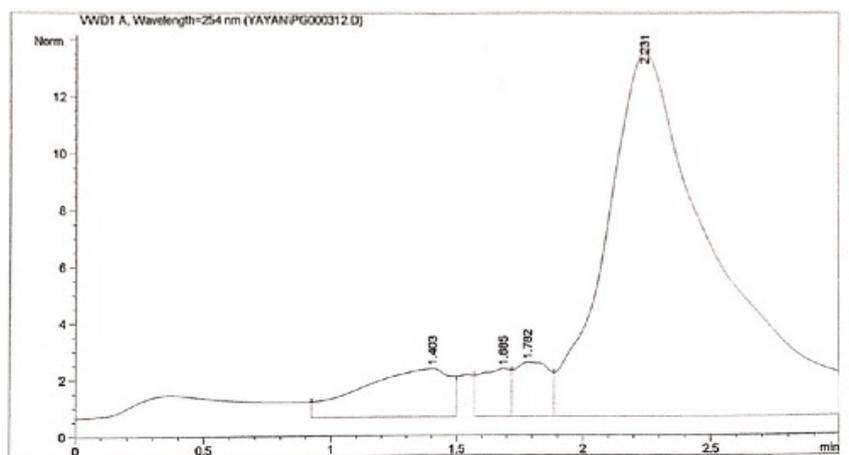


Figura B.2. Cromatograma del patrón PG/H₂O 5 ppm a 254 nm. FM 2 {60% ACN, 40% MeOH, 10% H₂O}. Flujo 0,8 ml/min.

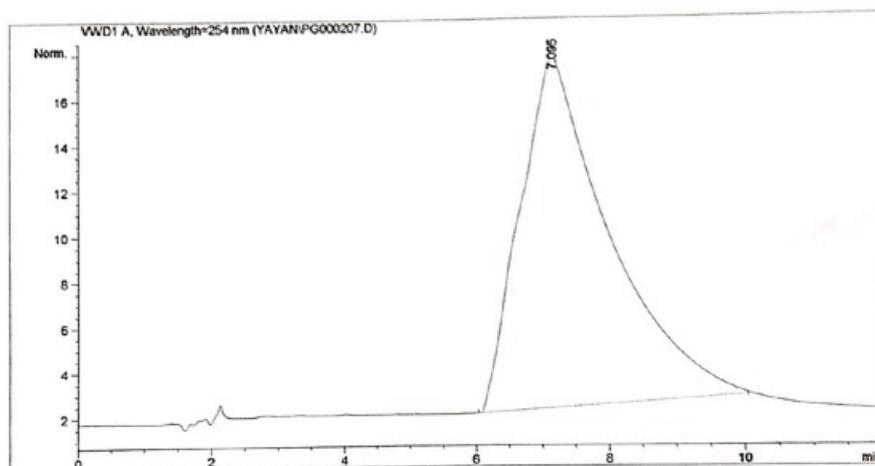


Figura B.3. Cromatograma del patrón PG/H₂O 20 ppm a 254 nm. FM 3 {60% ACN, 20% MeOH, 20% H₂O}. Flujo 0,8 ml/min.

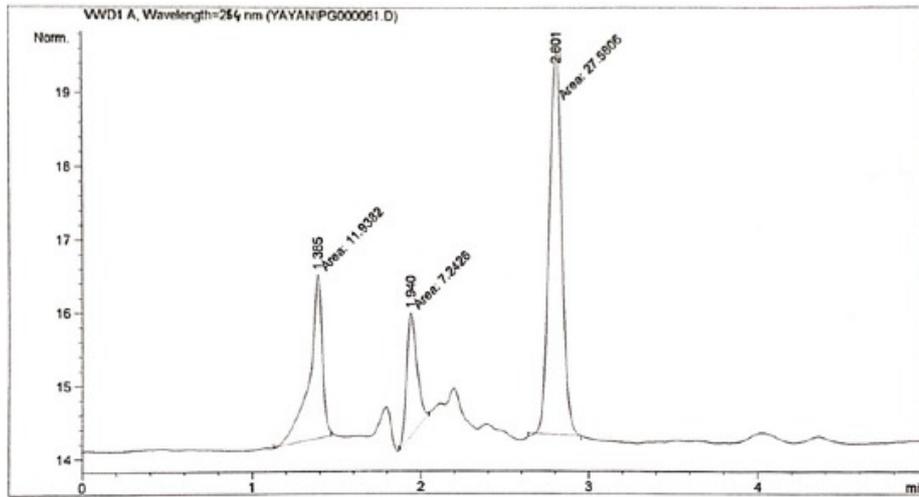


Figura B.4. Cromatograma del patrón PG/MeOH 100 ppm a 254 nm. FM 4 {80% ACN, 10% MeOH, 10% H₂O}. Flujo 0,8 ml/min.

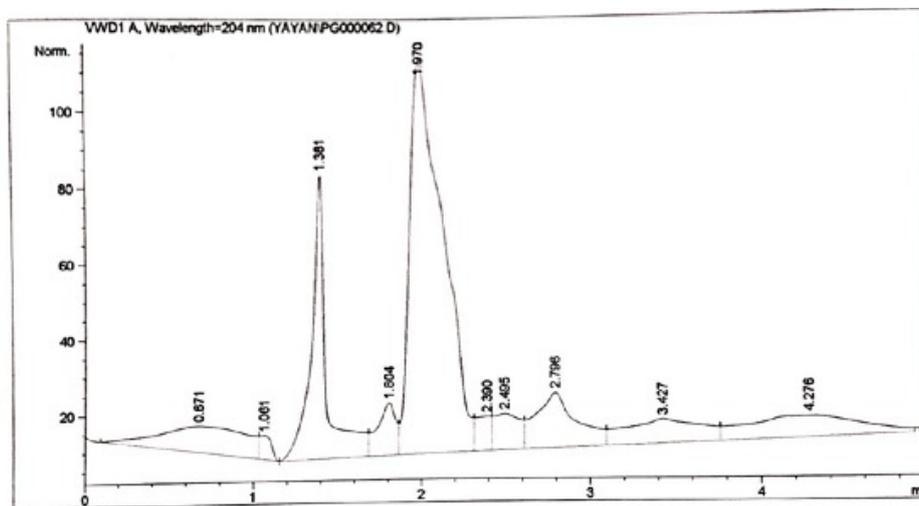


Figura B.5. Cromatograma del patrón PG/MeOH 100 ppm a 204 nm. FM 4 {80% ACN, 10% MeOH, 10% H₂O}. Flujo 0,8 ml/min.

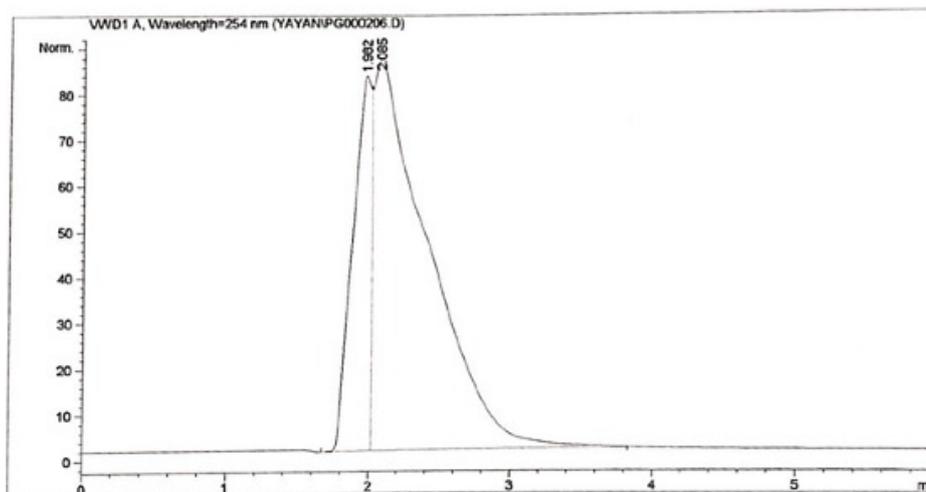


Figura B.6. Cromatograma del patrón PG/H₂O 40 ppm a 254 nm. FM 5 {80% ACN, 20% H₂O}. Flujo 0,8 ml/min.

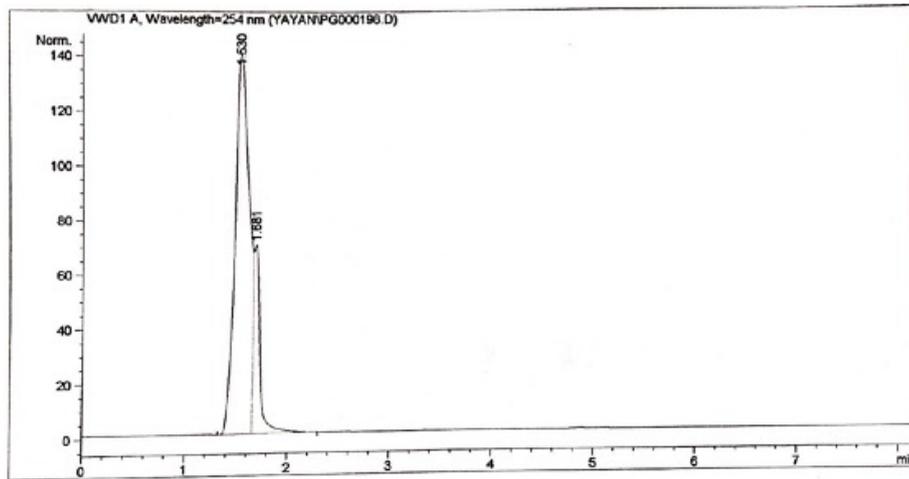


Figura B.7. Cromatograma del patrón PG/H₂O 40 ppm a 254 nm. FM 6 {60% ACN, 10% MeOH, 20% H₂O, 10% disolución acuosa de ácido fosfórico/dihidrogenofosfato pH 2,6}. Flujo 1,0 ml/min.

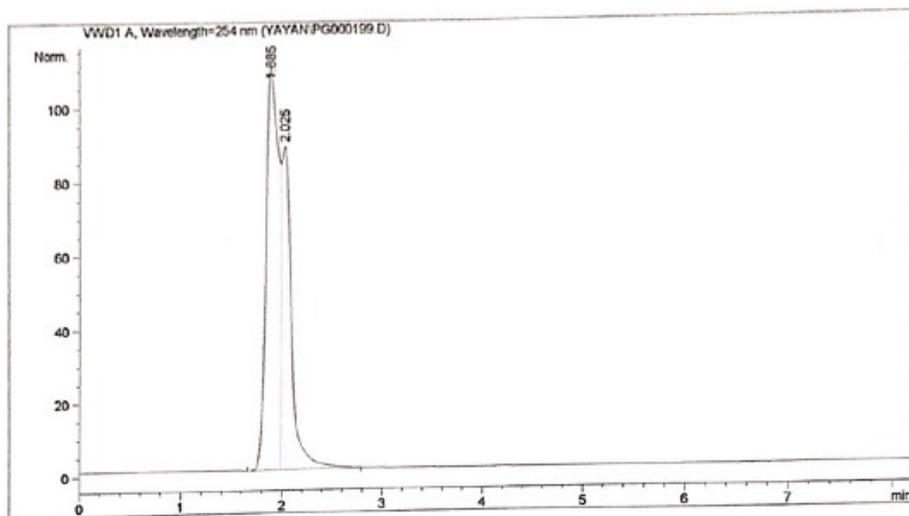


Figura B.8. Cromatograma del patrón PG/H₂O 40 ppm a 254 nm. FM 6 {60% ACN, 10% MeOH, 20% H₂O, 10% disolución acuosa de ácido fosfórico/dihidrogenofosfato pH 2,6}. Flujo 0,8 ml/min.

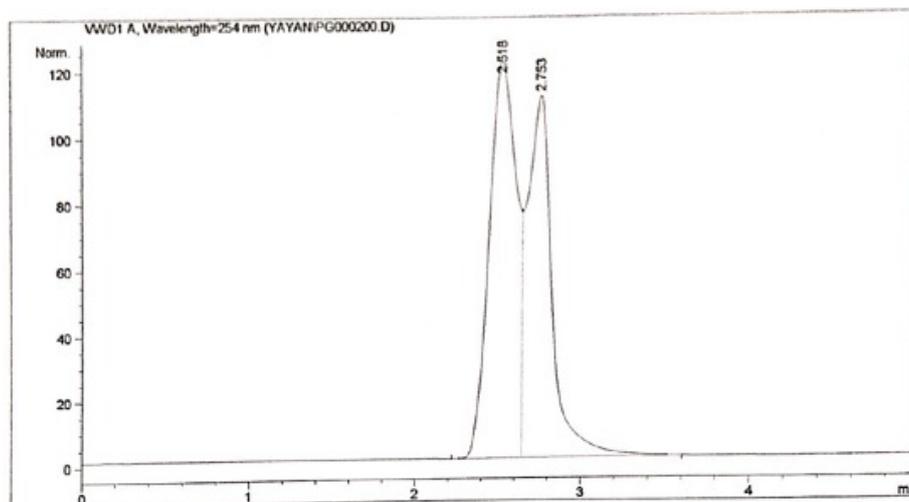


Figura B.9. Cromatograma del patrón PG/H₂O 40 ppm a 254 nm. FM 6 {60% ACN, 10% MeOH, 20% H₂O, 10% disolución acuosa de ácido fosfórico/dihidrogenofosfato pH 2,6}. Flujo 0,6 ml/min.

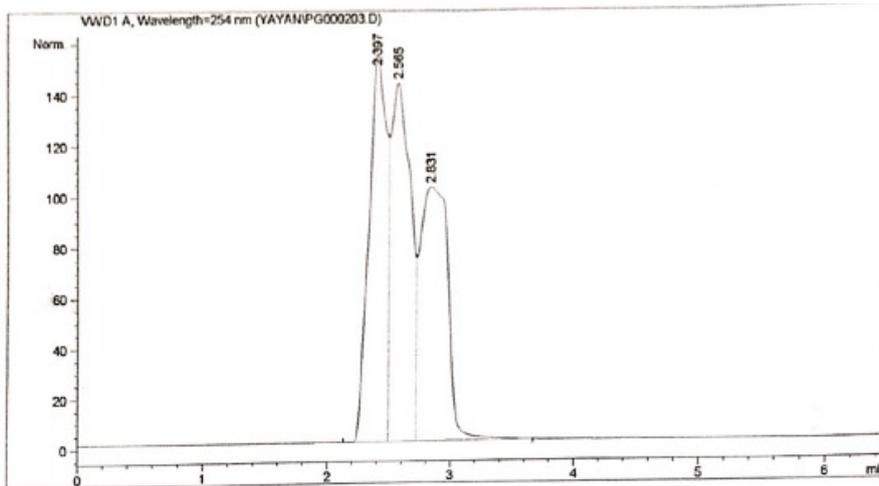


Figura B.10. Cromatograma del patrón PG/H₂O 40 ppm a 254 nm. FM 7 {70% ACN, 10% MeOH, 10% H₂O, 10% disolución acuosa de ácido fosfórico/dihidrogenofosfato pH 2,6}. Flujo 0,6 ml/min.

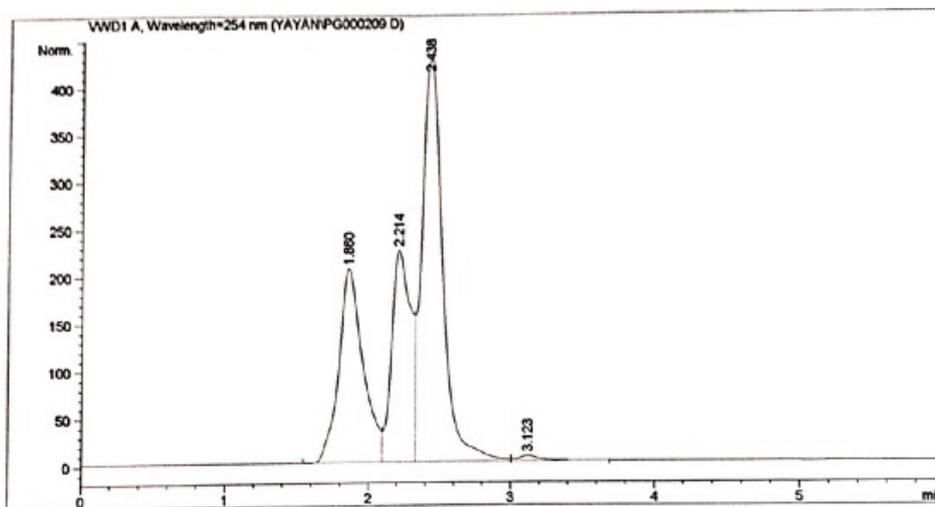


Figura B.11. Cromatograma del patrón PG/H₂O 60 ppm en a 254 nm. FM 8 {50% ACN, 30% H₂O, 20% disolución acuosa de ácido fosfórico/dihidrogenofosfato pH 2,6}. Flujo 0,8 ml/min.

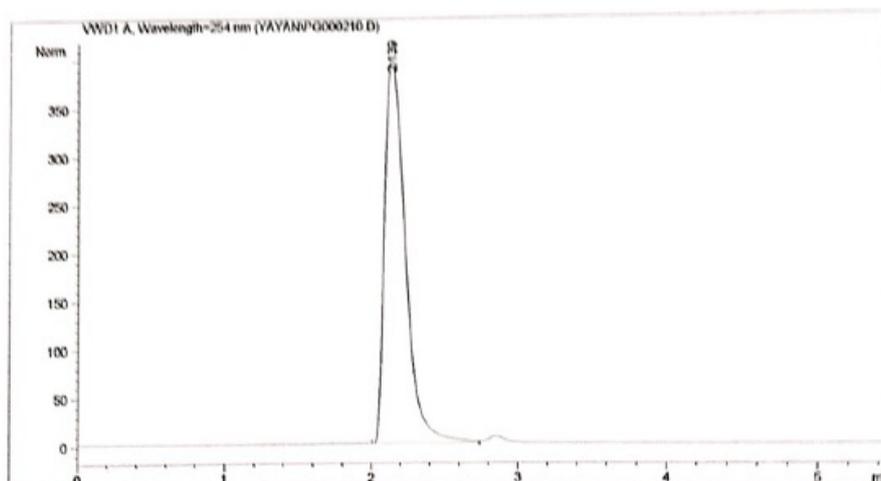


Figura B.12. Cromatograma del patrón PG/H₂O 60 ppm a 254 nm. FM 9 {50% ACN, 20% H₂O, 30% disolución acuosa de ácido fosfórico/dihidrogenofosfato pH 2,6}. Flujo 0,8 ml/min.

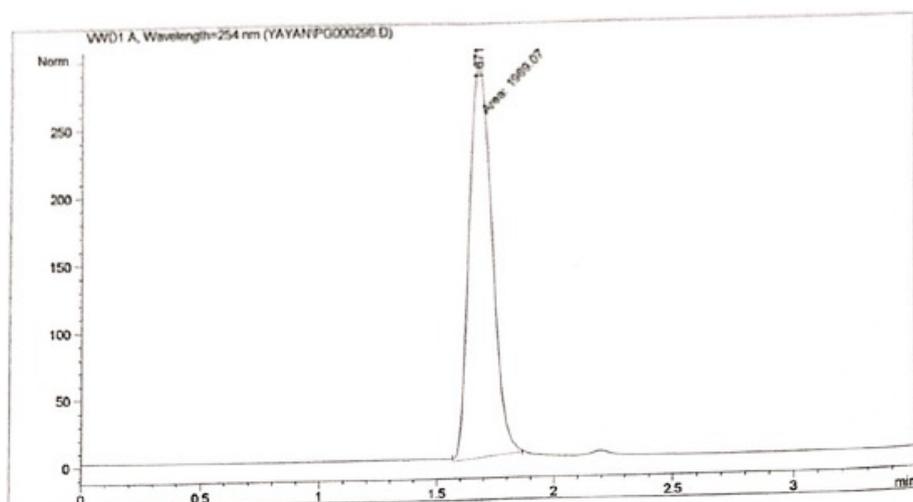


Figura B.13. Cromatograma del patrón PG/H₂O 40 ppm a 254 nm. FM **9** {50% ACN, 20% H₂O, 30% disolución acuosa de ácido fosfórico/dihidrogenofosfato pH 2,6}. Flujo 1,0 ml/min.

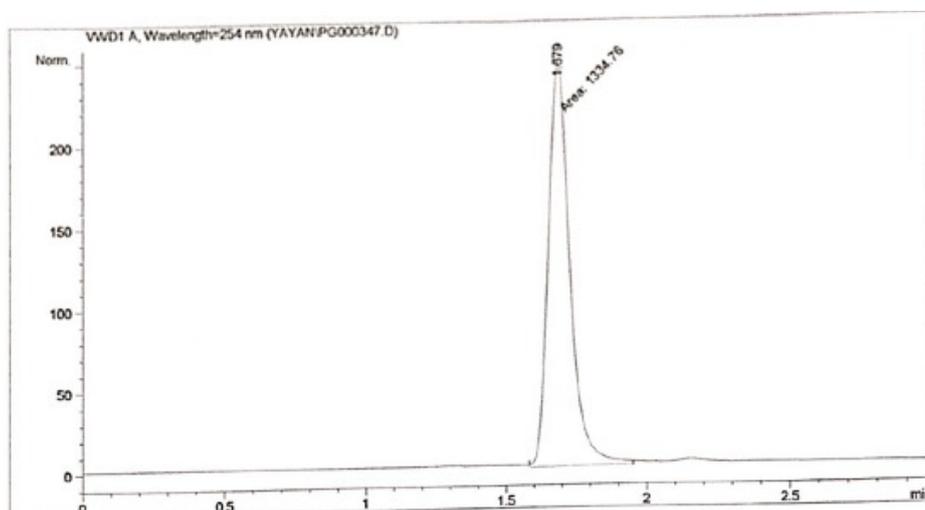


Figura B.14. Cromatograma del patrón PG/H₂O 40 ppm a 254 nm. FM **10** {50% ACN, 10% H₂O, 40% disolución acuosa de ácido fosfórico/dihidrogenofosfato pH 2,6}. Flujo 1,0 ml/min.

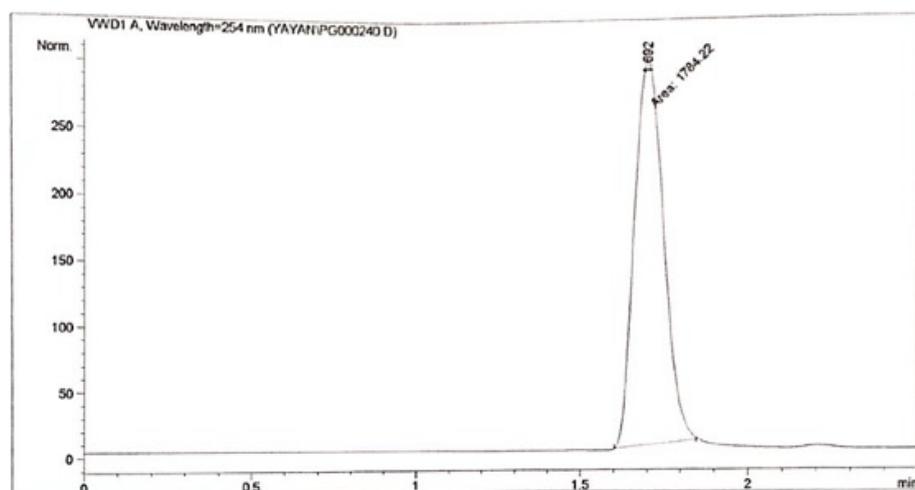


Figura B.15. Cromatograma del patrón PG/H₂O 40 ppm a 254 nm. FM **10** {50% ACN, 10% H₂O, 40% disolución acuosa de ácido acético pH 2,6}. Flujo 1,0 ml/min.

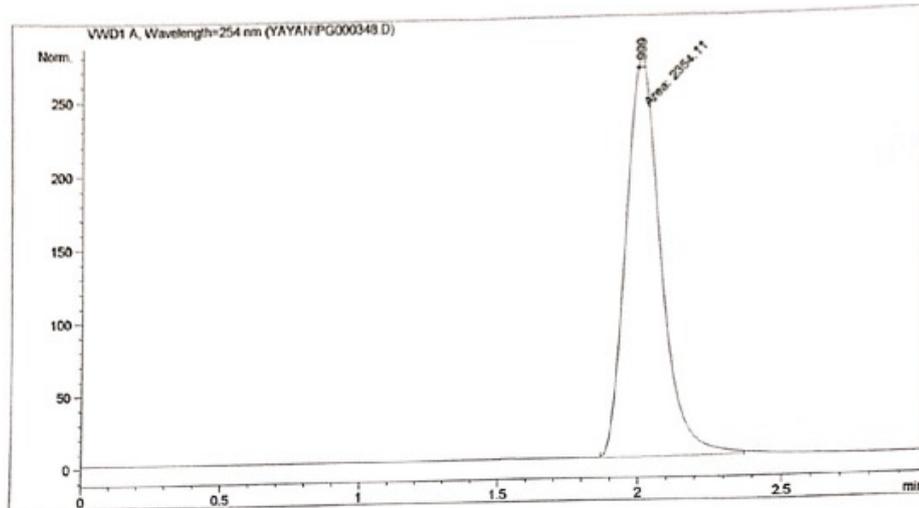


Figura B.16. Cromatograma del patrón PG/H₂O 40 ppm a 254 nm. FM 11 {40% ACN, 10% MeOH, 10% H₂O, 40% disolución acuosa de ácido fosfórico/dihidrogenofosfato pH 2,6}. Flujo 1,0 ml/min.

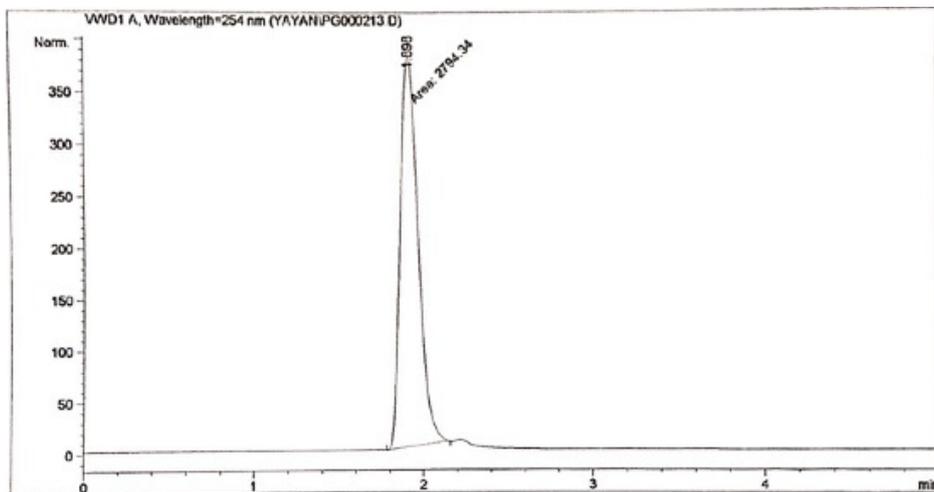


Figura B.17. Cromatograma del patrón PG/H₂O 60 ppm a 254 nm. FM 13 {60% ACN, 40% disolución acuosa de ácido fosfórico/dihidrogenofosfato pH 2,6}. Flujo 1,0 ml/min.

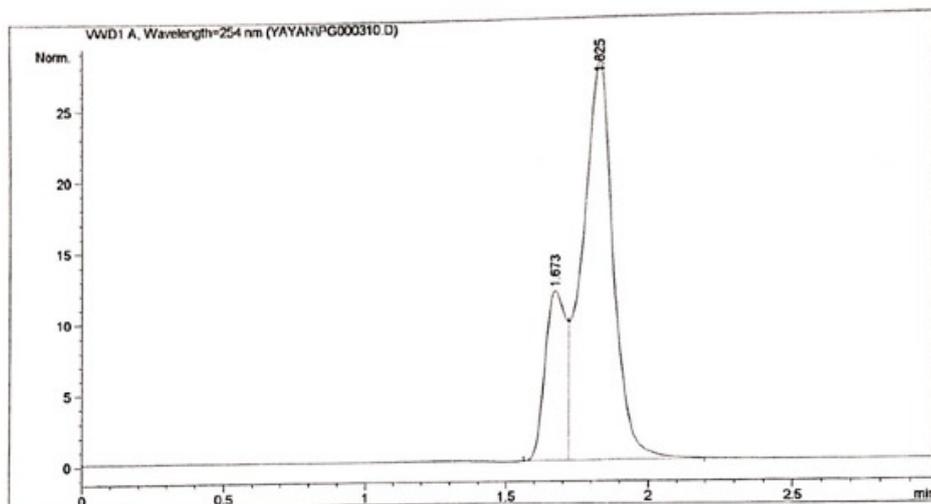


Figura B.18. Cromatograma del patrón PG/H₂O 40 ppm a 254 nm. FM 14 {70% ACN, 30% disolución acuosa de ácido fosfórico/dihidrogenofosfato pH 2,6}. Flujo 0,8 ml/min.

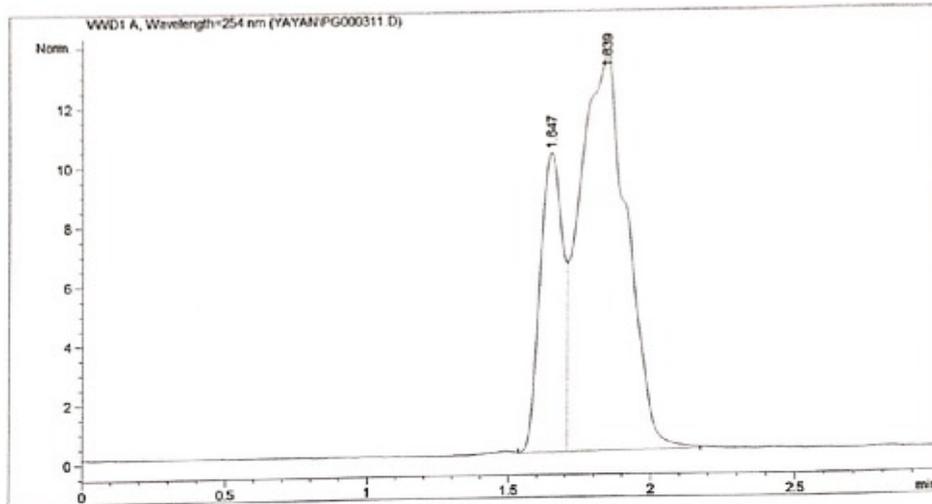


Figura B.19. Cromatograma del patrón PG/H₂O 5 ppm a 254 nm. FM 15 {80% ACN, 20% disolución acuosa de ácido fosfórico/dihidrogenofosfato pH 2,6}. Flujo 0,8 ml/min.

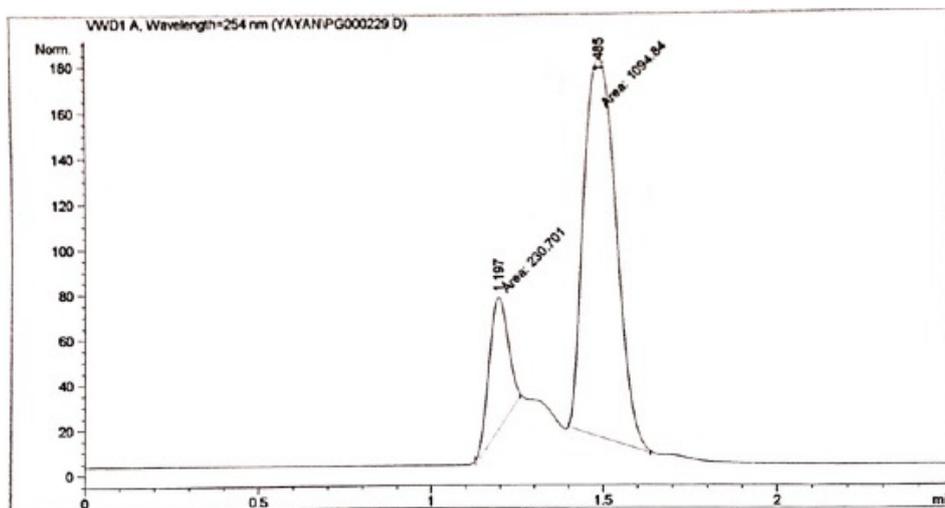


Figura B.20. Cromatograma del patrón PG/orina 30 ppm a 254 nm. FM 12 {60% ACN, 10% H₂O, 30% disolución acuosa de ácido fosfórico/dihidrogenofosfato pH 2,6}. Flujo 1,0 ml/min.

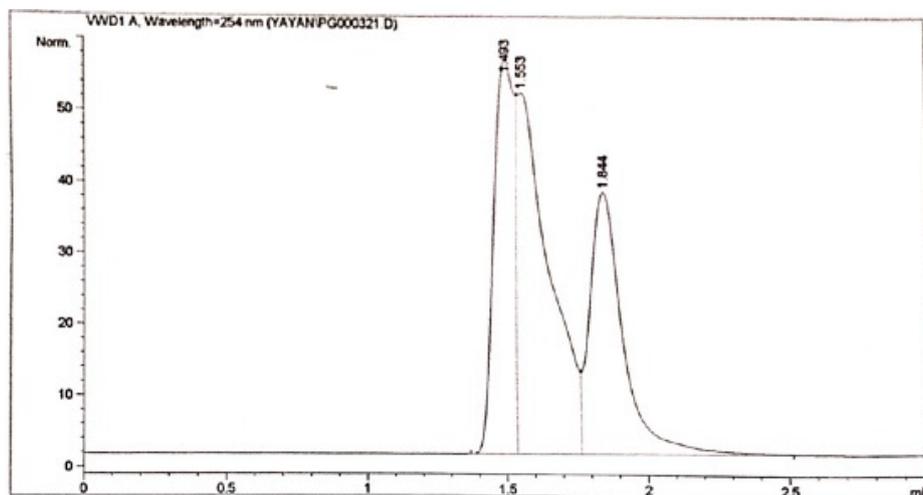


Figura B.21. Cromatograma del patrón PG/orina 8 ppm a 254 nm. FM 13 {60% ACN, 40% disolución acuosa de ácido fosfórico/dihidrogenofosfato pH 2,6}. Flujo 0,8 ml/min.

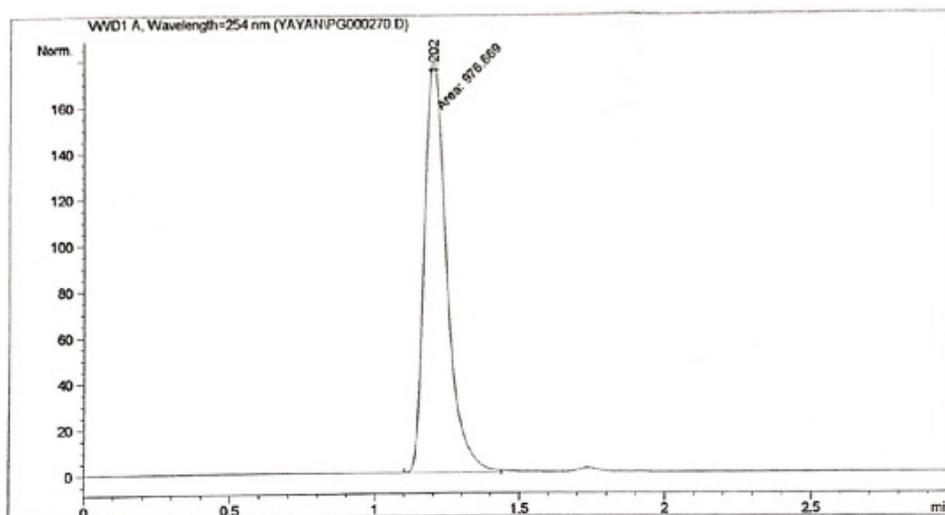


Figura B.22. Cromatograma del medio orina artificial a 254 nm. FM 10 {50% ACN, 10% H₂O, 40% disolución acuosa de ácido fosfórico/dihidrogenofosfato pH 2,6}. Flujo 1,0 ml/min.

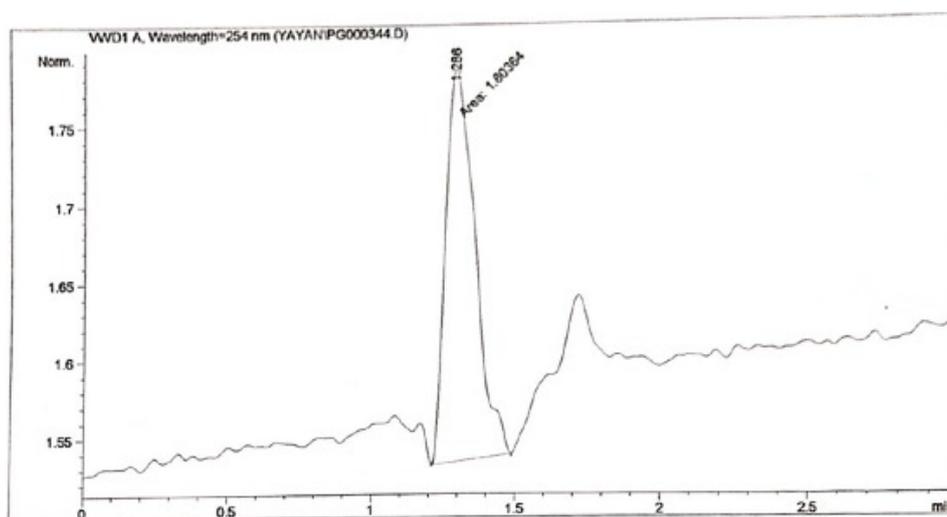


Figura B.23. Cromatograma de agua desionizada (blanco) a 254 nm. FM 10 {50% ACN, 10% H₂O, 40% disolución acuosa de ácido fosfórico/dihidrogenofosfato pH 2,6}. Flujo 1,0 ml/min.

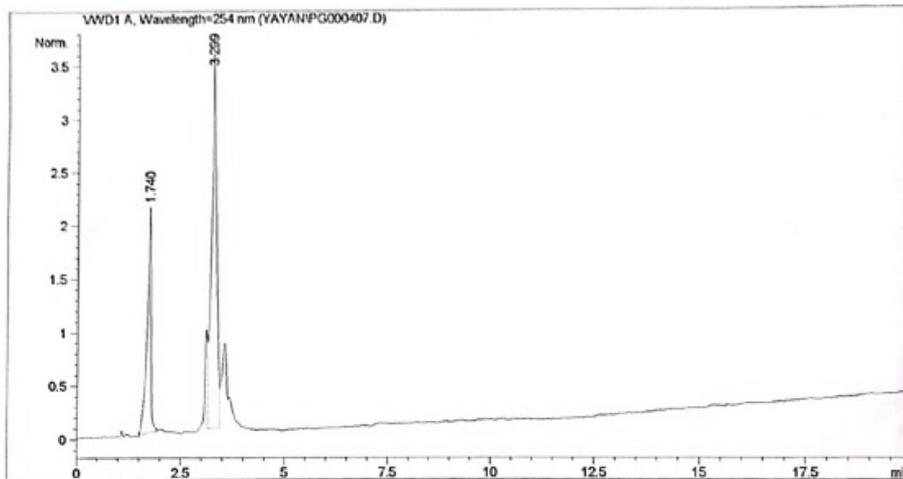
Columna polar ciano

Figura B.24. Cromatograma de PG/H₂O 60 ppm a 254 nm. FM A {50% ACN, 50% MeOH}. Flujo 1,0 ml/min.

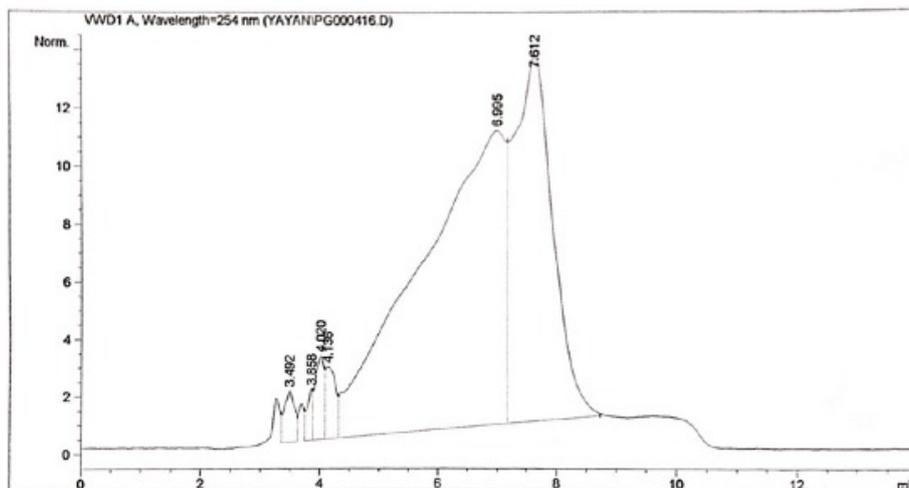


Figura B.25. Cromatograma de PG/orina 30 ppm a 254 nm. FM E {30% ACN, 60% MeOH, 10% disolución acuosa de ácido fosfórico/dihidrogenofosfato pH 2,6}. Flujo 1,0 ml/min.

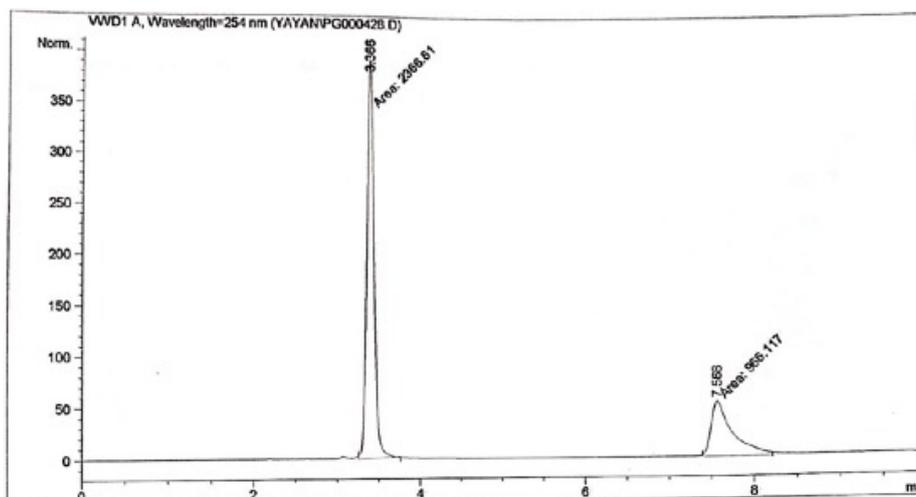


Figura B.26. Cromatograma de muestra Malarone original (réplica 1)/MeOH a 254 nm. FM E {30% ACN, 60% MeOH, 10% disolución acuosa de ácido fosfórico/dihidrogenofosfato pH 3,8}. Flujo 1,0 ml/min.

Sample Info : FM con gradiente
 30%AcN, 60%metanol, 10%tampón 2,6
 25%ACN, 60%Metanol, 15%tampón 2,6
 T^a=25°C, flujo 1ml/min, columna polar de ciano

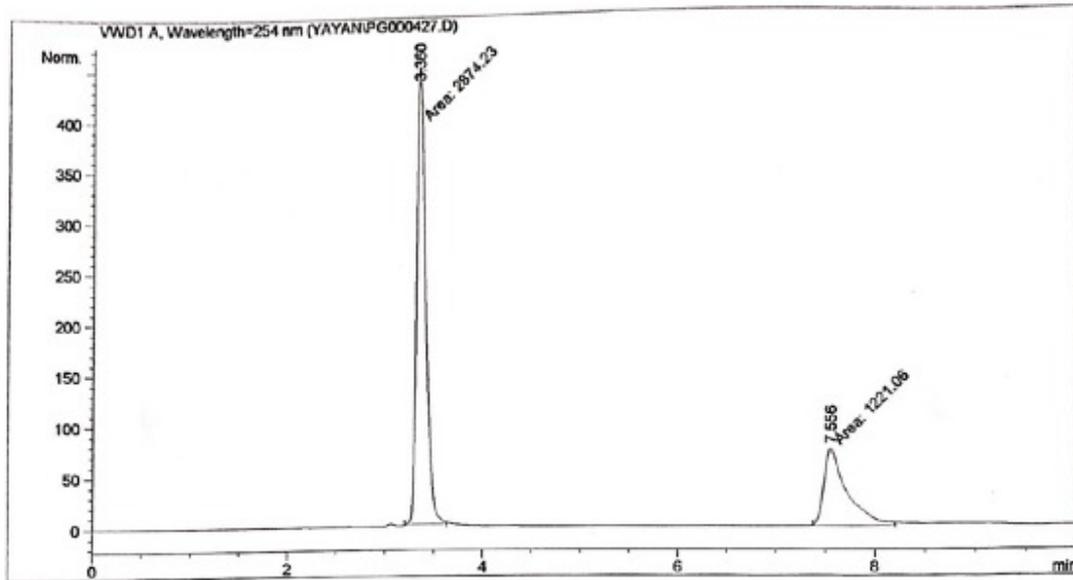


Figura B.27. Cromatograma de muestra Malarone original (réplica 1)/MeOH a 254 nm. Con FM **gradiente 1**.

Sample Info : FM con gradiente
 30%AcN, 60%metanol, 10%tampón 2,6
 20%ACN, 70%Metanol, 10%tampón 2,6
 T^a=25°C, flujo 1ml/min, columna polar de ciano

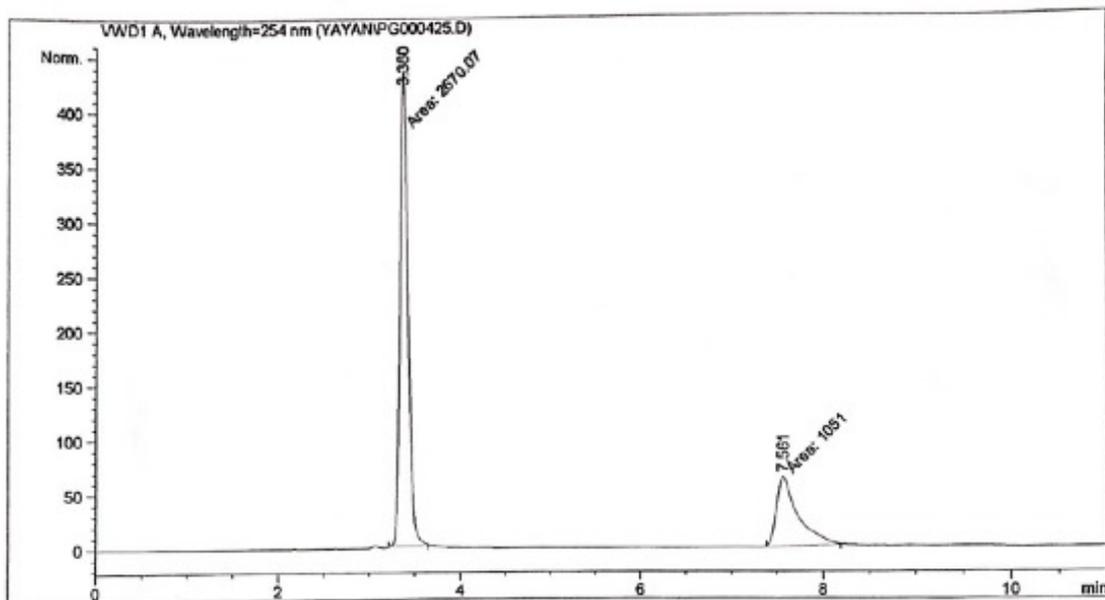


Figura B.28. Cromatograma de muestra Malarone original (réplica 1)/MeOH a 254 nm. Con FM **gradiente 2**.

C) Espectroscopia Raman

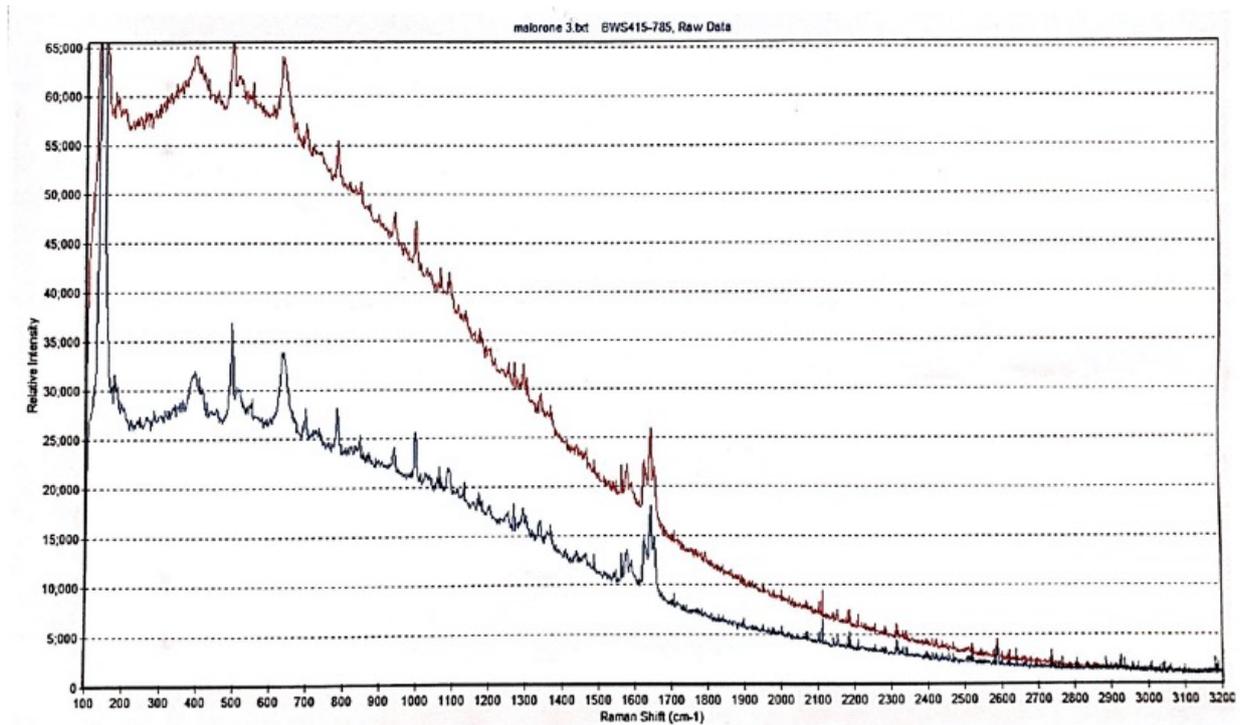


Figura C.1. Espectros Raman de Malarone con envoltorio en diferentes puntos de la muestra.

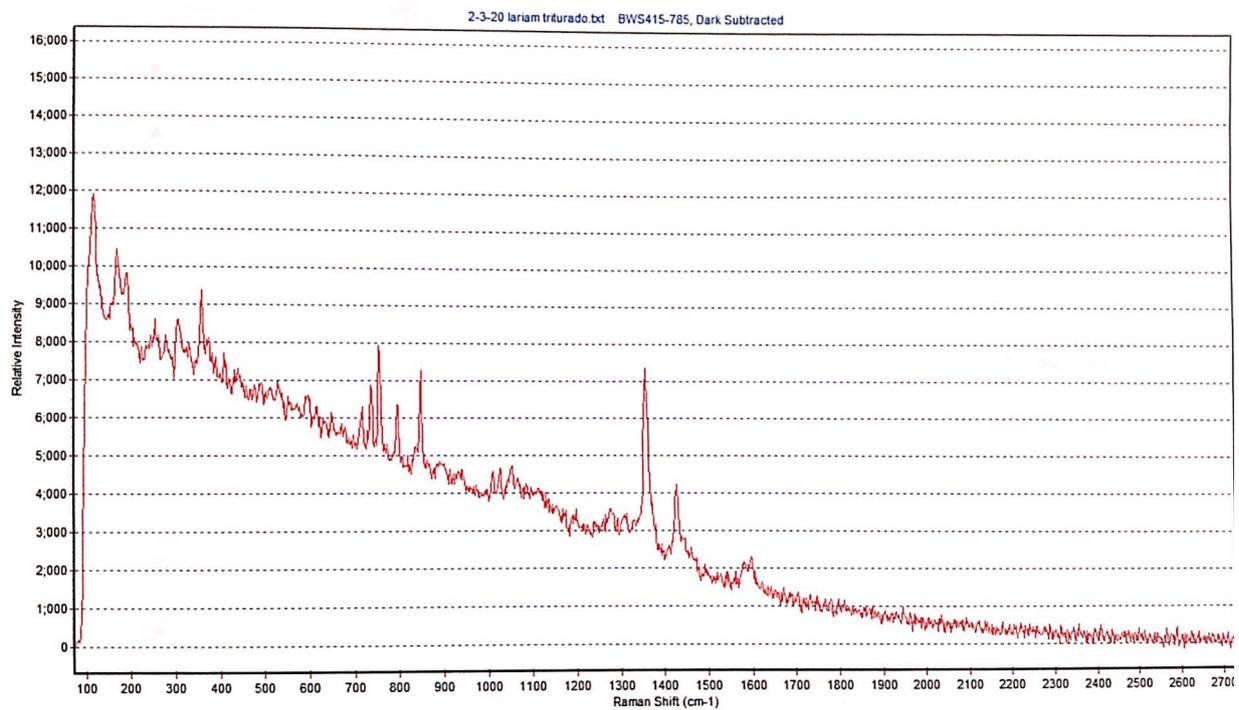


Figura C.2. Espectros Raman de Lariam triturado.

D) Espectroscopia IR

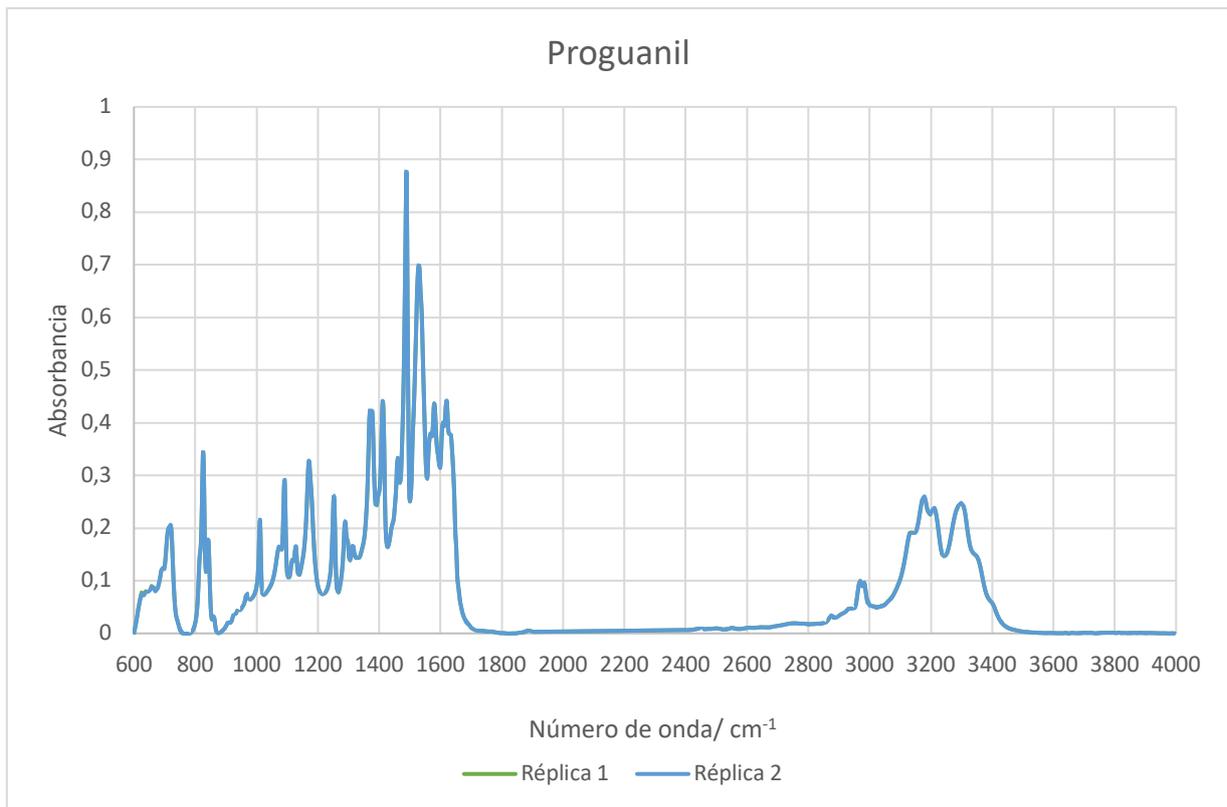


Figura D.1. Espectro IR de patrón proguanil.

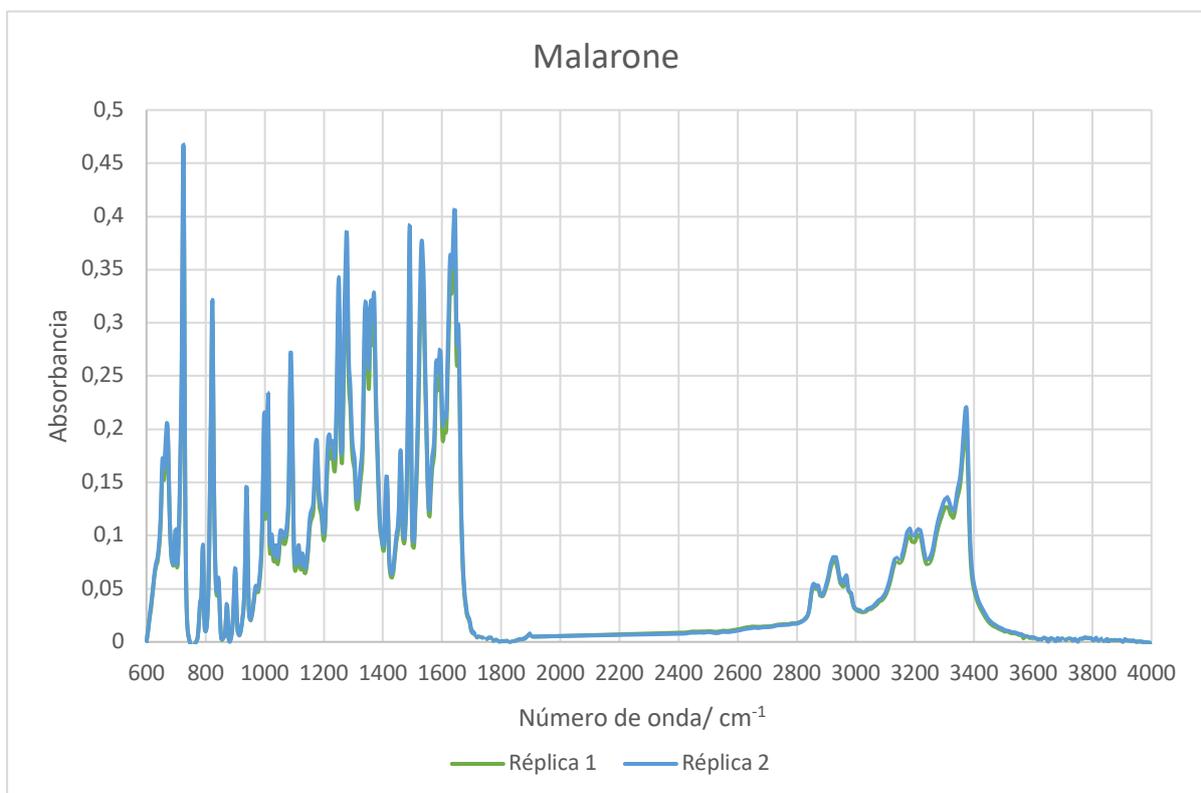


Figura D.2. Espectro IR de Malarone triturado.

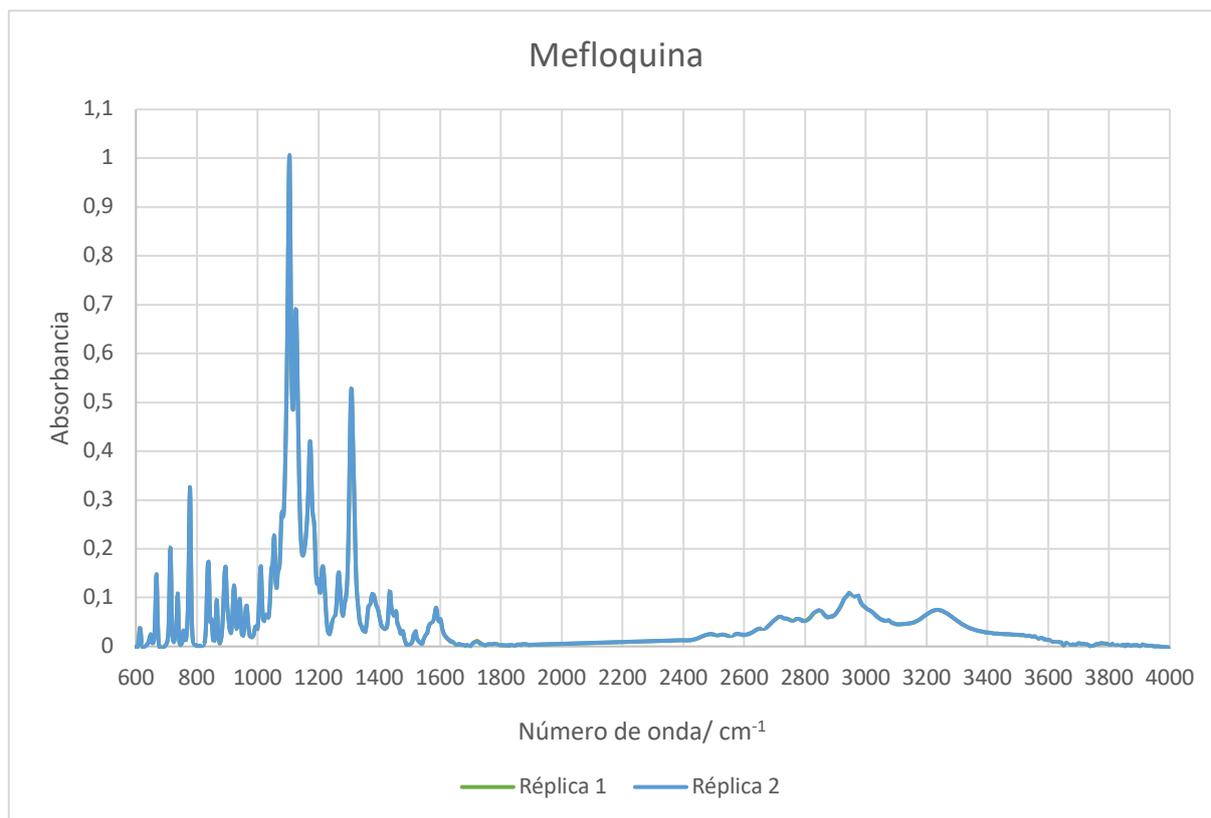


Figura D.3. Espectro IR de patrón mefloquina.

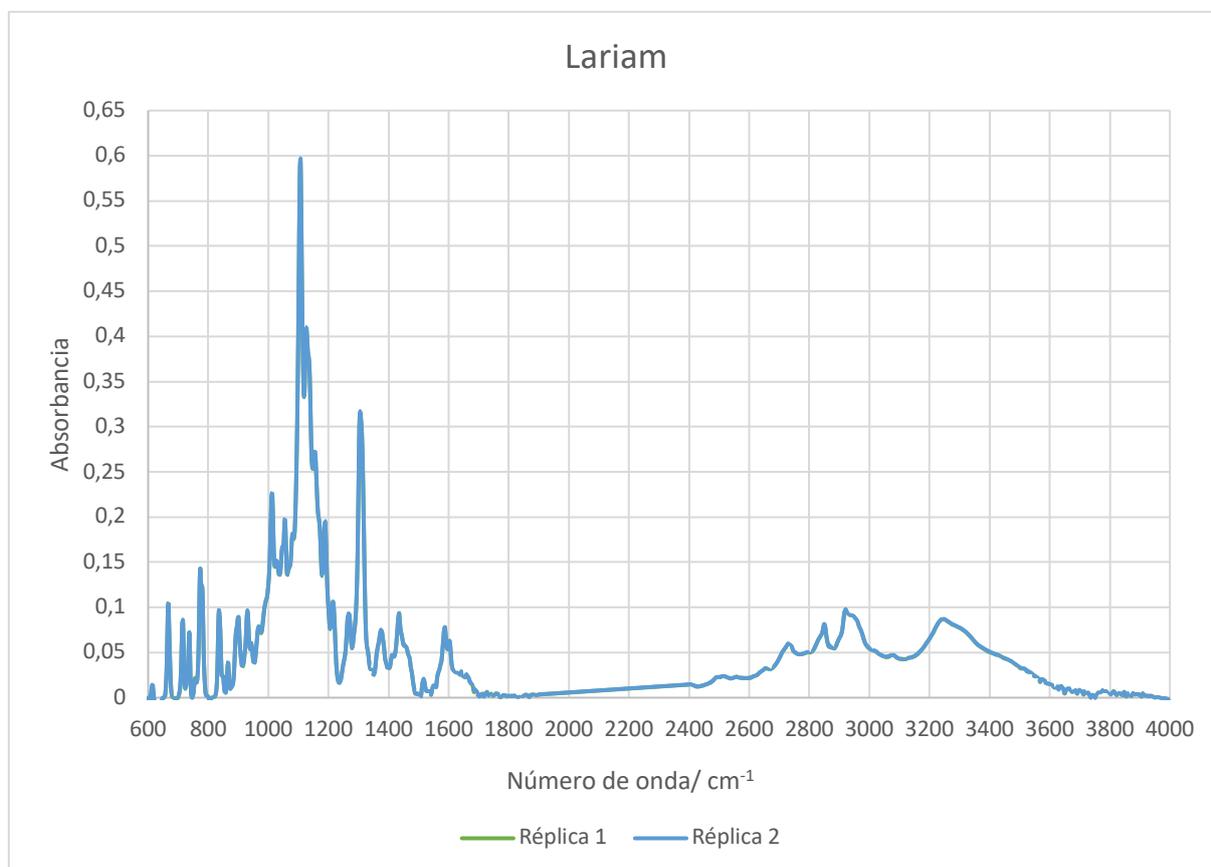


Figura D.4. Espectro IR de Lariam triturado.

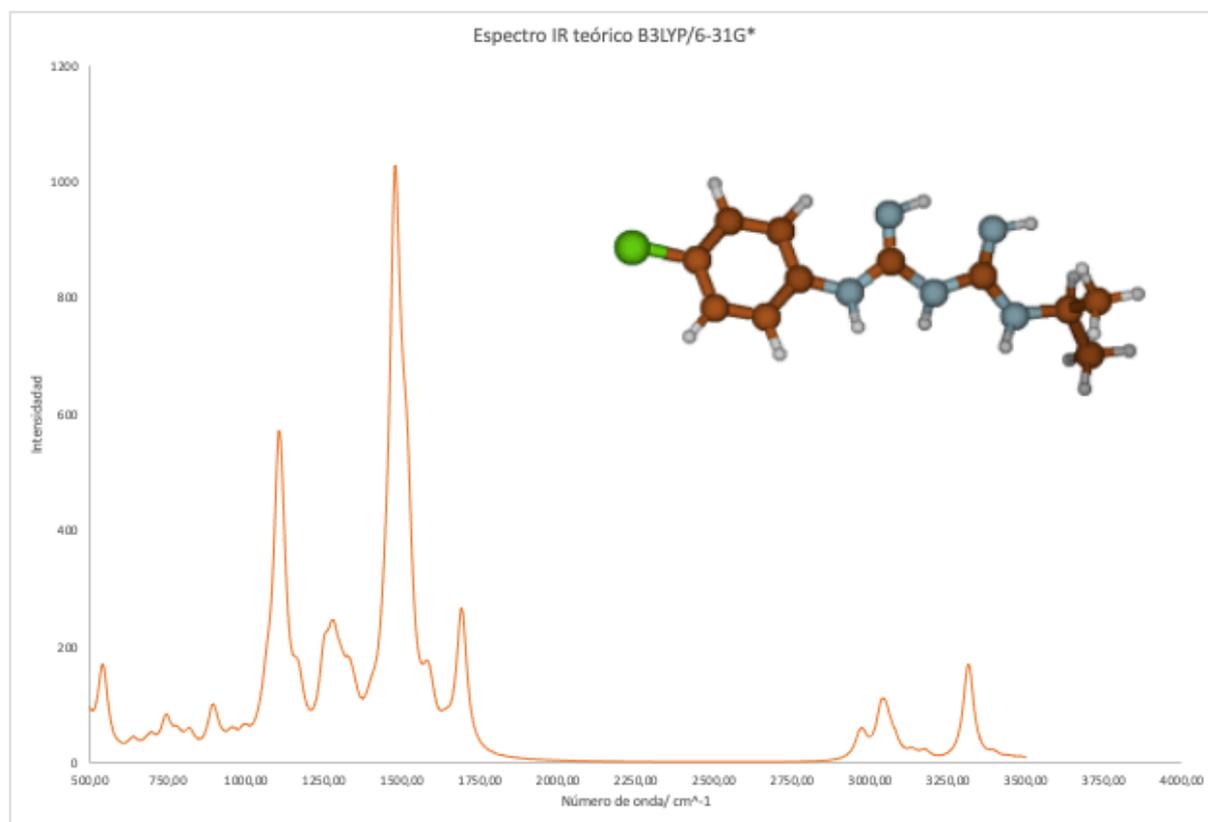


Figura D.5. Espectro IR de PG teórico a nivel B3LYP/6-31G* en fase gaseosa.

E) Resonancia magnética nuclear (RMN)

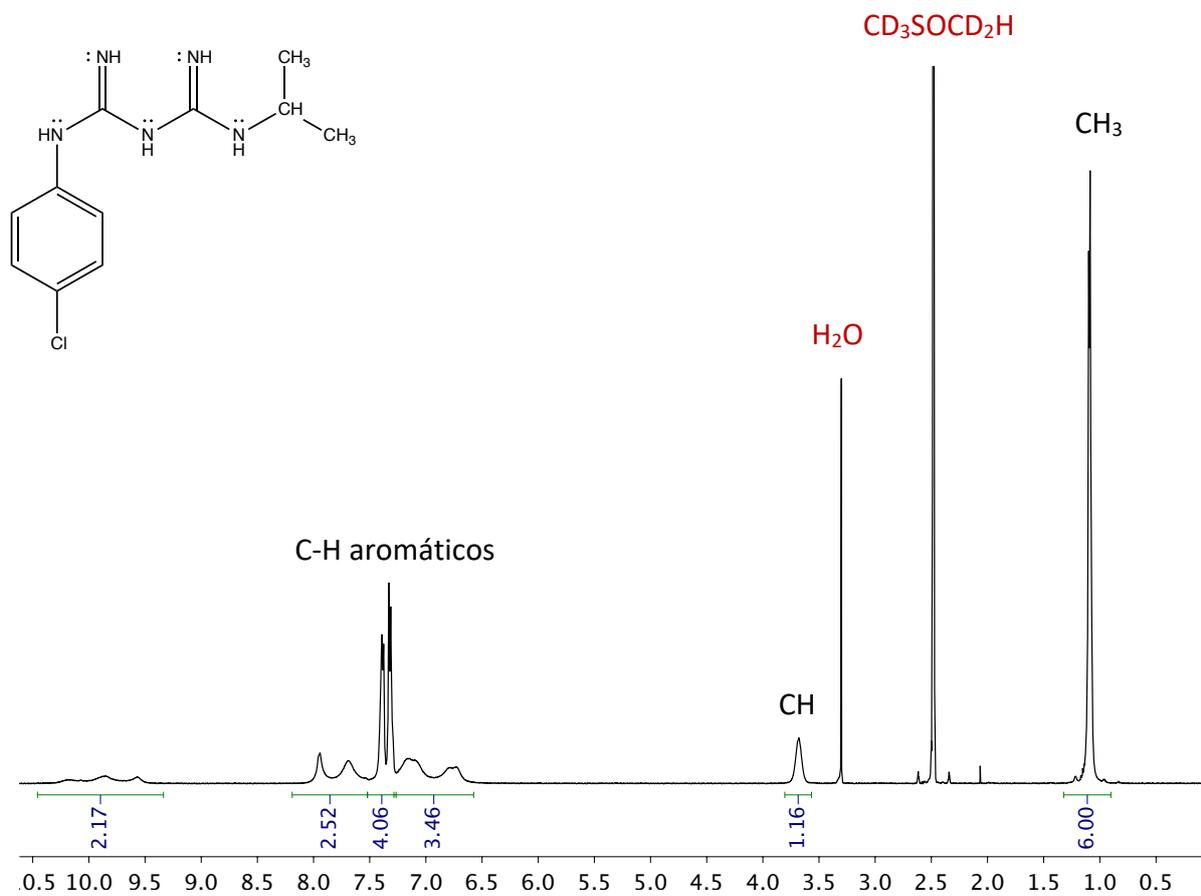


Figura E.1. Espectro RMN del patrón proganil {12 mg de PG en 0,5 ml de $\text{DMSO-}d_6$ }.

