

DESARROLLO DE UN METODO DE ANALISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE MEFLOQUINA EN SANGRE HUMANA SECADA SOBRE PAPEL DE FILTRO POR CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION CON DETECCION ULTRAVIOLETA

DEVELOPMENT OF AN ANALYSIS METHOD FOR DETERMINATION OF MEFLOQUINE IN WHOLE BLOOD SPOTTED ON FILTER PAPER BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH ULTRAVIOLET DETECTION

Diana M. Márquez F.,^{*1} Adriana L. Pabón V.,² Silvia Blair T.,² Carlos A. López C.^{3*} y Gladis Morales M.⁴

RESUMEN

Se valida el método de análisis para determinar mefloquina en sangre humana secada sobre papel de filtro Wathman No. 3 por HPLC con detección ultravioleta. Se hace extracción líquido-líquido y la separación se realiza con una columna C_{18} por elución isocrática; la fase móvil utilizada fue acetonitrilo : fosfato de potasio monobásico (40:60) y el analito fue monitoreado a 222 nm. Los límites de detección y cuantificación son de 97,5 ng / mL y 136,2 ng / mL respectivamente. La separación cromatográfica del analito demora 9 minutos y la cuantificación se hace por el método del estándar externo. Este método es relativamente simple, rápido y sensible y puede utilizarse para el monitoreo de estudios clínicos y farmacocinéticos.

Palabras Clave: *Mefloquina, validación, estudios de recuperación.*

ABSTRACT

A high-performance liquid chromatography method, with ultraviolet detection for the determination of mefloquine in human blood dried on Wathman No. 3 filter paper, is standardized. A liquid-liquid extraction is realized and the compound is separated on a C_{18} column by isocratic elution; the mobile phase is acetonitrile : potassium phosphate buffer (40:60) and the analyte is monitored at 222 nm. The detection and quantification limits are 97,5 ng / mL y 136,2 ng / mL respectively. The chromatographic separation takes 9 minutes and the analyte is quantified for the method of the external standard. This method is simple, fast and sensitive and can be used for the monitoring of pharmacokinetic and clinic studies.

Keywords: *Mefloquine, validation, recovery studies.*

1 Grupo de Productos Naturales Marinos. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. A.A 1226. Medellín-Colombia.

2 Grupo Malaria, Facultad de Medicina Universidad de Antioquia. A.A 1226. Medellín-Colombia.

3 Grupo de Análisis de Residuos, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Antioquia. A.A 1226. Medellín-Colombia.

4 Grupo de Investigación de Estudios Moleculares. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Antioquia. A.A 1226. Medellín-Colombia.

* Autores a quien se debe dirigir la correspondencia: dmarquez@farmacia.udea.edu.co ; carlopez@matematicas.udea.edu.co

INTRODUCCIÓN

La mefloquina es un medicamento profiláctico antimalárico usado en los casos en que el *Plasmodium falciparum* es resistente a la cloroquina y cuando los pacientes con malaria han presentado muchos efectos secundarios durante el tratamiento profiláctico con sulfadoxina-pirimetamina.

Para determinar las concentraciones de antimaláricos en fluidos biológicos como una manera de medir su eficacia, se han realizado algunos estudios en plasma por HPLC [1-7] y en sangre humana para determinar sulfadoxina y pirimetamina de sangre impregnada sobre papel de filtro utilizando extracción en fase sólida en la preparación de la muestra [8]. Particularmente se han reportado análisis de la mefloquina (Figura 1) por HPLC, utilizando diferentes procedimientos de derivatización en algunos de ellos usando detector de captura de electrones y en otros espectrometría de masas [9-14].

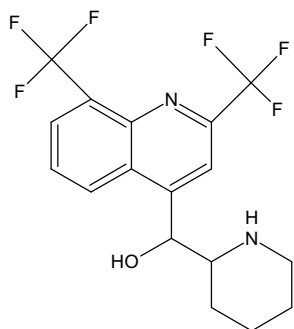


Figura 1. Estructura de la Mefloquina

Con el fin de facilitar el análisis de la mefloquina, evitando la extracción en fase sólida como método de preparación de muestra complejo y costoso y tratando de disminuir el riesgo de contagio de virus del VIH o microorganismos causantes de otras enfermedades contenidos en la sangre del paciente por parte del personal de laboratorio, se desarrolló y validó un método en el cual la preparación de la muestra es más sencilla, utilizando una extracción líquido-líquido y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detección ultravioleta para la determinación final del analito.

PARTE EXPERIMENTAL

Reactivos

Para la validación del método se utilizaron los siguientes reactivos: fosfato de potasio monobásico (Merck), fosfato de potasio dibásico (Carlo Erba), cloroformo (Mallinckrodt), acetonitrilo grado HPLC (EM Science), ácido clorhídrico concentrado (J.T.Baker), hidróxido de amonio (EM Science), cloruro de amonio (Merck), papel filtro Whatman No. 3.

Equipos y Condiciones Cromatográficas

Los equipos utilizados fueron: micropipetas de 1-20 μL , 10-200 μL y 100-1000 μL (Wilson), vortex (Schott), centrífuga 5416 para viales eppendorf (Brikmann) con capacidad para 18 viales, ultrasonido (Ultrasonic LC60H Elma). Para la separación cromatográfica se utilizó un cromatógrafo líquido marca Agilent serie 1100 con inyector manual Rheodyne serie 1100, bomba isocrática serie 1100, detector ultravioleta programable serie 1100, software Agilent ChemStations para HPLC y computador compatible.

Para el desarrollo del método para la determinación de mefloquina en sangre se utilizó una columna LiChrospher[®] 100 RP-18 (5 μm) en LiChroCART[®] 125-4 con precolumna RP-18, marca Merck, utilizando como fase móvil acetonitrilo : buffer fosfato de potasio monobásico a pH de 3,0 en proporción 40 : 60 y un flujo de 1,2 mL / min. El compuesto fue monitoreado a 222 nm. El volumen de muestra inyectada fue de 20 μL y para la cuantificación del analito se utilizó el método del estándar externo.

Patrón de Referencia

Se utilizó como referencia un estándar secundario de mefloquina lote 106144-01PO133 suministrado por Laboratorios Mepha S.A. (Bogotá).

Soluciones Estándar de Mefloquina

Se pesaron 5 mg de mefloquina y se disolvieron en 10 mL de metanol para obtener una concentración final de 500 $\mu\text{g/mL}$. De esta solución patrón se tomaron 320 μL , 120 μL y 40 μL y se diluyeron a 10mL con metanol para obtener soluciones estándares de 16 $\mu\text{g/mL}$, 6 $\mu\text{g/mL}$ y 2 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Para preparar los estándares de 0,6 $\mu\text{g/}$

mL y 0,2 µg/mL se tomó una alícuota de 375 µL y 125 µL de la solución de 16 µg/mL y se diluyó a 10 mL, respectivamente. Para preparar el estándar de 0,15 µg/mL se tomó una alícuota de 600 µL de la solución de 0,2 µg/mL y se completó volumen a 800 µL con metanol. Se inyectaron los siguientes estándares al cromatógrafo líquido: 6 µg/mL, 2 µg/mL, 0,6 µg/mL, 0,2 µg/mL y 0,15 µg/mL.

Preparación de Muestras

Se colocaron 100 µL de sangre en un papel filtro Wathman No. 3 y se dejó secar a temperatura ambiente. El papel filtro se cortó en pequeños pedazos, se introdujo en un vial de 2 mL y se le adicionó en su orden: 300 µL de búfer amoniorcloruro de amonio pH 9,0. La muestra se agitó en un vortex durante 1 minuto, se adicionó 700 µL de cloroformo y se volvió a agitar durante 2 minutos. Luego se centrifugaron a 14000 RPM durante 30 minutos y después de este tiempo se retiró la fase acuosa, y la fase orgánica se secó a temperatura ambiente. El residuo se disolvió en 1 mL de fase móvil, se filtró y luego fue inyectado al cromatógrafo líquido. El procedimiento se repitió con una concentración de 2 µg/mL.

Estudios de Recuperación

Se realizaron los estudios de recuperación adicionando a muestras de sangre blanco libres de mefloquina 2 niveles de concentración: 0,6 µg/mL, y 0,2 µg/mL de mefloquina. Tanto la muestra como el estándar fueron inyectados al cromatógrafo líquido y se calculó la cantidad del analito extraído. El porcentaje de recuperación (%R) se halló a través de la siguiente fórmula:

$$\% R = (\text{Cantidad de analito hallado}) / (\text{Cantidad de analito esperado}) \times 100 \text{ (Véase Tabla 1).}$$

Selectividad

Para determinar la selectividad (especificidad) del método de análisis se inyectaron la fase móvil, el placebo y la muestra enriquecida con el principio activo previo el proceso de extracción y el estándar del analito, con el fin de determinar si había alguna interferencia producida por la fase móvil o la matriz de la muestra con la señal de la mefloquina (Véase figura 2) [15-21].

Linealidad

La curva de calibración se realizó en el siguiente rango: 0,15 – 6,0 µg/mL y se construyó de la medida del área bajo la curva del pico del analito versus la concentración de cada solución estándar [15-21]. Las concentraciones de soluciones estándares para la curva de calibración fueron: 0,15 µg/mL, 0,2 µg/mL, 0,6 µg/mL, 2 µg/mL y 6,0 µg/mL. Cada nivel de concentración se inyectó por triplicado y a los datos obtenidos se les realizó análisis de regresión lineal y además los datos fueron graficados.

Precisión

Para determinar la precisión se preparó una muestra de sangre dopada con 0,6 µg de mefloquina y se inyectó 10 veces [15-21].

Exactitud

La exactitud del método se determinó dopando 9 muestras a 3 niveles de concentración (0,2 µg/ml, 0,6 µg/ml y 2 µg/ml) y se determinó el porcentaje de recuperación [15-21].

Límites de Detección y Cuantificación

Los límites de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) se hallaron con el método de extrapolación a concentración cero [22].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron los siguientes porcentajes de recuperación medidos a dos niveles de concentración (Véase tabla 1).

Tabla 1. Resultados de los estudios de recuperación realizados a muestras de sangre enriquecidas con mefloquina a dos niveles de concentración.

Muestra (µg / mL)	% Mefloquina ± RSD
0,6	97,79 ± 3,84 (n = 5)
0,2	96,81 ± 7,17 (n = 5)

Durante la determinación de la selectividad (especificidad) se concluyó que no existía ninguna interferencia con la señal del analito y que por lo tanto la señal observada correspondía al analito en estudio.

El coeficiente de correlación para la curva de calibración fue de 0,99967 y el r² de 0,999341 (Véanse figuras 2a, 2b y tabla 2).

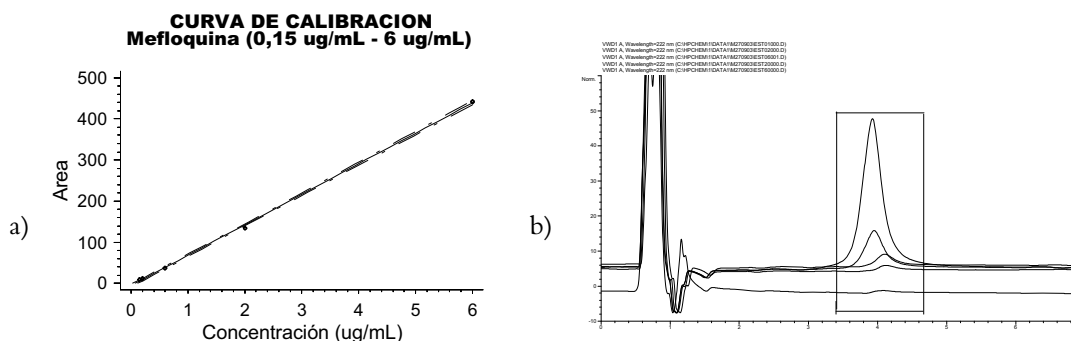


Figura 2. a) Curva de calibración de la mefloquina, b) Cromatogramas de los estándares de mefloquina (6 µg/µL, 2 µg/µL, 0,6 µg/µL, 0,2 µg/µL y 0,15 µg/µL).

Tabla 2. Resultados del análisis de regresión realizado a la curva de calibración de la mefloquina (N=15).

Parámetro	Estimado	Error Estándar	T estadístico	Valor P
Intercepto	-5,64401	1,50169	-3,75843	0,0024
Pendiente	74,1423	0,528147	140,382	0,0000
Total (Corr.)	Coefficiente de correlación	R-cuadrado (r^2)	Razón F	Error Est. estimado
402,685	0,99967 (r)	0,999341	19707,10	4,51885

Los datos anteriores muestran los resultados de un modelo de regresión lineal para describir la relación entre el área y la concentración de mefloquina. La ecuación que describe el modelo es: $y = -5,64401 + 74,1423X$. Como el valor P en la tabla es menor a 0,05, hay una relación estadísticamente significativa entre el área y la concentración de la mefloquina un nivel de confianza del 95%.

La hipótesis nula es la no correlación entre Y y X. Como el t de la pendiente es mayor que el t de tablas, se rechaza la hipótesis nula, siendo la correlación lineal estadísticamente significativa.

Para el ensayo de precisión, teniendo como referencia los valores dados por Horwitz [22] para una concentración de analito de 100 ng/mL en la muestra, el valor máximo permitido para el coeficiente de variación es 16 por lo tanto, el coeficiente de variación del analito (0,63) encuentra dentro del límite establecido. Esto permite inferir que el método es preciso para un intervalo de confianza individual (95%) de 98,18% -100,98% y un intervalo de confianza de la media (95%) de 99,14 % -100,02% con n-2 (10-2) grados de libertad.

Para determinar la exactitud del método se tomaron los datos obtenidos de los estudios de re-

cuperación realizados a 3 niveles de concentración (Véase figura 5) y a los datos obtenidos se les realizó el test de Cöchran obteniéndose un valor de 0,8143. Este valor se comparó con el valor G de la tabla de 0,8709 y se determinó que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados. Para la prueba t de Student se obtuvo un valor de 0,5002 el cual comparado con el valor t de la tabla de 2,306 es menor, lo cual indica que no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100 confirmando la exactitud del método (Véase tabla 3).

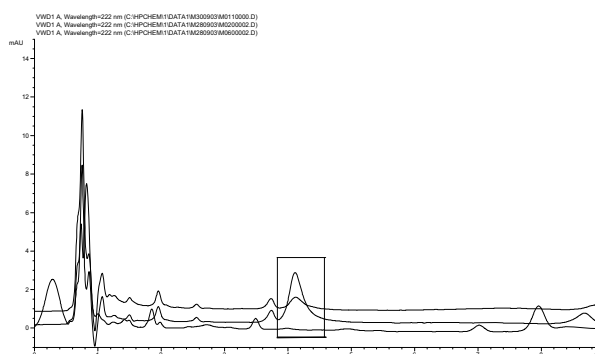


Figura 4. Cromatogramas de muestras de sangre dopadas con mefloquina a tres niveles de concentración.

Tabla 3. Porcentajes de recuperación de muestras de sangre dopadas con mefloquina a tres niveles de concentración.

Nivel de concentración	% Hallado	% Media \pm S
0,2 μg / ml	99,11 99,26 99,92	99,43 \pm 0,4309
0,6 μg / ml	101,82 101,39 101,26	101,49 \pm 0,2931
2 μg / ml	99,31 100,60 101,48	100,46 \pm 1,0914

Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) fueron de 97,5 ng/mL y 136,2 ng/mL respectivamente.

CONCLUSIONES

Este método es adecuado para la determinación de mefloquina en 100 mL de sangre impregnada en papel de filtro. Esta forma de toma de muestra facilita su conservación y transporte ya que se disminuye el riesgo de pérdida por ruptura o caída de la muestra líquida. Además, la manera de conservar la muestra facilita su manipulación y minimiza el riesgo de contaminación por contacto.

Además, la evaluación de los parámetros demostró que el método es selectivo, presenta linealidad, es preciso y exacto para la determinación de mefloquina en sangre secada sobre papel filtro. Este método también puede ser utilizado para el monitoreo de dicho metabolito durante estudios farmacocinéticos o clínicos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Seccional de Salud de Antioquia y a la Universidad de Antioquia por la financiación del proyecto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Edstein M. (1984). Simultaneous measurement of sulphadoxine, N4acetylsulphadoxine and pyrimethamine in human plasma. *J. Chromatogr.* 305:502-7.
- Bergqvist Y, Eriksson M. (1985). Simultaneous determination of pyrimethamine and sulphadoxine in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 79(3):297-301.
- Eljaschewitsch J, Padberg J, Schurmann D, Ruf B. (1996). High-performance liquid chromatography determination of pyrimethamine, dapson, monoacetyldapson, sulfadoxine, and N-acetyl-sulfadoxine after rapid solid-phase extraction. *Ther Drug Monit.* Oct;18(5):592-7.
- Edstein M. (1984). Quantification of antimalarial drugs. II. Simultaneous measurement of dapson, monoacetyldapson and pyrimethamine in human plasma. *J. Chromatogr.* 307:426-31.
- Edstein MD, Lika ID, Chongsuphajaisiddhi T, Sabchareon A,

Webster HK. (1991). Quantitation of Fansimef components (mefloquine + sulphadoxine + pyrimethamine) in human plasma by two high-performance liquid chromatographic methods. *Ther Drug Monit. Mar;*13(2):146-51.

- Astier H., Renard C., Cheminel V., Soares O., Mounier C., Peyron F. and Chaulet J.F. (1997). Simultaneous determination of pyrimethamine and sulphadoxine in human plasma by high-performance liquid chromatography after automated liquid-solid extraction. *J. Chromatog. B.* 698; 217-223.
- Hellgren U., Angel, V.H., Bergqvist Y., Arvidsson A., Forero J.S., and Rombo L. (1990). Plasma concentrations of sulphadoxine-pyrimethamine and of mefloquine during regular long term malaria prophylaxis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* (84), 46-49.
- Green M.D., Mount D.L., and Netley H. (2002). High-performance liquid chromatography assay for the simultaneous determination of sulphadoxine and pyrimethamine from whole blood dried onto filter paper. *J. Chromatog. B.* 767; 159-162.
- Bergqvist Y., and Churchill F.C. (1988). Detection and Determination of Antimalarial Drugs and their Metabolites in Body Fluids. *J. Chromatog.* 434, 1-20.
- Bergqvist Y., Churchill F.C. and Mount D.L. (1988). Determination of Mefloquine by Electron-Capture Gas Chromatography after Phosgene Derivatization in Biological Samples and in Capillary Blood Collected on Filter Paper. *J. Chromatog.* 428, 281-290.
- Nakagawa T., Higuchi T., Haslam J.L., Shaffer R.D. and Mendenhall D.W. (1979). GLC determination of whole blood antimalarial concentrations. *J. Pharm. Sci.*, 68 (6), 718-721.
- Schwartz D.E. and Ranalder U.B. (1981). Determination of mefloquine by electron-capture gas chromatography after phosgene derivatization in biological samples and in capillary blood collected on filter paper. *Biomed. Mass Spectrom.* 428 (8), 589-592.
- Heizmann P. and Geschke R. (1984). Determination of the antimalarial mefloquine in human plasma by gas chromatography with electron-capture detection. *J. Chromatog.* 311, 411-417.
- Mount DL, Churchill FC, Bergqvist Y. (1991). Determination of mefloquine in blood, filter paper-absorbed blood and urine by 9-fluorenylmethyl chloroformate derivatization followed by liquid chromatography with fluorescence detection. *Mar* 8; 564 (1):181-93.
- Quattrochi, O. A., Abelaira de A. S., y Laba R.F. (1992). Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica. Artes Gráficas Farro S.A. Argentina, p{ags., 279-324.
- Food and Drugs Administration (FDA). Reviewer Guidance. Validation of Chromatographic Methods. Center for Drugs Evaluation and Research (CDER). November 1994. <http://www.fda.gov/cder/guidance/cmc3.pdf>. Fecha de acceso: Marzo de 2002.
- International Conference of Harmonisation (ICH). (1996). Guidance for Industry. Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. November ICH. www.fda.gov/cder/guidance/1320fnl.pdf. Fecha de acceso: Marzo de 2002.
- Eurachem. (1998) The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. December. 1-61.
- Swartz, M.E. and Krull I.S. (1998) Validation of Chromatographic Methods. *Pharmaceutical Technology Magazine.* March, 104, p.,104-119.
- Analytical Procedures and Method Validation: Highlights of FDA's Draft Guidance. LC-GC, volume 19, number 1, January (2001). <http://www.fda.gov/cder/guidance/2396dft.htm>. Fecha de acceso: Marzo de 2002.
- Krull I and Swartz M. (1998). Validation of Analytical Methods: Reviews And Strategies. *LC-GC International.* December, 16 (12) p. 96-105.
- Castro C.M. Gascón F., Sebastiá, Pujol F., Martí, Sans R., Josep M., Pla, Lluís V. (1989). Validación de Métodos Analíticos. Comisión de Normas de Buena Fabricación y Control de Calidad. A.E.F.E., Septiembre . 25-40.

Fecha de Recibo: Febrero 27 de 2004
Fecha de Aceptación: Abril 20 de 2004