

42



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

“MÉTODOS DE SEPARACIÓN PARA EL ANÁLISIS
QUÍMICO Y EL DESARROLLO TECNOLÓGICO”.
“OBTENCION DE DICLOFENACO METÍLICO Y SU
DETERMINACION POR CROMATOGRAFIA DE
GASES”.

INFORME DE SERVICIO SOCIAL-TITULACION

QUE PARA OBTENER EL TITULO
DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A

ALEJANDRA VAZQUEZ FLORES

ASESORES *Q.F.B. ELIA GRANADOS ENRIQUEZ*
DR. RENE MIRANDA RUVALCABA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE MEXICO
CUAUTITLAN, EDO. DE MEXICO



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

AT'N. Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el Trabajo de:

El Servicio Social Titulación: "Métodos de Separación para el
Análisis Químico y el Desarrollo Tecnológico". "Obtención de
Diclofenaco Metílico y su determinación por Cromatografía de Gases".

que presenta la pasante: Alejandra Vázquez Flores
con número de cuenta: 8304371-6 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

A T E N T A M E N T E.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 20 de Febrero de 2001

PRESIDENTE	<u>M. en C. Guadalupe Pérez Caballero</u>	
VOCAL	<u>Q.F.B. Elia Granados Arriquez</u>	
SECRETARIO	<u>Q.F.B. Guadalupe Reboilar Barrera</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Dra. Adriana Morales Pérez</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Dra. Adriana Ganem Rondero</u>	

Dedicatorias

A Dios:

¡ Gracias padre ! por marcar en mi vida el tiempo de decisión, fortaleza, valor para con todos mis caminos

"Yo te amo señor, mi fuerza El señor es mi roca y mi fortaleza, es mi libertador y es mi Dios, es la Roca que me da seguridad es mi escudo y me da victoria".

Jul 18 2

*A mis Padres: Silvestro Vásquez Montano y Amenas Flores Pinos
Para ustedes padres míos dedico este logro hoy alcanzado, gracias por su amor, confianza entusiasmo y entrega para forjar los cimientos de mi camino. Los amo.*

A mis Hermanos: Silvia, Edmundo y Diego:

A ustedes dedico el presente trabajo, gracias su amor incondicional, por su apoyo, por esa gran unidad en la que hemos y seguiremos creciendo. Los amo

A mi Esposa: Amanda

A te amor, con el que comparto alegrías y tristezas, te ofrezco este logro, gracias por tu apoyo. Te amo.

A mis Hijos: Diego Armando, Emmanuel, Fabián Edmundo

A ustedes hijos dedico mi trabajo, gracias por su amor, paciencia desvelo, quisiera que este logro sea un apoyo para su presente formación, ya que ustedes son el motor irreplaceable de mi energía para todas mis inquietudes y logros. Los amo.

A mis Sobrinos: Juan Cristóbal, y Jaqueline.

*Quisiera brindarles con mi trabajo una fuente de enseñanza y contribuir así en su formación
Gracias. Los amo.*

Agradecimientos

A Mis Mesores de Feys

Química Analítica: C.F.B. Elita Granados Esquivares
A ti por ser mi mejor amiga, gracias por contribuir en mi formación profesional y ética,
por tu apoyo y paciencia brindado en forma incondicional, por creer en mí. Gracias.

Química Orgánica: Dr. Rene Miranda Ruvalcaba

A usted Doctor, gracias por brindarme su confianza y su apoyo de manera incondicional
Así como por contribuir a mi formación profesional y ética. Le expreso mi más grande
admiración.

Gracias

Sección de Química Analítica y Química Orgánica

Aprendo de todas las personas que me apoyaron con su colaboración y sus consejos para
mejorar este trabajo Laura Gómez, Reynaldo Garduño, Gabriel Arroyo, Jorge Escobar, Eva
Hernández, Roberto Onaya, Inés Nicolás, Olicia Noguera, Bernardo Francisco, Judith
García, Alina Revulla, Julio Botello, Gabriele Vargas, Flora Livaro. Gracias

M en C. Rita Armas (I.P.M. C. DANIELA FERRER)

Por sus consejos para la elaboración experimental en el presente trabajo. Gracias

A Ing. Jose Luis Velasco (INSTITUTO DE QUÍMICA)

Por la realización de los estudios en Espectrometría de Masas, en el presente trabajo. Gracias.

A Maestros del Jurado

Por su apoyo y sus consejos aportados para mejorar la calidad del presente trabajo. Gracias

A Maestros de esta Facultad

Por brindarme con sus conocimientos la oportunidad de ser un profesionalista. Gracias.

A Rosa Elva Alfaro (Servicio Social) F.C.P. C)

Gracias por tu apoyo para llevar a cabo la finalización de este trabajo.

A Genoveva Bartolo y su Familia

Gracias por su apoyo, trabajo, espacio para llevar a cabo la finalización de este trabajo.

A C. Angel Lucha Fuentes

Gracias por apoyarme con tu tiempo, trabajo para llevar a cabo este trabajo.

M en C. Hugo González Bejarano

Gracias por su confianza y apoyo para que este trabajo pudiese ser finalizado

ÍNDICE GENERAL

I. Índice General	1
1. Índice de figuras	3
2. Índice de tablas	4
3. Índice de gráficas experimentales	4
II. Glosario	5
III. Generalidades	
1. Introducción	6
2. Propiedades del diclofenaco sódico	8
3. Aspectos teóricos	9
3.1 La cromatografía de gases	9
3.1.1. Aspectos teóricos	9
3.2 Instrumentación de la cromatografía de gases	16
3.2.1 Componentes básicos	16
3.2.2 Control de velocidad de flujo	17
3.2.3. Columna	17
3.2.4. Fases estacionarias	17
3.2.4.1 Fases liquidas	17
3.2.5. Control de temperaturas	18
3.2.6. Detector de ionización de flama	19
3.3. Formación de derivados	21
IV. Objetivos	22
V. Cuadro Metodológico	23
VI. Equipo, Material y Reactivos	24

VII. Desarrollo Experimental y Discusión de Resultados

1. Parte Orgánica	
1.1. Metilación de diclofenaco sódico	26
1.2. Purificación	29
1.3. Solubilidad	30
1.4. Rendimiento	30
1.5. Identificación	31
2. Determinación del éster metílico de diclofenaco	34
2.1. Pruebas preliminares para la determinación del éster metílico de diclofenaco	34
2.2. Búsqueda de condiciones adecuadas para la determinación en la CG de (temperatura de columna y velocidad de flujo)	36
2.3. Método general para la determinación indirecta de diclofenaco sódico	41
2.3.1. Linealidad del sistema	42
3. Discusión de Resultados	43

VIII. Conclusiones 45

IX. Bibliografía 46

X. Apéndice 48

1. Índice de figuras

Figura 1.	Esterificación del DCLF	7
Figura 2.	Curva normal o gaussiana, cromatograma típico	11
Figura 3.	Mecanismos de ensanchamiento de banda	15
Figura 4.	Gráfico de Van Deemter para curva hipotética	15
Figura 5.	Esquema de un cromatografo de gases	16
Figura 6.	Esquema simplificado de un detector de ionización de flama	20
Figura 7.	Distribución de una cromatoplaca	27
Figura 8.	Montaje utilizado para determinar el desarrollo de una cromatoplaca	27
Figura 9.	Montaje del equipo quick-fit utilizado para llevar a cabo la reacción de esterificación	28
Figura 10.	Elección del sistema del eluyente <i>para ccf</i>	28
Figura 11.	Tiempo de reacción de metilación	29
Figura 12.	Espectro de masas del diclofenaco de metilo, obtenido por impacto electrónico a 70 ev y datos correspondientes de alta resolución	32
Figura 13.	Espectro cid-linked scans para el ion molecular del éster metílico de diclofenaco, obtenido por una relación B/E constante	33
Figura 14.	Experimento cid-linked scans para el fragmento (M-MeOH) ⁺ del éster metílico del diclofenaco obtenido de una relación B/E .constante	33
Figura 15.	Patrón de fragmentación del diclofenaco de metilo validado por CID-LS y EMAR	34
Figura 16.	Cromatograma del éster metílico de diclofenaco	36
Figura 17.	Espectrómetro de masas	49
Figura 18.	Ionización, fragmentación, separación, detección y registro de la acetona en un espectro de masas	50

2. Índice de tablas

Tabla 1.	Elección de fase móvil	26
Tabla 2.	Elección de disolvente	30
Tabla 3.	Resultado de rendimiento y punto de fusión	31
Tabla 4.	Determinación de temperatura de columna	38
Tabla 5.	Tiempos de retención y ancho de pico a diferente flujo	40
Tabla 6.	Platos teóricos en la determinación MEDCLF para verificar el efecto del flujo en la eficiencia de la separación	40
Tabla 7.	Linealidad del método	42

3. Índice de gráficas experimentales

Gráfica exp. 1.	Determinación de temperatura de columna	38
Gráfica exp. 2.	Determinación de flujo de nitrógeno	41
Gráfica exp. 3.	Linealidad del sistema	43

II. Glosario

C G	Cromatografía de gases
HPLC	Acrónimo en el idioma inglés (high performance liquid chromatography) para cromatografía de líquidos de alta resolución
IR	Espectrofotometría de absorción en el infrarrojo
UV	Espectrofotometría de absorción en el ultravioleta
DCLF	Diclofenaco
EMDCLF	Éster metílico del diclofenaco
LLC	Acrónimo en el idioma inglés (liquid-liquid chromatography) para cromatografía líquido-líquido
CGS	Cromatografía de gases-sólido
AEPT	Altura equivalente de platos teóricos
N	Número de platos teóricos
AcOEt	Acetato de etilo
$n\text{-C}_6\text{H}_{14}$	n -hexano
CHCl_3	Cloroformo
EMIE	Espectrometría de masas por impacto electrónico
EMAR	Espectrometría de masas mediante alta resolución
CID-LS	Acrónimo en el idioma inglés (collision induced dissociation linked scans) disociación por colisión inducida-para iones entrelazados
<i>ccf</i>	Cromatografía en capa fina
<i>cc</i>	Cromatografía en columna
<i>ca</i>	Condiciones ambientales

III Generalidades

1. Introducción. A principios de la década de los 90, no se contaba con un método específico para el análisis de diclofenaco sódico marcado en monografía de la farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos; por este motivo se establece un método para la determinación por cromatografía de gases (CG). En primer instancia se realiza una derivatización a MDCLF, debido a que la introducción del diclofenaco sódico en forma directa al cromatógrafo de gases no es posible, posteriormente se evalúan condiciones apropiadas para la determinación indirecta de diclofenaco sódico.

Es conveniente mencionar, que el análisis químico del diclofenaco se ha realizado ya mediante otras técnicas analíticas: en cromatografía de líquidos a alta resolución (HPLC) así como por espectrofotometría de absorción en el infrarrojo y en el ultravioleta (IR, UV). Para realizar la derivatización se revisó la siguiente información teniendo en claro el equipo y reactivos con los que se podía contar en ese momento para llevar a cabo la derivatización.

En 1975 Geiger *et al*¹ informaron de la determinación de diclofenaco para un método el cual está fundamentado en extraer del plasma los metabolitos de diclofenaco los cuales posteriormente fueron transformados en indolonas y así analizar el derivado correspondiente por CG con un detector de captura de electrones no lineal, para la formación de los derivados estudiados se utilizó diazometano en 2,2,2, trifluoroetano, se utilizó columna de metil silicona, la fase móvil fue nitrógeno a 45 mL/min, de la determinación de indolonas se obtuvo un coeficiente de variación del 6 %.

A su vez en 1980 Schweizer *et al*³ realizaron una determinación cuantitativa de diclofenaco en muestras de orina que contenían metabolitos monohidroxilados, la formación de derivados se hizo con hidróxido de sodio, tetrabutilamonio hidrógeno sulfato, yodometano y diclorometano, posteriormente analizándolos por CG empleando un detector de captura de electrones y utilizando columna de vidrio empacada con 3 % OV-17 en Gas Crom 80-100 malla, como fase móvil argón-metano (90:10) a 60 mL, para los cálculos de determinación fue considerada la altura de pico, el coeficiente de variación fue del 7 %.

En 1986 Schneider *et al*⁴ informó de la determinación de metabolitos de diclofenaco extraídos de muestras de orina que contenían metabolitos monohidroxilados a los cuales les realizó la formación de derivados con yoduro de metilo y tetraaxilamonio, hidrogeno sulfato, analizándolos por CG empleando un detector de captura de electrones, una columna capilar de vidrio (30 m × 0.3 mm de diámetro) adicionada con carbonato de bario, carbowax 40M, como fase móvil helio a 2 mL/min, nitrógeno a 30 mL/min. Para los cálculos de la determinación se utilizó la altura de pico, el coeficiente de variación es de 0–14 % siendo muy variable.

De interés especial se consideró el trabajo de Ikeda M. *et al*⁷ quienes esterificaron el diclofenaco con metanol y etanol en medio ácido, siendo determinados los respectivos ésteres por medio de la CG empleando un detector de captura de electrones, columna de vidrio (2 m), concluyendo que la determinación con el éster metílico de diclofenaco es mejor.

En base a lo anterior, se llevo a cabo el trabajo requerido para realizar el Servicio Social, para optar por la titulación de Química Farmacéutica Bióloga, determinándose indirectamente al diclofenaco sódico, para el cual se decidió realizar la esterificación del diclofenaco sódico en metanol/ácido sulfúrico concentrado (Figura 1) a 60° C/60 min (Ikeda M. *et al*⁸). La determinación se realizo en un Cromatografo de Gases Varian aerograp mod 244010 con detector de ionización de flama, con un integrador Hewellett-Packart mod 3396, utilizando una columna de aluminio empacada de 1.5%OV-101–cromG H/P100/120 mallas con nitrógeno como fase móvil.

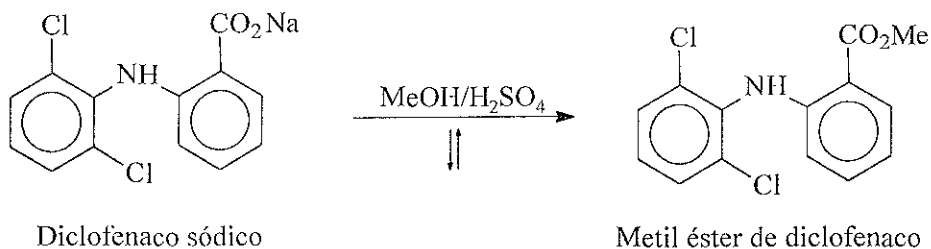


Figura 1. Esterificación del DCLF

glucorónidos y por los estersulfato.^{3,5,6} Aproximadamente, del 10 al 20 % de la dosis es excretado en bilis, en orina se excreta al 70 % de la dosis en tres días.

- ◆ Tiempo de vida media: 1.8 h en humano.
- ◆ Dosis: 75-150 mg/día.

3. Aspecto teóricos y parámetros relacionados con cromatografía de gases.

3.1. *La cromatografía de gases.*⁹ La Cromatografía en fase gaseosa es un método de separación que se basa en la diferencia de afinidad de cada uno de los componentes de la mezcla o muestra inicial por una fase estacionaria, originando que los componentes de la mezcla a separar avancen a diferentes velocidades al ser arrastrados del sistema cromatográfico por una fase móvil. La fase estacionaria se encuentra distribuida en el interior de un conducto (columna o sistema cromatográfico). La mezcla es introducida mediante un dispositivo e inyección y es transportada a través de toda la columna cromatográfica mediante una fase móvil gaseosa.

A la salida de la columna un detector apropiado señala la presencia de muestra y el grado de separación de esta.^{9,10}

3.1.1. *Teoría de la cromatografía de gases. Concepto de Plato teórico (Comportamiento ideal).* El concepto de plato teórico fue desarrollado en 1941 por Martín y Singe²⁵ para la cromatografía de partición líquido-líquido (LLC).

Para explicar el fenómeno de separación, compararon la LLC con un proceso de distribución en contracorriente donde la extracción en las dos fases se repite varias veces en forma encadenada. La diferencia residía en que en la cromatografía es el proceso continuo. Sin embargo la columna podía dividirse en cortes imaginarios donde se conseguía un equilibrio transitorio, antes de que la fase móvil avanzara hacia el siguiente. Cada corte se llamó “plato” y su espesor “**altura equivalente del plato teórico**” (**H o HEPT**). Entonces para una columna de longitud L, con N platos teóricos, la altura del plato resulta:

$$H=L/N$$

La *eficiencia* de una columna cromatográfica y por lo tanto su poder de separación se mide en función de su número de platos teóricos. Para lograr la separación de dos componentes dados no deben solo eluir a distintos tiempos de retención, si no que el ancho de los picos debe ser tan bajo como sea posible. El **número de platos teóricos**, puede calcularse en función del ancho del pico como:

$$N = 16(t_n/W_{tan})^2$$

Donde **t_n** es el tiempo de retención del pico n ésimo y **W_{tan}** su ancho medido sobre la línea base expresado en unidades de tiempo (el cálculo puede también expresarse en función del volumen de retención y el ancho de pico en unidades de volumen). Consecuentemente **H** y **N** dependen no sólo el diámetro, morfología y calidad de la partícula sino también de la calidad de empaquetamiento, de su envejecimiento, vaciamientos o canales producidos por disolución o golpes. Por otra parte, no solo la columna determina el valor de **N** como se verá más adelante, muchos factores instrumentales contribuyen al ensanchamiento de los picos (longitud y diámetro de tuberías, etc.). Otros factores determinantes de **N** y ajenos a la columna “física” corresponden a los procesos por los cuales la geometría del pico se aleja del ideal, es decir la curva normal o gaussiana (Figura 2).

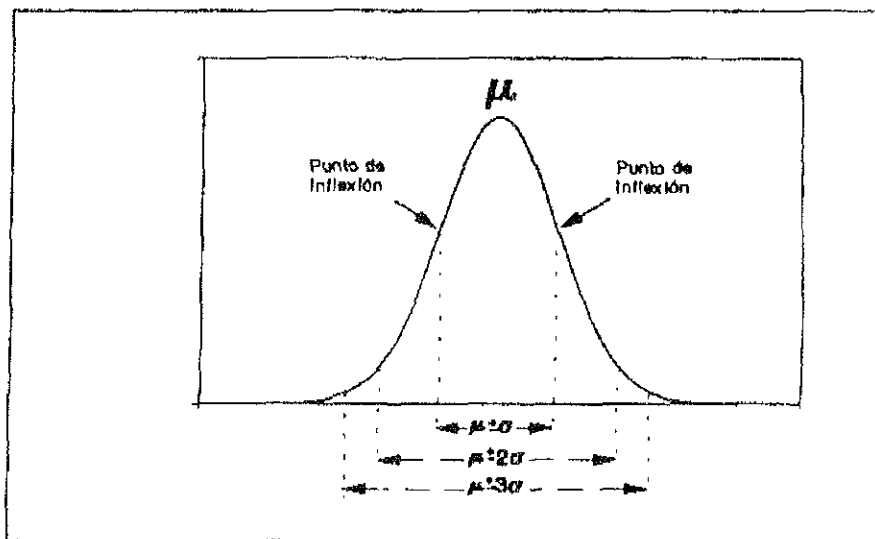


Figura 2. Curva normal o gaussiana, cromatograma típico.

Cuando se efectúan mediciones en un cromatograma que contiene más de un pico, puede observarse alguna variación en el número de platos teóricos calculado para cada soluto. Esto no significa que la determinación de N no tenga importancia. Por el contrario, la eficiencia suele medirse en varias ocasiones:

- * Para comparar materiales (en particular columnas) y métodos bajo las mismas condiciones experimentales.
- * Para optimizar un método analítico.
- * Para determinar si un método sigue siendo idóneo.
- * Para conocer el estado de una columna a lo largo de su vida útil.

Bidlingmeyer y Warren²⁶ analizaron las modalidades empleadas para la determinación de N , concluyendo que tanto el cálculo basado en la medida del ancho de pico en la base, la tomada a media altura de pico son poco exactas cuando el gráfico se aleja de la normalidad. Sin embargo, como estos autores reconocen, el método debe elegirse de acuerdo a las necesidades de analista teniendo en cuenta, las limitaciones de cada modalidad.²⁴

A continuación se discuten varios procesos que tienen lugar en la columna durante una separación cromatográfica los cuales contribuyen al ensanchamiento de la banda.

La eficiencia de la columna se mide por el número de platos teóricos según Van Deemter, para independizarnos de las características físicas del tubo que constituye a la columna, por la altura equivalente a un plato teórico (**HEPT** o **H**). Según Van Deemter la contribución de ensanchamiento de banda dentro de una columna cromatográfica son 4:

- * Proceso multipaso (o de caminos múltiples).
- * Difusión longitudinal.
- * Resistencia a la transferencia de masa en la fase móvil.
- * Resistencia a la transferencia de masa en la fase estacionaria.

Proceso multipaso. En una columna rellena con partículas de la fase estacionaria, el soluto encontrará diversos caminos. Es un trayecto finito, algunas moléculas encontrarán caminos directos o partículas a su paso, siguiendo un camino más tortuoso, retrasándose con respecto a las primeras. Su contribución al ensanchamiento de banda está dado por el diámetro de partícula (**dp**) y una constante (γ) que depende de la calidad del empaquetamiento y del relleno en la columna, donde **Hi** es la contribución del efecto multipaso a la altura equivalente del plato teórico. Este parámetro lo denominaremos A.

$$H_i = D_p \gamma$$

Difusión longitudinal. Si un soluto se estanca en la fase líquida, sus moléculas no permanecerán inmóviles sino que difundirán en todas direcciones hasta que su concentración sea uniforme en el seno del líquido. La contribución al ensanchamiento es una función inversa de la velocidad lineal de fase móvil (**u**) y directa con respecto al coeficiente de difusión del soluto en el solvente (**Dm**) y de una constante que evalúe el espacio ocupado por la fase móvil y su geometría (λ)

$$H_i = \lambda D_m / u$$

Expresando la ecuación sólo en términos de velocidad lineal, resulta :

$$H_i = B/u$$

Resistencia de transferencia de masa de la fase móvil A medida que el soluto se desplaza a través de la columna sus moléculas se transfieren, por un proceso reversible, desde la fase móvil hasta la fase estacionaria y viceversa. Este proceso requiere de un tiempo determinado, en el proceso real, las moléculas del soluto más favorables a la interacción con la fase estacionaria son las más cercanas, las más alejadas tardarán más tiempo con la interacción. Como la fase móvil está en movimiento, las moléculas más alejadas de la partícula habrán viajado un determinado trayecto antes de que sean retenidas por la fase estacionaria, de lo que resultará una dispersión de la banda inicial.

La contribución al ensanchamiento de banda será mayor cuando mayor sea la retención del soluto, la cual será directamente proporcional a un factor dependiente de k' (**fm**), a la velocidad lineal de la fase móvil (**u**) y el diámetro de partícula (**dp**) e inversamente proporcional al coeficiente de difusión del soluto de la fase móvil (**Dm**)

$$H_i = f_m \cdot dp^2 \cdot u / D_m$$

Resistencia a la transferencia de masa en la fase estacionaria. Este efecto es semejante al anterior, y es más pronunciado en cromatografía líquido-líquido (LLC), donde la fase estacionaria es un líquido retenido sobre un soporte inerte. Las moléculas de soluto se retienen en la fase estacionaria y son luego devueltas a la fase móvil en tiempo finito. Las moléculas próximas a la superficie serán devueltas más rápidamente que las moléculas que difundieron profundamente lo que dará origen a un ensanchamiento de banda original. El ensanchamiento será proporcional a una función de factor de capacidad (**fs**), el espesor de la fase estacionaria en LLC o la profundidad del poro (**df**) e inversamente proporcional al coeficiente de difusión del soluto en la fase estacionaria (**Ds**).

$$H_i = f_s \cdot df^2 \cdot u / D_s$$

Las constantes diferidas a la transferencia de masa puede agruparse para ser expresadas en términos de velocidad lineal :

$$H_i = C u$$

La ecuación de Van Demmter nos da lugar en función de velocidad lineal:

$$H = A + B/u + C u$$

Entre menor sea el **HEPT**, mayor será **N**, en las siguientes condiciones:

- * A menor diámetro de partícula
- * A menor viscosidad de la fase móvil (menor coeficiente de difusión).
- * A mayor temperatura, disminuye la viscosidad de la fase móvil.

A continuación se esquematizan mecanismos de ensanchamiento de banda y gráfico de Van Deemter (Figuras 3 y 4).

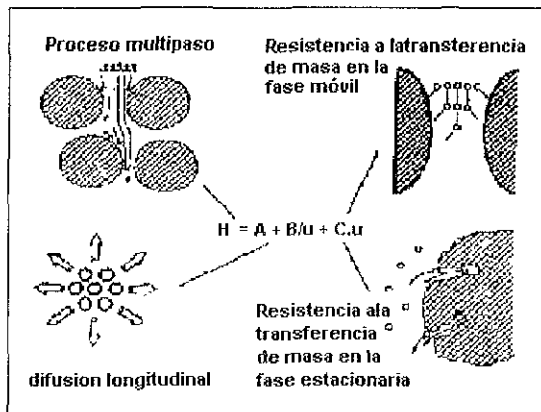


Figura 3. Mecanismos de ensanchamiento de banda.

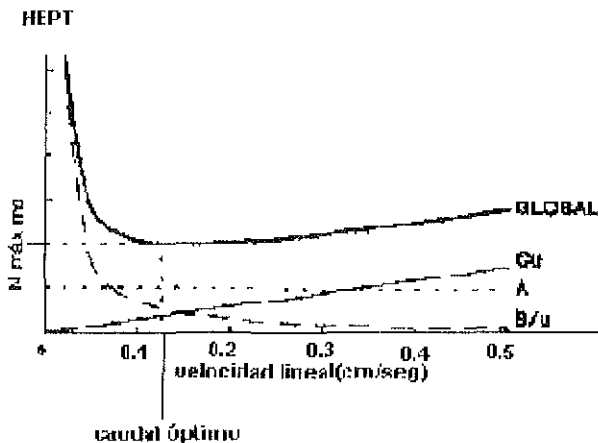


Figura 4. Gráfico de Van Deemter para una curva hipotética.

Se deduce del gráfico que existe una velocidad lineal a la cual el **HEPT** es mínimo, es decir la eficiencia es máxima, a caudales menores, que favorecen la difusión longitudinal y a caudales mayores dificultan los procesos de transferencia de masa, la difusión del proceso de multipaso se optimiza cuando se realiza el proceso de empaquetamiento de la columna en forma adecuada.

3.2. Instrumentación de la cromatografía de gases

3.2.1. *Componentes básicos de la CG.*^{9, 10, 11, 12, 13} En la cromatografía de gases la mezcla de soluto a separar, una vez volatilizada se hace pasar a través de un tubo largo y estrecho (columna) con la ayuda de un gas portador inerte (fase móvil). La mezcla es arrastrada por el gas portador y el disolvente no volátil (fase estacionaria) apoyado en un sólido inerte (soporte). El disolvente retarda los componentes de la muestra de acuerdo a los coeficientes de distribución hasta que estos forman bandas separadas en el gas portador, la separación está dada por la velocidad de cada uno de los componentes de la mezcla a su paso por la columna, los cuales van llegando en forma continua al sistema de detección. Las señales del detector se registran como una función de tiempo, obteniéndose una serie de picos que constituyen el cromatograma. La posición de los picos (tiempos de retención) se utilizan con fines cualitativos mientras que el tamaño de los mismos se relaciona con la concentración de los solutos según el proceso, los componentes de un cromatógrafo son (Figura 5).

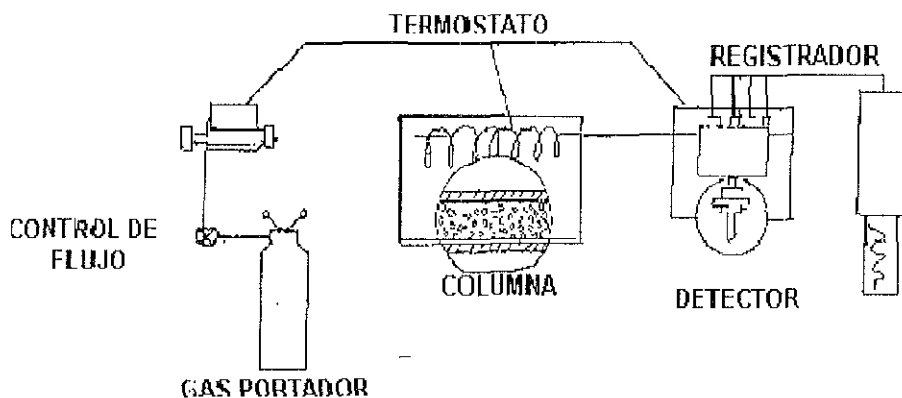


Figura 5. Esquema de un cromatógrafo de gases.

3.2.2. Control de velocidad de flujo⁹

Es importante mantener constante la velocidad de flujo en el sistema del cromatógrafo, debido a que influye en la eficiencia de la columna, así como en el tiempo de retención.

3.2.3. Columna^{9, 10, 23}

Existen dos tipos de columna, empaquetadas o rellenas y capilares o abiertas, columnas empaquetadas. Estas columnas se presentan en forma recta para obtener un empaque uniforme en forma espiral, su largo y diámetro varían de acuerdo a las necesidades del usuario.

3.2.4. Fases estacionarias^{9, 10, 23}

Las fases estacionarias utilizadas son dos, sólidos adsorbentes y fases líquidas soportadas en un sólido inerte.

3.2.4.1. Fases líquidas^{9, 10, 23}

Las fases líquidas en cromatografía de gases deben cumplir lo siguiente:

- * El intervalo de temperaturas debe ser de 100-300 °C, no siendo volátiles en este intervalo.
- * Estabilidad térmica
- * Baja viscosidad
- * Estabilidad química
- * Al disolver los solutos la disolución resultante debe ser inerte a temperatura de trabajo.

Es apropiado mencionar que debido a las altas temperaturas utilizadas en cromatografía de gases las fases líquidas que mejor se adaptan a estas características son los líquidos poliméricos de peso molecular alto. La fase de elección líquida dependerá de la composición de la muestra a separar. Los solutos polares se separarán mejor en fases estacionarias polares y los no polares en fases parafínicas.

La temperatura mínima de trabajo se establece mediante el punto de fusión de la fase líquida. Algunas fases se han utilizado por debajo de su punto de fusión como adsorbentes selectivos (para separar estereoisómeros), normalmente la resolución de la columna es baja por debajo de la temperatura de fusión de la fase líquida. Desde el punto de vista práctico, la fase líquida debe tener una solubilidad adecuada en algunos solventes orgánicos volátiles y “mojar” adecuadamente el soporte. Con respecto a la fase estacionaria que se selecciona por criterio de polaridad se tiene:

- * Fase polares: Se utilizan para separar un amplio rango de solutos polares capaces de originar gases de hidrógeno. La retención de estas fases esta determinada por la concentración de grupos hidroxilo y por la distribución de pesos moleculares de fase líquida.
- * Fases moderadamente polares: El uso de esta fase ha disminuido debido a la baja estabilidad de la columna y a las variaciones de una columna con otra.
- * Fases no polares: La única interacción que se produce con estas fases es la dispersión de los solutos no polares que lo hacen según su (tamaño de porción no polar).
- * Fases de diferentes polaridades: En este grupo se encuentran las siliconas o los polisiloxanos cuya unidad básica es el xilosano. Tienen una gran estabilidad térmica, permanecen en estado líquido en un amplio rango de temperaturas, pueden utilizarse en diferentes polaridades que van desde no polares hasta muy polares.

De manera complementaria se debe mencionar que la selección de la columna, tiene que ver también con la estabilidad química y térmica de la fase estacionaria.

3.2.5. Control de la temperatura^{9,10}

Existen zonas del cromatógrafo donde la temperatura debe controlarse con precisión: la zona de inyección, la columna y el detector:

- El control de temperatura en la zona de inyección de la muestra varia según se trate de columnas empaquetadas o abiertas, si la inyección se realiza en una cámara previa a la columna o directamente a esta. La temperatura debe ser suficientemente alta para evaporar completamente la mezcla del soluto y a su vez suficientemente baja que no se produzca la descomposición térmica de los mismos.
- La temperatura de la columna influye en la separación cromatográfica ya que afecta la constante de distribución de los solutos: reparto entre la parte gaseosa (volatilidad) y la fase estacionaria (adsorción de CGS) .
- El control de la temperatura del detector depende del tipo de detector usado ,pues las conexiones entre el y la columna deben de estar a temperaturas adecuadas para que no se produzcan condensaciones ,que darían lugar a pérdida de los componentes menos volátiles o al solapamiento entre picos. El detector de ionización de flama mantiene un mínimo de 125 °C para evitar la condensación de los solutos y de otros componentes de la muestra .
- Los cromatógrafos de gases disponen de sistemas termoregulables que permiten programar la temperatura de variación a lo largo del proceso cromatográfico, trabajar en un amplio rango de temperaturas, así como una temperatura fija (cromatografía isotérmica) o incremento de la temperatura entre el incremento de la temperatura (cromatografía con gradiente de temperatura), con precisión para lograr resultados reproducibles. Los tiempos de resolución de los solutos (separación) y la duración del proceso (tiempo de determinación) son afectados por la temperatura.:

La temperatura óptima depende de los puntos de ebullición de los componentes de la mezcla, esta no debe de ser inferior a los puntos de ebullición ya que la retención seria muy acentuada. Los tiempos de retención se doblan cuando la temperatura de columna desciende a 30 °C.

3.2.6. Detector de ionización de flama.^{9,10}

El cromatógrafo de gases posee un sistema continuo de detección por el que pasa el gas portador con los solutos separados procedentes de la columna. Su misión es poner en manifiesto el paso del analito originando una señal

eléctrica debido a que es simplificada, registrada o microprocesada. En el presente trabajo se utilizó un detector de ionización de flama. Este detector realiza medidas absolutas, es de tipo universal aunque ciertos casos puede hacerse selectivo, es destructivo y responde a la velocidad de flujo del soluto. Su funcionamiento esta basado en la relación directa que existe entre la conductividad eléctrica de un gas y la concentración de partículas cargadas (iones positivos, negativos y electrones). Se utiliza una llama de hidrógeno como fuente de ionización de las moléculas orgánicas que fluyen a través de la flama (Figura 6).

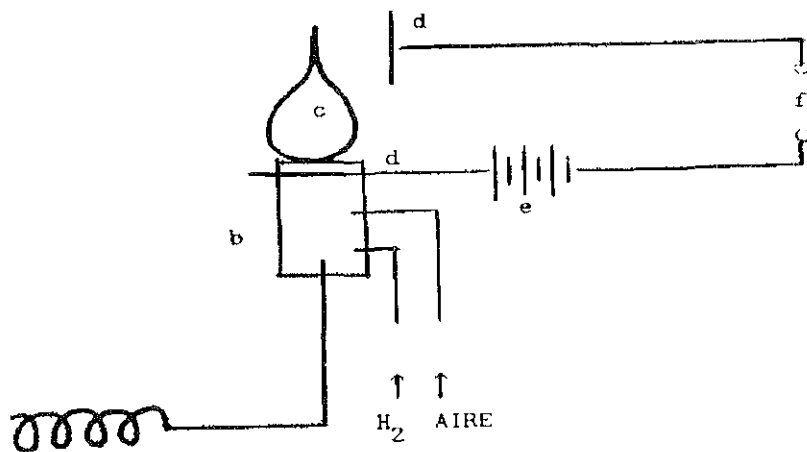


Figura 6. Esquema de un detector de ionización de flama: a) columna, b) quemador, c) flama, e) electrodos, f) retención de polarización de cerca de 300 V. f) amplificador y registrador.

Este detector dispone de un sistema de electrodos, situando el negativo en la base de la flama y el positivo en el cestillo o en el cilindro, alrededor de la flama cargado con +300 v. La corriente gaseosa que sale de la columna se mezcla con una corriente de hidrógeno (combustible) y entra en el detector donde se produce la combustión, para mantener la flama se usa oxígeno que se introduce por la base del detector, durante la combustión producida al llegar un compuesto orgánico a la flama, se forman partículas cargadas que originan una corriente y disminuyen la resistencia eléctrica entre los electrodos, esta emisión es amplificada y se dirige al registrador. La magnitud de esta corriente es proporcional al número de cargas que depende de la naturaleza y velocidad de flujo del soluto, por tanto es directamente proporcional con la cantidad del mismo.

El funcionamiento correcto de este detector depende de la elección adecuada de los tres flujos utilizados: gas portador, hidrógeno, y aire, en general se admite como óptimo esta concentración (1:1:10) aunque es recomendable la optimización de esta relación. La cantidad mínima detectable en este detector es de: 0.00001 mg. Es sensible a los compuestos orgánicos, su linealidad es 10^6 , su estabilidad es buena dado que es insensible a cambios de temperatura, siendo el límite de 400 °C, el gas portador es nitrógeno o helio.

3.3. Formación de derivados.^{23, 24}

Esta metodología es un proceso esencial en la cromatografía de gases, su objetivo es modificar la estructura molecular de la sustancia en estudio, para desplazar el punto de fusión de la molécula, esta se volatiliza a la temperatura de inyección, de esta manera esta sustancia se introduce a un cromatógrafo de gases y su comportamiento puede ser captado en forma de señal por un detector.

La formación ideal de derivados, se logra cuando los grupos funcionales de interés, reaccionan cuantitativamente y de manera rápida. El producto sin mayor procesamiento se inyecta a un cromatógrafo de gases como mezcla de reacción, la formación de derivados debe de ser completa, el exceso de reactivo, debe eluir con el pico del disolvente.

La formación de derivados se puede clasificar en dos tipos: La pre-columna, que es la más acercada a la ideal donde los derivados ya formados se separan en la columna. La post-columna es cuando la reacción se lleva a cabo después de inyectar la columna.

La ventaja de la formación de derivados pre-columna es que no existen límites en cuanto a la cinética de la reacción, puesto que una vez realizada la determinación no se afecta el resultado cromatográfico. Además aunque se utilice un exceso de reactivo, este no interfiere por que puede eliminarse en un paso previo o separarse en la misma corrida cromatográfica, sin embargo su desventaja principal se encuentra en la posible aparición en los derivados no deseados de la misma sustancia o por descomposición química, lo cual puede ocasiona la presencia de varios picos de una sola sustancia a analizar.

IV. Objetivos

Objetivo General

- Estudiar las condiciones apropiadas para la formación de MEDCLF y su determinación por la cromatografía de gases.

Objetivo Académico

- Capacitar y actualizar a tesisistas en técnicas de análisis químico.
- Apoyar las actividades de una Cátedra: “Métodos de separación para el análisis químico y el desarrollo tecnológico”.

Objetivo Social

- Contribuir al desarrollo del área farmacéutica mediante el uso de diversas técnicas analíticas.

Objetivos Específicos

- Realizar la esterificación del diclofenaco sódico para obtener un derivado apropiado (MEDCLF).
- Identificar el producto mediante sus propiedades físicas Espectroscópicas.
- Estudiar las condiciones cromatográficas para efectuar la determinación de MEDCLF.

V. Cuadro metodológico



VI. Equipo, material y reactivos

- ◆ Equipo y material utilizados durante la esterificación del DCLF.
 - Equipo quick-fit.
 - Rotavapor Caframo v-micro antriev de 180-120 rpm.
 - Balanza analítica.
 - Cámara de yodo.
 - Fisher-Johns melting poing apparatus serie 4018.
 - Termómetro de 400 °C.
 - Baño de vapor.
 - Sistema de vacío.
 - Cámara de cromatografía.
 - Cromatoplacas.
 - Columna de vidrio (3.5 cm de diámetro por 51 cm de largo).
 - Campana de vacío para realizar una cromatografía en flash.

- ◆ Equipo y material usado en química analítica:
 - Cromatógrafo de gases Varían Aerograp. M-244010.
 - Integrador Hewlett – Packard Mod. 3396.
 - Jeringa para cromatógrafo de 10 µl. Hamilton.
 - Columna empacada 1.5 % OV 101- ChromG H/P 100/120.
 - Sistema de vacío.

◆ Reactivos

- Diclofenaco sódico (estándar 99.0 %).
- Metanol grado HPLC, Fisher Chemical / Scientif . L A452-4.
- Metanol, Merck L. 2500.179807.251.
- Acido sulfúrico. Mallinckrodt A.R.L. 2876-07.
- Cloroformo, Merck l. 2500.179807.251.
- Sulfato de sodio anhidro, Productos Monterrey L. 6390.
- Gel de sílice 60 T. Part. 0.63-0.20 mm. 70-120 mesh ASTM L.707288. Merck. Y el lote 606106.
- Benceno, Baker analyzed, Monterrey L. 625639.
- *n*-Hexano, Aldrich L. 04717PW.
- Tolueno, Baker Analyzed. Reactivo LM25710.
- Cloroformo, reactivo Analítico. Monterrey l. 014357.
- Eter etílico Baker analyzed—Reactivo L-M-31089.
- Isopropanol, Baker analyzed L-M-32562.
- Acetona G. R.
- Acetato de etilo G. R.

VII. Desarrollo experimental y resultados

1.1. Esterificación de diclofenaco sódico.

Se pesaron 100 mg de diclofenaco sódico y se colocaron dentro de un matraz bola de 100 mL, acto seguido se adicionaron 20 mL de metanol absoluto y una gota de ácido sulfúrico concentrado; la mezcla, fue posteriormente sometida a temperatura de reflujo (Figura 9) del metanol (ca 53 °C) durante 60 minutos.^{7,8}

El desarrollo de la esterificación se siguió por medio de cromatografía en capa fina (Figuras 7, 8 y 10) empleando gel de sílice como soporte y como eluyentes (Tabla 1) diferentes proporciones del sistema AcOEt/*n*-C₆H₁₄, así como CHCl₃ al 100 %; el revelador empleado fue yodo metálico.

Tabla 1. Elección de la fase móvil.

<i>Disolvente</i>	<i>R_f</i>
<i>n</i> -Hexano/Cloroformo 4:1	0.3
Acetato de etilo 100 %	0.7
<i>n</i> -Hexano 100 %	0.0
Cloroformo 100 %	0.8

Con base en los resultados de la Tabla 1 se seleccionó el cloroformo como fase móvil debido a su *R_f*, siendo yodo el revelador más apropiado.

Para determinar el tiempo de reacción se realizó en varias ocasiones la misma reacción bajo, las condiciones ya antes mencionadas, pero con diferentes tiempos de reacción: 30, 60, 75, 90 y 120 minutos (Figura 11).

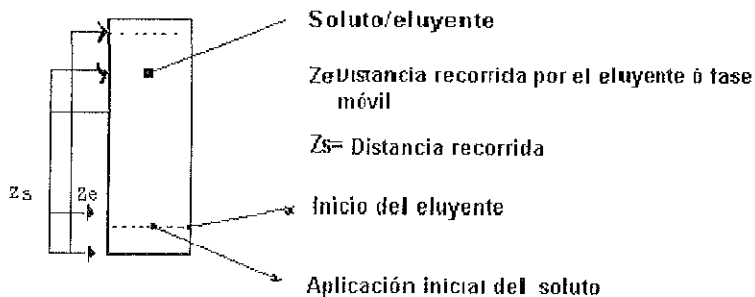


Figura 7. Distribución de una cromatoplaqueta.

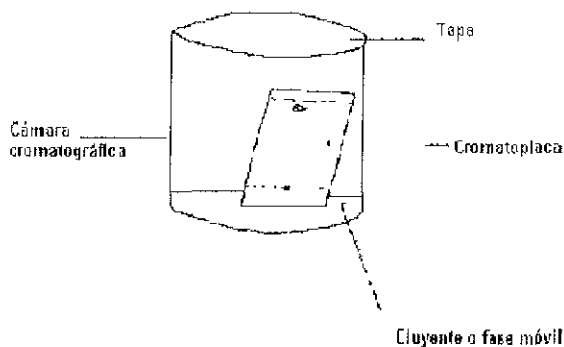


Figura 8. Montaje utilizado para determinar el desarrollo de una cromatoplaqueta.

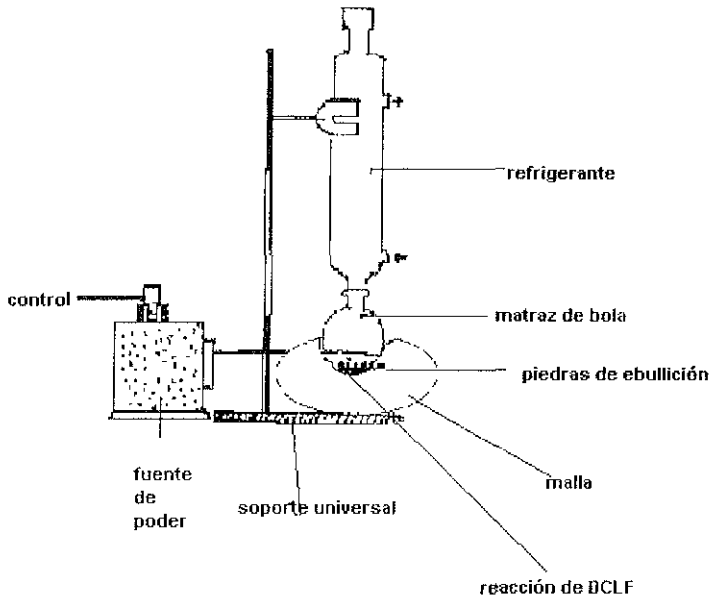
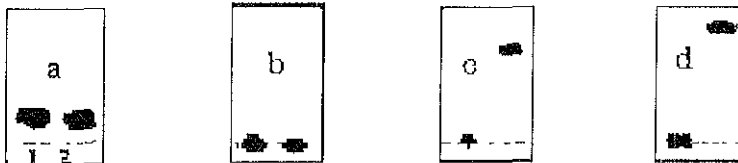


Figura 9. Montaje de equipo utilizado para llevar a cabo la reacción de esterificación.



- a.- *n*-Hexano/cloroformo 4:1
- b.- *n*-Hexano 100 %
- c.- Acetato de etilo 100 %
- d.- Cloroformo 100 %

- 1.-DCLF/Metanol
- 2.-EMDCLF

Figura 10. Elección del sistema eluyente para cromatografía de placa fina.

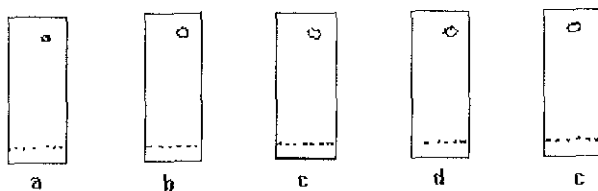


Figura 11. Tiempos de reacción de la metilación: (a) 30 min, (b) 60 min, (c) 75 min, (d) 90 min, (e) 120 min.

De la serie de análisis por *ccf* obtenido a diferentes tiempos, se determinó que el tiempo de reacción adecuado fue de 60 minutos a una temperatura *ca* 53 °C.

1.2. Purificación

Concluida la reacción de mezcla correspondiente fue concentrado a sequedad en un rotavapor; acto seguido, el residuo se disolvió con 30ml de CHCl_3 , previo a una serie de lavados con NaHCO_3 5 % (3 x 10 mL) y H_2O (3 x 10 mL). La fase orgánica residual fue posteriormente secada (Na_2SO_4 anh.) y vuelta a concentrar a presión reducida. Para concluir con la purificación del producto esperado la mezcla resultante se recurrió al empleo de una cromatografía en columna (flash) empleando como soporte gel de sílice 60-230 mesh y como eluyente CHCl_3 100 % reuniéndose las fracciones de mayor valor del R_f las cuales correspondieron al éster metílico esperado.

1.3. Solubilidad.

La solubilidad se determinó como sigue: en dos tubos de ensaye se diluyeron 20 mg del producto a cada uno de los tubos, a cada tubo se le adicionó un disolvente orgánico (5 mL).

Tabla 2. Elección de disolvente

<i>Disolventes</i>	<i>Resultado</i>
Benceno	+/+
Tolueno	+/+
Tetracloruro de carbono	+/+
Cloroformo	+/+
Eter	+/-
Acetona	+/-
2-propanol	+/-
Heptano	-/-
<i>n</i> -Hexano	-/-

+/+ soluble , +/- parcialmente soluble , -/- insoluble

En este caso, se selecciono el cloroformo aun cuando es un solvante orgánico se volatiliza rápidamente afecta la columna de cromatógrafo, en cromatografía de placa fina, mostró una adecuada eficiencia y grado de separación, por lo que se espera una realización de un adecuado cromatograma con una buena selectividad.

1.4 Rendimiento.

Se realizaron diez reacciones con 10 mg de diclofenaco sódico cada uno, las condiciones de reacción fueron las ya antes mencionadas, la purificación se realizó como en 1.2, la única variación es que la columna ocupada es de 7.5 cm. de diámetro por 25 cm. de longitud. De las fracciones obtenidas ya purificadas se determinó por cromatografía de placa para verificar la pureza del producto (Tabla 3).

El punto de fusión se realizó en un equipo Fisher-Jonhes colocando en porta objetos cada muestra ya purificada, y se observó la temperatura en que se fusionaban los cristales y se registraba su temperatura (Tabla 3). La desviación estándar se calculó con un 95 % de confianza.

Tabla 3. Resultado de rendimiento y punto de fusión.

<i>muestra</i>	<i>rendimiento (%)</i>	<i>p. fusión (°C)</i>
1	79.1	108
2	87.7	-
3	88.7	100
4	81.7	102
5	-	100
6	-	-
7	-	108
8	72.0	106
9	56.7	-
10	77.2	100
	X= 76.91	X=103.42
	S= 10.34	S= 3.49
	C.V=13.41	C.V= 3.38
	95% S=69.29-84.57	95% S=100.8-106.3

1.5. Identificación.

La estructura del producto y en consecuencia su identificación se hizo evidente mediante una serie de experimentos correspondientes a la espectrometría de masas que a continuación se discuten de manera conjunta.

En el espectro de masas obtenido por impacto electrónico (Figura 12) está presente un fragmento m/z 309 con una abundancia relativa del 51 % asignado tentativamente al ion molecular $[M^{+}]$ ya que de manera complementaria se observan un pico m/z 311 con un 60 % de abundancia relativa con respecto al M^{+} , lo cual es apropiado para un ión $[M+2]^{+}$

congruente con la contribución isotópica característica para dos átomos de cloro en la molécula.

Más es necesario mencionar que se confirmó la asignación del ion molecular y por ende el peso molecular del compuesto mediante los datos de alta resolución (EMAR) indicados también en la figura 12, ya que de esta manera se determinó la composición elemental $C_{14}H_{11}NO_2Cl_2$ consistente con m/z 295.0167 uma.

Así mismo en el espectro confinado en la figura 12 resalta la presencia de otros picos que fortalecen la propuesta de la estructura para el producto formado: m/z 277(18) para $[M-MeOH]^+$, m/z 242 (42) para $[M-MeOH-Cl]^+$ y m/z 214 correspondiente al pico base asignado a $[M]^+$.

Finalmente la identificación del producto de esterificación se evidenció mediante dos experimentos de disociación inducida por colisión-iones entrelazados (Figuras 13, 14) para los iones M^{+} y $[M-MeOH]^+$, mediante estos en conjunto con los datos del espectro EMIE y los de EMAR se propuso el patrón de fragmentación indicado en la figura 15.

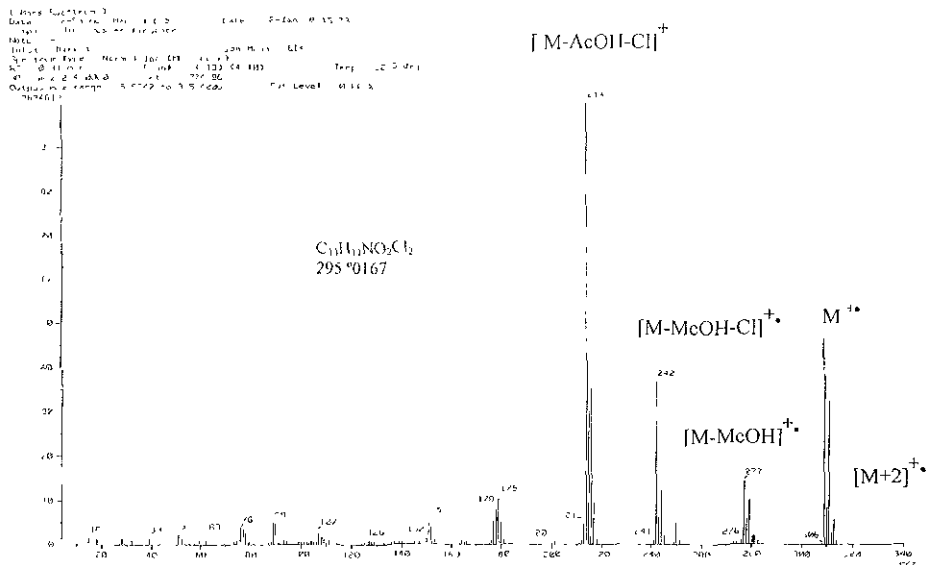


Figura 12. Espectro de masas del diclofenaco de metilo, obtenido por impacto electrónico a 70 ev, y datos de alta resolución.

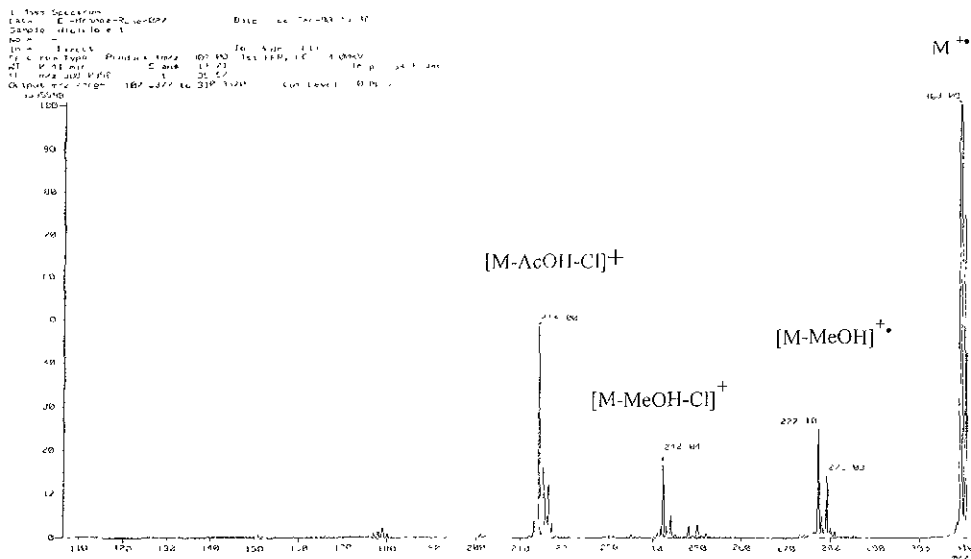


Figura 13. Experimento CID-linked scans para el ion molecular del éster metílico de diclofenaco, determinando a una relación B/E constante.

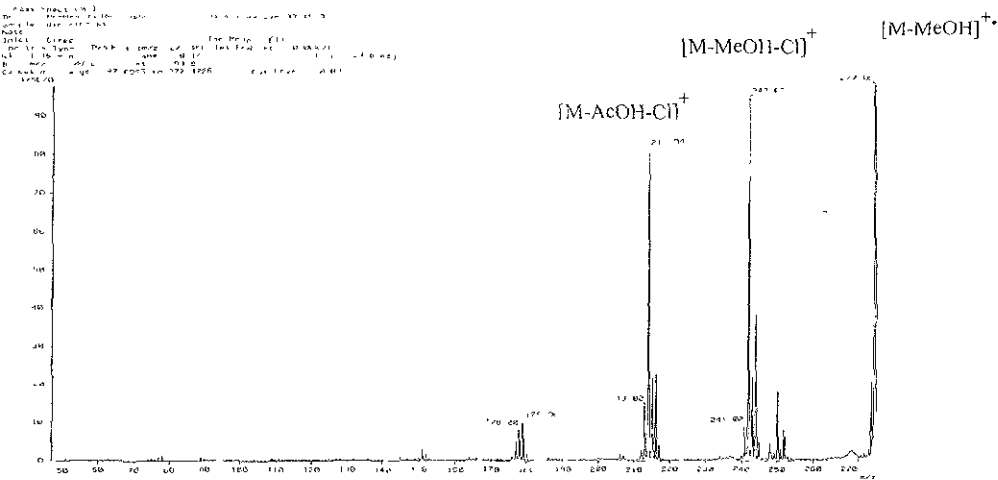


Figura 14. Experimento CID-linked scans para el fragmento $(M-MeOH)^+$ del éster metílico del diclofenaco, obtenido a una relación B/E constante.

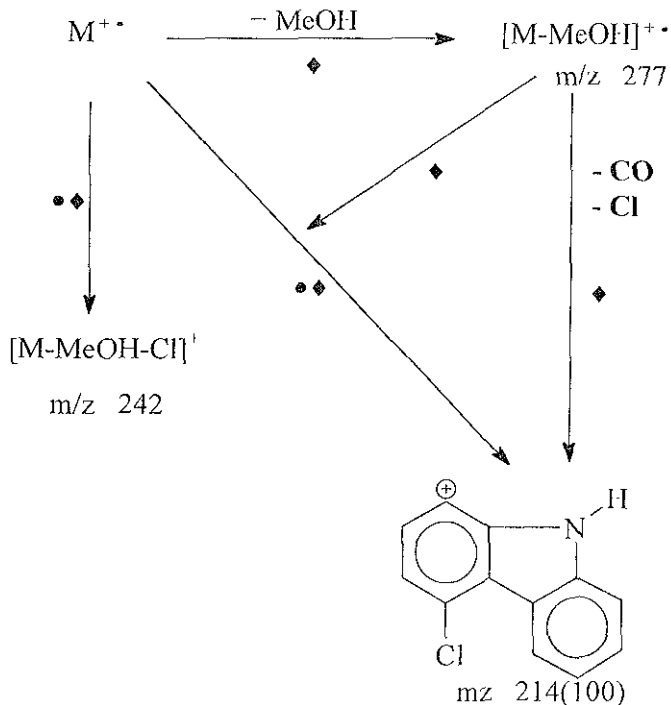


Figura 15 . Patrón de fragmentación del diclofenaco de metilo, validado por ♦CID-LS y •EMAR

2.0 Determinación indirecta de diclofenaco sódico por CG.

2.1. Pruebas preliminares para la determinación de éster metílico en la cromatografía de gases. Se utilizó un cromatógrafo de gases Varian Aerograp mod. M-244010 con detector de ionización de flama, como fase móvil nitrógeno, para el procesamiento de señal se utilizó un integrador Hewwlett-Packard mod. 3396.

Selección de columna: en base a la polaridad y peso molecular del EMDCLF se revisaron las columnas con las que se contaba se seleccionó la 1.5 % OV 101 Chromo GH/P 100/120, con una capacidad de temperatura de columna hasta de 350 °C con un diámetro de 1.5 mm. y una longitud de 148.7 cm, siendo una columna parcialmente polar.

El manejo general del equipo se realizó de la siguiente manera:

- Encender el equipo (cromatógrafo, integrador, conexión de gases).
- Regular el flujo de paso de nitrógeno, oxígeno e hidrógeno.
- Encendido de flama, elección de temperatura de inyección, temperatura de columna, calentamiento de horno
- Elección de parámetros del integrador para observar el cromatograma (origen de la base, atenuación, velocidad de carta, área límite de rechazo, límite de ruido, ancho de pico).
- Inyección de muestra solubilizada en cloroformo
- Observación de cromatograma (Figura 16)
- Análisis de Resultado.

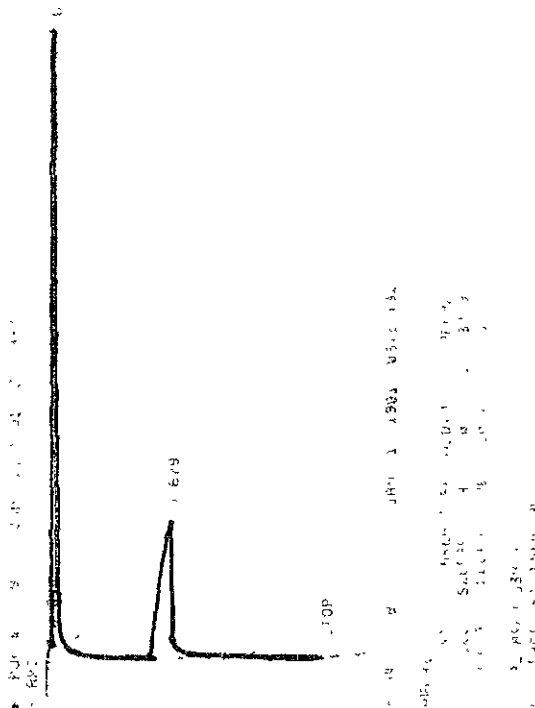


Figura 16. Cromatograma de EMDCLF.

2.2. Búsqueda de condiciones adecuadas para la determinación de temperatura de trabajo y velocidad de flujo.

Se preparó una solución de 5 $\mu\text{g/mL}$ de EMDCLF de esta disolución se inyectaron 5 μL al cromatógrafo con una temperatura de inyección de 210 $^{\circ}\text{C}$, temperatura de columna de 190 $^{\circ}\text{C}$, y temperatura de detección de 100 $^{\circ}\text{C}$ con un flujo de nitrógeno de 30 mL, un flujo de oxígeno de 30 mL por minuto, un flujo de hidrógeno de 30 mL por minuto con estas condiciones no se observó respuesta.

Se cambiaron condiciones de temperatura en distintos intervalos y se probaron distintos flujos de nitrógeno, temperatura de columna, temperatura de detección, velocidad de carta, temperatura de inyección, volumen de inyección, hasta llegar a condiciones adecuadas

Determinación de la temperatura de columna.

Para efectuar la determinación se siguieron estas condiciones de trabajo:

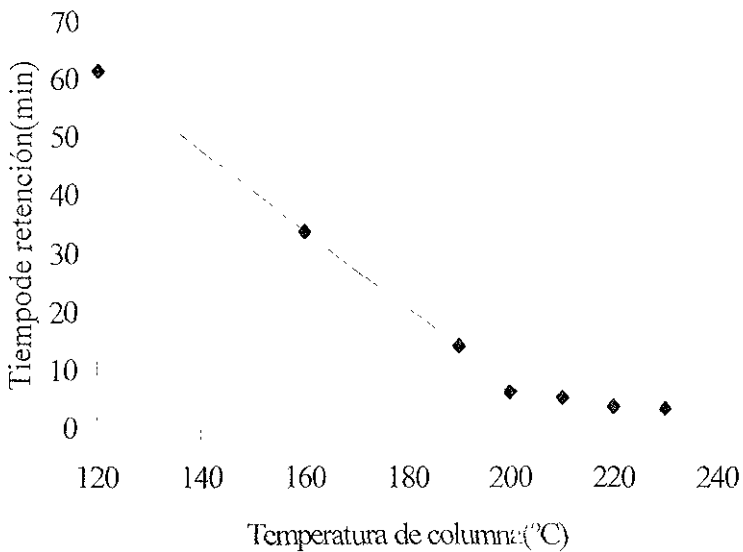
- flujo de nitrógeno es de 30 mL/min
- flujo de oxígeno es de 300 mL/min
- flujo de hidrógeno es de 30 mL/min
- temperatura de inyección de 190 °C
- temperatura de columna de 120 – 230 °C
- temperatura de detección de 230 °C
- un volumen de inyección 5microlitros (10 mg/mL) de muestra.

Se realizó la corrida por triplicado en cada una de las temperaturas probadas,(Tabla 4) inicialmente la temperatura del sistema cromatográfico debía ser de menor temperatura en inyección y de mayor temperatura en la detección. El barrido a distintas temperaturas en la columna se hizo para verificar la temperatura adecuada de trabajo, considerando eficiente la temperatura que muestra un menor tiempo de retención y alto N.

De acuerdo a los resultados representados en el gráfico experimental 1, se consideró la temperatura de 210 °C, con un tiempo de retención de 5.464 min. Por considerarse la temperatura adecuada .

Tabla 4. Determinación de temperatura de columna.

<i>Temperatura de columna (°C)</i>	<i>Tiempo de retención (min).</i>
120	61.581
160	33.947
190	14.274
200	6.364
210	5.464
220	3.920
230	3.486



Gráfica experimental 1. Determinación de la temperatura de la columna

Determinación de velocidad de flujo:

Al establecerse la temperatura de columna se prosigue a determinar el flujo adecuado del nitrógeno en función del AEPT, considerando las siguientes condiciones de trabajo:

- Temperatura de inyección 190 °C
- Temperatura de columna 210 °C
- Temperatura de detección de 230 °C
- Flujo de nitrógeno: de 15 a 40 mL/min volumen de inyección 5 µL. (10 mg/mL)

Los datos obtenidos fueron utilizados para ajustar el flujo de nitrógeno como gas acarreador y se tomaron tres lecturas en cada flujo calculándose la media del tiempo de retención T_R y la media del ancho del pico w . (Tabla 5)

Para realizar los cálculos para determinar el número de platos teóricos, se consideró lo siguiente:

El número de platos teóricos es adimensional y se calcula :

$$N = 16 \frac{(T_R)^2}{(W)^2}$$

Con respecto al cálculo de la altura equivalente a un plato teórico está dada:

$$AEPT = \frac{L}{N}$$

Donde L es la longitud de columna (1.48 m.) y N es el número de platos teóricos. (Tablas 5 Y 6).

El punto en el cual aparece un menor AEPT es el flujo de 22 mL/min. Siendo este punto el de mayor número de platos teóricos, por lo que se tiene una mayor eficiencia de columna en este punto. Es el comportamiento que se asemeja a la curva de Van Dcemer. (Gráfica experimental 2).

En resumen las condiciones de trabajo óptimas fueron:

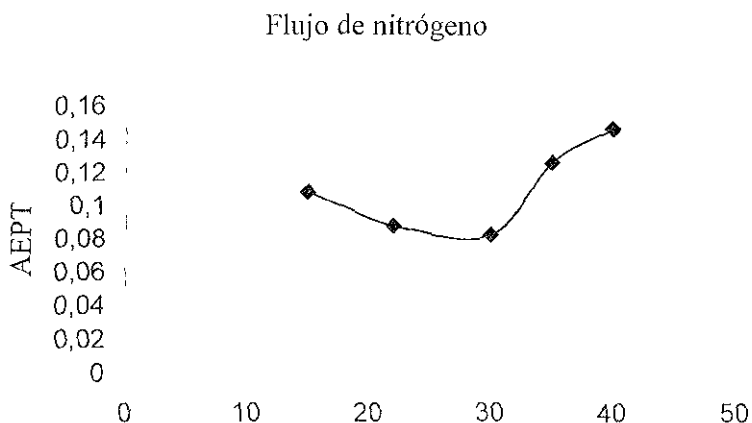
- Flujo de nitrógeno : 22 mL/min
- Flujo de oxígeno : 30 mL/min
- Flujo de hidrógeno : 30 mL/min
- Temperatura de inyección : 190 °C
- Temperatura de columna : 210 °C
- Temperatura de detección : 230 °C
- Volumen de inyección: 5 μ L(10 mg/mL)

Tabla 5. Tiempos de retención y ancho de pico a diferentes flujos.

<i>Flujo (mL/min)</i>	<i>TR</i>	<i>w</i>
15	9.981	1.083
22	5.709	0.558
30	7.366	0.707
35	6.504	0.762
40	6.697	0.845

Tabla 6. Platos teóricos en la determinación de MEDCL para verificar el efecto del flujo en la eficiencia de la separación.

<i>Flujo (mL/min)</i>	<i>TR (mm)</i>	<i>N</i>	<i>AEPT (cm)</i>	<i>w</i>
15	9.981	1358.97	0.1089	1,083
22	5.709	1674.89	0.0889	0,558
30	7.366	1796.78	0.083	0,707
35	6.504	1165.65	0.1269	0,762
40	6.697	1005.00	0.1476	0,845



Gráfica experimental 2. Determinación de flujo nitrógeno

2.3 Método general para la determinación indirecta del diclofenaco sódico

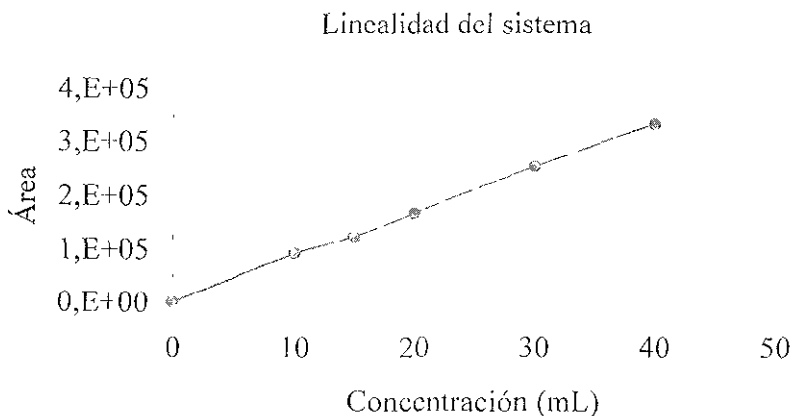
- Para la determinación del éster metílico se construyó una curva de calibración con EMDCLF en concentraciones de 1, 2, 3, 4 y 5 miligramos/mL, utilizando cloroformo como disolvente
- El volumen de inyección es de 10 μL , para cada uno de los estándares.
- Se mantuvo en baño de hielo cada uno de los sistemas preparados, para evitar posible volatilización de cloroformo, evitando así que variara el volumen de muestra a inyectar.

2.3.1 Linealidad del sistema

Se determinó construyendo una curva de calibración a partir del estándar, analizando cinco niveles de concentración (10, 15, 20, 30, 40 $\mu\text{g}/\text{en } 10 \mu\text{L}$)(Tabla 8 y Gráfica experimental 3).

Tabla 7. Linealidad del método.

<i>Concentración mg/10mL</i>	<i>Día 2</i>
10	92198
15	122523
20	167570
30	253927
40	331945
	$r=0.998$
	$B=8414$
	$A=827.186$



Gráfica experimental 3. Linealidad del sistema ♦Día 2.

3. *Discusión de resultados.*

1. La esterificación se llevó a cabo según (Ikeda^{7,8}). El desarrollo de la esterificación se siguió por medio de cromatografía de placa fina, el cloroformo fue utilizado como: eluyente de éster metílico de diclofenaco, como fase móvil en cromatografía placa fina y fase móvil en cromatografía de separación en columna (purificación). El revelador más apropiado para las cromatoplasas fue yodo.

El tiempo de reacción adecuado es de 60 min, (ca 53°C), esto se verificó de acuerdo al seguimiento de reacción por medio de cromatografía de placa fina.

La pureza de EMDCLF recuperado (69.29–84.57 %) siendo apropiado su rendimiento.

El punto de fusión es de (100.8-106.3 °C) siendo similar al reportado que es de 106-108 °C.

Con respecto a su identificación, se efectuó mediante espectrometría de masas, al confirmarse el ion molecular y por ende el peso molecular mediante los datos de alta resolución (EMAR), de esta manera se determina

la composición elemental de $C_{14}H_{11}NO_2Cl_2$ finalmente se emplearon dos experimentos de asociación inducida por colisión-iones entrelazados para los iones M^+ y $[M-MeOH]^+$, proponiendo su patrón de fragmentación, analizando en conjunto lo anterior se concluye que se trata del éster metílico de diclofenaco.

2. La columna utilizada es 1.5 % OV 101 como CHP 100/120, con capacidad máxima de temperatura es de 350 °C, su composición es de polidimetilsiloxano, su diámetro 1.5 mm. y long. 148.7 cm., separa mezclas por punto de ebullición de compuestos con intervalo amplio según el P.M de las moléculas. Esta columna fue la opción con la que se contaba; sin embargo de haber podido sugerir columnas, se hubiera seleccionado QF-1,OV-210,SP-240 debido a los grupos funcionales de MEDCLF (grupo halogenuro), en base a las características de polaridad de la molécula esta es parcialmente polar por lo que, se hubiera seleccionado columnas como: OV-17,OV-215,OV-225. La selección de la fase estacionaria líquida esta basada según polaridad del soluto y la fase estacionaria .

La molécula que se pretenda determinar para este tipo de columna debe de tener un PM menor a 400 g/mol. El máximo de saturación de la columna es 100 µg/mL, por lo que se eligió un rango 10-40 µg/10µL.

Las condiciones de trabajo para la determinación de temperatura de columna es de 210 –220 °C debido a que a temperaturas mas altas no había una adecuada resolución. A 210 °C el ancho de pico era adecuado reflejando así la eficiencia de columna y temperaturas mayores había un ensanchamiento de pico por lo cual aumentaba el tiempo de retención, disminuyendo la eficiencia de columna para su determinación.

El flujo de nitrógeno usado es de 22 mL/min, que corresponde a número de platos teóricos de 1674.89 y un AEPT 0.0889, es importante comentar que se debe tener mucho control sobre el flujo de nitrógeno ya que cualquier variación de este afecta la eficiencia de la columna.

VIII. Conclusiones

- Se obtuvo el derivado metilado de DCIF por esterificación.
- Se llevó a cabo la identificación del éster metílico mediante diversos experimentos de la espectrometría de masas (impacto electrónico, alta resolución y disociación inducida por colisión-iones entrelazados) llegando a identificar dicho derivado.
- Se efectuó la determinación indirecta del diclofenaco sódico debido a que la señal detecta MEDCL, presentando buena eficiencia en la separación dado el número de platos teóricos ($N=1674.89$).
- La determinación indirecta no fue posible evaluarla y optimizarla, sólo se estudió la linealidad del método cromatográfico, los estudios de confiabilidad como son la reproducibilidad y precisión del método, no se realizaron, serán efectuados en un posterior estudio.
- La Linealidad de la curva de calibración se cumplió entre 1.0-4.0 mg/mL, utilizando como estándar el derivado MEDCLF puro.

IX Bibliografía

- 1.-Sallman A, *American Journal of Medicine*, **80**, (1985) 29.
- 2.-Geiger U. P. et. al, *Journal of Chromatography* ,**111**, (1975) 293.
- 3.-Schweizer A. et. al, *Journal of Chromatography*, **195**, (1980) 421.
- 4.-Schneider W. et. al, *Journal of Chromatography*, **383**, (1986) 413.
- 5.-Stierlin J.W.et. al, *Xenobiotica*, **9**, (1979) 611.
- 6.-Godbillon J. et. al, *Journal of Chromatography* **338**, (1985) 151.
- 7.-Ikeda M. et. al, *Journal of Chromatography* **183**, (1980) 41.
- 8.-Ikeda M. et. al, *Journal of Chromatography* **223**, (1981) 486.
- 9.-Jurado J.L, *Colección de Química Analítica I. cromatografía en fase gaseosa*. FESC-UNAM, México 1991.
- 10.-Tellez García J.V, *Apuntes de Cromatografía en fase de Vapor*, IMP 1980.
- 11.-Henry R. et. al, *Química Clínica. Principios y técnicas*, Jims. Barcelona 1980.
- 12.-Valcarcel M, *Técnicas Analíticas de Separación*, Reverte, México 1988.
- 13.-García E. P, *Curso Básico de Cromatografía*, FESC/UNAM,1989.
- 14.-March J, *Advanced Organic Chemical Reactions Mechanisms and structure*, 2º, Mc. Graw Hill, 1977.
- 15.-Vogel A. I, *Elementary Practical Organic Chemical*, 5ª, Longman Scientific and Technological, England 1991.
- 16.-Wingrove A. et al, *Química Orgánica*, Harla, México 1980.

- 17.-Morrison R. et. al, *Química Orgánica*, 5ª, Addison Wesley Iberamericana Estados Unidos 1990.
- 18.-*Manual Microsoft Word. Referencia Ed. Microsoft Corporation.* 1990.
- 19.-Guerra J, *Pharmaceutical Technology*, **3**, (1984) 81.
- 20.-Rampazzo P, *Farmaco*, **45**, (1990) 807.
- 21.-Rosas L. J, *Determinación de Diclofenaco Sódico por método de HPLC*, FESC-UNAM, 1993.
- 22.-Botello L, *Determinación de diclofenaco sódico mediante extracción espectrofotométrica con azul de metileno como reactivo analítico*, FESC-UNAM, México 1993.
- 23.-Willard T. H, *Métodos de Separación para el Análisis*, Gpo. Iberoamérica, México 1991.
- 24.-Quattrochi A. et. al, *Introducción al HPLC*, Artes Gráfica S. A, California, 1992.
- 25.-Martín V. et al, *Cromatography*, **125**, (1976) 17.
- 26.-Bidling M, et al, *Anal Chem* **56**, (1984) 1583.
- 27.-Sallman A, *American Journal of Medicine*, **80**, (1986) 29.
- 28.-Hernández E, et al, *Paquete 1 de Prácticas ,para la experimentación en Química Orgánica*. FESC-UNAM, México 1995.
- 29.-McLafferty F. et al, *Interpretation of mass spectra*, University Science Books E.U. A., 1993.

X. Apéndice

Espectrometría de Masas^{28, 29}

La espectrometría de masas es una técnica analítica, preferentemente para especies orgánicas, que es usada para identificar compuestos desconocidos, cuantificar materiales conocidos así, como para ayudarse a elucidar estructuras, esto puede ser efectuado con cantidades muy pequeñas (*ca* pg) y actualmente con equipos muy simples en su manejo.

Uso de la Espectrometría de masas^{28, 29}

- Identificación de estructuras de biomoléculas tales como carbohidratos, ácidos nucleicos y esteroides.
- Determinación de fármaco en el cuerpo(anti doping).
- Ejecución de análisis forenses, tales como confirmación y cuantificación de drogas.
- Análisis de contaminantes en el medio ambiente.
- Identificación y cuantificación de componentes de mezclas orgánicas complejas.
- Análisis inorgánicos multielementales ultrasensibles.

Origen de la Espectrometría de masas^{28, 29}

La Espectrometría de Masas tiene origen en el tubo de vacío de J. J. Thompson, que demostró la existencia de electrones y “rayos positivos” en los inicios de este siglo. Thompson observó que la nueva técnica podía tener éxito por químicos para analizar sustancias químicas, lo cuál manifestó en su libro “*Rayos de Electricidad y su Aplicaciones al Análisis Químico*”. A pesar de esta observación, la aplicación primaria de la espectrometría de masas residió en los físicos por espacio de casi 30 años; ésta fue usada para descubrir un gran número de isótopos, así como para medir sus masas exactas. Estas medidas dieron lugar a la creación de desarrollos posteriores en diversos campos, abarcando desde la geocronología hasta la investigación bioquímica.

Espectrómetro de masas^{28, 29}

El instrumento actual (Figura 1a-b) varía en tamaño, desde una caja pequeña como un horno de microondas casero a grandes instrumentos de investigación que ocupan un laboratorio entero. La muestra (sólida, líquida o gaseosa) es

introducida en una cámara de vacío y enseguida ionizada en una fuente de ionización siendo de forma común mediante el bombardeo de las moléculas con un gas de electrones, técnica de ionización por impacto electrónico (IE) así se genera una mezcla de iones positivos, negativos y neutros predominando las especies positivas que son las analizadas por esta técnica. Dicho bombardeo se realiza con electrones de un potencial de 70 eV. Los iones (fragmentos) positivos son separados por combinaciones de campos eléctricos (\vec{E}) y/o (\vec{B}) de acuerdo con su relación (m/z), éstos después son manifestados por un detector en el cual los iones generan una corriente eléctrica proporcional al número de iones finalmente estas señales eléctricas son registradas como un espectro de masas.

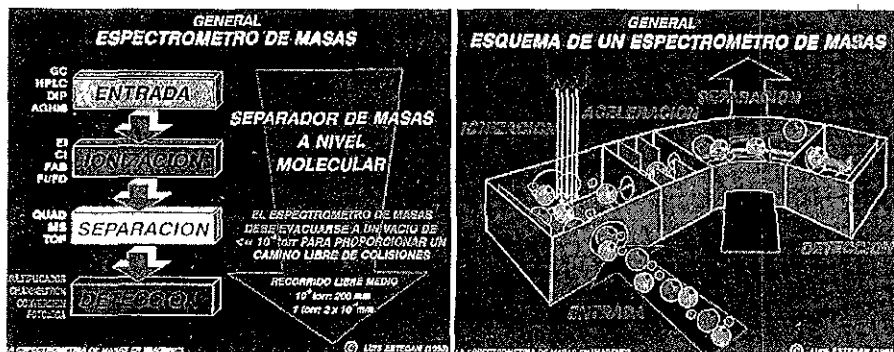


Figura 17. Espectrómetro de Masas

En resumen los procesos que ocurren en un espectro de masas (Figura 2) son:

1. Ionización y fragmentación de la muestra.
2. Separación de fragmentos mediante la relación m/z .
3. Detección de fragmentos (como corriente eléctrica).
4. Registro de señales (espectro de masas).

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

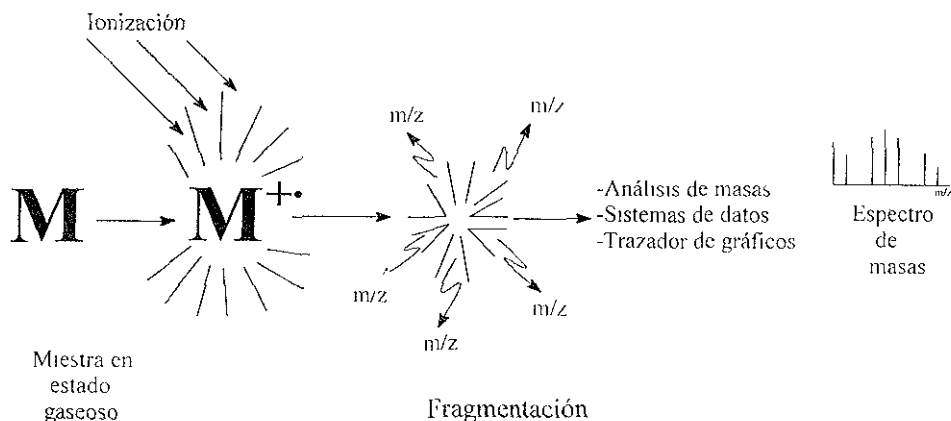


Figura 18. Ionización-fragmentación, separación, detección y registro de la acetona en un espectrómetro de masas.

Características de un espectro de masas^{28, 29}

Un espectro de masas es una gráfica de abundancia relativa de iones vs su relación m/z . Los iones y sus abundancias relativas permiten en un determinado establecer el peso molecular y la estructura del compuesto que está siendo analizado. En el proceso de ionización de la molécula, ésta generalmente se fragmenta originando fragmentos iónicos que aparecen en el espectro donde la relación m/z corresponde al peso del fragmento. Así, comúnmente el fragmento de mayor valor de m/z (M^+ , ión molecular) corresponde a la molécula ionizada y en consecuencia a su vez al peso molecular de la muestra el fragmento de mayor abundancia relativa (100%) se le conoce como pico base (pb). Otros fragmentos que frecuentemente suelen aparecer, dependiendo del compuesto analizado, son aquellos que implican la pérdida de un grupo metilo y/o agua, los cuales indican como $[M-15]^+$ y $[M-18]^+$ respectivamente, de manera correspondiente con los espectros que se representan a continuación, se ejemplifican los conceptos anteriores descritos.

Acoplamiento a cromatografía de gases (CG-EM)^{28, 29}

Para obtener el espectro de masas es un compuesto orgánico dado en una mezcla de compuestos, esta debe de ser separada en sus componentes individuales antes de ser analizadas. Es así que la cromatografía de gases (CG) se acopla a la espectrometría de masas, esta conexión permite a los componentes, ser separados y analizados secuencialmente.

Ionización por impacto de electrones

Para aquellas moléculas que pueden ser separadas por impacto electrónico (IE), es a menudo la más usada para generar iones para análisis por espectrometría de masas.

La ionización mediante bombardeo con electrones acelerados con un potencial de 70 electrón voltios es un proceso “duro” y altamente energético, puede conducir a una fragmentación abundante que deja un pequeño y a veces ningún indicio de ion molecular. Cuando hay una ausencia de ion molecular, el peso molecular y la estructura no son determinados fácilmente esto ha dado lugar al desarrollo de técnicas de baja energía o “suave”.

En el proceso de ionización (IE) la energía de electrones ionizantes es generalmente más grande que la de los enlaces que mantienen a la molécula unida de ésta manera, cuando los electrones con alta energía interactúan con un molécula la ionización ocurre, los enlaces se rompen y los fragmentos son formados.