





Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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 está 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.

**A MIS PADRES**

**A MIS HERMANOS**

## **AGRADECIMIENTOS**

- Al Dr. Salvador Rivera Flores. Director General de Servicios Periciales de la P. G. J. D. F., así como a la Dra. María Lourdes Islas, su Secretaría Particular por permitirme realizar este trabajo dentro de dicha institución.

- Al Biol. Carlos Carriado, Jefe del Laboratorio Químico Forense por su apoyo, confianza y amistad.

- Al Q.F.B. Filiberto Huerta por su apoyo y sugerencias.

- A todos los que hicieron posible de una forma u otra la realización de este trabajo.

## **INDICE**

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>I. Introducción</b>	<b>2</b>
<b>II. Fundamentación</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Antecedentes y Situación Actual del Consumo de Drogas en México</b>	<b>4</b>
<b>2.2. Análisis de Drogas</b>	<b>6</b>
<b>2.3. Aspectos Farmacológicos Generales de los Anoréxicos</b>	<b>8</b>
<b>2.4. Aspectos Farmacológicos Generales de las Benzodiazepinas</b>	<b>10</b>
<b>2.5. Pruebas con Desarrollo de Color</b>	<b>12</b>
2.5.1. Introducción	12
2.5.2. Procedimiento general de las pruebas	13
2.5.3. Esquemas de pruebas (reactivos)	13
2.5.4. Ventajas de las pruebas de orientación con desarrollo de color	14
2.5.5. Desventajas de las pruebas de orientación con desarrollo de color	14
<b>2.6. Espectroscopia de Infrarrojo</b>	<b>16</b>
2.6.1. Manejo de la muestra	17
2.6.2. Aplicaciones de la espectroscopia	18
2.6.3. Identificación de sustancias por IR	18
<b>2.7. Cromatografía en Capa Fina</b>	<b>20</b>
2.7.1. Introducción	20
2.7.2. Fundamentación	20
2.7.3. Fase estacionaria (adsorbentes)	24
2.7.3.1. Modificación del adsorbente	26
2.7.4. Fase móvil	26
2.7.5. Análisis por cromatografía en capa fina	28

2.7.5.1. Extracción	28
2.7.5.2. Aplicación de la muestra	30
2.7.5.3. Desarrollo	31
2.7.5.4. Detección o procedimientos de localización	34
2.7.5.5. Confirmación (evaluación)	36
2.7.5.5.1. Factores que afectan la reproducibilidad de los Rf	39
2.7.5.5.2. Estandarización de los Rf	40
2.7.6 Cromatografía en capa fina de alta resolución	41
III. Planteamiento del problema	43
IV. Objetivos	45
4.1. Objetivo General	45
4.2. Objetivos Específicos	45
V. Hipótesis	46
VI. Diseño Experimental	47
6.1. Recursos Materiales de consumo	47
6.1.1. Disolventes	47
6.1.2. Reactivos	47
6.1.3. Sustancias	48
6.1.4. Sustancias de referencia	48
6.1.5. Materiales	49
6.1.6. Equipo	49
6.2. Metodología	50
6.2.1. Obtención de las muestras	50
6.2.2. Extracción del principio activo	50
6.2.2.1 Extracción clorofórmica	50

6.2.2.2. Extracción metanólica directa	51
6.2.3. Pruebas con desarrollo de color	51
6.2.4. Análisis por IR	52
6.2.5. Cromatografía en capa fina de alta resolución	52
6.2.6. Evaluación de los agentes de revelado	53
6.2.7. Calificación del método cromatográfico	53
VII. Resultados	55
7.1. Extracción del principio activo	55
7.2. Pruebas con desarrollo de color	57
7.3. Análisis por IR	58
7.4. Cromatografía en capa fina de alta resolución	66
7.5. Selección de los agentes de revelado	72
7.6. Calificación del método cromatográfico	74
VIII. Discusión de Resultados	78
8.1. Extracción del principio activo	78
8.2. Pruebas con desarrollo de color	80
8.3. Análisis por IR	82
8.4. Cromatografía en capa fina de alta resolución	85
8.5. Selección de los agentes de revelado	91
8.6. Calificación del método cromatográfico	94
IX. Conclusiones	96
X. Sugerencias	98
XI. Apéndice A	99
XII. Apéndice B	103
XIII. Bibliografía	104

## RESUMEN

Debido a que no todos los laboratorios de Química Forense de nuestro país cuentan con equipo instrumental, se requiere de un método general que permita identificar fármacos de abuso presentes en formas farmacéuticas. El presente trabajo describe un método general de análisis por cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC), rápida y confiable para la identificación de benzodicepinas y anorécticos, fármacos que están controlados y de los que se abusa comúnmente. Del grupo de las benzodicepinas se estudiaron al diazepam, clonazepam, diazepam, flurazepam, flunitrazepam y lorazepam; dentro del grupo de los anorécticos se estudiaron bajo estudio dietilproprén, fenfluramina, fenproporex, fenproporex, fenproporex y mazindol. El principio activo fue extraído por cloroformo a partir de una solución acuosa alcalina. Antes del desarrollo cromatográfico, se emplearon las pruebas con desarrollo de color de Lieberman para anorécticos y la de formaldehído/sulfuro para benzodicepinas, lo que permitió una identificación presuntiva de dichos fármacos. Los extractos obtenidos se cromatografiaron sobre placas HPTLC de sílica gel. Se emplearon tres sistemas de disolventes: (1) cloroformo/metanol (90:10), (2) heptano/tolueno/dietilamina (75:15:10) y (3) heptano/acetato de etilo/etanol/hidrocloruro de amonio del 27 al 30 % (p / v) (70:70:10:5), mézclas que mostraron buena distribución de Rf. Los bajos coeficientes de correlación entre los sistemas permitió emplearlos a la vez para aumentar la probabilidad de identificación. Los valores de Rf fueron estandarizados por medio de dos sustancias de referencia, diazepam para benzodicepinas y fenproporex para anorécticos. El sistema (1) se puede emplear como sistema de discernimiento para benzodicepinas, mientras que para anorécticos es el sistema (2). Posteriormente los fármacos se pueden confirmar en el sistema (3). Los fármacos se detectan sobre las placas por la secuencia de aspersión que incluye (1) ninhidrina, (2) solución de iodo-platino acidificado y (3) reactivo de Dragendorff. Por la combinación de los resultados de las pruebas con desarrollo de color, los Rf en los diferentes sistemas HPTLC y los colores desarrollados por los diversos agentes de revelado es posible identificar a dichos fármacos.



## I. INTRODUCCION

Desde hace tiempo el hombre ha hecho uso de fármacos con fines no médicos. El tipo de fármacos que suelen emplearse en dosis no prescritas puede variar entre somníferos, tranquilizantes, antidepresivos, analgésicos y estimulantes. En el caso de narcóticos, las drogas (denominación genérica de cualquier sustancia natural o sintética de efecto estimulante, depresivo, o narcótico) implicadas principalmente son la marihuana, el hachís, el LSD, la cocaína, la morfina y la heroína. (1)

Por lo anterior, se han emitido leyes para controlar la venta y distribución de todos los medicamentos depresores, estimulantes y otros fármacos propicios de abuso. De acuerdo con lo establecido en el artículo 244 de la Ley General de Salud, para los efectos de esta Ley, se consideran sustancias psicotrópicas aquellas que determine específicamente el Consejo de Salubridad General o la Secretaría de Salud, y en general, los barbitúricos y otras sustancias naturales o sintéticas depresoras o estimulantes del Sistema Nervioso Central que por su acción farmacológica pueden inducir farmacodependencia. Ahí se proporciona una lista de medicamentos que, con base en lo dispuesto por el artículo 227 de la ley General de Salud, se determina que integran los grupos a que se refiere el artículo 226 de dicha Ley en sus fracciones I, II y III. (2)

Dentro de dicho artículo están incluidas las benzodiazepinas y anoréxicos objeto de este estudio. Se ha observado que entre los fármacos controlados éstos son los de mayor abuso. En el grupo de las benzodiazepinas se encuentran principalmente el diazepam, lorazepam, clonazepam, flunitrazepam, clordiazepóxido y flurazepam; de los anoréxicos se puede mencionar a la fentermina, dietilpropión, mazindol, fenproporex y fenfluramina.

La tendencia común de que la posesión, uso y abuso de fármacos controlados está relacionada con actos delictivos propicia la necesidad e interés por el desarrollo de un método analítico general, rápido, confiable y de bajo costo, que permita determinar si una forma

farmacéutica contiene uno o varios principios activos considerados como psicotrópicos, para colaborar eficientemente con el Ministerio Público a fin de tipificar un delito, ya que al iniciarse una averiguación previa relacionada con la posesión, uso y abuso de fármacos se pide el análisis químico a efecto de proporcionar el dictamen correspondiente para determinar si el principio activo corresponde a la denominación o grupo de psicotrópicos de acuerdo a la Ley General de Salud.

Los métodos comúnmente disponibles para la identificación de fármacos de abuso pueden ser clasificados de la siguiente forma: técnicas espectroscópicas, técnicas cromatográficas, polarografía, inmunoensayo, pruebas con desarrollo de color, etc. (3,4). Aunque existen esquemas de análisis, estos fueron diseñados para la determinación de fármacos y sus metabolitos en orina; para estos casos en particular los esquemas son muy elaborados, pues involucran extracción ácido base y el fraccionamiento de la muestra con diferentes disolventes.

Por lo citado, se requiere de un método de análisis para la identificación de este tipo de fármacos en productos farmacéuticos, que sea accesible a la mayoría de los laboratorios de Química Forense de nuestro país, ya que no todos los laboratorios cuentan con el equipo instrumental adecuado. Por esta razón la Cromatografía en Capa Fina puede ser una técnica útil para el análisis de sustancias desconocidas en productos farmacéuticos y sustancias puras, pues posee las siguientes ventajas: mínima instrumentación, bajo costo, simplicidad, mínimo espacio en el laboratorio, rapidez, excelente resolución de componentes, alta sensibilidad para una amplia variedad de fármacos, especificidad y fácil interpretación de los resultados.

## **II. FUNDAMENTACION**

### **2.1. Antecedentes y Situación Actual del Consumo de Drogas en México.**

A mediados de siglo, aparece en el continente americano el llamado "fenómeno de las drogas", que por su trascendencia, influiría en aspectos fundamentales de la vida nacional de varios países de la región, incidiendo en sus economías y relaciones sociales.

Posteriormente, éste fenómeno pasó de un problema secundario a ser un problema fundamental para muchos gobiernos.

Aunque la producción y uso de sustancias de tipo psicotrópico era práctica común en muchas regiones de América desde antes de la llegada de los españoles, su uso era con fines médicos y rituales. Sin embargo, la posterior industrialización y surgimiento de drogas sintéticas generó y propició el consumo de numerosas drogas, para fines médicos y no médicos.

Las cifras disponibles e incompletas sobre el consumo de drogas a nivel mundial son las siguientes (5):

existen 4.8 millones de personas en el mundo que son consumidoras de cocaína;

3.4 millones consumen barbitúricos, sedantes y tranquilizantes;

2.3 millones son consumidores de anfetaminas;

1.7 millones consumen opio;

1.6 millones consumen hojas de coca;

750, 000 consumen heroína y

más de 30 millones consumen marihuana

Los consumidores de drogas son farmacodependientes vueltos adictos por el uso y abuso de drogas prescritas médicamente. Las drogas ayudan "artificialmente" al individuo a adaptarse a las exigencias que la sociedad urbana impone, pues el hombre que vive en las grandes urbes

cotidianamente se enfrenta a la tensión generada por el vértigo de la ciudad y recurre al uso de depresores y estimulantes del Sistema Nervioso Central (SNC).

Para los años cincuenta se encuentran las primeras informas en México del empleo de disolventes inhalables con el propósito de alitar el SNC.

En la década de los sesenta, diversos movimientos juveniles, fomentan el consumo de drogas en nuestro país. El uso de marihuana y drogas sintéticas con acción sobre el SNC se incrementó, tendencia que continuó en los años setenta.

En los ochenta, los disolventes inhalables y la marihuana eran las drogas de mayor consumo en nuestro país. Al finalizar esta década, se observa un aumento en el consumo de cocaína.

De acuerdo con la "Encuesta Nacional de Adicciones" efectuada en 1988, el 4.8 % de la población urbana entre 12 y 65 años ha consumido una o más drogas, lo que significa que existen 1,713,000 usuarios de cuando menos una vez; el 2.1 % de la población fue usuario activo en los 12 meses previos al estudio y 0.9 % en el mes anterior. (5)

Lo anterior indica que es oportuno que la sociedad mexicana desarrolle una seria acción de tipo preventiva que detenga o anule el consumo de estas drogas, para evitar que los índices de consumo, aún bajos, alcancen valores altos.

Dentro de las acciones que tendrán que llevar a cabo diversas instituciones del Sector Salud, indudablemente comprende la identificación de sujetos adictos para su posterior rehabilitación. El laboratorio de Química debe desempeñar un papel importante a fin de:

- Identificar y cuantificar en fluidos biológicos la droga consumida.
- Determinar la última vez que fue consumida.
- Identificar en muestras de calle (formas farmacéuticas), el tipo de droga consumida.

## **2.2. Análisis de Drogas.**

El análisis de drogas es una estrategia efectiva para la identificación de sujetos adictos a ellas, pero se presta a controversias por la cuestión de los derechos humanos.

Actualmente muchas oficinas de gobierno realizan análisis para la detección de uso y abuso de drogas para determinados empleos. En adición a lo anterior, muchas compañías privadas han desarrollado programas para la detección de drogas en orina en su personal de planta y como requisito de ingreso al mismo, sobre todo en aquellos trabajos que requieren absoluta coordinación sensorial y motora.

El análisis de drogas se realiza en muestras de orina como primera prueba o como una técnica de discernimiento para sustancias como la marihuana, cocaína, opiáceos, barbitúricos, anfetaminas y benzodiazepinas.

La orina se usa como fluido de prueba ya que es un producto normal del cuerpo, fácil de obtener y colectado en forma no invasiva.

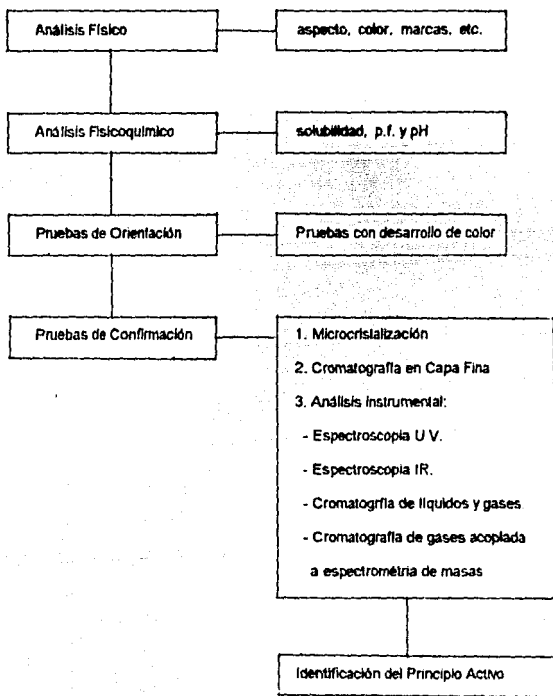
Los procedimientos más comunes para el monitoreo son: Pruebas de inmunoensayo, específicamente la prueba de inmunoensayo multiplicador enzimático, conocida como EMIT (por sus siglas en inglés) y el radioinmunoensayo. Ambos procedimientos usan anticuerpos específicos para drogas, para diferenciar muestras positivas y negativas. Son pruebas rápidas, relativamente baratas y muy sensibles para la mayoría de las drogas.

Dos de los inconvenientes de estas técnicas se refieren a que se necesita del consentimiento del individuo para la recolección de la muestra, y a que se obtienen falsos positivos, pues no son del todo específicas, debido a que diversas sustancias reaccionan en forma cruzada con otras drogas.

Por otra parte, entre las pertenencias y/o ropas de los supuestos usuarios a las drogas se pueden encontrar artefactos para el uso, preparación o administración de la misma, o en su

defecto, se encuentran trazas de polvo, cápsulas, tabletas o grageas de dicha droga, susceptibles de analizarse. (6)

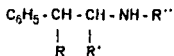
En este último caso, la estrategia de análisis a seguir varía en relación a fluidos biológicos y es la siguiente:



### 2.3. Aspectos Farmacológicos Generales de los Anoréxicos.

Aunque en rigor el término anfetaminas designa a la forma racémica (dl) de la  $\beta$ -fenilisopropilamina, el nombre anfetaminas ha venido a abarcar no sólo a la primera entidad química, el isómero dextrógiro dextroanfetamina y su homólogo N-metanfetamina, sino, en un contexto amplio, a una gran cantidad de sustancias estructural y farmacológicamente relacionadas con ella. Muchas veces la lista de fármacos de los que se abusa comprende anoréxicos (aminas simpatomiméticas destinadas a suprimir el apetito, entre ellas están fenproporex, fentermina, fenfluramina y el dietilpropión) en la clasificación general de anfetaminas o agentes tipo anfetamínicos (a excepción del mazindol).

Las anfetaminas son fenilaminas sintéticas con un anillo aromático y una cadena lateral etilamina que tiene un sustituyente alquilo en el carbono alfa. Su estructura general es la siguiente:



En los años 70's, se impusieron restricciones severas a la producción y distribución de anfetaminas, disminuyendo la producción legítima de este fármaco. Recientemente, se han desarrollado varios fármacos para reemplazar a las anfetaminas como anoréxicos y se conocen colectivamente como análogos o congéneres de las anfetaminas. Incluyendo entre otros al dietilpropión, mazindol, fentermina, fenproporex y fenfluramina.

Las anfetaminas son estimulantes del SNC. Actúan provocando el vaciamiento de las vesículas de almacenamiento de neurotransmisores, hacia el espacio sináptico.

Cuando se administran anfetaminas, el apetito y la fatiga disminuyen. En general, los sentidos están en alerta y el cuerpo en un estado de tensión. Estos fármacos hacen que el usuario

trabaje más de lo necesario y por más tiempo de lo esperado. Sus efectos duran varias horas después de su administración. (7)

Los efectos más destacados sobre el SNC son diversas manifestaciones de estímulos que originan inquietud, insomnio, hiperactividad e irritabilidad. En algunos pacientes puede inducir ansiedad y en otros, una cierta euforia que les da sensación de satisfacción, esperanza y afecto por lo cual pueden dar lugar a su abuso. Estas drogas calman la percepción, pero no la fatiga real. Las dosis grandes pueden causar alucinaciones y el uso continuo y prolongado puede llevar a la paranoia y a otras alteraciones peligrosas del comportamiento.

Se emplean en el tratamiento de la narcolepsia debido a su capacidad para estimular un estado de vigilia. Actualmente se usan con poca frecuencia para el tratamiento de la depresión nerviosa central debida a sobredosis de drogas.

También pueden ser útiles en ciertos trastornos motores. Se ha observado un efecto benéfico sobre los estados depresivos, pero en este aspecto han sido superados por otros fármacos.

La supresión del apetito (efecto anorexígeno) es el efecto más ampliamente usado y del cual se hace mayor abuso; el potencial para inducir abuso varía entre los diversos fármacos anoréxicos.

A pesar de que estos congéneres producen los mismos efectos que la anfetamina, son menos potentes. (8)



## **2.4. Aspectos Farmacológicos Generales de las Benzodiazepinas.**

Las benzodiazepinas son un grupo de fármacos que producen depresión específica del SNC y están clasificadas dentro del grupo de los sedantes-hipnóticos, específicamente dentro de los tranquilizantes menores. Son útiles para tratar condiciones de ansiedad y neurosis (ansiolíticos).

La eficiencia, el espectro de acción clínico y el amplio margen de seguridad de las benzodiazepinas, llevaron a desarrollar amplios programas de investigación que han dado como resultado el descubrimiento de varias compuestas potencialmente útiles.

En general, las benzodiazepinas se clasifican de acuerdo a la duración de sus efectos en:

a) Benzodiazepinas de acción larga: permanecen en el cuerpo por largo tiempo y necesitan tomarse una o dos veces al día. Ejemplos:

- diazepam
- clonazepam
- clordiazepóxido
- flurazepam
- prazepam

b) Benzodiazepinas de acción intermedia: de acción corta, se eliminan más rápido del cuerpo; se pueden tomar de 3 a 4 veces al día. Ejemplos:

- temazepam
- alprazolam

c) Benzodiazepinas de acción corta: son las de acción más corta; se eliminan rápidamente y pueden administrarse de 3 a 4 veces por día. Ejemplos.

- oxazepam
- lorazepam
- triazolam (7)

Las benzodiazepinas se emplean en el alivio sintomático de la ansiedad y los estados de tensión debidos a ambientes de estrés o a factores emocionales. También son útiles en los estados psiconeuróticos caracterizados por tensión, ansiedad, fatiga, síntomas depresivos o agitación. Ciertas benzodiazepinas (clordiazepóxido y diazepam) también son útiles en la abstinencia alcohólica aguda. El clonazepam es útil solo o como coadyuvante en el manejo de

varios tipos de convulsiones epilépticas. El diazepam es útil como coadyuvante en procedimientos endoscópicos, en el manejo del espasmo agudo de los músculos esqueléticos y mediante inyección parenteral, en el estado epiléptico para controlar las convulsiones por sobredosis de anestésicos locales y otros episodios convulsivos recurrentes severos. (8)

## **2.5. Pruebas con Desarrollo de Color.**

### **2.5.1. Introducción.**

Para la identificación inicial del principio activo en formas farmacéuticas y fluidos biológicos se recomienda emplear pruebas cualitativas presuntivas, a pesar de que éstas pruebas en su mayoría sean empíricas y los principios de la reacción se desconozcan.

Dichas pruebas son versátiles, de simple ejecución y pueden ser aplicadas directamente sobre alícuotas de la muestra, así como en muestras biológicas tales como sangre, orina, jugo gástrico o vómito.

La selección de las reacciones químicas apropiadas se puede convertir en un problema, dado las diversas pruebas que están reportadas; por ejemplo, para el opio, hay más de 50 reactivos propuestos. Aunque la mayoría de estas pruebas carecen de especificidad, sin embargo es posible obtener un cierto grado de especificidad al hacer uso de combinaciones de los reactivos propuestos. Cuando va a ser empleada una prueba presuntiva, es esencial seleccionar aquella que proporcione la cantidad máxima de información con una mínima cantidad de muestra.

A pesar de las limitaciones de estas pruebas ( como la obtención de falsos positivos o falsos negativos, la falta de especificidad y la dificultad de la Interpretación de algunos resultados) aún continúan proporcionando respuestas preliminares rápidas en relación a la sustancia estudiada. La información útil proporcionada por estas pruebas incluye: (a) la ausencia definitiva de un compuesto o un grupo de compuestos y (b) la posible presencia de un compuesto o compuestos que pertenecen a un cierto grupo. La información positiva proporcionada por estas pruebas deberá ayudar en la selección de la prueba de confirmación más específica (9)

### 2.5.2. Procedimiento general de las pruebas.

Ordinariamente estas reacciones se realizan sobre placas de porcelana o en tubos de ensayo. Se coloca una cierta cantidad de la muestra problema y posteriormente se adiciona el reactivo de color. Simultáneamente se realiza la reacción utilizando controles negativos y positivos. El control positivo verifica que el color en particular se produce por el reactivo, siempre y cuando el fármaco se encuentre en cantidad suficiente. El control negativo verifica la ausencia del fármaco al no desarrollarse el color producido por el control positivo.

La mayoría de las muestras no requieren de una preparación especial. Se usa una pequeña porción del contenido de una cápsula, el producto del raspado de una tableta, o una porción representativa de una planta. Sin embargo, algunas preparaciones comerciales contienen más de un fármaco lo que puede complicar la interpretación del color de la prueba. Al tener diversos compuestos, se puede realizar la extracción de una porción de la muestra, para así poder aislar compuestos ácidos, neutros y básicos antes de proceder a realizar la prueba.

### 2.5.3. Esquemas de pruebas (reactivos).

Entre los esquemas que se han descrito se encuentra el desarrollado por Masoud (9) en el que se emplean tres reactivos como base para la identificación del compuesto desconocido, se trata de los reactivos de Mayer, Wagner y Dragendorff. El esquema de Masoud es relativamente simple y funciona bien para la identificación de diversas sustancias de abuso.

El esquema de Fitzgerald y Watasek (10) utiliza igualmente una serie de tres pruebas de color: Keller, Marquis y ácido nítrico, lo que permite la identificación presuntiva de 28 sustancias de las que se abusa comúnmente. Al emplear este esquema es necesario el uso de pruebas adicionales para identificar grupos en particular que no reaccionan con ninguno de los tres reactivos anteriores.

Otro esquema es el desarrollado por Velapoldi y Wicks (11) en el que se parte del empleo del reactivo de Marquis el cual produce seis grupos de colores, posteriormente en cada grupo se identifica la sustancia desconocida mediante el empleo de otros reactivos.

De forma un poco más específica, Clarke (12) recomienda el empleo del reactivo formaldehído/ácido sulfúrico para la identificación de benzodiazepinas, mientras que para algunos de los anoréxicos menciona al reactivo de Lieberman.

La identificación definitiva debe realizarse mediante el uso de otras técnicas tales como Cromatografía en Capa Fina, cromatografía de líquidos, cromatografía de gases; pruebas microcristalinas; espectroscopía de infrarrojo, ultravioleta, visible y de masas; etc.

#### 2.5.4. Ventajas de las pruebas de orientación con desarrollo de color.

Estas pruebas son rápidas y de bajo costo. Algunas de ellas forman el color inmediatamente después de que entran en contacto el reactivo y la muestra. El equipo que se requiere para la realización de las pruebas es de bajo costo.

Una prueba positiva indica la posible presencia de un compuesto o grupo de compuestos, lo que ayuda significativamente a la elección del procedimiento de prueba definitiva.

Lo más importante es que una prueba negativa elimina la probabilidad de la presencia de un grupo de compuestos. (13)

#### 2.5.5. Desventajas de las pruebas de orientación con desarrollo de color.

Las desventajas de las pruebas de desarrollo de color se pueden enumerar de la siguiente forma:

1. Su principal desventaja es la falta de especificidad. Se debe valorar la información que se puede obtener de una prueba no específica, contra el tamaño de la muestra que se tiene. Estas pruebas destruyen la muestra, así que si demasiada muestra se emplea para desarrollar la

prueba, la cantidad requerida para la identificación definitiva no será suficiente si se cuenta con poca muestra.

2. Pueden ocurrir falsos positivos. Otros fármacos o compuestos pueden dar el mismo color o similar color con el mismo reactivo. Si varios fármacos están presentes en la muestra, el reactivo puede reaccionar con más de un fármaco y desarrollar un color no indicativo de un único compuesto.

3. Pueden tener lugar falsos negativos. No debe desarrollarse color si el compuesto de interés no está presente en concentraciones detectables. Esto es raro, no obstante, que la mayoría de los reactivos de prueba son sensibles en el intervalo de los microgramos.

4. Puede ser difícil la interpretación de los resultados. Este es un problema aún en las manos de personal experto y generalmente ocurre como resultado de adulterantes en el material de prueba. Este problema se puede eliminar mediante el uso de técnicas de separación, mismas que requieren tiempo, habilidad y conocimientos.(13)

## 2.4. Espectroscopia de Infrarrojo

Dado que el espectro IR de una sustancia es característico de la misma, lo anterior permite identificarla. Por lo tanto, el empleo de la espectroscopia de infrarrojo es útil para ser empleada como método de referencia, con la finalidad de asegurar que la sustancia destinada a ser utilizada en el análisis cromatográfico es la de la sustancia de interés.

El término espectrofotometría se refiere a las mediciones de las cantidades absorbidas o emitidas de luz como función de la longitud de onda y su interacción con la materia.

La base de las espectroscopias es la interacción entre la radiación electromagnética y la materia, donde el intervalo de las radiaciones va desde las ondas de radio hasta los rayos cósmicos.

La región infrarrojo se divide a su vez en infrarrojo cercano ( $13333-4000\text{ cm}^{-1}$ ), infrarrojo medio ( $4000-400\text{ cm}^{-1}$ ) e infrarrojo lejano ( $400-10\text{ cm}^{-1}$ ). Siendo la región media la empleada en el análisis o identificación de fármacos. La región del infrarrojo tiene menor energía que la región ultravioleta y son producidas por cambios en los niveles moleculares que requieren menos energía; y provocan variaciones en los niveles vibracionales y rotacionales de las moléculas. Esta es la región más importante del espectro para la identificación del principio activo de medicamentos.

Cuando una onda infrarroja incide sobre una molécula, puede provocar cambios en los niveles de energía vibracionales o rotacionales. Durante este proceso la molécula permanece en su estado base electrónico, o sea, el de menor energía.

No todas las frecuencias aparecen en el espectro infrarrojo ya que solo son activas (aparecen) aquellas que llevan un cambio del dipolo de enlace, por lo cual la aparición de las bandas de absorción depende de la simetría de la molécula.

Las vibraciones de valencia corresponden a desplazamientos en ángulo recto con respecto a la dirección del enlace y producen una deformación del enlace químico. (14)

### 2.8.1. Muestreo de la muestra.

Básicamente existen tres formas de obtener un espectro IR, las cuales están de acuerdo a la naturaleza de la muestra, y son las que se describen a continuación:

1. Los espectros de gases o de líquidos con bajo punto de ebullición se obtienen por la expansión de la muestra dentro de una celda. La técnica de fase de vapor está limitada debido al porcentaje relativamente elevado de compuestos que no poseen la suficiente presión de vapor para producir un adecuado espectro de absorción.

2. Los líquidos se pueden examinar en solución o como compuestos puros. Los líquidos puros y soluciones se examinan entre placas de cloruro de sodio. Las placas de cloruro de plata se emplean con muestras que disuelven las placas de cloruro de sodio.

En el caso de soluciones, el disolvente seleccionado debe ser seco y transparente a la región de interés. Entre los disolventes más empleados están el cloroforno, el tetracloruro de carbono y el disulfuro de carbono. Se debe de evitar la combinación de disolventes y solutos que puedan reaccionar. Por ejemplo, el disulfuro de carbono no puede usarse como disolvente para aminas primarias o secundarias. Los amino alcoholes reaccionan ligeramente con el disulfuro de carbono y con el tetracloruro de carbono.

3. Los sólidos se examinan como discos compresos o como un depósito cristalino en forma de película. La técnica de disco compreso depende de la compresión del polvo seco de bromuro de potasio. La muestra (0.5-1 mg) se mezcla íntimamente con aproximadamente 100 mg de polvo seco de bromuro de potasio. La mezcla es prensada bajo una presión de 10,000 - 15,000 libras por pulgada cuadrada, obteniéndose un disco transparente. La calidad del espectro depende de la calidad del mezclado y del tamaño de partícula suspendida, que debe ser de 2  $\mu\text{m}$  o menos.



Las películas solamente son útiles cuando el material se puede depositar de la solución o enfriarse de un microcristal fusionado o como una película cristalina. La técnica de película es adecuada particularmente para obtener espectros de plásticos y resinas. (15)

### 2.6.2. Aplicaciones de la espectroscopia.

Las aplicaciones de la espectrofotometría son las siguientes:

- a) Es herramienta general de investigación: la absorción de la luz por un material puede relacionarse con la estructura molecular de la muestra. De la posición e intensidad de las bandas de absorción se pueden deducir las "constantes de enlace" que mantienen unida a la molécula y hacer estudios sobre la naturaleza de los enlaces moleculares.
- b) En el análisis cualitativo (criterio de pureza, naturaleza química y número de componentes) y cuantitativo (soluciones, sólidos y gases) de compuestos de interés, en poco tiempo y con bastante precisión.
- c) Estandarización y análisis del color de las sustancias de interés y de esta manera determinar periodos de caducidad de los mismos. (15)

### 2.6.3. Identificación de sustancia por IR

Como ya se ha indicado, el espectro infrarrojo de una sustancia es una característica como lo es la densidad óptica, el punto de fusión o algún otro parámetro físico. En general cuando los espectros de dos sustancias son idénticos, se puede suponer que es altamente probable que se trate de una misma sustancia. Sin embargo, esto no quiere decir que se pueda tener la certeza absoluta de ello, ya que hay sustancias diferentes que tienen espectros idénticos. Por ejemplo, los isómeros ópticos en solución dan el mismo espectro, mientras que en estado sólido los espectros pueden ser diferentes. En pocas palabras el análisis de los espectros nos permite

como regla general (con algunas excepciones) identificar una sustancia. Por tal efecto es importante tomar en cuenta los siguientes puntos:

- a) Se debe comparar los espectros tomando concentraciones iguales y en el mismo medio. En el caso de soluciones es importante usar el mismo disolvente.
  - b) Se deben comparar espectros obtenidos a diferentes concentraciones para poder resolver los picos de baja densidad y los de alta intensidad.
  - c) Cuando los espectros sean de diferentes concentraciones la relación de las intensidades de los picos del espectro debe ser igual una y en otro, si es que se trata de la misma sustancia.
  - d) Usar cuando sea posible los compendios de espectros que existen y obtener los espectros de la sustancia que se quiere identificar en las condiciones de los espectros de comparación. Por otra parte cuando dos muestras tienen diferentes espectros IR obtenidos en iguales condiciones, entonces se puede afirmar con absoluta certeza que se trata de dos sustancias diferentes.
  - e) El método empleado para la identificación del espectro de la sustancia dependerá de que tanta información acerca del compuesto esté disponible, por ejemplo, valores de Rf y reacciones de color.
- (15)

La similitud entre las moléculas de los fármacos benzodiazepinas y anabólicos como grupos individuales permite agruparlos para diferenciarlos. De forma general, en el caso de las benzodiazepinas es común encontrar una banda entre  $1680$  y  $1725\text{ cm}^{-1}$  que corresponde al carbonilo de la amida presente en la molécula.

Por otro lado, aquellas sustancias que no contengan un carbonilo tales como fenfluramina, fenproporex, fenfermina y mazindol presentarán una banda en la región de  $695$  a  $705\text{ cm}^{-1}$  que se asigna al movimiento fuera del plano del anillo aromático.

En base a los diversos grupos funcionales presentes en la molécula, su clase ( $1^{\circ}$ ,  $2^{\circ}$  o  $3^{\circ}$ ), su posición (sustitución), así como el comparar los espectros IR obtenidos con los reportados, se podrá decir si el espectro IR corresponde o no a la sustancia de interés.

## **2.7. Cromatografía en Capa Fina.**

### **2.7.1. Introducción.**

En la práctica diaria de la Química Forense, es común encontrarse con muestras complejas. En estas muestras, la separación de los componentes de la matriz es fundamental para la identificación posterior, por lo cual la extracción y separación del principio activo es el punto crítico en el análisis forense. Resolviendo el paso anterior, la identificación y cuantificación del analito es relativamente fácil.

La Cromatografía en Capa Fina es una de las técnicas más usadas para la separación e identificación de fármacos. Se puede utilizar ya sea para fármacos en su estado puro o extractos de formulaciones farmacéuticas, de materiales fabricados ilícitamente y en el estudio de muestras biológicas.

Aunque la Cromatografía en Capa Fina es básicamente una técnica de separación, bajo condiciones controladas se puede emplear para identificar y cuantificar fármacos. Es considerada como un método analítico básico debido a su simplicidad, confiabilidad, bajo costo y selectividad en la detección. Además, requiere de equipo y espacio mínimo, por lo que es una técnica adecuada para cualquier laboratorio.

En el análisis forense, la Cromatografía en Capa Fina se emplea como una técnica de identificación confirmativa.

### **2.7.2. Fundamentación.**

La Cromatografía en Capa Fina implica la separación de sustancias químicamente relacionadas. El sistema está compuesto de dos fases; una de ellas es la fase estacionaria (adsorbente) y la otra es la fase móvil. La fase estacionaria es una capa fina de un polvo finamente pulverizado unida a un soporte sólido. La fase móvil es un líquido en el que la sustancia a separar

se disuelve, este asciende por acción capilar a través de la fase estacionaria y los componentes se mueven a través de la misma tomando diferentes posiciones.

Dependiendo de las interacciones de estos componentes, de su estado físico y en general de sus propiedades fisicoquímicas, por ejemplo: grado de polaridad, grado de ionización, resultará cualquiera de los principios fisicoquímicos que rigen el método de separación cromatográfica.

Por ejemplo, en los compuestos aromáticos (como en algunos aniónicos) la existencia de ciertos sustituyentes puede considerarse importante para determinar el poder de elución del mismo. Un compuesto con grupos -COOH por ejemplo, tendrá un mayor poder de adsorción y menor de elución que otros con grupos -Cl. El poder de adsorción de sustituyentes en compuestos aromáticos es la siguiente, de mayor a menor: -COOH, -CONH<sub>2</sub>, -OH, -NHCOCH<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -OCOCH<sub>3</sub>, -COCH<sub>3</sub>, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -NO<sub>2</sub>, -OCH<sub>3</sub>, -H, -Cl. Considerando el tipo de interacción que existe entre los componentes del sistema es posible establecer por lo tanto desde un punto de vista teórico los siguientes tipos de cromatografía:

#### 1. ADSORCION.

Basada en la diferencia de polaridad entre las moléculas de la mezcla y el adsorbente.

El adsorbente (fase estacionaria) posee un alto poder de atracción electrostática sobre la mezcla, la elución o separación puede efectuarse mediante fuerzas competitivas del disolvente empleado.

Los compuestos de la mezcla tienden a adsorberse al sólido (fase estacionaria) con diferente grado de intensidad de acuerdo a su polaridad, tipo y número de grupos funcionales, longitud de la cadena, etc.

Los compuestos de mayor polaridad se adsorben más fuertemente y migran a través del sistema más lentamente que los compuestos no polares o de menor polaridad.

En la cromatografía de adsorción la posición de la sustancia en la placa está definida por la constante de adsorción, que es igual a:

$$C_a = C_a / C_m$$

donde:

$C_a$  = concentración del compuesto a la altura específica en un sistema.

$C_a$  = concentración en el adsorbente.

$C_m$  = concentración en la fase móvil.

Mientras mayor sea la atracción del adsorbente por el compuesto, mayor será  $C_a$  y éste no será eluido tan fácilmente. El coeficiente de adsorción ( $C_a$ ) será mayor.

Si por el contrario, el grado de atracción electrostática que posee el adsorbente sobre un compuesto es muy bajo, éste será fácilmente eluido y su concentración en el disolvente ( $C_m$ ) será mayor que en el adsorbente. El coeficiente  $C_a$  será menor.

Existen dos casos extremos:

$C_a$  = máximo.

$C_a$  = mínimo.

y entre ambos existe toda una serie de valores.

En general puede afirmarse que los procesos de adsorción son adecuados para separar componentes de polaridad distinta e isómeros estructurales cuyas energías de interacción con un mismo adsorbente sean distintas.

## 2. PARTICION.

El mecanismo de separación, se basa en la diferencia de solubilidades de los compuestos a separar entre dos fases no miscibles entre sí, que son la fase estacionaria y la fase móvil las cuales son líquidas. La función del adsorbente en este tipo de cromatografía es servir exclusivamente como soporte inerte para la fase estacionaria.

Puesto que los sitios capaces de ejercer una atracción electrostática sobre la mezcla están ocupados por un líquido, la separación se hace entre dos fases líquidas en las cuales los compuestos tienden a distribuirse. A este proceso se le llama por tal motivo "partición" o "distribución".

En la cromatografía de partición la separación de un compuesto depende del coeficiente de partición (distribución) ( $K_d$ ):

$$K_d = C_m / C_o$$

donde:

$C_m$  = concentración del compuesto en la fase estacionaria líquida que cubre los sitios de atracción electrostática del adsorbente.

$C_o$  = concentración del compuesto en la fase móvil.

Aquí existen igualmente dos casos extremos:

$C_d$  = máximo.

$C_d$  = mínimo.

Los procesos de partición permiten la separación de sustancias de distinta solubilidad, p. ej. en una serie homóloga.

Existen además la cromatografía de intercambio iónico, electroforesis y exclusión o filtración molecular.

Se sabe sin embargo, que la teoría sólo permite predecir a grandes rasgos el comportamiento real de las sustancias. La cromatografía es todavía una técnica marcadamente empírica, debido a que, para la mayoría de los sistemas, contribuyen a la separación tanto los procesos adsorptivos como los de partición. (16, 17)

### 2.7.3. Fase estacionaria (adsorbentes).

Una capa fina de fase estacionaria apropiada está adherida a una placa adecuada, ya sea vidrio, aluminio o plástico. Tal adherencia está asegurada por el mezclado con un agente aglomerante como el sulfato de calcio. El vidrio es el material más empleado. La mayoría de las fases estacionarias son adsorbentes y la separación se debe a la interacción entre la muestra y la superficie de la fase estacionaria.

Las características principales y los parámetros de los adsorbentes se resumen en los tres apartados siguientes:

#### (1) Composición química y estructura.

Los numerosos adsorbentes se clasifican básicamente en dos tipos:

- Fases polares (hidrófilas), también llamadas straight phases o fases normales.
- Fases apolares (lipófilas), también llamadas reversed phases o fases reversas (RP).

En medio se encuentran las fases medianamente polares. En su mayoría se trata de adsorbentes modificados como por ejemplo las fases nitriladas, dioladas o aminadas. Sus propiedades se asemejan a las de las fases normales o reversas dependiendo del eluyente.

Las fases polares se combinan en general con eluyentes no polares como cloroformo/metanol. Por el contrario, las fases reversas se combinan con eluyentes con alto contenido en agua. Naturalmente, al cambiar de fase directa a fase reversa se invierte el orden de elución.

Los adsorbentes de mayor significación práctica son el gel de sílice, el gel de sílice modificado, el óxido de aluminio y la celulosa.

Cerca de un 90% de las separaciones se realiza sobre gel de sílice, un polvo poroso y amorfo. Contiene en su superficie grupos Si-OH que pueden formar enlaces por puente de hidrógeno entre ellos o con sustancias polares.

La literatura sobre el empleo de gel de sílice en cromatografía de capa fina, principalmente para la identificación de fármacos, ya sean sólidos o líquidos (como las benzodiazepinas y anoréticos) es muy amplia de acuerdo con Egli y Keller (18); en cuanto a las fases reversas, la literatura es mucho menos abundante. En su estudio ellos encontraron que la cromatografía en fase normal y fase reversa son métodos que poseen versatilidad similar y que son complementarias.

Las gomas de sílice modificadas se obtienen por reacción mediante enlaces apropiados. Los grupos funcionales como  $-NH_2$ , DiOL o  $-CN$  quedan así fijados químicamente sobre la superficie del adsorbente. Los gomas de sílice hidrofobizadas con alquilociclenas (silinizadas) son de especial interés en cromatografía.

Partiendo del gel de sílice se obtienen fases apolares llamadas fases reversas. Se comercializan sistemas RP con 1, 8 ó 18 átomos de carbono en la cadena hidrófoba: las fases RP-2, RP-8 y RP-18.

Por último existen también gomas de sílice con grupos funcionales quirales (ópticamente activos). Estas fases permiten separar sustancias ópticamente activas en sus enantiómeros por interacción de diastereómeros.

## (2) Características de grano y de poro.

La eficiencia de la separación de un adsorbente está determinada por su estructura geométrica. También forma parte de ella el tamaño de partícula y su distribución. La selectividad de un adsorbente depende, por el contrario, de la estructura química del material.

## (3) Parámetros de capa.

El espesor de las capas de separación analítica se sitúa típicamente entre los 100 y 250  $\mu m$ , mientras que el de las capas de separación normales está alrededor de los 250  $\mu m$  y el de las capas de CCF de alta eficiencia (HPTLC) alrededor de los 200  $\mu m$ . Para separaciones preparativas existen placas con espesores entre 0.5 y 2 mm.



También influyen en las propiedades de las capas los aglomerantes empleados, que aumentan su estabilidad y fijación (p.ej., el yeso o aglomerantes orgánicos). (16, 17)

#### 2.7.3.1. Modificación del adsorbente.

Las propiedades cromatográficas de la placa pueden ser modificadas mediante el tratamiento de la fase estacionaria con varios reactivos. Esto se logra rotando o sumergiendo la placa en una solución apropiada o por la adición de un modificador al mismo tiempo en que se prepara la placa. Simples cambios en el pH puede ser efectivos, por ejemplo, el tratar las placas de gel de sílice con hidróxido de potasio decrece la retención y produce manchas más redondas para compuestos básicos. Entre los agentes de impregnación más comunes están la soluciones de ácido oxálico o hidróxido de potasio 0.1 - 0.5 N. Clarke (12); Sthal (17); Phillips & Gardiner (19), y Japp & colaboradores (20) hacen uso del hidróxido de potasio para la separación cromatográfica de compuestos lácteos, como lo son las tetraciclinas y anabólicos. Las placas de gel de sílice "ácidas" se emplean preferentemente para separar compuestos ácidos (fenoles, ácidos, etc.) y las placas "básicas" para la separación de alcoholos, aminas, etc. Si la sustancia forma una sal con el agente de impregnación, generalmente no migrará con disolventes débilmente polares. (12, 17)

#### 2.7.4. Fase móvil.

La elección de la fase móvil, ya sea un disolvente o mezcla de disolventes, dependerá de los compuestos a separar y de la fase estacionaria a ser empleada.

Además del adsorbente y su actividad, la elección del eluyente también influye en la separación. Con las fases reversas es fácil encontrar una buena fase móvil, ya que existen pocos disolventes miscibles con el agua. Por otra lado, la amplia variedad de fases móviles para fase normal incrementa el potencial de separación.

El eluyente disuelve del adsorbente las sustancias a separar, haciéndolas avanzar. Cuanto más eluyente se adsorbe sobre el adsorbente, mayor es el poder de elución de éste (poder de desplazamiento). Si la sustancia tiene mayor afinidad por el eluyente que por el adsorbente, se eluye más próxima al frente.

El eluyente también está sometido al proceso cromatográfico. Este fenómeno se pone de relieve cuando se utilizan eluyentes de más de un componente, dando lugar a la aparición de los llamados "frentes  $\beta$ ".

Se ha comprobado la utilidad de ordenar los eluyentes en una sucesión de poder de elución creciente. Esta "serie electrofórica" se corresponde esencialmente con la ordenación de los eluyentes según su polaridad o su constante dieléctrica. Estrictamente hablando, una serie electrofórica es válida sólo para un adsorbente determinado. Con todo, las series para el gel de sílice y el óxido de aluminio son casi iguales, mientras que la serie para una fase RP tiene un aspecto totalmente distinto.

La propiedad más importante de un disolvente que debe emplearse en cromatografía es, por un lado la pureza de éste y por el otro el "poder de elución" del mismo.

Conociendo el poder de elución de un disolvente, es posible seleccionar el más adecuado para cada mezcla que desee separarse. En la mayoría de los casos no es posible efectuar separaciones con un solo disolvente, sino que frecuentemente se emplean mezclas de polaridad intermedia a la de los diferentes disolventes individuales. La serie electrofórica permite seleccionar los disolventes adecuados para obtener la polaridad deseada (16, 17)

Las fases móviles para la identificación de benzodiazepinas y anoréxicos (que son considerados como de tipo anfetamínico) están constituidas por mezclas de metanol, hidróxido de amonio, ciclohexano, tolueno, dietilamina, cloroformo, acetato de etilo, etanol, acetona y heptano; predominando: cloroformo/acetona, metanol/hidróxido de amonio, acetato de etilo/etanol, cloroformo/metanol, ciclohexano/tolueno/dietilamina, etc. (1, 3, 12, 13, 20-35)

### **2.7.5. Análisis por cromatografía en capa fina.**

El objetivo central de la cromatografía en capa fina, es la separación de la mezcla y la identificación subsiguiente de los componentes. Básicamente la secuencia de análisis es la siguiente:

1. Extracción.
2. Aplicación de la muestra (o extracto).
3. Desarrollo cromatográfico.
4. Detección de los compuestos separados.
5. Confirmación (evaluación).

El seguir este procedimiento produce resultados confiables y aceptables.

#### **2.7.5.1. Extracción.**

La preparación de la muestra es una etapa decisiva en todo método de análisis en especial en la determinación de microcomponentes (trazas) y en los casos donde la matriz que rodea a la sustancia de interés es muy compleja. La selección del método más apropiado depende de muchos factores como:

1. Propiedades físicas y químicas del analito. El conocimiento de algunas propiedades fisicoquímicas del analito es esencial en el diseño de un método de preparación de las muestras. Es conveniente conocer su estructura química, peso molecular, solubilidad, propiedades ácido base (pKa), etc.
2. Concentración del analito en la muestra. Este factor tiene importancia decisiva. Para análisis en altas concentraciones en general se requieren preparaciones sencillas como la solubilización y filtración. Análisis en bajas concentraciones, por su parte, pueden requerir metodologías más elaboradas que involucran numerosas operaciones para lograr una solución cuya concentración sea aceptable.

3. Naturaleza de la matriz. La remoción de los componentes de la matriz puede ser un paso crítico en los casos donde la concentración del analito en la muestra se detecta con dificultad o no se detecta.

4. Forma en la que se presenta el analito en la muestra. Es necesario conocer el estado en que se encuentra el analito en la muestra para poder diseñar un método apropiado de preparación. En muestras de origen biológico el analito puede o no encontrarse como tal sino unido a proteínas transportadoras, metabolizado como éster, amida o éter de los ácidos sulfúricos o glucurónicos o metabolizado a otra sustancia diferente. En estos casos sus propiedades químicas pueden cambiar radicalmente.

La naturaleza de la muestra dicta el método básico para preparar la solución a aplicar. Si la muestra es líquida puede, como primera aproximación, aplicarse directamente previa filtración, en cambio si es un sólido es necesario molerlo y homogeneizarlo apropiadamente, posteriormente las sustancias a analizar presentes en la matriz sólida deben solubilizarse en un disolvente adecuado. Estos disolventes deben seleccionarse por su poder solubilizante del analito y su bajo poder solubilizante de los componentes de la matriz de la muestra.

Los métodos de preparación de la muestra más importantes son disolución, extracción líquido-líquido y líquido-sólido (36, 37), mismos que se describen a continuación:

A. Disolución. Separación directa por solubilización de los componentes principales (extracción simple). Al finalizar debe de eliminarse el disolvente. Este método puede ser aplicado a productos farmacéuticos o sustancias puras, como lo mencionan Clarke (12) y Sthal (17), en donde el disolvente de elección es el metanol para algunos fármacos.

B. Extracción líquido - líquido. La muestra se reparte entre dos disolventes no miscibles. La matriz de la muestra se concentra en un disolvente y la sustancia a analizar en el otro. El método hace preciso tener buenos conocimientos químicos. Los componentes de la muestra deben ser conocidos. En el caso que ocupa este trabajo, una solución acuosa del producto farmacéutico

puede ser tratada como una muestra urinaria (1, 3, 13, 21 - 28, 31, 32, 35 - 38), de esta forma se pueden obtener fracciones de compuestos ácidos, básicos y neutros; las benzodiazepinas y anérgicos se encontrarán en la segunda fracción. El procedimiento consiste en tratar a una fase acuosa con álcali y extraerla con un disolvente orgánico, por ejemplo cloroformo.

C. Extracción en fase sólida. Extracción con columnas o cartuchos de plástico rellenas con diversos materiales (tierras diatomas o fases modificadas químicamente que retienen relativamente las sustancias). La muestra se introduce en la columna. La elución con disolventes orgánicos provoca la separación de todas las sustancias. Broich (22) y Kalsha (23) emplearon este método para extraer benzodiazepinas, anfetaminas y compuestos relacionados de muestras urinarias, obteniéndose una mejor eficiencia en la extracción y extractos más limpios.

#### **2.7.5.2. Aplicación de la muestra.**

En general se aplican muestras que han sido sometidas a alguna preparación. Se dibuja una línea con lápiz a una distancia de 1-2 cm del borde inferior de la placa. Las muestras son aplicadas sobre esta línea, llamada el origen. La aplicación puede hacerse puntual o en forma de banda. En general, la aplicación en forma de banda produce un menor alargamiento de la mancha en la dirección del flujo, comparado con la aplicación puntual. Por este procedimiento se eliminan en gran parte las sobrecargas de la capa que pueden conducir a la formación de coles. Además las mezclas aplicadas en forma de banda se separan mejor y se evalúan con mayor exactitud. La desventaja reside en que se pueden aplicar pocas bandas por capa.

La muestra, normalmente de 1-10 µg del material dependiendo del espesor de la capa es disuelta en un pequeño volumen de disolvente (1-10 µl). La elección del disolvente de la muestra es determinante para el tamaño de la mancha de partida. Algunos disolventes cromatografían las sustancias en forma circular sobre el mismo punto de partida, mientras que otros no. El disolvente

usado para aplicar la muestra debe ser volátil y de baja polaridad para que la mancha no se difunda demasiado.

Para aplicar las muestras se utilizan generalmente capilares o microjeringas. Cuando se aplican mediante capilares basta el poder de la capa para hacer fluir la solución a ensayar. La aplicación por jeringa es una aplicación forzada: la muestra se espulsa al ejercer una fuerza sobre la jeringa.

Para análisis cualitativos se usan a menudo tubos de punto de fusión con puntas estiradas a modo de capilares de aplicación. Al usarse capilares debe prestarse atención a que se llenen y vacíen en su totalidad.

La concentración debe escogerse de tal manera que un único vaciado del capilar aporte suficiente sustancia a la capa, ya que aplicar varias veces sobre el mismo punto puede provocar la deformación de la mancha al cromatografiar.

El diámetro de las manchas en el punto de partida no deben ser mayor a 4 mm para cromatografía convencional y menos de 1.5 mm para HPTLC. Las manchas de partida deben secarse completamente antes del desarrollo.

En análisis cuantitativo se utiliza en lo posible equipos de aplicación automatizados. (16)

### **2.7.5.3. Desarrollo.**

En cromatografía en capa fina se entiende por desarrollo que el eluyente o mezcla penetre en la capa de CCF - en general debido al poder capilar, ocasionalmente también por aplicación de presión - y en su avance transporte las sustancias aplicadas en la dirección del flujo. A causa de las interacciones entre muestra, fase móvil y fase estacionaria, las sustancias se separan en sus componentes individuales.

Normalmente se emplean cámaras saturadas por los vapores del eluyente. La cámara es cubierta en el interior por papel filtro en tres de sus lados y posteriormente es llenada con la fase

móvil hasta una altura inferior al punto de aplicación en la placa. Luego se permite la saturación de la cámara por los vapores de la fase móvil. Una vez que se ha equilibrado la cámara se introduce la placa.

Generalmente los desarrollos cromatográficos se realizan con placas de 20 X 20 cm para cromatografía convencional, para algunas fases móviles esto toma alrededor de 2 horas para alcanzar una distancia de 10 - 15 cm. El tiempo de desarrollo se puede reducir considerablemente si las placas se eluyen a una distancia de 5 cm, pues existe un incremento exponencial en el tiempo de desarrollo cuando se incrementa la distancia de desarrollo. La principal desventaja es la pérdida de resolución, lo que puede ser compensado empleando placas HPTLC.

Una vez que la placa se ha desarrollado hasta la distancia predeterminada, es retirada de la cámara y se marca la posición del frente del disolvente antes de la evaporación del mismo.

En la práctica se utilizan distintos métodos de desarrollo. En principio existen tres posibilidades de desarrollo en CCF: desarrollo lineal (ascendente u horizontal), desarrollo circular desde el centro hacia el exterior y desarrollo circular hacia el centro (anticircular) (16, 17). Se describe a continuación únicamente el más empleado:

A) Creciente (lineal). La placa se introduce en un recipiente adecuado de manera que el eluyente moje la capa por debajo de la línea de partida. Este asciende por capilaridad hasta la altura deseada y transporta la mezcla de sustancias a separar. Las manchas se hacen mayores cuanto más cercanas están al frente del eluyente. Durante la elución pueden deformarse adquiriendo forma de elipse, especialmente en las proximidades del frente del disolvente. Es la técnica de elución más utilizada para la separación e identificación de benzodiazepinas y anoréxicos. En la tabla 1 se resumen los sistemas cromatográficos usados para la separación y detección de benzodiazepinas y anoréxicos.

B) Horizontal (lineal). La placa se encuentra en posición horizontal y se le aplica el eluyente de manera continua a través de una mecha o hendidura capilar, con lo que se puede eluir desde uno o

**TABLA I. RESUMEN DE SISTEMAS CROMATOGRAFICOS PARA LA SEPARACION DE BENZODIACEPINAS Y ANOREXICOS.**

COMPUESTO	VALORES DE R <sub>F</sub>															
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
Clordacepato	72	55	00	66	63	09	00	00	02	50	10	54	00	62	02	50
Diacepam	92	89	94	92	86	50	00	00	23	73	56	00	00	75	23	73
Clonacepam	00	00	00	00	00	00	00	00	00	53	35	80	88	72	00	53
Fluracepam	00	00	00	00	00	00	00	00	10	72	54	86	00	63	10	72
Fluracepam	00	00	00	00	00	00	00	00	30	48	03	61	00	62	30	48
Loracepam	00	00	00	00	00	00	00	00	01	36	23	64	00	52	01	36
Fentemina (HCl)	00	00	00	00	00	00	32	29	00	00	00	00	00	00	00	00
Fentemina	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	34	00	26
Fenfuramina (HCl)	00	00	00	00	00	00	46	38	00	00	00	00	00	00	00	00
Fenfuramina	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	47	48	41
Diethylpropion (HCl)	00	00	00	00	00	00	73	73	00	00	00	00	00	00	00	00
Diethylpropion	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	94	87	62
Mizandol	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	63	06	13
Fentemina	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	46	00

00 = NO REPORTADO. Los desarrollos cromatográficos se realizaron sobre placas de gel de sílice de 20 x 20 cm sin tratamiento previo, a excepción de E, F, N, O y P, que fueron tratadas con KOH 0.1 N en metanol.  
 A = acetato de etilo/metanol/hidróxido de amonio (85/10/1) B = acetato de etilo/ciclohexano/p-dioxano/metanol/agua/hidróxido de amonio (50/50/10/15/0/5) C = acetato de etilo/metanol/hidróxido de amonio (85/10/3) D = acetato de etilo/metanol/agua/hidróxido de amonio (85/10/3/1) E = acetato de etilo/metanol/diisilamina (90/10/1/6) F = acetato de etilo/benceno/clorofórmico (40/40/20) G = metanol/amoniaco (100/15) H = metanol I = ciclohexano/tolueno/diisilamina (75/15/10) J = clorofórmico/metanol (90/10) K = clorofórmico/acetato (80/20) L = acetato de etilo/metanol/amoniaco/agua (43/5/0/5/15) M = metanol/amoniaco (50/0/5) N = metanol/amoniaco (100/1/5) O = ciclohexano/tolueno/diisilamina (75/15/10) P = clorofórmico/metanol (90/10)

Referencias 12, 19 - 23, 25, 26, 28, 30.



ambos lados. La ventaja de este sistema es el empleo de menos fase móvil, proporciona una saturación más rápida de la cámara y se obtienen tiempos de desarrollo mucho más cortos (cámaras HPTLC).

C) Bidimensional (lineal) Cuando se desarrolla bidimensionalmente la mezcla a separar se aplica sobre el punto de partida situado en una esquina de la placa. A continuación se introduce la placa en una cubeta normal y se desarrolla en forma lineal. Una vez seca la placa se gira 90°, se introduce en una segunda cubeta con otro eluyente y se eluye de nuevo. La trayectoria cromatográfica del primer recorrido pasa a ser la línea de partida del segundo desarrollo. Schütz junto con sus colaboradores (33) emplearon el desarrollo bidimensional para la detección e identificación de cloracepato, clordacepóxido, diacepam, medazepam y nitracepam sobre gel de sílice con 1) heptano/tolueno/acetato de etilo/etanol/solución de amoníaco al 25 % (70:70:10:5), y 2) benceno.

#### 2.7.5.4. Detección o procedimientos de localización.

El procedimiento de detección debe proporcionar tanta información como sea posible. Si se utilizan diversos agentes de detección para diferenciar los compuestos de un mismo grupo, es preferible el desarrollo de placas por duplicado.

Debido a que la mayoría de los compuestos orgánicos son incoloros, se deben de visualizar, preferentemente por una técnica no destructiva.

Después del desarrollo se retiran las placas de la cubeta, se secan y se detectan las sustancias separadas. Esto es muy sencillo en el caso de compuestos coloreados o de sustancias que pueden hacerse fluorescer o que absorben radiación UV. Cuando las sustancias no son coloreadas ni absorben radiación UV ni fluorescen bajo la luz UV deben derivatizarse con reactivos

de detección para formar sustancias coloreadas, fluorescentes o absorbentes en la luz UV.

Existen métodos de detección denominados "universales", que permiten localizar cualquier compuesto sobre la placa y la posición que éstos han alcanzado al ser separados de la muestra. Este tipo de detección posee el inconveniente de que inutiliza el compuesto para cualquier análisis posterior.

Existen también métodos específicos para determinados compuestos (o grupos de compuestos) basados en reacciones químicas específicas que ocurren entre el compuesto separado y un reactivo químico que se aplica sobre la placa, generalmente por aspersión.

Los métodos usuales de detección son los siguientes:

I. Detección mediante radiación UV. Es un procedimiento rápido y sencillo para detectar los compuestos separados. Las lámparas UV emiten radiaciones de longitud de onda de 254 nm y/o 365 nm. La detección se realiza en habitaciones oscuras o en cubetas con lámpara UV integrada. Las sustancias que absorben por ejemplo a 254 nm pueden ser detectadas muy fácilmente sobre placas que contienen el indicador fluorescente F 254, cuya fluorescencia verde se excita mediante la longitud de onda de 254 nm. Las sustancias disminuyen la emisión del indicador fluorescente excitado por UV<sub>254</sub> y se reconocen como manchas oscuras sobre un fondo fluorescente (disminución de la fluorescencia, extinción de la fluorescencia). Este procedimiento no modifica ni destruye la estructura química de los compuestos detectados y son por ello los más adecuados para fines preparativos.

II. Detección por derivatización a compuestos coloridos. Las reacciones de derivatización se utilizan cuando las fracciones individuales no reaccionan a la radiación UV o cuando la sensibilidad de la detección es insuficiente. La derivatización precromatográfica sirve no sólo para visualizar sino también para aumentar la selectividad del sistema de separación por los compuestos investigados o transformar los compuestos lábiles en estables. La derivatización postcromatográfica sirve sobre todo para revelar las sustancias separadas o para aumentar la sensibilidad de la detección. La tabla

El muestra los agentes de revelados más empleados para la detección de benzodiazepinas y anoréxicos. Usualmente los reactivos de detección se rocían sobre la placa o folio mediante atomizadores adecuados. Esta operación debe de realizarse siempre bajo una campana de extracción con buen tiro o mediante un dispositivo extractor adecuado que se lleve la niebla de reactivo, generalmente tóxica o agresiva y los vapores de disolvente. Además de los dispositivos de rociado se disponen también de dispositivos de inmersión. La inmersión y extracción verticales así como el tiempo de permanencia en la cubeta de inmersión pueden seleccionarse a voluntad y se realiza de manera automática. En ocasiones los cromatogramas han de calentarse en una estufa o sobre una placa calefactora después de aplicar los reactivos de detección, para activar la reacción (12)(16)(17)

#### 2.7.5.5. Confirmación (evaluación).

Tras finalizar un cromatograma de capa fina deben evaluarse los resultados. La primera información que proporciona un cromatograma terminado es el comportamiento de elución de las sustancias separadas. Este comportamiento se expresa mediante el parámetro  $R_f$ , que se define como: la relación que existe entre la distancia desde el punto aplicación hasta la mancha de la sustancia sobre la distancia entre el punto de partida y el frente del eluyente

La posición de la mancha de la sustancia se toma en su punto más intenso, generalmente el centro

Una característica muy importante de todo sistema cromatográfico es que la separación de cada uno de los componentes de una mezcla es constante para dicho sistema cromatográfico. Esto es válido sin embargo siempre y cuando los componentes del sistema y varios parámetros se mantengan constantes

El  $R_f$  se considera un valor de orientación debido a los numerosos factores difícilmente controlables simultáneamente que influyen en la retención. Una sustancia eluida bajo condiciones

**TABLA II. METODOS USUALES DE DETECCION PARA BENZODIACEPINAS  
Y ANOREXICOS EN CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA.**

<b>AGENTE</b>	<b>COMPUESTO DETECTADO</b>	<b>OBSERVACION MANCHAS</b>	<b>REFERENCIA</b>
Ninhidrina	Aminas	1 <sup>ra</sup> , violeta-rosa 2 <sup>da</sup> , amarillo	1, 3, 12, 22, 25, 26, 27, 31, 38
Vapores de iodo	Comp. orgánicos, especial- mente no saturados	Café	18, 27
Iodo-platino acidificado	Alcaloides y compuestos nitrogenados	Violeta, azul, café anaranjado, etc.	1, 12, 13, 19, 20, 22, 23, 25-28, 34, 38
Reactivo de Dragendorff	Alcaloides y compuestos nitrogenados	Amarillo, anaranjado, rojo-anaranjado, café- anaranjado	12, 22, 25, 30, 34, 35, 38
Reactivo FPN	Fenotiacinas y dibenza- cepinas	Rojo, rojo-café para fenotiacinas y azul para dibenzacepinas	12
Co(SCN) <sub>3</sub>	Alcaloides y compuestos aminados	Azul	38
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> soln.	Aminas	Intensifica la reacción de la ninhidrina	26-28
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fum.	Comp. orgánicos	Negras	38
Luz UV 254 y 365 nm	Comp. orgánicos y heterocíclicos	Oscuras	38

idénticas puede emplearse como patrón para determinar un valor relativo de  $R_f$ , el  $R_{fX}$  o  $R_{fS}$ , definido como la relación existente entre el punto de partida y la mancha de la sustancia sobre la distancia entre el punto de partida y la mancha de la sustancia patrón. Al contrario del  $R_f$ , que es menor o igual que la unidad, el  $R_{fS}$  puede ser mayor que uno.

Existe una gran variedad de métodos (16, 17) adecuados a cada tipo de problemática. Los más importantes se describen a continuación:

A. Evaluación cualitativa. Los cromatogramas de capa fina se realizan para identificar sustancias de una mezcla, pero también para comprobar purezas o separar mezclas. Sirven especialmente para el control de síntesis o del transcurso de una reacción. El  $R_f$  indica la posición en que se encuentra una sustancia en el cromatograma. Con fines de identificación es necesario relacionar los  $R_f$  de los compuestos analizados con los de las sustancias patrón. Si coinciden es probable (pero no seguro) que se trate de las mismas sustancias. La certeza en la identificación sólo se consigue realizando, además de la cromatografía de capa fina, estudios espectroscópicos.

B. Evaluación semicuantitativa. Se utiliza cuando hay que determinar si se está claramente por encima o por de bajo de unos valores límite, o cuando bastan indicaciones aproximadas. En cualquier caso se cromatografían junto a la muestra diversas concentraciones de la sustancia de interés. La evaluación se realiza por comparación visual o por medición del diámetro o de la superficie de las manchas.

C. Evaluación cuantitativa. Para la evaluación cuantitativa se disponen de métodos indirectos y directos. En el primer caso las sustancias han de extraerse de la placa mediante un proceso de disolución para seguir los estudios. Una posibilidad de evaluación indirecta, consiste en raspar la región de la capa en que se encuentra la sustancia de interés, disolver la sustancia y, a continuación, analizarla mediante un procedimiento analítico adecuado, como en el trabajo realizado por Chollus (21) para la separación e identificación de las drogas más comunes de abuso, en donde se hace uso de espectroscopía UV. En el segundo caso la evaluación tiene lugar

directamente sobre la placa. En todos los métodos directos de evaluación es esencial aplicar los mismos volúmenes de muestra y patrón sobre la misma placa. Las concentraciones deben ser del mismo orden y los  $R_f$  deben estar comprendidos entre 0.3 y 0.7. Los cromatogramas se registran por densitometría en un espectrofotómetro para cromatogramas y se evalúan por comparación de las alturas de los picos o de la superficie del pico entre patrones y muestras. Las mediciones se realizan bajo luz visible o en la región UV, según las propiedades de la sustancia, generalmente a longitud de onda en que la sustancia a determinar muestra un máximo de absorción. En general la absorción de la luz se mide por reflexión (la radiación UV es absorbida por el vidrio o el gel de sílice y no atraviesa la placa). La densitometría ha sido aplicada por Gujras y sus colaboradores (24), así como por Lillaunde y Korte (30), para la identificación de fármacos y drogas en orina.

#### 2.7.5.5.1. Factores que afectan la reproducibilidad de los $R_f$ .

En vista de que los  $R_f$  son empleados como procedimiento de identificación, es importante reconocer los factores que afectan su reproducibilidad. Los factores más importantes se describen a continuación:

1. Fase estacionaria. La calidad del adsorbente y el aglomerante, la presencia de impurezas, y la uniformidad del espesor que deben mantenerse constantes influyen sobre la reproducibilidad de los  $R_f$ . Si la placa va a ser activada, el mismo procedimiento debe seguirse para cada ocasión.
2. Fase móvil. Esta debe prepararse con disolventes grado reactivo o grado analítico y áreas de usarse si es que uno de los disolventes es volátil o higroscópico.
3. Cámara de desarrollo. Es importante que las condiciones de saturación sean atendidas durante la elución de las placas. Es preferible el empleo de cámaras pequeñas forradas en el interior

con papel filtro y suficiente eluyente. también hay que permitir el equilibrio de la cámara antes de eluir las placas.

4. Temperatura. Aunque el control preciso de la temperatura no es necesario, la cámara debe mantenerse alejada de fuentes de calor, luz, etc. A la vez que la temperatura aumenta, los disolventes volátiles se evaporan más rápidamente y generalmente los Rf disminuyen ligeramente.

5. Distancia de desarrollo. No hay grandes cambios en los Rf corregidos con cambios en la distancia de desarrollo cuando el sistema es saturado. Si el sistema no es saturado, hay un incremento aparente en los Rf al incrementar la distancia de desarrollo, debido a la evaporación del disolvente en la parte superior de la placa.

6. Cantidad de muestra aplicada. El incremento de la cantidad de muestra aplicada aumenta los Rf de unos fármacos, especialmente si el sistema "colee". Por ejemplo, usando placas de gel de sílice con cloroformo/acetona como eluyente. 5 µg de ácido benzoico tienen un Rf de 26, mientras que 20 µg tienen un Rf de 34. Sin embargo, si la placa está sobrecargada, esto producirá manchas "cooledas" y el Rf disminuirá. (12, 17)

#### 2.7.5.5.2. Estandarización de los Rf.

Para identificar una sustancia por cromatografía en capa fina, el Rf es registrado en diferentes sistemas cromatográficos.

Otra alternativa es, como ya se mencionó, hacer uso de una solución estándar que deberá de eluirse junto con la muestra, ésta deberá contener de uno a cuatro de los componentes principales de la muestra bajo investigación, lo que permite comparar las posiciones de las sustancias y también, si es necesario, comparar sus tamaños y colores. Además, la posición de una sustancia desconocida sobre el cromatograma puede ser descrita con mejor certeza por el uso de sustancias de referencia, en vez de solamente el Rf. La determinación del Rf relativo a una sustancia estándar ha sido empleada por Berry and Grove (34), entre otras.

Otra aproximación para la estandarización o normalización de los  $R_f$  es la representación gráfica de los valores de  $R_f$ , como lo describe Phillips y Gardiner (19); Japp y sus colaboradores (20), estos valores representan el llamado "perfil cromatográfico" que es característico para la sustancia bajo estudio. Al emplear dicho método se determinan los valores promedio de tres o más sustancias de referencia usando condiciones óptimas previamente establecidas. Después del desarrollo de la placa se obtienen los valores de  $R_f$  y se realiza el gráfico de los  $R_f$  estandarizados de las sustancias de referencia en las abscisas contra los  $R_f$  observados de los estándares en las ordenadas, posteriormente se interpolan los valores de  $R_f$  experimentales de las sustancias investigadas y así se corrigien.

Otro método para la corrección de los  $R_f$  es el empleado por Dhont y sus colaboradores (39), Galanos y Kapoulas (40), en el que se hace uso de dos sustancias de referencia. Una modificación de este método es el empleado por Franke y sus colaboradores (41) en el que se emplean tres sustancias de referencia. Los valores así calculados pueden ser usados para la identificación de sustancias mediante el empleo de una base de datos.

#### 2.7.6. Cromatografía en capa fina de alta resolución.

Los últimos avances dentro del campo de la cromatografía han combinado la selección de materiales más homogéneos (granulometría más estrecha) con técnicas más finas de separación, empleando cámaras especializadas.

Así se han descrito nuevas técnicas que facilitan el trabajo con bajas concentraciones. Esta técnica es la llamada cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC), que emplea las llamadas cromatoplasmas para nanocromatografía, que están elaboradas con gel de sílice cuyo tamaño de poro está dentro de límites estrechos de variación, lo que permite la cuantificación de cantidades en el orden de nanogramos.



La eficiencia lograda a través de la optimización de los distintos parámetros en la cromatografía en capa fina ha tenido como objetivo lo siguiente:

1. Logro de una buena separación del componente investigado de otros que pueden, incluso, interferir en un determinado análisis y en distancias de desarrollo pequeñas (3-6 cm).
2. La separación del máximo de componentes en una determinada mezcla.
3. La detección y cuantificación de componentes en concentraciones lo más bajas posibles, incluso en presencia de concentraciones significativamente más altas de otros componentes (algo que es problemático en HPLC).
4. La mayor sensibilidad posible, especialmente en la detección de componentes trazas (de hasta 0.005 µg por absorción y 0.1 µg por fluorescencia).
5. La perfecta dosificación en la cantidad de muestra aplicada, evitando los problemas tales como "coleos" y "efectos de borde", comúnmente asociados a grandes volúmenes de aplicación (sobrecarga).
6. El logro máximo de precisión en el análisis cromatográfico (Sobre todo si se utilizan densitómetros).
7. La adquisición del máximo de información confiable de los compuestos separados a fin de minimizar los problemas de identificación y de falsos positivos.
8. Minimizar el tiempo de análisis cromatográfico (diez veces menos que con la cromatografía en capa fina convencional).
9. Minimizar el gasto de reactivos, en especial de disolventes y maximizar la utilización de placas (hasta 16 siembras en placas de 10 X 10 cm).
10. La máxima reproducibilidad, afectada principalmente por la humedad, saturación de la cámara, modificación de la mezcla del disolventes de desarrollo y la temperatura. (16)

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los problemas centrales en Química Legal, entre otros, es la identificación del principio activo de medicamentos en un periodo de tiempo relativamente corto.

La confiabilidad y rapidez del análisis, dependerá de los siguientes factores:

- a) Cantidad de la muestra. El estudio se complicará si sólo se cuenta con trazas o unos cuantos miligramos de muestra.
- b) Condiciones de la muestra. Si la muestra está contaminada y no se posee información sobre ella, el análisis se complicará y será más lento el estudio.
- c) Instrumentos y equipo disponible.
- d) Experiencia del analista

Generalmente, cantidad y condiciones de la muestra son factores que se pueden subsanar solicitando más muestra e información sobre la misma. En cuanto a la experiencia del analista, es indispensable que este tipo de análisis lo deberá de efectuar un químico analista. Sin embargo, el punto difícil de subsanar a corto plazo es el que se refiere al equipo e instrumentos, de tal forma que éste se considera un factor crítico para el estudio de este tipo de muestras.

Aunque se conocen esquemas generales de análisis para la identificación de fármacos (benzodiazepinas y anoréxicos), éstos generalmente incluyen métodos instrumentales costosos, lo que los hace inaccesibles a la mayoría de los laboratorios de Química Legal de nuestro país, ya que no todos cuentan con el equipo adecuado. Además, dichos esquemas analíticos están diseñados para la identificación del fármaco y/o sus metabolitos en fluidos biológicos.

Por lo anteriormente expuesto, es necesario disponer de un esquema analítico general para la identificación rápida y confiable de las principales benzodiazepinas y anoréxicos en formas farmacéuticas, basado en Cromatografía en Capa Fina como técnica de confirmación, cuyo costo y acceso, estará al alcance de cualquier laboratorio

Como las benzodiazepinas y los anorexícos se producen en forma de tabletas, comprimidos, grageas y cápsulas, un método adecuado requerirá de la extracción selectiva del principio activo contenido en el medicamento, seguido de su identificación presuntiva y finalmente su identificación confirmativa por Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución.

## **IV. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo General:**

Desarrollar un método general de análisis que permita en forma rápida y confiable la identificación de benzodiazepinas y anoréxicos en medicamentos mediante el empleo de Cromatografía en Capa fina de Alta Resolución.

### **4.2. Objetivos Específicos:**

1. Establecer un método general de extracción para benzodiazepinas y anoréxicos presentes en medicamentos.
2. Evaluar reacciones con desarrollo de color que permitan la identificación presuntiva de benzodiazepinas y anoréxicos.
3. Seleccionar los sistemas de disolventes adecuados para la separación cromatográfica de benzodiazepinas y anoréxicos.
4. Seleccionar los agentes de revelado capaces de identificar y diferenciar benzodiazepinas y anoréxicos.
5. Calificar el método cromatográfico.

## V. HIPOTESIS

Considerando que las benzodicepinas y anoréxicos presentan constantes de ionización con carácter básico ( pka entre 8.0 y 11.6 ) y solubilidades similares en cloroformo y metanol, serán susceptibles de ser extraídas a partir de un concentrado acuoso alcalino por cloroformo o mediante extracción directa con metanol. Posteriormente, en base a su polaridad se podrán resolver e identificar usando sistemas cromatográficos con disolventes de baja y/o mediana polaridad y con la ayuda de agentes de revelado apropiados.

## VI. DISEÑO EXPERIMENTAL

### 6.1. Reactivos Materiales de Consumo.

#### 6.1.1. Disolventes (grado reactivo).

Acetona.	Dietilamina.
Agua desionizada.	Metanol.
Acetato de etilo.	n-Heptano.
n-Butanol.	Tolueno.
Cloroformo.	

#### 6.1.2. Reactivos.

Ácido acético.	Iodo.
Ácido hexacetoplatínico.	ioduro de potasio.
Ácido nítrico.	Ninhidrina.
Ácido perclórico.	Nitrato de bismuto.
Ácido sulfúrico.	Nitrato de cobalto.
Hidróxido de amonio del 27 al 30% (p/v).	Nitrato de sodio.
Cloruro férrico.	Sulfato de sodio anhidro.
Formaldehído.	Tiocianato de potasio.

### 6.1.3. Sustancias.

TABLA III. LISTA DE BENZODIACEPINAS Y ANOREXICOS ESTUDIADOS.

COMPUESTO	FORMA FARMACEUTICA	CONCENTRACION
Clonacepam.	Comprimidos.	0.5 y 2 mg.
Clonitacepóuido.	Grageas	5 mg.
	Comprimidos.	10 mg.
Diacepam.	Tabletas.	10 mg.
Dietilpropión.	Tabletas y cápsulas.	75 mg
Fenfluramina.	Tabletas.	20 mg.
Fenproporex.	Tabletas.	10 mg.
Fentermina.	Cápsulas.	15 mg.
Flunitracepam.	Comprimidos.	2 mg.
Fluracepam.	Cápsulas.	30 mg.
Leracepam.	Tabletas.	2 mg.
Mazindol.	Comprimidos.	1 mg.
	cápsulas.	2 mg.

### 6.1.4. Sustancias de Referencia.

I. Diacepam, materia prima. Solución al 0.1 % en cloroformo.

II. Fenproporex, materia prima. Solución al 0.1 % en cloroformo.

### 8.1.5. Material.

- Placas de vidrio para HPTLC de gel de sílice 60 F<sub>254</sub> (Merck), de 5 X 5 cm, con un espesor de capa de 0.20 mm.
- Cámara de desarrollo para HPTLC (Desaga, Merck), de 50 X 50 mm.
- Micropipeta automática de 100-1000 µl.
- Micropipeta automática de 50-200 µl.
- Microjeringa de 10 µl.
- Aspirador (atomizador).
- Celdas de cloruro de sodio para IR.
- Tubos de ensayo.
- Mortero con pistilo.
- Tubos capilares.
- Pipetas pasteur.
- Embudo de vidrio.
- Vaso de precipitados.
- Papel filtro Whatman No. 4.

### 8.1.6. Equipo.

- Espectrofotómetro FTIR 1600 de Perkin-Elmer.
- Centrífuga.
- Vortex.
- Parrilla de calentamiento.
- Lámpara UV 254 y 365 nm.



## **6.2. Metodología.**

### **6.2.1. Obtención de las muestras.**

Del grupo de medicamentos controlados se seleccionaron fármacos representativos del grupo de benzodiazepinas y anoréxicos para ser estudiados, en función de la frecuencia de análisis en el Laboratorio Químico Forense de la Procuraduría General de Justicia del Distrito Federal. Se analizaron las diferentes formas farmacéuticas disponibles para cada uno de dichos fármacos, así como sus concentraciones nominales, mismas que se especifican en la tabla III.

Las muestras se obtuvieron del muestrario de drogas del Laboratorio. Se analizó un número de muestras de tal forma que las pruebas de desarrollo con color se realizaron por duplicado, mientras que las determinaciones para cromatografía en capa fina de alta resolución fueron por sextuplicado, mismas que se usaron para la evaluación de los agentes de revelado.

### **6.2.2. Extracción del principio activo.**

Como los dos grupos de fármacos estudiados presentan solubilidades similares, se ensayaron dos tipos de extracción: extracción clorofórmica alcalina y extracción metanólica directa, utilizando diazepam (comprimido de 10 mg) como muestra de referencia.

#### **6.2.2.1. Extracción clorofórmica.**

El método de extracción consistió en triturar la muestra (tableta, comprimido, gragea o el contenido de la cápsula) hasta la obtención de un polvo fino. El mismo se disolvió en agua, se agitó hasta disolución. Posteriormente se filtró y enseguida se le ajustó el pH a 12 con hidróxido de amonio del 27 al 30 % (p/v). Luego de adicionar cloroformo para extraer al fármaco, se permitió separar las fases y se pipetó la capa clorofórmica.

Se realizaron dos tratamientos para la extracción, los cuales fueron las combinación de:

- a) volumen de agua para disolución: 5 y 10 ml.
- b) volumen de cloroformo para extracción: 1 X 5 ml y 2 X 5 ml.

#### **6.2.2.2. Extracción metanólica directa.**

La muestra se trituró hasta polvo fino y se disolvió en 2 ó 5 ml de metanol, con la finalidad de evaluar la influencia de los diferentes volúmenes de disolvente sobre la extracción. Luego de agitarse, se centrifugó para separar las capas. El sobrenadante fue pipeteado y empleado para el análisis.

#### **6.2.3. Pruebas con desarrollo de color.**

Para la identificación presuntiva de benzodicepinas y anoréxicas se siguió el procedimiento que a continuación se describe.

Después de la evaporación del disolvente sobre un baño maría, el extracto se reconstituyó en 200  $\mu$ l de cloroformo. Se emplearon 100  $\mu$ l para cada una de las pruebas, que se desarrollaron de la siguiente forma:

**A) Reacción de formaldehído/ácido sulfúrico (apéndice B) para la identificación de benzodicepinas:**

En un tubo de ensayo se mezcló la muestra ( 100  $\mu$ l ) con tres gotas del reactivo de formaldehído/ácido sulfúrico y se calentó en un baño de agua a ebullición por un minuto, registrándose el color producido.

**B) Reacción de Lieberman (ver apéndice B) para identificación de anoréxicas:**

Se colocaron 100  $\mu$ l de la muestra en un tubo de ensayo y se añadieron tres gotas del reactivo de Lieberman, catalizándose la reacción por el empleo de un baño de agua a ebullición durante un minuto, registrándose el color desarrollado.

Paralelamente al desarrollo de las pruebas se corrió un blanco y un control positivo de diazepam y fenproporex.

#### 6.2.4. Análisis por IR.

El extracto obtenido fue secado con sulfato de sodio anhidro, se filtró, y se evaporó a sequedad en baño maría. Posteriormente se reconstituyó con cloroformo y una alícuota del mismo se aplicó sobre una celda de cloruro de sodio. Finalmente se obtuvo el espectro infrarrojo del extracto, mismo que se comparó con los espectros reportados en la literatura, para la identificación final del principio activo extraído.

#### 6.2.5. Cromatografía en capa fina de alta resolución.

El extracto cloroformico se reconstituyó en 50  $\mu$ l de cloroformo. Con la ayuda de capilares calibrados se aplicaron 1-2  $\mu$ l de la solución en forma de punto sobre las cromatoplaques HPTLC (previamente tratadas con solución de KOH 0.1 N en metanol) a 1 cm del borde inferior de las mismas y se dejó sécar a una distancia de 3.5 cm junto con las soluciones de referencia en los sistemas de disolventes:

1. cloroformo/metanol (80:10).
2. Heptano/nitrueno/diclorometano (75:15:10).
3. Heptano/acetato de etilo/etanol/hidróxido de amonio del 27 al 30 % (p/v) (70:70:10:5).

Los primeros dos se eligieron en función de ser los más empleados en los laboratorios de Química Forense (2, 18 - 20, 32, 41) y el tercero en base a que es un buen sistema para benzodiazepinas (33).

El desarrollo cromatográfico se realizó en cámaras previamente saturada. Cada dos corridas se cambió el sistema de disolventes. Las condiciones ambientales durante las determinaciones fueron una temperatura promedio de 23.7°C y una humedad relativa promedio de 38.72%.

### **6.2.6. Evaluación de los agentes de revelado.**

Después del desarrollo de la placa, esta fue retirada de la cámara y secada al aire. Primeramente se evaluó bajo la luz UV 254 nm. Después de esto se rociaron los agentes de revelado (apéndice B) y se anotaron los colores desarrollados. Los agentes de revelado evaluados fueron los siguientes:

- I. Iodo.
- II. UV 254 nm.
- III. Reactivo de Dragendorff.
- IV. Solución de tiocianato de cobalto.
- V. Solución de ninhidrina.
- VI. Reactivo FPN.
- VII. Solución de ácido sulfúrico al 0.5%.
- VIII. Solución de iodo-pirino acidificado.

### **6.2.7. Calificación del método cromatográfico.**

Para propósitos de identificación, la reproducibilidad de los Rf es determinante para asegurar la confiabilidad de los resultados, por lo tanto, se procedió a efectuar seis corridas simultáneas en iguales condiciones experimentales para cada una de las muestras a fin de conocer la precisión del método en cuanto a los valores de Rf obtenidos. En este paso se usó una solución de referencia de benzodiazepinas y anoréticos, diazepam y fenproporex respectivamente.

A su vez se determinaron los coeficientes de correlación existentes entre los diferentes sistemas cromatográficos, lo anterior con la finalidad de conocer la correlación de las propiedades cromatográficas entre los sistemas. Si los coeficientes de correlación son bajos, entonces se obtendrá mayor información de la sustancia, pues lo anterior indica que la sustancia de interés presenta diferente Rf para cada sistema, por lo que aumenta la probabilidad de identificación.

Para la determinación de los coeficientes de correlación ( $r$ ) se emplea la siguiente fórmula:

$$r = \frac{\sum XY - n\bar{X}\bar{Y}}{(n-1) S_x S_y}$$

donde  $S_x$  y  $S_y$  son las desviaciones estándar de  $X$  y  $Y$ , respectivamente.

## VII. RESULTADOS

### 7.1. Extracción del Principio Activo.

Las figuras 1 a 4 muestran los espectros IR de un comprimido de 10 mg de diacepam utilizado como muestra de referencia. Los espectros son resultantes de los procedimientos de extracción clorofórmica y metanólica.

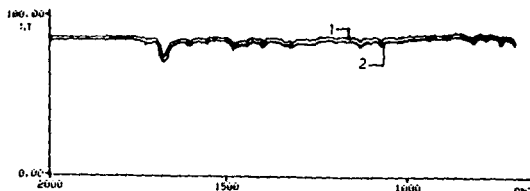


FIG. 1. Espectros IR que comparan la extracción de un comprimido de 10 mg de diacepam disuelto en 10 ml de agua y extraído con (1) 1 X 5 ml de CHCl<sub>3</sub> y (2) 2 X 5 ml de CHCl<sub>3</sub>. No se observa diferencia significativa entre ambos procedimientos.

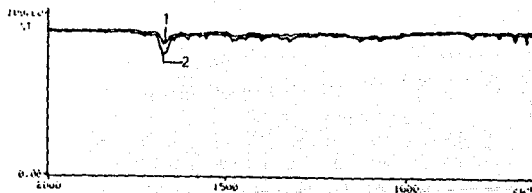


FIG. 2. Comparación de la extracción de un comprimido de diacepam de 10 mg disuelto en 5 ml de agua y extraído con (1) 1 X 5 ml de CHCl<sub>3</sub> y (2) 2 X 5 ml de CHCl<sub>3</sub>. No se aprecia diferencia entre los tratamientos.

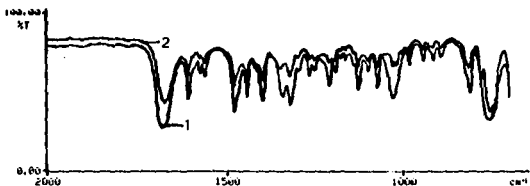


FIG. 3. Espectros IR de diacepam 10 mg extraído con (1) 1 X 5 ml de  $\text{CH}_3\text{OH}$  y (2) 1 X 2 ml de  $\text{CH}_3\text{OH}$ . Se observa mayor área de las bandas con la primera extracción.

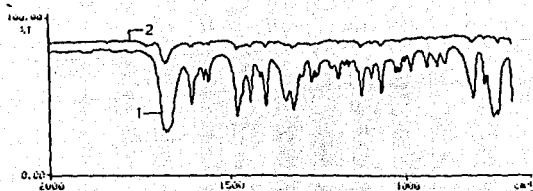


FIG. 4. Comparación de los espectros IR resultantes de dos procedimientos de extracción: (1) extracción metanólica directa y (2) extracción cloroformica alcalina. Se observa mayor área de las bandas con el primer procedimiento.

### 7.2. Pruebas con Desarrollo de Color.

La siguiente tabla muestra los colores obtenidos al aplicar el reactivo de Lieberman y solución de formaldehído/ácido sulfúrico a las diversas benzodiazepinas y anoréxicos.

TABLA IV. PRUEBAS CON DESARROLLO DE COLOR  
PARA ANORÉXICOS Y BENZODIAZEPINAS

SUSTANCIA	REACTIVO	
	FORMALDEHÍDO/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	LIEBERMAN
<b>A. BENZODIAZEPINAS</b>		
CLONACEPAM	ANARANJADO	NO COLOR
CLONAZEPAXIDIO	ANARANJADO	NO COLOR
DIACEPAM	ANARANJADO	NO COLOR
FLUNITRACEPAM	ANARANJADO	NO COLOR
FLURACEPAM	ROSA	NO COLOR
LORACEPAM	ANARANJADO	NO COLOR
<b>B. ANORÉXICOS</b>		
DIETILPROPION	NO COLOR	AMARILLO
FENFLURAMINA	NO COLOR	AMARILLO
FENPROPorex	NO COLOR	AMARILLO
FENTERMINA	NO COLOR	AMARILLO
MAZINDOL	NO COLOR	AMARILLO

Las benzodiazepinas estudiadas no desarrollaron color al aplicar e los extractos el reactivo de Lieberman, mientras que sí lo hacen al reaccionar con el reactivo de formaldehído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. En cambio, la primera de estas pruebas aplicadas a los anoréxicos, desarrolla color similar a los reportados.



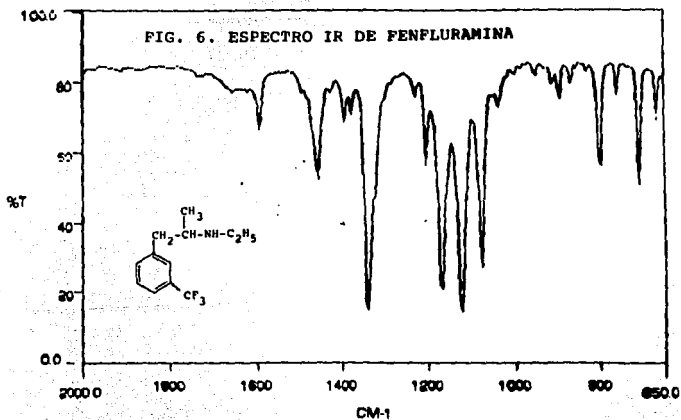
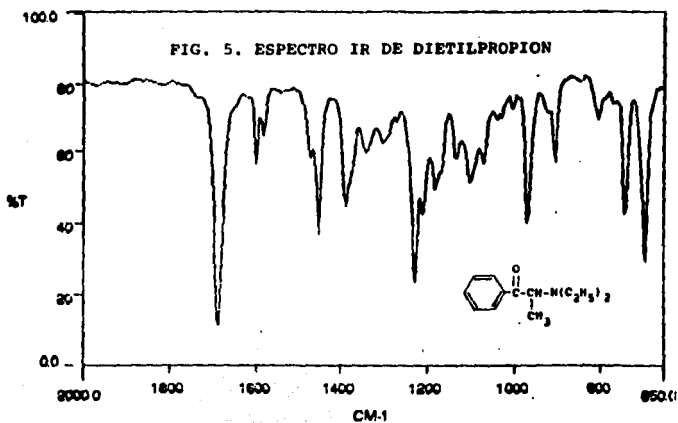
### 7.3. Análisis por IR.

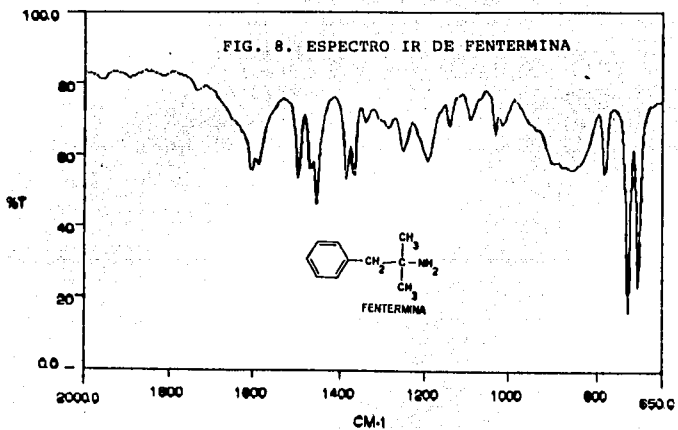
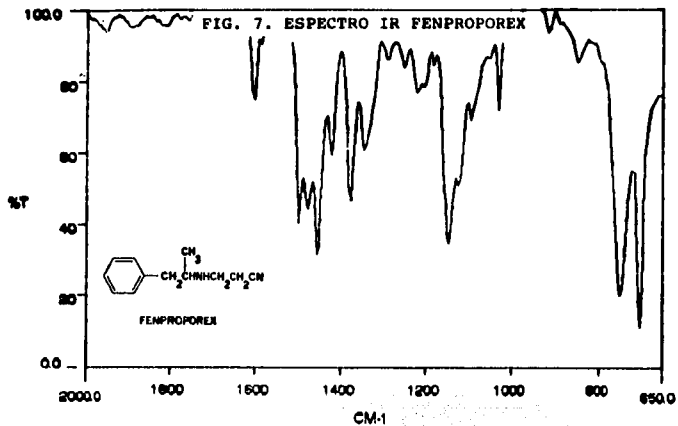
#### a) Anoréxicos.

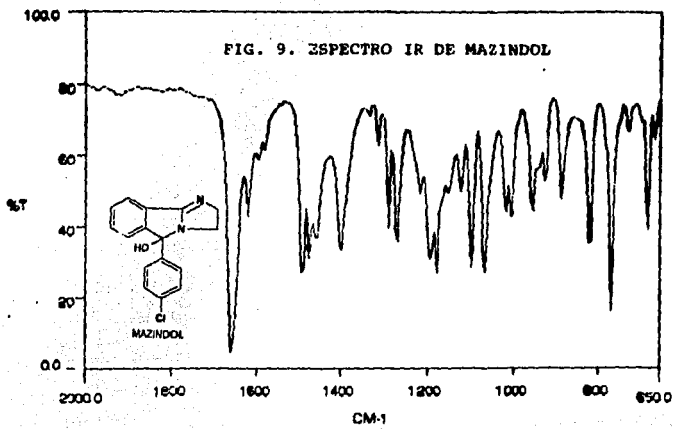
La tabla V muestra la frecuencia de las principales bandas de absorción obtenidas para los anoréxicos estudiados. Los espectros fueron obtenidos aplicando el extracto sobre varillas de cloruro de sodio en forma de película. Los espectros IR obtenidos se encuentran en las figuras 5 a 9.

**TABLA V. BANDAS DE ABSORCIÓN PRINCIPALES EN EL IR  
DE LOS ANOREXICOS ESTUDIADOS.**

<b>FARMACO</b>	<b>REGION (cm<sup>-1</sup>)</b>
DIETILPROPION	1087, 1500, 1226, 738, 691
FENFLURAMINA	1580, 1204, 1167, 1120, 788
FENPROPorex	1582, 1218, 744, 701
FENTERMINA	1602, 1384, 1366, 725, 703
MAZINDOL	1659, 1094, 1065, 765, 675





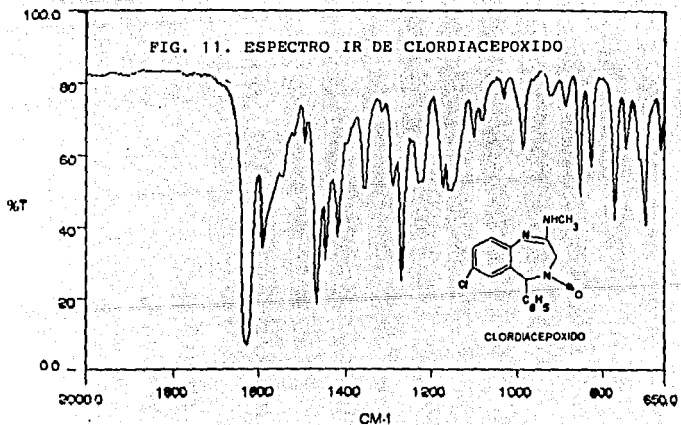
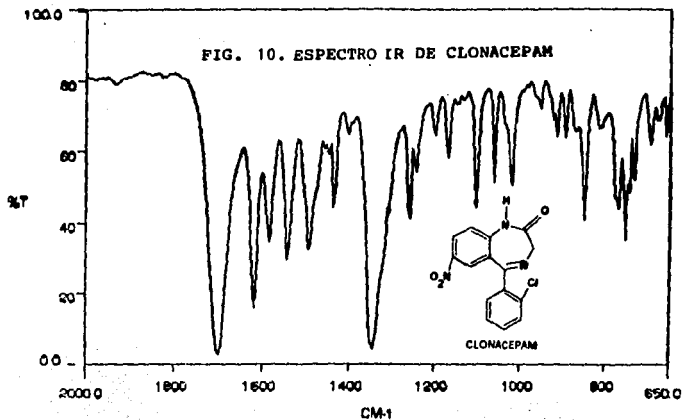


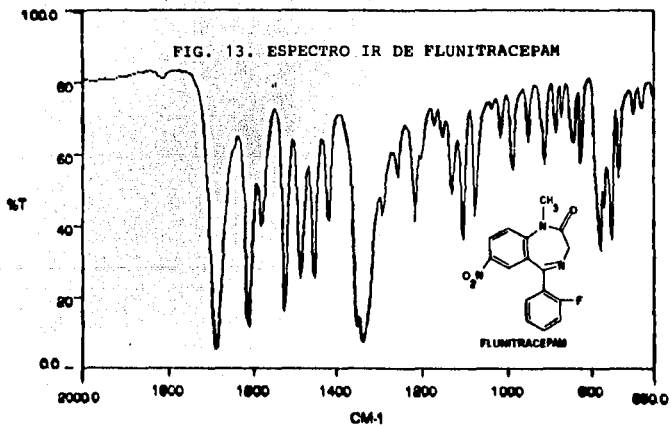
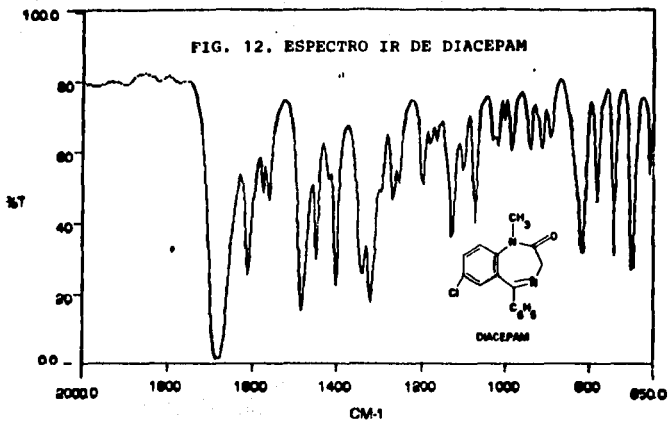
b) Benzodicepinas.

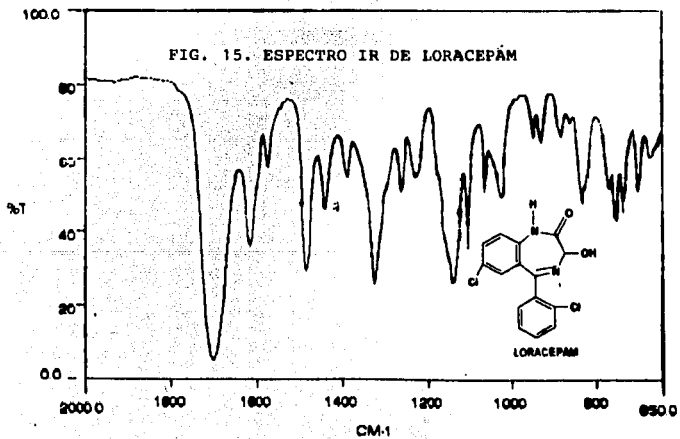
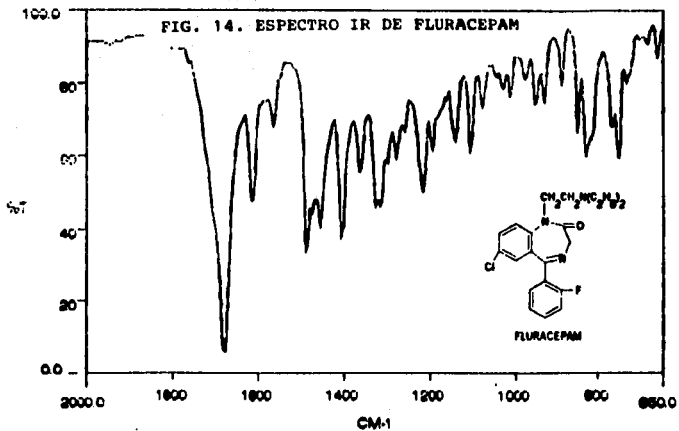
Las frecuencias de las principales bandas de absorción de las benzodicepinas estudiadas se encuentran resumidas en la tabla VI. Los espectro IR de las benzodicepinas se encuentran en las figuras 10 a 15.

**TABLA VI. BANDAS DE ABSORCION PRINCIPALES EN EL IR  
DE LAS BENZODICEPINAS ESTUDIADAS.**

<b>GRUPO</b>	<b>REGION (cm<sup>-1</sup>)</b>
CLONACEPAM	1695, 1615, 1538, 1298, 750
CLORDIACEPOXIDO	1627, 1598, 1284, 830, 785, 685
DIACEPAM	1680, 1600, 1126, 738, 697
FLUNTRACEPAM	1688, 1611, 1524, 1338, 1101, 748
FLURACEPAM	1677, 1612, 1215, 1103, 747
LORACEPAM	1698, 1615, 1133, 1100, 751









#### 7.A. Cromatografía en Fase Fija de Alta Resolución.

Los valores  $R_f$  presentes en las tablas siguientes son los valores promedio de seis corridas de cada uno de los fármacos, pues no se observó diferencia entre las determinaciones por lo que se considero el mismo valor.

##### a) Benzodiazepinas.

En las tablas VII, VIII, IX y X se presentan los valores de  $R_f$  y  $R_{rel}$  promedio de seis corridas obtenidos experimentalmente para benzodiazepinas en tres sistemas de disolventes.

**TABLA VII. VALORES DE  $R_f$  Y  $R_{rel}$  DE BENZODIAZEPINAS EN EL SISTEMA DE DISOLVENTES CLOROFORMO/METANOL (90:10).**

BENZODIAZEPINA	$R_f$	$R_{rel}^a$	$R_{rel}^b$
CLONACEPAM	0.4714	0.8461	0.8250
CLORDIAZEPOXIDO	0.4428	0.7948	0.7750
DIACEPAM	0.5571	1.0000	0.9750
FLUNITRACEPAM	0.5571	1.0000	0.9751
FLURACEPAM	0.4281	0.7892	0.7500
LORACEPAM	0.2741	0.4871	0.4750

<sup>a</sup> $R_{rel}^a$ , relativo a diazepam. <sup>b</sup> $R_{rel}^b$ , relativo a flunitrazepam.

De acuerdo a los  $R_f$  obtenidos en este sistema, el diazepam y flunitrazepam presentan el mismo  $R_f$  y el valor más alto, en tanto que el loracepam tiene el  $R_f$  menor. Los restantes tienen valores que oscilan entre 0.42 y 0.47.

**TABLA VII. VALORES DE  $R_f$  Y  $R_{rel}$  DE BENZODIACEPINAS EN EL SISTEMA DE  
DISOLVENTES n-HEPTANO/TOLUENO/DIETILAMINA (75:15:10).**

BENZODIACEPINA	$R_f$	$R_{rel}^a$	$R_{rel}^b$
CLONACEPAM	0.0000	0.0000	0.0000
CLORDIACEPOXIDO	0.0000	0.0000	0.0000
DIACEPAM	0.1571	1.0000	0.5788
FLUNITRACEPAM	0.0714	0.4545	0.2631
FLURACEPAM	0.1857	1.1818	0.6642
LORACEPAM	0.0000	0.0000	0.0000

<sup>a</sup> $R_{rel}$ , relativo a diacepam. <sup>b</sup> $R_{rel}$ , relativo a fenproporex.

Bajo este sistema de disolventes clonacepam, clordiacépoxido y loracepam no migraron del punto de partida, mientras que diacepam, flunitracepam y fluracepam se encuentran bien separadas.

**TABLA IX. VALORES DE  $R_f$  Y  $R_{rel}$  DE BENZODIACEPINAS EN EL SISTEMA DE  
DISOLVENTES n-HEPTANO/ACETATO DE ETILO/ETANOL/HIDROXIDO DE AMONIO  
DEL 27 AL 30 % (p/v) (70:70:10:5).**

BENZODIACEPINA	$R_f$	$R_{rel}^a$	$R_{rel}^b$
CLONACEPAM	0.3714	0.1954	0.7878
CLORDIACEPOXIDO	0.2286	0.4210	0.4648
DIACEPAM	0.5428	1.0000	1.1515
FLUNITRACEPAM	0.4857	0.8947	1.0303
FLURACEPAM	0.4571	0.8421	0.9896
LORACEPAM	0.2000	0.3684	0.4242

<sup>a</sup> $R_{rel}$ , relativo a diacepam. <sup>b</sup> $R_{rel}$ , relativo a fenproporex.

Todas las benzodiacépinas bajo este sistema se separan unas de otras e lo largo de la placa.

**TABLA X. VALORES DE Rf Y Rm\* DE BENZODIACEPINAS EN TRES SISTEMAS DE DISOLVENTES.**

BENZODIACEPINA	SISTEMA								
	1			2			3		
	Rf	Rst <sub>g</sub>	Rst <sub>y</sub>	Rf	Rst <sub>g</sub>	Rst <sub>y</sub>	Rf	Rst <sub>g</sub>	Rst <sub>y</sub>
CLONACEPAM	0.4714	0.8461	0.8250	0.0000	0.0000	0.0000	0.3714	0.1954	0.7878
CLORDIACEPOXIDO	0.4428	0.7948	0.7750	0.0000	0.0000	0.0000	0.2285	0.4210	0.4848
DIACEPAM	0.5571	1.0000	0.9750	0.1571	1.0000	0.5789	0.5428	1.0000	1.1515
FLUNITRACEPAM	0.5571	1.0000	0.9750	0.0714	0.4545	0.2831	0.4857	0.8947	1.0303
FLURACEPAM	0.4285	0.7892	0.7500	0.1857	1.1818	0.6842	0.4571	0.8421	0.9896
LORACEPAM	0.2741	0.4871	0.4750	0.0000	0.0000	0.0000	0.2000	0.3684	0.4242

\*Rst<sub>g</sub> relativo a diacepam, Rst<sub>y</sub> relativo a fenproporex.

1= cloroformo/metanol (50:10) 2= heptano/tolueno/dietilamina (75:15:10)

3= heptano/acetato de etilo/atenuel/hidróxido de amonio del 27 al 30 % (p/v) (70:70:10:5)

Aquí se resumen los valores de Rf y Rst de las benzodiacepinas en los tres sistemas de disolventes, para una visualización más rápida de los resultados obtenidos.

b) Anoréxicos.

En las tablas XI, XII, XIII y XIV se presentan los valores de  $Rf$  y  $R_{rel}$  promedio de seis corridas obtenidas experimentalmente para anoréxicos.

**TABLA XI. VALORES DE  $Rf$  Y  $R_{rel}$  DE ANOREXICOS EN EL SISTEMA DE DISOLVENTES CLOROFORMO/METANOL (90:10).**

ANOREXICO	$Rf$	$R_{rel}^a$	$R_{rel}^b$
DIETILPROPION	0.6142	1.1025	1.0750
FENFLURAMINA	0.3248	0.6153	0.6000
FENPROPorex	0.5714	1.0256	1.0000
FENTERMINA	0.3571	0.6408	0.6248
MAZINDOL	0.3248	0.6153	0.6000

<sup>a</sup> $R_{rel}$ , relativo a diazepam. <sup>b</sup> $R_{rel}$ , relativo a fenproporex.

Los anoréxicos fenfluramina y mazindol bajo este sistema tienen un  $Rf$  igual, mismo que es el valor mínimo en comparación con los otros anoréxicos, siendo el máximo para el dietilpropión.

**TABLA XII. VALORES DE R<sub>f</sub> Y R<sub>st</sub> DE ANOREXICOS EN EL SISTEMA DE  
DISOLVENTES n-HEPTANO/TOLUENO/DIETILAMINA (75:15:10).**

ANOREXICO	R <sub>f</sub>	R <sub>st<sub>a</sub></sub> <sup>a</sup>	R <sub>st<sub>b</sub></sub> <sup>b</sup>
DIETILPROPION	0.5857	3.7272	2.1578
FENFLURAMINA	0.4000	2.5454	1.4736
FENPROPOREX	0.2714	1.7272	1.0000
FENTERMINA	0.2428	0.4414	0.8947
MAZINDOL	0.0285	0.1818	0.1052

<sup>a</sup>R<sub>st<sub>a</sub></sub> relativo a diacepam. <sup>b</sup>R<sub>st<sub>b</sub></sub> relativo a fenproporex.

La mayor resolución de anoréxicos con esta fase móvil está entre el dietilpropión, fenfluramina y mazindol. Los dos restantes, aunque sus R<sub>f</sub> son próximos pueden diferenciarse.

**TABLA XIII. VALORES DE R<sub>f</sub> Y R<sub>st</sub> DE ANOREXICOS EN EL SISTEMA DE  
DISOLVENTES n-HEPTANO/ACETATO DE ETILO/ETANOL/HIDROXIDO DE AMONIO  
DEL 27 AL 30 % (p/v) (70:70:10:5).**

ANOREXICO	R <sub>f</sub>	R <sub>st<sub>a</sub></sub> <sup>a</sup>	R <sub>st<sub>b</sub></sub> <sup>b</sup>
DIETILPROPION	0.0000	0.0000	0.0000
FENFLURAMINA	0.2428	0.4473	0.5151
FENPROPOREX	0.4714	0.8684	1.0000
FENTERMINA	0.2571	0.4736	0.5454
MAZINDOL	0.1857	0.3421	0.3939

<sup>a</sup>R<sub>st<sub>a</sub></sub> relativo a diacepam. <sup>b</sup>R<sub>st<sub>b</sub></sub> relativo a fenproporex.

Por el empleo de esta fase móvil el dietilpropión no migró del punto de partida. Fenfluramina, fentermina y mazindol cuentan con valores de R<sub>f</sub> de dimensiones similares, pero aún así se resuelven bien aunque no tanto como fenproporex.

**TABLA XIV. VALORES DE R<sub>f</sub> Y R<sub>st</sub> DE ANOREXICOS EN TRES SISTEMAS DE DISOLVENTES.**

ANOREXICO	SISTEMA								
	1			2			3		
	R <sub>f</sub>	R <sub>st<sub>g</sub></sub>	R <sub>st<sub>f</sub></sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>st<sub>g</sub></sub>	R <sub>st<sub>f</sub></sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>st<sub>g</sub></sub>	R <sub>st<sub>f</sub></sub>
DIETILPROPION	0.6142	1.1025	1.0750	0.5857	3.7272	2.1578	0.0000	0.0000	0.0000
FENFLURAMINA	0.3248	0.6153	0.6000	0.4000	2.5454	1.4736	0.2428	0.4473	0.5151
FENPROPorex	0.5714	1.0256	1.0000	0.2714	1.7272	1.0000	0.4714	0.8684	1.0000
FENTREMINA	0.3571	0.6406	0.6249	0.2428	0.4414	0.8947	0.2571	0.4736	0.5454
MAZINDOL	0.3248	0.6153	0.6000	0.0285	0.1818	0.1052	0.1857	0.3421	0.3939

R<sub>st<sub>g</sub></sub> relativo a dioxepem, R<sub>st<sub>f</sub></sub> relativo a fenproporex.

1= cloroformo/metanol (90:10) 2=heptano/tolueno/dietilamina (75:15:10)

3= Heptano/acetato de etilo/etanol/hidróxido de amonio del 27 al 30 % (p/v) (70:70:10:5)

Los resultados de los valores de R<sub>f</sub> y R<sub>st</sub> obtenidos experimentalmente para los anorexicos en los tres sistemas de disolventes evaluados se encuentran resumidos aquí.

### 7.5. Selección de los Agentes de Revelado.

En las tablas XV y XVI se encuentran los colores obtenidos con los diversos agentes de revelado para benzodicepinas y anoréxicos, junto con sus Rf en los tres sistemas de disolventes.

**TABLA XV. VALORES DE Rf Y COLOR DESARROLLADO\* CON LOS AGENTES DE REVELADO DE BENZODIACEPINAS EN LOS TRES SISTEMAS DE DISOLVENTES**

BENZODIACEPINA	SISTEMA <sup>a</sup>			AGENTE DE REVELADO <sup>b</sup>							
	1	2	3	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
CLONACEPAM	0 4714	0 0000	0 3714	+	+	+	+	AZU	NC	CAF	CAF
CLORDIACEPOXIDO	0 4428	0 0000	0 2285	+	+	+	+	ANA	NC	NC	VIO
DIACEPAM	0 5571	0 1571	0 5428	+	+	+	+	AMA	NC	CAF	CAF
FLUNITRACEPAM	0 5571	0 0714	0 4857	+	+	+	+	AZ-g	NC	CAF	CAF
FLURACEPAM	0 4285	0 1857	0 4571	+	+	+	+	AMA	NC	AMA	VIO
LORACEPAM	0 2741	0 0000	0 2000	+	+	+	+	VER	NC	NC	CAF

<sup>a</sup> 1 = cloroformo/metanol (80:10) 2 = heptano/tolueno/dioxilamina (75:15:10)

3 = heptano/acetato de etilcelulosa/hidróxido de amonio del 27 al 30 % (p/v) (70:70:10:5)

<sup>b</sup> I = Vapor de yodo. II = UV 264 nm. III = Reactivo de Dragendorff. IV = Solución de tiocianato de cobalto. V = Reactivo FPN y posterior observación a luz UV 365 nm. VI = Solución de ninhidrina y posterior exposición a luz UV 365 nm por 10 minutos. VII = Solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5% hasta transparencia de la placa y posterior calentamiento. VIII = Solución de yodo-potasio acidificado.

\* Código de colores: ANA = anaranjado, AMA = amarillo, AZ-g = azul-gris, AZU = azul, CAF = café, NC = no color, VER = verde, VIO = violeta  
(+) I. Café. II. Oscuro. III. Anaranjado. IV. Azul.

**TABLA XVI. VALORES DE RI Y COLOR DESARROLLADO\* CON LOS AGENTES DE REVELADO DE LOS ANOREXICOS EN LOS TRES SISTEMAS DE DISOLVENTES**

ANOREXICO	SISTEMA <sup>a</sup>			AGENTE DE REVELADO <sup>b</sup>								
	1	2	3	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	
DIETLPROPION	0.6142	0.5857	0.0000	+	+	+	+	---	NC	CAF	VIO	
FENFLURAMINA	0.3248	0.4000	0.2428	+	+	+	+	---	NC	CAF	VIO	
FENPROPorex	0.5714	0.2714	0.4714	+	+	+	+	---	NC	NC	VIO	
FENTERMINA	0.3571	0.2428	0.2571	+	+	+	+	---	VIO	CAF	NC	
MAZINDOL	0.3248	0.0285	0.1857	+	+	+	+	---	NC	CAF	CAF	

<sup>a</sup> 1= cloroformo/metanol (80:10) 2= heptano/tolueno/diclorometano (75:15:10)

3= heptano/acetato de etilo/etanol/nitrato de amonio del 27 al 30 % (p/v) (70:70:10:5)

<sup>b</sup> I = Vapor de iodo. II = Luz UV 254 nm. III = Reactivo de Dragendorff. IV = Solución de tiocianato de cobalto. V = Reactivo FPN y posterior observación a luz UV 365 nm. VI = Solución de ninhidrina y posterior exposición a luz UV 365 nm por 10 minutos. VII = Solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5% hasta transparencia de la placa y posterior calentamiento. VIII = Solución de iodo-potasio acidificado.

\* Código de colores: ANA = anaranjado, AMA = amarillo, Az-g = azul-gris, AZU = azul, CAF = café, NC = no color, VER = verde, VIO = violeta

(+) I, Celb; II, Oscuro; III, Anaranjado; IV, Azul.



## 7.4. Calificación del Método Cromatográfico.

### A) Precisión del método en cuanto a los Rf.

Los valores de Rf presentes en las tablas VII a XIV son los valores promedio de seis corridas de los valores obtenidos experimentalmente.

### B) Coeficientes de correlación.

Las siguientes tablas muestran los coeficientes de correlación determinados a partir de los Rf y Rst entre los diferentes sistemas de disolventes empleados.

**TABLA XVII. COEFICIENTES DE CORRELACION DE LOS Rf ENTRE LOS SISTEMAS HPTLC PARA BENZODIACEPINAS**

SISTEMA	1	2	3
1	1.0000	0.4152	0.7547
2	0.4152	1.0000	0.7917
3	0.7547	0.7917	1.0000

1= cloroforno/metanol (90:10) 2= heptano/tolueno/dietilamina (75:15:10)

3= heptano/acetato de etilo/etanol/hidróxido de amonio del 27 al 30 % (p/v) (70:70:10:5)

Los tres sistemas son susceptibles de emplearse juntos para la identificación de benzodiazepinas debido a los bajos coeficientes de correlación.

**TABLA XVIII. COEFICIENTES DE CORRELACION DE LOS  $R_{Fj}$  ENTRE LOS SISTEMAS HPTLC PARA BENZODIACEPINAS**

SISTEMA	1	2	3
1	1.0000	0.4150	0.6079
2	0.4150	1.0000	0.8764
3	0.6079	0.8764	1.0000

1= cloroformo/metanol (90:10) 2= heptano/tolueno/diclorometano (75:15:10)

3= heptano/acetato de etilo/etanol/hidróxido de amonio del 27 al 30 % (p/v) (70:70:10:5)

Los 3 sistemas presentan coeficientes de correlación bajos, por lo tanto se pueden emplear a la vez para el análisis cromatográfico de benzodiazepinas.

**TABLA XIX. COEFICIENTES DE CORRELACION DE LOS  $R_{Fj}$  ENTRE LOS SISTEMAS HPTLC PARA BENZODIACEPINAS**

SISTEMA	1	2	3
1	1.0000	0.4158	0.7548
2	0.4158	1.0000	0.7918
3	0.7548	0.7918	1.0000

1= cloroformo/metanol (90:10) 2=heptano/tolueno/diclorometano (75:15:10)

3= heptano/acetato de etilo/etanol/hidróxido de amonio del 27 al 30 % (p/v) (70:70:10:5)

Coefficientes de correlación bajos son obtenidos para los tres sistemas, por lo tanto es posible el empleo de los tres sistemas para aumentar la probabilidad de identificación.

**TABLA XX. COEFICIENTES DE CORRELACION DE LOS  $R_i$  ENTRE LOS  
SISTEMA NPTLC PARA ANOREXICOS**

SISTEMA	1	2	3
1	1.0000	0.8024	-0.0723
2	0.8024	1.0000	-0.4383
3	-0.0723	-0.4383	1.0000

1= clorofloro/metanol (30:10) 2= heptano/tolueno/dioxolano (76:18:10)  
3= heptano/acetato de etilcelosano/hidróxido de amonio del 27 al 30 % (p/v) (70:70:10:5)  
El mejor coeficiente de correlación en cuanto a los  $R_i$  para anoréxicos está entre los sistemas 1 y 2, pues el valor es de baja magnitud, lo que proporciona mayor información.

**TABLA XXI. COEFICIENTES DE CORRELACION DE LOS  $R_{rel,i}$  ENTRE LOS  
SISTEMAS NPTLC PARA ANOREXICOS**

SISTEMA	1	2	3
1	1.0000	0.7132	-0.0828
2	0.7132	1.0000	-0.4172
3	-0.0828	-0.4172	1.0000

1= clorofloro/metanol (30:10) 2= heptano/tolueno/dioxolano (76:18:10)  
3= heptano/acetato de etilcelosano/hidróxido de amonio del 27 al 30 % (p/v) (70:70:10:5)  
El par de sistemas de disolventes 1 - 2 es el que presenta un coeficiente de correlación mejor, en base al  $R_{rel,i}$  para los anoréxicos, ya que su valor es bajo y por tanto permite obtener mayor información para la identificación de los anoréxicos.

**TABLA XXII. COEFICIENTES DE CORRELACION DE LOS  $R_{ij}$  ENTRE LOS  
SISTEMAS HPTLC PARA ANOREXICOS**

SISTEMA	1	2	3
1	1.0000	0.6042	-0.0830
2	0.6042	1.0000	-0.4489
3	-0.0830	-0.4383	1.0000

1= cloróformo/metanol (90:10) 2= heptano/acetona/diclorometano (75:15:10)

3= heptano/acetato de etilo/acetona/ácido acético de amonio del 27 al 30 % (p/v) (70:70:10:5)

Para los  $R_{ij}$  de los anorexicos se parejo de disolventes 1 - 2 fue el que presentó el mayor coeficiente de correlación, ya que un valor mayor proporciona mayor información para la identificación.

## VIII. DISCUSION DE RESULTADOS.

### 8.1. Extracción del Principio Activo.

Este procedimiento fue desarrollado para la identificación de clonacepam, diacepam, clordiacepóxido, loracepam, flunitracepam, fluracepam, dietilpropión, mazindol, fentermina, fenfluramina y fenproporex. El proceso requiere solamente de una extracción.

Para la extracción del principio activo de productos farmacéuticos sólidos, se recomienda el empleo de disolventes de solubilidad selectiva (36, 37). Conforme a lo anterior, y de acuerdo a los resultados de las figuras 1 a 4, el cloroformo y el metanol poseen la mayor capacidad de disolución sobre el fármaco y bajo poder solubilizante de los excipientes.

Los volúmenes de agua y disolvente se seleccionaron de acuerdo a las solubilidades reportadas para benzodiazepinas y anoréxicos (8, 12, 42). En el caso de la solubilidad en agua, el peor de los casos fue con diacepam que es ligeramente soluble en agua (1:100 - 1, 000 partes). Con respecto a la solubilidad en los disolventes los casos extremos fueron con clordiacepóxido y flunitracepam, el primero es ligeramente soluble en cloroformo y el segundo es soluble 1:100 partes de metanol. De las figuras 1 a 4 se observó que con los volúmenes de agua y disolvente empleados se obtuvo suficiente cantidad de muestra para el análisis, de tal forma que se empleó uno sólo disolvente (cloroformo o metanol) y la mínima cantidad del mismo para ambos grupos de sustancias. Así que los disolventes cloroformo y metanol mostraron mayor efecto de disolución sobre el principio activo y escaso poder de solubilización de los excipientes.

Como las benzodiazepinas y los anoréxicos son bases nitrogenadas solubles en los disolventes orgánicos, la extracción de éstos fue realizada con cloroformo a partir de una solución acuosa alcalina. De esta forma se obtiene la base libre del fármaco en aquellos casos en donde el principio activo está presente como la sal en el producto farmacéutico.

Como se puede observar por la intensidad de las bandas en las figuras 1 y 2, la extracción fue independiente de los volúmenes de agua y cloroformo usados, pues no existe gran diferencia entre los diversos tratamientos. Por otro lado, tal como se aprecia en la figura 3, es mejor la extracción con 5 ml de metanol en lugar de 2 ml. De acuerdo a la figura 4 se infiere que la extracción metánolica es mejor que la cloroformica. Sin embargo, este procedimiento de extracción, presenta los desventajas de que el extracto es muy concentrado (desventaja para este caso en particular), lo que causa inconvenientes tanto en el comportamiento cromatográfico como en las pruebas con desarrollo de color. En el primero de los casos el valor de Rf varía al presentar la molécula otro radical (el clorhidrato proveniente de la sal), además de que el sistema "cola" al aumentar la cantidad de muestra aplicada y aparecen manchas en el frente del disolvente. En el segundo caso, el color desarrollado por un reactivo en particular puede variar por otro radical presente en la molécula que se estudia, las sales pueden dar diferente color debido a cambios en el pH.

## 8.2. Pruebas con Desarrollo de Color.

Este tipo de pruebas no son del todo específicas, las que se eligieron proporcionaron información suficiente para la identificación presuntiva de las benzodiazepinas y anoréxicos estudiados. Las pruebas usadas fueron las reacciones de Lieberman y la de formaldehído/ácido sulfúrico.

De acuerdo con Clarke (12), la reacción de Lieberman se emplea para la identificación de anoréxicos. Aunque se desconoce el principio de la reacción, se ha observado que con este reactivo se obtienen diversos colores. Para dietilpropión y fenfluramina se obtuvo un color amarillo, lo que coincide con lo reportado, en cambio, no se reportan los colores desarrollados por mazindol, fenproporex y fentermina. En este ensayo se observó que los anteriores desarrollaron una coloración amarilla. Según Clarke (12), algunos compuestos que contienen dos anillos benzénicos monosustituidos (o algunos compuestos disustituidos donde el flúor es el segundo sustituyente) los cuales están unidos a un átomo de carbono o adyacentes al átomo de carbono desarrollan un color que varía de anaranjado a café; por lo que era de esperarse que el mazindol presentara una coloración similar.

En base a su estructura química el fenproporex y la fentermina deberían de desarrollar un color anaranjado, que es producido por compuestos benzénicos monosustituidos no unidos a grupos C = O, N - C (=O) ó C = N - O.

Aunque los colores obtenidos experimentalmente para mazindol, fenproporex y fentermina no corresponden exactamente a lo reportado, hay que tomar en cuenta que el color producido depende de factores como: cantidad de la muestra y las condiciones de la prueba (temperatura, pH, presencia de material ajeno, etc.).

Con respecto a las benzodiazepinas diazepam, flurazepam, clordiazepóxido, flunitrazepam, clonazepam y lorazepam; se utilizó el reactivo de formaldehído-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para su

identificación presuntiva. Con este reactivo las benzodiazepinas generalmente dan un color anaranjado con la excepción de bromacepam y clozapina (amarillo) y fluracepam (rosa), lo que corresponde a lo obtenido y registrado en la tabla IV. Probablemente el ácido del reactivo que es a la vez oxidante y deshidratante realiza primero una condensación de los compuestos aromáticos con el formaldehído y luego oxida los compuestos resultantes a productos coloridos.



### 8.3. Análisis IR.

#### A. Anoréticos.

Mediante el estudio de los espectros IR de los anoréticos estudiados, se identificaron los principales grupos funcionales, cuyas frecuencias en el infrarrojo se encuentran en la tabla V, junto con sus espectros IR.

Para los anoréticos dietilpropión, fenproporex, fentermina y fenfluramina fue común encontrar bandas de intensidad variable a media en  $\sim 700$ ,  $750$  y  $780 \text{ cm}^{-1}$  que se originan por la deformación C-H del anillo aromático fuera del plano.

Bandas de intensidad fuerte y variable producidas a  $\sim 750$  y  $700 \text{ cm}^{-1}$  se deben a la monosustitución del anillo bencénico para dietilpropión, fenproporex y fentermina (figuras 5, 7 y 8). Se observó una banda en  $\sim 796 \text{ cm}^{-1}$  que corresponde a la sustitución meta en el caso de la fenfluramina (figura 6).

Las bandas entre  $1226$  y  $1204 \text{ cm}^{-1}$  de intensidad media a débil son debidas al estiramiento C-N de las aminas. Las aminas primarias (fentermina) y secundarias (fenfluramina y fenproporex) presentaron otra banda de intensidad media a débil ocasionada por la deformación N-H, dicha banda se observó en la región de  $1602$  a  $1582 \text{ cm}^{-1}$ .

En el espectro correspondiente a dietilpropión se observó la presencia de una banda intensa cerca de  $1667 \text{ cm}^{-1}$ , característica del carbonilo (ariloxona) presente en la molécula. También se identificó una banda en  $1599 \text{ cm}^{-1}$  originada por el estiramiento C-C del anillo aromático.

El grupo  $\text{CF}_3$  en la molécula de fenfluramina se identificó por la presencia de dos bandas fuertes en la región de  $1120$  y  $1167 \text{ cm}^{-1}$ .

La fentermina presentó dos bandas en  $1384$  y  $1366 \text{ cm}^{-1}$ , característica de la deformación C-H del grupo gem-dimetil.

El mazindol fue el único de los anoréxicos que no presentó estructura similar a los anteriores. Sin embargo, se observó una banda en  $1659\text{ cm}^{-1}$  que corresponde al estiramiento C=N. También se observó una banda en la región de  $1094\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a la deformación O-H. La banda de intensidad media en  $1085\text{ cm}^{-1}$  es característica del estiramiento C-Cl.

#### B. Benzodiazepinas.

Debido a que las benzodiazepinas presentan estructura similar, fue posible su identificación con base a las diferencias generadas por los diversos grupos funcionales presentes. La frecuencia de las bandas IR de las benzodiazepinas se encuentran en la tabla VI, junto con los espectros IR obtenidos.

Fue común encontrar bandas de fuerte intensidad entre  $1695$  y  $1677\text{ cm}^{-1}$  asignadas al carbonilo de la amida (excepto clordiazepóxido), así como una banda de intensidad media a fuerte entre  $1627$  y  $1600\text{ cm}^{-1}$  que corresponden al estiramiento C=N. Otro tipo de bandas comunes fueron las observadas aproximadamente a  $700$ ,  $750$  y  $850\text{ cm}^{-1}$ , características de la deformación C-H del anillo aromático fuera del plano.

En los espectros del cionacepam y flunitacepam (figuras 10 y 13) se observaron bandas entre  $1570$ - $1500$  y  $1370$ - $1300\text{ cm}^{-1}$  características de moléculas que poseen grupos  $\text{NO}_2$ .

El clordiazepóxido (figura 11) presentó una banda de intensidad media en  $1589\text{ cm}^{-1}$  originada por la deformación N-H de la amina secundaria unida al anillo, así como otra banda en  $1264\text{ cm}^{-1}$  debida al estiramiento C-N de la misma.

La banda de intensidad fuerte observada en  $1101$  y  $1103\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente de los espectros de flunitacepam y fluracepam (figuras 13 y 14) corresponden al estiramiento C-F. El fluracepam presentó una banda mediana en  $1215\text{ cm}^{-1}$  debida al estiramiento C-N de la amina terciaria alquímica.

El diazepam y lorazepam (figuras 12 y 15) presentaron bandas en 1126 y 1100  $\text{cm}^{-1}$  respectivamente, atribuidas al estiramiento C-Cl. En el espectro de lorazepam se observó una banda en 1133  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a la deformación O-H.

Las bandas principales de absorción en el IR de los grupos funcionales para los anoréxicos y benzodiazepinas que se encuentran en las tablas V y VI, así como su frecuencia e intensidad han sido reportadas por Clarke (12), Creswell (14) y Silvershein (15). Dichos grupos funcionales, su región en el IR, su intensidad y la comparación de espectros IR obtenidos con los reportados permitió deducir que la sustancia extraída corresponde a la sustancia en particular.

#### **8.4. Cromatografía en Fase Fina de Alta Resolución.**

Los valores promedio de los  $R_f$  y  $R_{st}$  de las benzodiazepinas y anoréxicos estudiados en los tres sistemas HPTLC (sistema de disolventes 1, 2 y 3) están registrados en las tablas VIII a XIV. Para la obtención de los  $R_f$  se emplearon los residuos provenientes de la extracción cloroformica, que corresponden al fármaco en forma de la base libre. No se emplearon los extractos metanólicos para el estudio ya que se hubieran presentado dos situaciones importantes: Primero, el extracto obtenido estaría muy concentrado, por lo que afectaría el desarrollo cromatográfico por sobrecarga. Segundo, el comportamiento cromatográfico varía al presentarse la molécula en forma de clorhidrato; por lo que son extraídos como tales con metanol, en los cuales el Cl favorecería su elución a diferencia de un grupo amino cuya elución se retardaría.

El tratamiento previo de las cromatoplaques con KOH metanólico fue útil, ya que permitió obtener manchas circulares más definidas. Además, el empleo de este tipo de agentes de impregnación inorgánicos disminuye el tiempo de retención (valores de  $R_f$  mayores) debido a que el KOH reacciona con el gel de sílice ocupando sitios activos del mismo (12, 16, 17). Este efecto, puede ser apreciado de alguna forma al comparar los  $R_f$  reportados del dietilpropión y diacepam obtenidos al realizar el desarrollo cromatográfico sobre placas tratadas y no tratadas con KOH metanólico, empleando como eluyente metanol:amoníaco de acuerdo a la tabla I.

Phillips y Gardiner (19) encontraron que al cromatografiar feniletilaminas sobre placas "básicas" y empleando como eluyente cloroformo/metanol se mejoraba la movilidad, siendo aún mejor cuando se usó ciclohexano/benceno/dietilamina. Con base a lo anterior se procedió al empleo de las mismas. De lo anterior se deduce que las placas "básicas" fueron útiles para la separación de compuestos con carácter básico como benzodiazepinas, anoréxicos, alcaloides, aminas, etc., en general compuestos nitrogenados.

La cantidad de sustancia por aplicar y su área sobre la cromatoplaça, se estandarizó mediante el empleo de cromatoplaças HPTLC. El tipo de disolvente es importante para el tamaño de la mancha de partida. Algunos disolventes difunden la sustancia en forma circular sobre el punto de partida, mientras que otros no ( 2, 16, 17 ). Se seleccionó el clorofórmico como disolvente de aplicación debido a que es volátil y de baja polaridad de tal forma que no se difunde la mancha.

La aplicación en punto de 1 a 2  $\mu$ l de la solución del extracto de la muestra, evitó la aparición de una mancha en el frente del solvente y el "coleo" de la mancha producida por la sustancia en estudio. Como se sabe, la aplicación en banda produce manchas menos alargadas comparada con la aplicación en punto (16, 17), ya que se eliminan en gran parte las sobrecargas de la capa que pueden conducir a la formación de "coleas". El incremento del volumen de aplicación de la muestra sobre la placa afecta a los Rf, especialmente si el sistema "colea", pues hace difícil la medición y evaluación de los Rf. Sin embargo, con el empleo de las cromatoplaças HPTLC, por sus características de grano y poro, y por los parámetros de capa, se logró la adecuada aplicación de la cantidad de muestra, evitando los problemas tales como el "coleo" y el "efecto de borde", asociados generalmente a grandes volúmenes de aplicación. (16)

Considerando que no se conoce exactamente la polaridad (constante dieléctrica) de las moléculas estudiadas y tomando en cuenta que las benzodiazepinas presentan una estructura base, que se diferencian sólo por ciertos grupos funcionales, es posible tratar de justificar su comportamiento cromatográfico con base en el poder de adsorción de los sustituyentes sobre la molécula. También hay que considerar que la afinidad del compuesto por la fase móvil es determinante para su elución.

De acuerdo con las tablas VII y X con el eluyente clorofórmico/metanol (90:10), que es una mezcla de disolventes con características de mediana polaridad se observó que la mayoría de las benzodiazepinas permanecieron dentro de un intervalo de Rf de 0.42 a 0.55, aproximadamente.

Siendo el menor Rf para el loracepam debido a que es un compuesto que presenta un grupo OH, capaz de formar puente de hidrógeno con el gel de sílice, por lo tanto es mayor su poder de adsorción en comparación con las otras benzodiazepinas. Posteriormente se encontró que el fluracepam siguió en orden decreciente de adsorción al loracepam, el fluracepam se diferencia del loracepam en que el primero presenta un grupo dietilamina en cadena alquílica unida a la amida cíclica, lo que le confiere mayor movilidad. Luego siguió en el mismo orden clordacepóxido y clonacepam, al compararse estructuralmente se observó que el segundo migró más, pues un grupo NO<sub>2</sub> presente en la molécula permite una mayor movilidad en comparación con un grupo metilamino. El diacepam y flunitracepam bajo estas condiciones cromatográficas presentan el mismo Rf, que a su vez son los valores más altos ya que poseen respectivamente grupos Cl y NO<sub>2</sub>, por lo que se esperaba que presentarían un Rf mayor, es decir menor poder de adsorción. De acuerdo con lo reportado el diacepam debería de migrar más que el flunitracepam, cosa que no se obtuvo debido tal vez a la distancia de desarrollo. Sin embargo, a pesar de presentar el mismo Rf pueden ser diferenciadas por los agentes de revelado.

Al emplear una mezcla de disolventes con carácter predominantemente de baja polaridad, heptano/tolueno/dietilamina (75:15:10) (tablas VIII y X) se obtuvo que para las benzodiazepinas clonacepam, clordacepóxido y loracepam no migraron del punto de partida, lo que significa que fueron adsorbidas más fuertemente por el adsorbente en comparación con el resto de las benzodiazepinas y que el eluyente no contó con el poder de elución requerido que permitiera su migración. El diacepam, flunitracepam y fluracepam mostraron buena movilidad, así como también buena separación en comparación con el sistema anterior. El fluracepam probablemente alcanzó un Rf mayor porque a diferencia de las otras benzodiazepinas que migraron, contiene un grupo dietilamino, mismo que es menos adsorbido sobre la capa de gel de sílice. En orden decreciente de elución le siguieron diacepam y flunitracepam con grupos Cl y NO<sub>2</sub>, respectivamente.

Cuando las benzodiazepinas estudiadas se desarrollaron con heptano/acetato de etilo/etanol/hidróxido de amonio del 27 al 30 % (p/v) (70:70:10:5), es decir, bajo condiciones algo más polares y más básicas que el sistema cloroformo/metanol, se encontró una mejor separación de las benzodiazepinas (tablas IX y X), todas ellas se separaron bien dentro de un margen de Rf de 0.2 a 0.54, poca movilidad pero buena separación. Confirmando lo anterior el loracepam presentó el Rf de menor valor por lo explicado con anterioridad. En el orden acostumbrado le siguieron clordiazepóxido y cionacepam por las razones anotadas en el párrafo anterior. Posteriormente continuaron en orden decreciente de adsorción fluracepam, flunitracepam y diacepam. Resultando que el diacepam alcanzó un mayor valor de Rf por poseer un grupo Cl en la molécula. En cuanto a fluracepam y flunitracepam su posición podría justificarse por el hecho de que el segundo contiene en su molécula al grupo NO<sub>2</sub> que lo hace de poca adsorción, a diferencia del grupo dietilamino presente en el fluracepam, que incrementa su adsorción.

Para entender el comportamiento cromatográfico de los anoréxicos es posible hacer uso del mismo criterio empleado con las benzodiazepinas.

En cuanto a los anoréxicos que fueron eluidos con los mismo sistemas de disolventes empleados para las benzodiazepinas, se obtuvo que los compuestos de este tipo al ser eluidos con cloroformo/metanol (90:10) tomaron posiciones de la parte baja a la mitad de la distancia de desarrollo, siendo el menor Rf para fenfluramina y mazindol que fueron fuertemente adsorbidos por el gel de sílice por la presencia de grupos capaces de formar puente de hidrógeno con el adsorbente (ver tablas XI y XIV). Con valores de Rf de valor medio se encontraron fentermina y fenproporex de lo que se deduce que la fentermina es adsorbida con mayor fuerza por presentar un grupo NH<sub>2</sub> primario, en tanto que el fenproporex posee una amina secundaria en una cadena alquílica. En cambio, el dietilpropión con Rf alto es adsorbido con menor intensidad debido a la presencia de un grupo dietilamino. En resumen, con este sistema se obtuvo buena movilidad y la mayoría de los compuestos fueron separados adecuadamente.

El sistema constituido por heptano/tolueno/dietilamina (75:15:10) mostró mejor movilidad que el sistema anterior para los anoréxicos, pues se resolvieron mejor los compuestos, obteniendo valores de Rf desde 0.02 hasta 0.58. Con este sistema, nuevamente el mazindol presentó un Rf bajo debido a su grupo OH que ejerce acción electrostática con la capa del adsorbente. En cambio, el dietilpropión tomó la posición más alta sobre la cromatopla. Los demás estuvieron adecuadamente separados unos de otros. La fentermina alcanzó la segunda posición en orden decreciente de poder de adsorción debido al grupo NH<sub>2</sub> en su estructura molecular. Posteriormente siguieron en orden decreciente de adsorción fenproporex y fenfluramina. Probablemente la fenfluramina migró más debido a que su cadena alquílica es saturada en comparación con la cadena alquílica del fenproporex que es más larga y presenta una triple ligadura, la cual es más fuertemente adsorbida. Los Rf obtenidos con este sistema se encuentran en las tablas XII y XIV.

El sistema heptano/acetato de etilo/etano/hidróxido de amonio del 27 al 30 % (pv) (70:70:10:5) que fue elegido para la separación de benzodiazepinas, resuelve igualmente bien a los anoréxicos tal como lo muestran los Rf obtenidos y presentados en las tablas XIII y XIV. De las tablas mencionadas anteriormente se nota que hay poca movilidad en la parte inferior de la placa cromatográfica. Inversamente a lo obtenido con anterioridad, el dietilpropión no migró del punto de origen con este sistema, lo que puede deberse a la solubilidad de la molécula. En orden decreciente de poder de adsorción siguieron: mazindol, fenfluramina, fentermina y fenproporex.

En el caso de este último sistema, es difícil explicar el comportamiento cromatográfico aquí obtenido únicamente en base a la conocida secuencia del poder de adsorción de sustituyentes en compuestos aromáticos, ya que son diversos los factores que rigen el comportamiento cromatográfico.

La posición en la escala de Rf del mazindol concuerda por la presencia en su molécula de un grupo OH. De acuerdo a sus grupos funcionales, la fentermina debería de tomar una posición inferior a la fenfluramina, sin embargo el poder de elución del eluyente favoreció a la fentermina. Bajo



estas condiciones el fenproporex tomó la posición más alta en comparación con los otros anoréxicos gracias a que fue más afín a la fase móvil que a la fase estacionaria.

### **8.5 Selección de los Agentes de Revelado.**

Generalmente una mancha cromatográfica se identifica por tener el mismo Rf y mismo color que una sustancia estándar u otra relativa a él. Hay que recordar que aunque la cromatografía es una técnica de separación, no es una técnica de identificación, sin embargo por la combinación del Rf y la coloración desarrollada al aplicar los agentes de revelado, fue posible identificar las manchas.

Después de desarrollarse las placas, fueron observadas bajo luz UV de longitud de onda corta (254 nm), con el fin de evaluar preliminarmente a los fármacos estudiados que fluorescen bajo luz UV.

De acuerdo con los resultados presentados en las tablas XV a XVI, se deduce que la siguiente secuencia de aspersion fue adecuada para la identificación y diferenciación entre los diversos compuestos aminados.

Para la identificación de compuestos con nitrógenos primarios, secundarios y terciarios se siguió la secuencia de aspersion que a continuación se describe:

1. Los nitrógenos primarios se detectaron con ninhidrina y posterior exposición a luz UV de 365 nm por diez minutos. De esta manera la fentermina se detectó como una mancha violeta. En cambio las benzodiazepinas, mazindol y dietilpropión no reaccionaron con este reactivo. La fenfluramina y el fenproporex tampoco reaccionaron. No desarrollaron coloración debido probablemente a que el grupo amino no se encuentra en la parte terminal de la cadena alquímica unida al anillo benzénico.

2. Una vez seca la placa fue rociada con solución de  $H_2SO_4$  para intensificar la reacción de la ninhidrina y hacerlas visibles, ya que en ocasiones los compuestos amfetamínicos no se visualizan en el primer paso. Por otra parte, los compuestos presentaron coloración amarilla (flurazepam), café (dietilpropión, fenfluramina, fentermina, mazindol, clonazepam, diazepam y

(flunitracepam) o bien no reaccionaron al rociar el ácido que es un fuerte agente oxidante y deshidratante.

3. Los compuestos con nitrógenos secundarios y terciarios desarrollaron la coloración reportada con la solución de iodo-platino acidificado. Básicamente se observaron dos colores, café y violeta. El primero, para clonacepam, diacepam, flunitracepam, loracepam y mazindol. La coloración violeta correspondió a distilpropión, fenfuramina, fenproporex, clordacepóxido y fluracepam. La fentermina fue la única que no reaccionó con el reactivo de iodo-platino acidificado. Con este reactivo no fue posible diferenciar entre diacepam y flunitracepam ya que presentaron el mismo Rf cuando se eluyeron con cloroformo/metanol (90:10). En cambio, sí se diferenciaron clonacepam y clordacepóxido, pues el primero presentó un color café y el segundo un color violeta, pero no diferenció loracepam de clonacepam, pues tuvieron el mismo Rf y color junto con el clordacepóxido en el sistema heptano/tolueno/dietilamina (75:15:10).

Mazindol y fenfuramina que tuvieron el mismo Rf cuando fueron estudiadas con cloroformo/metanol (90:10) se pudieron diferenciar con el iodo-platino en base a que el mazindol fue una mancha café mientras que la fenfuramina fue violeta.

4. Una suspensión subsiguiente con el reactivo de Dragendorff permitió comprobar o diferenciar a los compuestos restantes. Todos los compuestos estudiados presentaron un color anaranjado. Con este reactivo, pudo ser identificada la fentermina que no había reaccionado con los anteriores agentes de revelado.

El reactivo FPN (reactivo V, tabla XV y XVI) aunque está indicado para la detección de fenotiacinas y dibenzazepinas fue de utilidad para diferenciar a las benzodiazepinas, mismas que mostraron coloraciones diferentes. No ocurriendo así para los anoréxicos que no mostraron reacción alguna.

Los agentes de revelado I, II, III, y IV según las tablas II, XV y XVI son de aplicación general para alcaloides o compuestos nitrogenados, por lo que no proporcionaron información

relevante que permitiera identificar o diferenciar a las benzodiazepinas y anorexícos. Sin embargo, al hacer uso de la combinación de ellos con los otros agentes de detección fueron capaces de diferenciar entre clonacepam, clonitazepóxido, diacepam, diazepam, etilpropilén, fenfluramina, fenproporex, fentermina, flunitrazepam, fluracepam, loracepam y mazindol.

## 8.6. Calificación del Método Cromatográfico.

### A) Precisión del método

El hecho de no haberse observado diferencias entre los valores de Rf estandarizados, significa que hubo precisión en cuanto a los valores obtenidos experimentalmente, independientemente de la sensibilidad del sistema de medición. Lo anterior significa que la variación entre las determinaciones individuales son bajas.

Los Rf obtenidos tanto de benzodiazepinas como de anoréxicos fueron estandarizados utilizando diazepam y fenproporex como sustancias de referencia, obteniéndose los R<sub>st</sub> (Rf relativos), mismo que se encuentran en las tablas VII - XIV. Los R<sub>st</sub> calculados de esta manera fueron reproducibles, pues mediante su empleo se corrigieron los errores sistemáticos tales como humedad relativa, temperatura, calidad del adsorbente, etc. (41)

### B) Determinación de los coeficientes de correlación.

Los coeficientes de correlación entre los diferentes sistemas HPTLC evaluados para el análisis cromatográfico de benzodiazepinas y anoréxicos objeto de este estudio, están tabulados en las tablas XVIII a XXIII. Se determinaron inicialmente a partir de los Rf, posteriormente se calcularon en base a los R<sub>st</sub> relativos a diazepam y fenproporex.

La determinación de los coeficientes de correlación tuvo como finalidad determinar la correlación entre las propiedades cromatográficas de los sistemas HPTLC empleados. Como puede apreciarse en las tablas XVI y XXII, los valores calculados a partir de los Rf son bajos, lo que significa que la correlación entre las propiedades cromatográficas son bajas. Esto sugiere que la variación del Rf en un determinado sistema de disolventes está asociada con la variación del otro,

obteniéndose información extra cuando más de un sistema de desarrollo se emplea con propósitos de identificación. Con base a lo anterior se encontró que los tres sistemas son adecuados para emplearse en el análisis cromatográfico de benzodiazepinas y anoréticos.

Los coeficientes de correlación calculados con base en los Rf relativos (R<sub>rel</sub>) son de baja magnitud. De lo anterior se deduce que para los R<sub>rel</sub> (Rf relativo a diazepam, tabla XVIII) de las benzodiazepinas los tres sistemas resuelven adecuadamente y para anoréticos los sistemas 1 y 2. Comparando los R<sub>rel</sub> (Rf relativo a fenproporex, tablas XIX y XXII) de benzodiazepinas y anoréticos se observó que los mejores coeficientes de correlación para las benzodiazepinas son los obtenidos con los tres sistemas. Para los anoréticos son los sistemas 1 - 2.

## IX. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos y discutidos en este trabajo de investigación, se formulan las siguientes conclusiones:

1.- La extracción cloroformo alcalina de benzodiazepinas y anoréxicos seguida del análisis confirmativo por IR, demostró ser adecuada para aislar e identificar a los principios activos.

2.- La reacción de Lieberman y la de formaldehído/ácido sulfúrico son pruebas presuntivas adecuadas para la identificación de las benzodiazepinas y anoréxicos provenientes de los extractos cloroformicos alcalinos. La reacción de Lieberman produjo coloración amarilla para los anoréxicos y reacción negativa para las benzodiazepinas. El formaldehído/ácido sulfúrico dio reacción negativa para anoréxicos, mientras que clonacepam, clordiazepóxido, diacepam, flunitracepam y loracepam desarrollaron una coloración anaranjada, el fluracepam desarrollo una coloración rosa.

3.- El análisis IR es un método adecuado para confirmar la presencia de los principios activos estudiados provenientes de los extractos cloroformicos alcalinos realizados a los medicamentos.

4.- Los sistemas de disolventes (1) cloroformo/metanol (90:10) y (2) heptano/tolueno/dietilamina (75:15:10) se recomiendan para ser usados como sistemas de discernimiento inicial para la identificación de benzodiazepinas y anoréxicos, seguido de su posterior confirmación por el empleo del sistema (3) heptano/acetato de etilo/hidróxido de amonio del 27 al 30 % (p/v) (70:70:10:5).

La identificación de las benzodiazepinas y anoréxicos estudiados por HPTLC es más confiable si se utilizan más de un sistema de disolventes para su estudio.

5.- El sistema de discernimiento recomendado para la identificación benzodiazepinas es el sistema (1), mientras que para los anoréxicos es el sistema (2).

6.- La secuencia de aspersion con ninhidrina, solución de iodo-piostino acidificado y el reactivo de Dragendorff permite la identificación y diferenciación entre benzodicepinas y anoréxicos con los tres sistemas de disolventes. El reactivo FPN permite diferenciar entre benzodicepinas.

7.- La determinación de los valores de Rf en relación a una sustancia de referencia aumenta la reproducibilidad de los mismos.

8.- Los coeficientes de correlación bajos permiten emplear los tres sistemas de disolventes a la vez para aumentar la probabilidad de identificación.

9.- Es factible identificar la presencia de benzodicepinas y anoréxicos utilizando las reacciones de Lieberman y formaldehído/ácido sulfúrico, seguido del análisis HPTLC aquí propuesto.



## **X. SUGERENCIAS**

1. Los valores de  $R_f$  no son constantes físicas y pueden variar por varias causas predecibles. Por ejemplo, la temperatura, la pureza y la relación (v/v) de los disolventes deben de mantenerse constantes para obtener resultados reproducibles.

2. Aunque los valores de  $R_f$  pueden variar de un día a otro y aún de lote a lote de cromatoplasas y a otros factores como la humedad, actividad del adsorbente, uniformidad del espesor de la capa y a cambios en la temperatura, el modo de elución continúa siendo el mismo.

3. Se recomienda el aumento de la distancia de desarrollo en caso de incluir más compuestos de los aquí analizados.

## **XI. APENDICE A.**

### **PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS DE BENZODIACEPINAS Y ANOREXICOS.**

#### **CLONACEPAM.**

Nombre químico: 5-(2clorofenil)-1,3-dihidro-7-nitro-2H-1,4-benzodiazepin-2-ona.

P.M. 315.72

Cristales blancos con p.f. 236.5-238.5 °C.

Solubilidad en mg/ml a 25 °C: acetona 31; cloroformo 15; metanol 8.6; éter 0.7; benceno 0.5; agua menos de 0.1.

Constante de disociación:  $pK_a$  1.5, 10.5

Coefficiente de partición: Log P (octanol/pH 7.4). 2.4

#### **CLORDIACEPOXIDO.**

Nombre químico: 7-cloro-N-metil-5-fenil-3H-1,4-benzodiazepin-2-amina 4-óxido.

7-cloro-2-metilamino-5-fenil-3H-1,4-benzodiazepin 4 óxido.

P.M. 299.75

Poivo amarillo cristalino, sensible a la luz con p.f. cerca de 236-238.5 °C. Prácticamente insoluble en agua; soluble 1:50 en etanol, 1:30 en éter y 1:8.2 en cloroformo.

El clordiazepo es un poivo cristalino de color blanco o ligeramente amarillento con punto de fusión de 212-218 °C, con descomposición. Sensible a la luz. Soluble 1:10 en agua, 1:40 en etanol; prácticamente insoluble en cloroformo y éter.

Constante de disociación:  $pK_a$  4.6 (20°C).

Coefficiente de partición: Log P (octanol/pH 7.4). 2.7.

### DIACEPAM.

Nombre químico: 7-cloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepin-2-ona.

P.M. 284.76

Poivo cristalino de color blanco o amarillo con p.f. 131-135 °C.

Poco soluble en agua, soluble 1:25 en etanol, 1:2 en cloroformo y 1:39 en éter.

Constante de disociación:  $pK_a$  3.3 (20°C).

Coefficiente de partición: Log P (octanol/pH 7.4), 2.7.

### DIETILPROPION.

Nombre químico: 2-(diethylamino)-1-fenil-propanona. 2-diethylaminopropiofenona.

P.M. 205.30

El clorhidrato es un polvo fino cristalino blanco con p.f. de 175 °C, con descomposición.

Soluble 1:0.5 en agua, 1:3 en cloroformo, 1:3 en etanol; prácticamente insoluble en éter.

### FENFLURAMINA.

Nombre químico: N-etil- $\alpha$ -metil-3-(trifluorometil)benzenetanamina

N-etil- $\alpha$ -m-(trifluorometilfenil)fenetilamina.

P.M. 231.27

Forma de prácticamente insoluble en agua. Soluble en cloroformo.

El clorhidrato es un polvo cristalino. p.f. 168-172 °C. Soluble 1:20 en agua, 1:10 en etanol y 1:10 en cloroformo; prácticamente insoluble en éter.

Constante de disociación:  $pK_a$  9.1 (25°C).

### FENPROPorex

Nombre químico: 3-[-(1-metil-2-fenetil)amino]propanonitrilo.

3-[( $\alpha$ -metilfenetil)amino]propionitrilo.

P.M. 188.27

Líquido con p.eb. 126°127 °C.

El clorhidrato es un polvo cristalino blanco e inodoro con p.f. 198 °C. Soluble en agua y en etanol al 95%.

### FENTERMINA

Nombre químico:  $\alpha$ -dimetilbenzenetanamina.  $\alpha$ -dimetilfenetilamina.

P.M. 149.23

Líquido aceitoso incoloro. p.eb. 705 °C. Ligeramente soluble en agua; soluble en etanol, cloroformo y éter. Es un isómero de metilamfetamina.

El clorhidrato es un polvo blanco cristalino. p.f. 198 °C. Muy soluble en agua, etanol y cloroformo; prácticamente insoluble en éter

Constante de disociación:  $pK_a$  10.1.

### FLUNITRACEPAM

Nombre químico: 5-(2-fluorofenil)-1,3-dihidro-1-metil-7-nitro-2H-1,4-benzodiazepin-2-ona.

P.M. 313.30

Sólido cristalino casi blanco o amarillo pálido. p.f. alrededor de 170 °C.

Escasamente soluble en agua; soluble 1:172 en etanol, 1:3 en cloroformo; 1:300 en éter y 1:100 en metanol.

Constante de disociación:  $pK_a$  1.8.

### FLURACEPAM.

Nombre químico: 7-cloro-1-[2-(diethylamino)etil]-5-(2-fluorofenil)-1,3-dihidro-2H-1,4-benzodiazepin-2-ona.

P.M. 357.89

Cristales blancos. p.f. 77-82 °C.

El clorhidrato es un polvo blanco cristalino con p.f. 212 °C, con descomposición. Soluble 1:2 en agua, 1:4 en etanol, 1:90 en cloroformo y 1:3 en metanol; muy escasamente soluble en éter.

El monoclóridato es muy soluble en agua; libremente soluble en etanol; prácticamente insoluble en éter. Es un polvo blanco cristalino.

Constante de disociación:  $pK_a$  1.9, 8.2.

Coefficiente de partición: Log P (octanol/pH 7.4), 2.3.

### LORACEPAM.

Nombre químico: 7-cloro-5-(2-clorofenil)-1,3-dihidro-3-hidróxi-2H-1,4-benzodiazepin-2-ona.

P.M. 321.16

Polvos blancos con p.f. 168-168 °C.

Solubilidad (mg/ml): agua 0.08, cloroformo 3, alcohol 14, propilenglicol 18, acetato de etilo 30.

Constante de disociación:  $pK_a$  1.3, 11.5 (20°C).

Coefficiente de partición: Log P (octanol/pH 7.4), 2.4

### MAZINDOL.

Nombre químico: 5-(4-clorofenil)-2,5-dihidro-3H-imidazol[2,1-a]isonidol-5-ol.

P.M. 264.74

Polvos blancos cristalinos. p.f. 198-199 °C.

Insoluble en agua y poco soluble en alcohol.

Constante de disociación:  $pK_a$  8.6.

## **XII. APENDICE B.**

### **SOLUCIONES Y REACTIVOS.**

Dragendorff, reactivo: (a) mezclar 2 gramos de nitrato de bismuto, 25 ml de ácido acético y 100 ml de agua; (b) disolver 40 gramos de ioduro de potasio en 100 ml de agua. Mezclar 10 ml de (a), 10 ml de (b), 20 ml de ácido acético y 100 ml de agua. Preparar cada dos días.

Formaldehído/ácido sulfúrico, solución: A 4 volúmenes de ácido sulfúrico concentrado adicionar 6 volúmenes de solución de formaldehído colocando la punta de la pipeta por debajo de la superficie del ácido, con agitación y enfriamiento adecuado. Dejar reposar por una hora. Si hay turbiedad se elimina por calentamiento en un baño de agua a ebullición por un minuto.

FPN, reactivo: Mezclar 5 ml de solución de cloruro férrico al 5 %, 45 ml de solución de ácido perclórico al 20 % y 50 ml de ácido nítrico al 50 %.

Iodo-platino acidificado, solución: Disolver 0.25 gramos de ácido hexacloroplatínico y 5 gramos de ioduro de potasio en suficiente agua para producir 100 ml. A la solución anterior añadir 5 ml de ácido clorhídrico.

Liebermann, reactivo: Adicionar 5 gramos de nitrato de sodio a 50 ml de ácido sulfúrico concentrado con enfriamiento y extracción adecuada de los vapores.

Ninhidrina, solución al 0.5 %: Adicionar 0.5 gramos de ninhidrina a 10 ml de ácido clorhídrico y diluir a 100 ml con acetona. Preparar diariamente.

Tiocianato de cobalto, solución: Disolver 6 gramos de nitrato de cobalto y 18 gramos de tiocianato de potasio en 100 ml de agua.

### **XIII. BIBLIOGRAFIA.**

1. Breiter, J. Test Orientativo para el Reconocimiento del Abuso de Drogas y Productos Farmaceuticos, por Cromatografía en Capa Fina". Contacto Latinoamericano, Merck 1/78. 6-14.
2. Ley General de Salud, actualizada a abril de 1994.
3. Kaistha, K.K. "Drugs abuse Screening Programs: Detection Procedures, Development Costs, Street-Sample Analysis, and Field Test". J. Pharm. Sci. 61(5), 655-679 (1972).
4. De Silva, J.A.F. "Analytical Strategies for Therapeutic Monitoring of drugs in Biological Fluids". J. Chromatog. 340, 3-30 (1985)
5. Alvarez Gómez, Josefina (compiladora). "Tráfico y Consumo de Drogas. Una Visión Alternativa". UNAM-ENEP ACATLAN (1991).
6. Carroll R. Charles. "Drugs in Modern Society". 3a ed. Brownman R. Benchmark. 1993.
7. Smith/Reynard. "Farmacología". Médica Panamericana. 1993.
8. Remington's Pharmaceutical Sciences. 6a ed. Mack Publishing Company. USA, 1980.
9. Masoud, A. N. "Systematic Identification of Drugs of Abuse I: Spot test". J. Pharm. Sci. 64(5), 841-844 (1975).
10. Fitzgerald, T. J. and Walasek, E. J. "Drug Detection with Color Test". Clin. Toxicol. 6, 599 (1975).
11. Velapoldi, R. A. and Wicks, S. A. "The Use of Chemical Spots Test Kits for the Presuntive Identification of Narcotics and Drugs of Abuse". J. Forensic. Sci. 19(3), 636-656 (1974).
12. Clarke's. "Isolation and Identification of Drugs". 2a ed. Pharmaceutical Press. London, 1986.
13. Toma, J. J. ; Bondo, P. B. and Sunshine, I. "Guidelines for Analytical Toxicology Programs". CRC Press, Inc. USA, 1977.

14. Creswell, Runquist y Cambell. "Análisis Espectral de Compuestos Orgánicos". 2a ed. Diana. México, 1980.
15. Silverstein, Bassler and Morrill. "Spectrometric Identification of Organic Compounds". 4a ed. John Wiley and Sons. USA, 1981.
16. Bauer, Gros y Sauner. "Cromatografía en Capa Fina". Hüthig Buch Verlag, Germany, 1992.
17. Sthal, E. "Thin-Layer Chromatography". 2a ed. Springer-Verlag, Germany, 1980.
18. Egli, R. A. and Keller, S. "Comparison of Silica-gel and Reversed-Phase Thin-Layer Chromatography in Testing Drugs". J. Chromatog. 291, 249-256 (1984).
19. Phillips, G.F. and Gardiner, J. "The Chromatographic Identification of Psychotropic Drugs". J. Pharm. Pharmac. 21, 793-807 (1969).
20. Japp, M.; Garthwaite, K.; Geeson, A. V. and Osselton, M.D. "Collection of Analytical Data for Benzodiazepines and Benzophenones". J. Chromatog. 439, 317-339 (1988).
21. Choluis, N. H. "Separation and Quantitation of Mixture of the Most Commonly Abused Drugs". J. Pharm. Sci. 62(1), 112-114 (1973).
22. Broich, J. R.; Hoffman, D. B.; Andryuskas, S.; Gelante, I. and Umberger, C. "An Improved Method for Rapid, Large-Scale Thin-Layer Chromatographic Urine Screening for Drugs of Abuse". J. Chromatog. 60, 95-101 (1971).
23. Kaistha, K. K. and Jaffe, J. H. "TLC Techniques for Identification of Narcotics, Barbiturates and CNS Stimulants in a Drugs Urine Screening Program". J. Pharm. Sci. 61(5), 769-689 (1972).
24. Guyton, H.; Kemany, G.; Hollosi, I. and Pucsek, J. "Determination of Some Agents by Overpressured Thin-Layer Chromatography". J. Chromatog. 291, 471-475 (1984).
25. Broich, J. R.; Hoffman, D. B.; Gelder, S. J.; Andryuskas, S. and Umberger, C. J. "Liquid-Solid Extraction for Forensic Analysis I. Application to Urine Samples for Detection of Drugs of Abuse". J. Chromatog. 63, 309-312 (1971).



26. Kaistha, K. K. and Jaffe, J. H. "Reliability of Identification Techniques for Drugs of Abuse in a Urine Screening Program and Drugs Excretion Data". *J. Pharm. Sci.* 61(12), 305-307 (1972).
27. Mule, S. J. "Routine Identification of Drugs of Abuse in Human Urine I. Application of Fluorometry, Thin-Layer and Gas-Liquid Chromatographic". *J. Chromatog.* 56, 255-266 (1971).
28. Jain, N. C.; Leung, W. J.; Budd, R. D. and Sneath, T. C. "Thin-Layer Chromatographic Screening and Confirmation of Basic Drugs of Abuse in Urine". *J. Chromatog.* 115, 519-526 (1975).
29. Mc. Linden, V. J. and Stenhouse, A.M. "A Chromatographic System for Drugs Identification". *Forensic Sci. Inter.* 13, 71-79 (1979).
30. Lillsunde, P. and Korte, T. "Comprehensive Drugs Screening in Urine Using Solid-Phase Extraction and Combined TLC and GC/MS Identification". *J. Anal. Toxicol.* 15, 71-81 (1991).
31. Berry, D.J. and Grove J. "Improved Chromatographic Techniques and Their Interpretation for the Screening Urine from Drugs-Dependent Subjects". *J. Chromatog.* 61, 111-123 (1971).
32. Bastos, M.L.; Kananen, G.E.; Young, R.M.; Mofar, J.R. and Sunshine, J. "Detection of Basic Drugs and Their Metabolites in Urine". *Clin. Chem.* 16, 931-940 (1970).
33. Schütz, C.; Post, D.; Schewe, G. and Schütz, H. "Mikrochemischer Nachweis und Unterscheidung von fünf Tranquillizern aus der Klasse der 5-Phenyl-1, 4-Benzodiazepine mit der DC TRT-Technik". *Z. Anal. Chem.* 262, 282-286 (1972).
34. Berry, D.J. and Grove, J. "Emergency Toxicological of Drugs Commonly Taken in Overdose". *J. Chromatog.* 80, 205-209 (1973).
35. Connor, K.A. "Curso de Análisis Químico Farmacéutico". 2a ed. Reverte. España, 1981.
36. Katz, E. "Quantitative analysis Using Chromatographic Techniques". John Wiley and Sons. Great Britain, 1986.
37. Quattrocchi, O.A., Andriazzi, S.A y Labra, R.F. "Introducción a la HPLC". Artes Gráficas Farro. Argentina, 1992.

38. "Reactivos de Coloración para Cromatografía en Capa Fina y en Papel". E. Merck. Darmstadt (R.F. de Alemania).
39. Dhont, J.H.; Vinkenborg, C.; Compas, H.; Ritter, F.J.; Labadie, R.P.; Verweij, A. and Zeew, R.A. "Application of  $R_f$  Correction in Thin-Layer Chromatography by Means Two Reference  $R_f$  Values". J. Chromatog. 47, 376-381 (1970).
40. Galanos, D.S. and Kapoulas, V.M. "The Paper Chromatographic Identification of Compounds Using Two Reference Compounds" J. Chromatog. 13, 128-138 (1964).
41. Franke, J.P.; Schepers, P., Bosman, J. and Zeew, R.A. "Optimization of Thin-Layer Chromatography for Toxicological Screening: Applicability of Shorter Development Distances". J. Anal. Toxicol. 6, 131-134 (1982).
42. The Merck Index. 11a ed. Merck and Co. USA, 1969.
43. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. 39a ed. Ediciones PLM. México, 1993.