

Hallazgo de diclofenaco en un producto fitoterapéutico a base de caléndula comercializado en Colombia

Finding diclofenac in a marigold-based phytotherapeutic product marketed in Colombia

Elena E. Stashenko; Andrés F. González; Jairo R. Martínez; Camilo Durán; Cristian Oliveros; Leyde K. Gualteros; William Salgar; Camilo Henríquez; Diego Rojas

Forma de citar: Stashenko EE, González AF, Martínez JR, Durán C, Oliveros C, Gualteros LK, et al. Hallazgo de diclofenaco en un producto fitoterapéutico a base de caléndula comercializado en Colombia. Salud UIS. 2020; 52(3): 261-284. doi: <http://dx.doi.org/10.18273/revsal.v52n3-2020008> 

Resumen

Introducción: la consulta de un particular que trajo un producto fitoterapéutico a base de caléndula cuyo consumo le causó fuertes reacciones adversas, originó esta investigación sobre la composición de este producto. **Objetivo:** caracterizar la composición química de muestras de lotes diferentes de un producto comercial denominado fitoterapéutico a base de caléndula (*Calendula officinalis*) (PFC) comercializado en Colombia. **Metodología:** se analizaron tabletas de ocho cajas del PFC de cuatro lotes diferentes de producción (2017 y 2018). Se llevó a cabo el análisis de espacio de cabeza (HS) de tabletas por microextracción en fase sólida (SPME), con una fibra PDMS/DVB (65 µm), expuesta al HS de la muestra durante 30 min a 50 °C. Las fracciones volátiles se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS). Los extractos de tabletas obtenidos con mezcla de metanol:agua (1:1, v/v) se analizaron por cromatografía líquida (LC) de alta (HPLC) y ultra-alta eficiencia (UHPLC), con detectores de arreglo de diodos (DAD) y espectrometría de masas de alta resolución (HRMS), respectivamente; la cuantificación de diclofenaco se hizo por calibración con patrón externo y por adición de estándar. Los espectros de masas de baja y alta resolución y patrones de fragmentación de las sustancias detectadas se estudiaron, usando GC/HRMS y LC/HRMS-Orbitrap. **Resultados:** en tabletas analizadas por HS-SPME, se encontraron monoterpenoides y sesquiterpenoides de origen vegetal, ftalatos, residuos de solventes (2-cloroetanol, etilenglicol) y sustancias químicas intermediarias en la síntesis de diclofenaco (2,6-dicloroanilina y 2,6-cloro-*N*-fenil-bencenammina). En los cromatogramas, obtenidos por GC/MS de los extractos de tabletas obtenidos con diclorometano, se detectaron diclofenaco, sus impurezas A, B y C, los ésteres de diclofenaco y algunas otras impurezas. Diclofenaco en cantidad *ca.* 40 mg (7-8%) se cuantificó por HPLC en tabletas (> 70 analizadas) escogidas al azar de ocho cajas del PFC, adquirido en el mercado local de Bucaramanga (Colombia). **Conclusión:** en cada tableta analizada se determinaron alrededor de 40 mg del compuesto sintético diclofenaco

1. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

Correspondencia: Elena Stashenko. Dirección: Edificio CENIVAM, Carrera 27, calle 9. Teléfono: +57 76456737. Correo electrónico: elena@tucan.uis.edu.co

Recibido: 20/05/2020

Aprobado: 07/07/2020

Publicado en línea: 08/07/2020

(sustancia no declarada en la etiqueta del producto) y en ninguna se detectaron ésteres de los triterpenoides oleanano o faradiol, constituyentes del extracto de caléndula que poseen actividad antiinflamatoria; se encontraron algunos flavonoides comunes a muchas plantas, en cantidades mil veces menores que la de diclofenaco.

Palabras clave: Diclofenaco; Fitoterapéutico; *Calendula officinalis*; GC/MS; HPLC; LC/MS.

Abstract

Introduction: The consultation of a person who brought a marigold-based phytotherapeutic product whose consumption caused strong adverse reactions, originated this investigation of the composition of this product. **Objective:** to characterize the chemical composition of samples of different lots of a commercial product called calendula-based phytotherapeutic product (*Calendula officinalis*) (PFC) commercialized in Colombia. **Methodology:** Tablets of eight packs of the phytotherapeutic product from four different production batches (2017 and 2018) were analyzed. Headspace analysis (HS) of tablets by solid phase microextraction (SPME) was carried out with a PDMS/DVB fiber (65 μm), exposed to the HS of the sample for 30 min at 50 °C. Volatile fractions were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS). Tablet extracts obtained with methanol:water mixture (1:1, v / v) were analyzed by liquid chromatography (LC) of high (HPLC) and ultra-high performance (UHPLC) with diode array (DAD) and high-resolution mass spectrometric (HRMS) detectors, respectively; diclofenac was quantified by external calibration and standard addition. Low- and high-resolution mass spectra (MS, HRMS) and fragmentation patterns of detected substances were studied, using GC/HRTOF-MS and LC/HRMS-Orbitrap. **Results:** in tablets analyzed by HS-SPME, monoterpenoids and sesquiterpenoids of plant origin, phthalates, solvent residues (2-chloroethanol, ethylene glycol) and intermediary chemicals in diclofenac synthesis (2,6-dichloroaniline and 2,6-chloro-N-phenyl-benzenamine) were found. In the chromatograms (GC/MS) of the extracts of tablets obtained with organic solvent (dichloromethane), diclofenac, its impurities A, B and C, diclofenac esters, and some other compounds were detected; diclofenac quantification by HPLC found amounts of ca. 40 mg (7 - 8%) in tablets (> 70 analyzed) chosen at random from eight packs of the calendula-based phytotherapeutic product, purchased in the local market in Bucaramanga (Colombia). **Conclusion:** each analyzed tablet contained around 40 mg of the synthetic compound diclofenac (substance not declared in the product's label) and no tablet contained detectable amounts of esters of the triterpenoids oleanane or faradiol, which are calendula extract constituents that possess anti-inflammatory activity; a few flavonoids that are common to many plants were found in amounts a thousand times smaller than that of diclofenac.

Keywords: Diclofenac; Phytotherapeutic; *Calendula officinalis*; GC/MS, HPLC, LC/MS.

Siglas y abreviaturas:

AINE - antiinflamatorio no esteroideo; AT - Agilent Technologies; CH_2Cl_2 - diclorometano; CID - disociación inducida por colisiones; CRM - material de referencia certificado; CV - coeficiente de variación (%); D.I. - diámetro interno de una columna (mm); d_p - grosor de la fase estacionaria (μm); DCF - diclofenaco; DVB - divinilbenceno; EI - ionización en fase gaseosa (10^{-3} - 10^{-6} Torr) con electrones acelerados por un campo de 50 - 100 eV (70 eV - valor estándar); EIC - corriente iónica extraída (cromatograma o fragmentograma de masas); ES - electronebulización; ESI - ionización por electronebulización (*electrospray*); eV - electrón-voltio, unidad de energía correspondiente al trabajo realizado por un electrón cuando atraviesa un potencial de 1 V y cubre una distancia de 1 cm ($1 \text{ eV} = 1,602 \times 10^{-19} \text{ J}$); FA - ácido fórmico; GC - cromatografía de gases o cromatógrafo de gases, según el contexto; GC/MS - cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas; GLP - Buenas Prácticas de Laboratorio; GMP - Buenas Prácticas de Manufactura; HCD - celda de disociación por colisiones activadas de alta energía; HESI - interfaz de electronebulización con calefacción; HPLC - cromatografía líquida de alta eficiencia; HRMS - espectrometría de masas de alta resolución; HS - espacio de cabeza; HS-SPME - microextracción en fase sólida en espacio de cabeza (*headspace*); Invima - Instituto de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos; IR - espectroscopia infrarroja o espectro infrarrojo, según el contexto; IUPAC - Unión Internacional de Química Pura y Aplicada; L - longitud; LC - cromatografía líquida; LC/MS - cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas; LOD - límite de detección; LOQ - límite de cuantificación; LRI - índice(s) de retención lineal(es); MeOH - metanol; MS - espectrometría de masas, espectrómetro de masas o espectro de masas, según el contexto; NIST - Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (Estados Unidos); SGC - Sistema de Gestión de Calidad; SIM - monitoreo de ion(es) seleccionado(s); SPME - microextracción en fase sólida; ONAC - Organismo Nacional de Acreditación de Colombia; PDMS - poli(dimetilsiloxano); PEG - poli(etilenglicol); PFC - producto fitoterapéutico a base de caléndula; PVDF - fluoruro de poli(vinilideno); ppm - partes por millón; s - desviación estándar;

TIC - corriente iónica total o cromatograma de corriente de iones; TLC - cromatografía de capa fina o de capa delgada; TOFMS - espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo; m/z - relación masa/carga (m - masa de la partícula, z - número de cargas en la partícula); I, % - abundancia (o intensidad de señal) del ion (corriente iónica) en el espectro de masas; t_r - tiempo de retención; UHPLC - cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia; UV - espectroscopia ultravioleta o espectro ultravioleta, según el contexto.

Introducción

Este estudio fue originado por un caso que se presentó en el laboratorio de análisis químico instrumental, CROM-MASS, de la Universidad Industrial de Santander, que desarrolla su labor científica enfocada en tres ejes misionales: docencia, investigación y extensión. Asesorías técnicas, servicios de análisis, la investigación científica básica y aplicada, son actividades inherentes de la universidad para la solución de diversos problemas técnicos, económicos y sociales, entre ellos, los relacionados con la salud pública. El Laboratorio desarrolla la investigación en las áreas de análisis ambiental, alimentos, toxicológico y del estudio de la calidad de productos de consumo humano, entre otras. Proteger al consumidor por medio del conocimiento científico sobre los productos que consume y garantizar el cumplimiento de su calidad, inocuidad y la debida transparencia en cuanto al contenido e identidad de sus ingredientes, comprende realizar varios estudios fisicoquímicos, microbiológicos, toxicológicos y sobre la composición química de sus ingredientes. Esta última se determina usando una combinación de diversas técnicas de preparación de la muestra y de su análisis instrumental.

En febrero del 2018 llegó al Laboratorio una solicitud de análisis de una ciudadana que indagaba sobre un producto comercial, denominado fitoterapéutico a base de flor seca de caléndula (*Calendula officinalis*) (PFC), según ella, adquirido en una farmacia local y recomendado por un médico especialista. El motivo para solicitar este análisis fue la reacción adversa que ella había experimentado (fuertes dolores de estómago y de cabeza, un malestar general e hinchazón), después de ingerir varias tabletas del PFC. La paciente tomaba este producto para aliviar dolores musculares y de articulaciones. En la caja del producto se anunciaba que este actuaba de manera 100% natural, contenía 150 mg de extracto seco de caléndula (*Calendula officinalis*) y que se podía tomar hasta tres tabletas diarias.

En Colombia, el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (Invima), responsable de la vigilancia sanitaria de productos de tanto impacto en la salud pública como los alimentos, medicamentos e insumos, define un *producto fitoterapéutico* como

“producto medicinal empacado y etiquetado, cuyas sustancias activas provienen del material de una planta medicinal o sus asociaciones, presentado en estado bruto o en forma farmacéutica, y que se utiliza con fines terapéuticos”¹.

La etiqueta del PFC indica que su uso fitoterapéutico es como anti-inflamatorio. Esta es una de muchas actividades biológicas que se atribuyen a la caléndula popularmente, lo que ha motivado investigaciones para verificarla con ensayos confiables y para hallar las sustancias responsables de esta actividad. Ésteres del faradiol, un triterpenoide, se han identificado como los compuestos activos más relevantes en el uso tópico del extracto de caléndula como anti-inflamatorio². Una combinación de técnicas cromatográficas ha permitido aislar con relativamente alta pureza (>96%) estas sustancias³. Ukiya, et al.⁴ identificaron varios triterpenos y flavonoles en el extracto de flores de caléndula y probaron su capacidad de inhibición de la inflamación causada en orejas de ratón, por el acetato de 12-O-tetradecanoilforbol. Los resultados mostraron que ocho triterpenos tipo oleanano fueron activos como anti-inflamatorios. Posteriormente, experimentos en los que se administró oralmente extracto de caléndula a ratones, mostraron que el mecanismo de la actividad anti-inflamatoria puede deberse a la inhibición de citoquinas proinflamatorias y de Cox-2 en el bazo de los ratones⁵.

Se realizó, preliminarmente, una extracción con solvente de una tableta del PFC entregado, y el extracto obtenido se analizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS). Los resultados mostraron sorpresivamente la presencia de diclofenaco (DCF) -un antiinflamatorio no esteroideo del grupo de los AINES⁶, producto de síntesis⁷-, junto con algunos de sus derivados e impurezas; para su identificación, inicialmente, se usó un patrón analítico de DCF. La presencia del DCF, un compuesto sintético, no fue advertida en la etiqueta de la caja del PFC.

A raíz de este hallazgo, surgió la pregunta de investigación: ¿Es la muestra de PFC traída a CROM-MASS un caso particular, o también se encuentra DCF en otras muestras de este PFC disponibles regularmente en el comercio? Se decidió profundizar

en la investigación y adquirir varias cajas de este producto en el mercado local para confirmar o descartar la presencia de diclofenaco. Se compraron ocho cajas del PFC en la ciudad de Bucaramanga (Colombia), en diferentes establecimientos (farmacias o droguerías) legalmente constituidos. Para determinaciones químicas se usó la combinación de varias técnicas de extracción y de análisis por cromatografía (TLC, GC, LC) y espectrometría de masas (MS). Los resultados confirmaron la presencia de DCF (ca. 40 - 42 mg por tableta) en todas las tabletas analizadas (> 70, ca. 30%), escogidas al azar de las ocho cajas del PFC de cuatro lotes diferentes de producción (2017 y 2018) indicados en sus etiquetas. En este trabajo, se describe la estrategia analítica empleada y los resultados obtenidos sobre el análisis del PFC comercializado en Bucaramanga (Colombia).

Materiales y métodos

Obtención del material de estudio. Ocho cajas con 30 tabletas en cada una del producto fitoterapéutico a base caléndula (*Calendula officinalis*) fueron adquiridas en febrero y marzo del 2018, en establecimientos comerciales legalmente constituidos. En la **Tabla 1**, aparecen los detalles de los productos adquiridos:

cuatro de ellos, correspondían a tres lotes diferentes, según las etiquetas de la caja, y fueron fabricados, respectivamente, en marzo (1 caja), noviembre (1 caja) y diciembre (2 cajas) de 2017, mientras que otros cuatro productos comerciales pertenecían al mismo lote de producción de enero de 2018.

En la **Tabla 1**, aparecen los lugares comerciales identificados, según sus coordenadas geográficas (*Google Earth*), junto con la información sobre la hora y la fecha de cada adquisición. El traslado del producto fitoterapéutico al laboratorio y su ingreso siguieron las normas del SGC basadas en ISO 9001 e ISO/IEC 17025⁸, en las recomendaciones de Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP)⁹ y los protocolos generales^{10,11} de la cadena de custodia (registros fotográficos y documentales) para salvaguardar la identidad y la integridad de las muestras antes de la extracción, durante su análisis y posterior almacenamiento. Un código interno del Laboratorio fue asignado a cada caja del PFC (**Tabla 1**). Todos los experimentos se llevaron a cabo -por lo menos- por duplicado, algunas extracciones de tabletas de la misma caja fueron realizadas por diferentes analistas y en diferentes días y meses, para confirmar la reproducibilidad de los análisis.

Tabla 1. Producto fitoterapéutico a base de caléndula (*Calendula officinalis*) adquirido en establecimientos comerciales de Bucaramanga (Colombia).

Nº	Código interno asignado al producto	Fecha de fabricación del producto	Hora y fecha de adquisición del producto	Coordenadas geográficas del lugar de adquisición
1	1-01-F333-17	Marzo 2017	10:00, 22 de febrero, 2018	7°06'58.6"N 73°06'40.0"W
2	2-01-F460-17	Noviembre 2017	11:40, 5 de marzo, 2018	7°07'38.6"N 73°06'47.2"W
3	3-01-F463-17	Diciembre 2017	10:58, 5 de marzo, 2018	7°08'03.3"N 73°07'04.2"W
4	4-02-F463-17	Diciembre 2017	11:18, 5 de marzo, 2018	7°07'41.5"N 73°06'47.7"W
5	5-01-F500-18	Enero 2018	11:14, 25 de febrero, 2018	7°08'01.6"N 73°07'24.8"W
6	6-02-F500-18	Enero 2018	11:54, 5 de marzo, 2018	7°07'18.8"N 73°06'43.6"W
7	7-03-F500-18	Enero 2018	11:30, 5 de marzo, 2018	7°07'40.3"N 73°06'52.9"W
8	8-04-F500-18	Enero 2018	11:51, 5 de marzo, 2018	7°07'18.5"N 73°06'43.4"W

El procedimiento general siguió los pasos que se describen en la **Figura 1**. Se realizó la cromatografía en capa delgada (TLC) de las muestras (como técnica preliminar o de *screening*), cuyos resultados revelaron la presencia de DCF en el producto, pero requerían la confirmación. Los análisis de compuestos volátiles y volatilizables (50 °C) y de los extractos obtenidos con solventes orgánicos a partir tabletas pulverizadas del PFC se llevaron a cabo por diferentes técnicas: las fracciones volátiles y los extractos en CH₂Cl₂ se analizaron por GC/MS y los extractos, obtenidos con MeOH:H₂O (1:1, v/v), por cromatografía líquida de alta

eficiencia (HPLC) con detector de arreglo de diodos (DAD) y de ultra-alta eficiencia (UHPLC) con detector de masas de alta resolución (HRMS). Los analizadores de masas de tiempo de vuelo (HRTOF-MS) y *Orbitrap*, se usaron para medir masas exactas de iones-producto en los espectros MS y de moléculas protonadas (e.g., DCF y sus impurezas) para confirmar sus composiciones elementales. El material de referencia certificado (CRM) se usó para realizar calibraciones y para cuantificar DCF por HPLC-DAD y por UHPLC-ESI⁺-HRMS-*Orbitrap*.



Figura 1. Esquema general de las etapas de la adquisición del producto fitoterapéutico a base de caléndula (*Calendula officinalis*), la preparación de la muestra, las extracciones (HS-SPME y con solventes orgánicos) y los análisis de fracciones volátiles y extractos por diferentes técnicas de cromatografía de gases (GC), líquida (LC) y espectrometría de masas de baja y alta resolución (MS y HRMS).

Análisis de compuestos volátiles por cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC/MS-I). La extracción de compuestos volátiles presentes en tabletas del PFC se llevó a cabo por la técnica SPME (SPME, *Manual holder*, lote 67628, *Supelco Analytical*, Bellefonte, PA, EE. UU.) en modo de extracción en espacio de cabeza (HS). Se tomó una tableta del PFC de cada lote (peso de tableta: 590 ± 29 mg, $n = 16$) y se homogeneizó en un mortero hasta pulverizar. El homogeneizado se transfirió inmediatamente a un frasco ámbar de 4 mL con tapa rosca y *septum* para el análisis por HS-SPME. Para alcanzar el equilibrio térmico, el frasco con la muestra se calentó a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una plancha de calentamiento (HEI-STANDAR, *Heidolph*, Schwabach, Alemania) por 10 min, usando un soporte *Manual SPME Sampling Stand* de Supelco. Una fibra de SPME (*Supelco Analytical*, Bellefonte, PA, EE. UU., lote 96730), recubierta con PDMS-DVB (grosor, $65\text{ }\mu\text{m}$) se expuso por 30 min al espacio de cabeza de la muestra a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después la fibra del dispositivo SPME -con compuestos adsorbidos- se introdujo al puerto de inyección del equipo GC-MS, en donde los analitos se desorbieron térmicamente durante 10 min. La inyección de la fibra SPME fue en modo manual, con la relación *split* 1:30, a $250\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para cada nuevo experimento -antes de la extracción SPME-, la fibra se acondicionó, según las recomendaciones del fabricante.

El análisis de sustancias desorbidas térmicamente de la fibra SPME, se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases GC AT7890A (*Agilent Technologies*, Palo Alto, CA, EE. UU.), acoplado a un detector selectivo de masas (AT, MSD 5975C), operado en modo de barrido completo de radiofrecuencia (*full scan*) de un cuadrupolo ($150\text{ }^{\circ}\text{C}$), en un intervalo de masas m/z 30 - 400 u. Las moléculas se ionizaron por impacto de electrones (EI) de 70 eV de energía promedio (corriente de electrones $35\text{ }\mu\text{A}$), a $230\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los componentes de la fracción volátil se separaron en una columna cromatográfica capilar de sílice fundida DB-WAX [poli (etilenglicol) (PEG)] de 60 m (L) x $0,25\text{ mm}$ (D.I.) x $0,25\text{ }\mu\text{m}$ (d_p) (*J&W Scientific*, Folsom, CA, EE. UU.). La temperatura de la columna se programó de $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ (6 min) a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ @ $4\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y, luego, hasta $230\text{ }^{\circ}\text{C}$ @ $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. La línea de transferencia se mantuvo a $230\text{ }^{\circ}\text{C}$. El gas de arrastre fue helio (99,995%, Linde, Bucaramanga, Colombia) y su flujo se mantuvo constante, a 1 mL min^{-1} . El análisis por GC/MS se realizó usando el *software MSD ChemStation (AT)*, versión E.02.00.1431.

Análisis de extractos por cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC/MS-II). Se analizaron dos grupos de muestras. (1) El primer grupo estuvo constituido por ocho muestras, obtenidas a partir de cinco tabletas, aleatoriamente seleccionadas de cada caja del PFC; las tabletas se homogeneizaron

por pulverización en un mortero y se almacenaron en una bolsa sellable durante cuatro meses. (2) El segundo grupo fue conformado por ocho muestras de dos tabletas, escogidas al azar de cada caja del PFC, que se homogeneizaron y se analizaron inmediatamente después de su pulverización. Al homogeneizado de cada muestra, se le realizó una extracción sólido-líquido usando CH_2Cl_2 o $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ (1:1 v/v) como solvente. La muestra pulverizada ($25,2 \pm 0,4$ mg) se depositó en un tubo Eppendorf de 1 mL, y se adicionó el solvente orgánico (1 mL). El tubo Eppendorf con la mezcla se agitó (1800 rpm, 30 s), se llevó a ultrasonido (10 min) y se centrifugó por 5 min. Luego, se tomó el sobrenadante y se depositó en un frasco de cromatografía de 1,5 mL para su análisis por GC/MS.

Los análisis de los extractos obtenidos con solvente (CH_2Cl_2) del PFC, se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases GC AT 6890 Series Plus (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE. UU.), acoplado a un detector selectivo de masas MSD (AT, MSD 5973), operado en modo de barrido completo de radiofrecuencia (*full scan*) en un cuadrupolo, en el rango de masas m/z 35 - 550 u, y también en modo SIM [monitoreo de ion(es) seleccionado(s)]; en ambos casos, se usó la ionización por impacto de electrones (EI, 70 eV, 35 μA , 250 °C). Para la detección de DCF por GC/MS/SIM se seleccionaron tres iones característicos en m/z 295 (M^+), 242 [(M - H_2O) - Cl]⁺ y m/z 214 [(M - H_2O) - Cl - CO]⁺, separados por un filtro de masas cuadrupolar mantenido a 150 °C. Se usó una columna cromatográfica capilar de sílice fundida DB-5MS (J&W Scientific, Folsom, CA, EE. UU.) [5%-fénil-poli(metilsiloxano) (PDMS)] de 60 m (L) x 0,25 mm (D.I.) x 0,25 μm (d). El modo de inyección fue *splitless*; la temperatura del inyector se mantuvo a 250 °C, mientras que las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia, a 250 °C y a 280 °C, respectivamente; se usó helio (99,995%, Linde, Bucaramanga, Colombia) como gas de arrastre con un flujo volumétrico constante de 1 mL min^{-1} ; el volumen de inyección fue $V_{\text{iny}} = 2$ μL . Entre cada muestra, se analizaban los blancos de dos solventes y el lavado de la jeringa del inyector fue profuso (siete veces con MeOH). El análisis por GC/MS se realizó usando el *software* MSD ChemStation (AT), versión E.01.00.237.

Análisis de extractos por cromatografía líquida con detector de arreglo de diodos, HPLC-DAD, y de espectrometría de masas, LC/MS (UHPLC-ESI⁺-HRMS-Orbitrap). 5 mg de la muestra de tabletas del PFC pulverizadas se depositaron en un tubo Eppendorf de 15 mL, y se agregó una solución MeOH:H₂O (5

mL, 1:1 v/v). La mezcla se agitó (1800 rpm, 30 s), se llevó a ultrasonido (10 min) y se centrifugó por 5 min. Una alícuota de 15 μL del extracto se aforó a 5 mL con MeOH:H₂O. A partir de la solución preparada, 200 μL fueron diluidos nuevamente con una solución MeOH:H₂O (1 mL); el extracto diluido se pasó por filtro de PVDF (0,22 μm) antes de su análisis por HPLC. Cada muestra se preparó por duplicado para su análisis por LC/MS (UHPLC-ESI⁺-HRMS-Orbitrap).

Para el análisis por HPLC-DAD de extractos metanólicos de tabletas del PFC, se usó un cromatógrafo líquido HPLC Agilent Technologies 1260 Infinity (AT, Palo Alto, CA, EE. UU.) con detector UV-Vis de arreglo de diodos (DAD), a una longitud de onda de $\lambda = 274$ nm. La columna empleada en el análisis fue Kinetex (C₁₈) (Phenomenex, Torrance, CA, EE. UU.) de 100 mm (L) x 4,6 mm (D.I.) x 2,6 μm (tamaño de partícula). La inyección se realizó en modo automático ($V_{\text{iny}} = 20$ μL), el régimen fue isocrático bajo una relación de 50:50 [ácido fórmico (FA) al 0,5% (v/v) en agua:acetonitrilo] por 10 min, con un flujo de la fase móvil de 1 mL min^{-1} . Durante el análisis, la columna se mantuvo a 30 °C. El diclofenaco fue detectado a una longitud de onda $\lambda = 274$ nm, se usó una longitud de onda de referencia de $\lambda = 380$ (10) nm. Los datos obtenidos se analizaron con el *software* ChemStation Edition for LC & LC/MS Systems, Rev. C.01.05 [35] (Agilent Technologies, AT 2001 - 2013).

Los extractos de tabletas del PFC, obtenidos con MeOH:H₂O, se analizaron en un cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiencia (UHPLC), Dionex™ UltiMate™ 3000 (Thermo Scientific, Germering, Alemania), equipado con una unidad de desgasificación, una bomba binaria de gradiente, un inyector automático (automuestreador, a 10 °C) con bandejas de 120 viales y un compartimiento para albergar columna bajo control de temperatura (T = 30 °C). La separación cromatográfica se realizó en una columna Hypersil GOLD aQ (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE. UU.) de 100 mm (L) x 2,1 mm (D.I.) x 1,9 μm (tamaño de partícula) antecedida por una columna de guardia Accucore aQ Defender (Thermo Scientific, San Diego, CA, EE. UU.) de 10 mm (L) x 2,1 mm (D.I.) x 2,6 μm de tamaño de partícula. La fase móvil fue FA al 0,2% en agua (A) y FA al 0,2 % en MeOH (B). El flujo de la fase móvil fue 300 $\mu\text{L min}^{-1}$ y el volumen de inyección $V_{\text{iny}} = 2$ μL . La condición de gradiente fue 100% de A, que cambió linealmente en 8 min a 100% de B, se mantuvo durante 4 min, luego regresó a 100% de A en 1 min y se mantuvo durante 3 min. El cromatógrafo UHPLC estaba acoplado a un espectrómetro de masas

de alta resolución *Orbitrap*TM (*Exactive Plus*, *Thermo Scientific*, Bremen, Alemania) con una fuente de ionización por electronebulización con calentamiento (HESI-II) a 350 °C, operada en modo de registro de iones positivos. El gas nitrógeno ($N_2 > 99\%$), usado como gas nebulizador, gas de cortina, gas auxiliar y gas de colisiones en la celda de disociación por colisiones activadas de alta energía (HCD), se obtuvo en el generador NM32LA (*Peak Scientific*, Escocia, Reino Unido). La temperatura del capilar fue 320 °C y el voltaje del nebulizador V_{cap} se fijó en +3,5 kV. La resolución del *Orbitrap-MS* en el modo de adquisición *full scan* (*full MS*) se estableció en 70000 (R_{FWHM} , m/z 200 u). Los espectros MS se adquirieron en un intervalo de masas de m/z 80 - 1000 u. Las moléculas protonadas $[M + H]^+$ se fragmentaron en una celda de disociación por colisiones activadas de alta energía (HCD) con diferentes voltajes mantenidos en 10, 20 o 30 V; se usó el nitrógeno N_2 como gas de colisiones. La calibración del instrumento se realizaba semanalmente con una solución Pierce LTQ Velos ESI para iones positivos (*Thermo Scientific*, Rockford, IL, EE. UU.). La adquisición de datos se realizó en modos *full MS* y *stepped-scan* para cada voltaje en la celda HCD. Los datos obtenidos se procesaron utilizando un *software Thermo XCalibur*TM, versión 3.1.66.10 (*Thermo Scientific*, San José, CA, EE. UU.).

Identificación de sustancias. Para la identificación de las sustancias en las fracciones volátiles y en los extractos obtenidos del PFC, se usaron los siguientes cinco criterios: (1) comparación de los espectros MS experimentales (EI, 70 eV) con los de las bases de datos NIST-2017, Willey08 o Adams^{12,13}, con un grado de coincidencia entre los espectros MS experimentales y los de las bases de datos superior al 90%; (2) estudio de patrones de fragmentación de sustancias en los espectros obtenidos por EI (70 eV)¹⁴⁻¹⁶ y por ESI⁺, usando la celda HCD; (3) análisis elemental (determinación de masas exactas con un error de medición Δ ppm \approx 1 de los iones-producto (GC/HRMS, LC/HRMS) y de las moléculas protonadas $[M + H]^+$ (LC/HRMS), junto con el análisis de relaciones isotópicas de iones; (4) comparación de los tiempos de retención, t_R , de sustancias en cromatogramas obtenidos por GC, HPLC-DAD o UHPLC/MS con los de los materiales de referencia disponibles, así como la determinación de los índices de retención lineales (LRI) para terpenos y su comparación con los de la literatura^{12,17-20}; para la determinación de los LRI se empleó una mezcla de parafinas lineales $C_8 - C_{40}$ adquiridas a *AccuStandard*, Inc. (New Haven, CT, EE. UU.); (5) uso de sustancias-patrón (limoneno, carvona, anetol, hidrocarburos

lineales, ácidos grasos y sus ésteres metílicos) y del material de referencia certificado (CRM) de DCF para su identificación confirmatoria y cuantificación.

Las masas exactas de los iones en los espectros MS de DCF y de sus análogos o impurezas se midieron en un cromatógrafo de gases GC AT 7890 B *GC-System* (AT, Palo Alto, CA, EE.UU.), acoplado a un MS de alta resolución HRMS *LECO Pegasus GC-HRT 4D* (*Leco Corporation*, Saint Joseph, MI, EE. UU.), provisto de un analizador de masas de tiempo de vuelo (HRTOF-MS) con varios reflectrones y la resolución $R_s = 40000$. Se usó una columna cromatográfica capilar de sílice fundida HP-1 (AT, Palo Alto, CA, EE. UU.) de 100%-PDMS de 100 m (L) x 0,25 mm (D.I.) x 0,25 μ m (d_f). La inyección de muestras se realizó en modo *split* (1:30), a 250 °C, con un volumen de inyección $V_{inj} = 1$ μ L. Se usó helio como gas de arrastre (99,995%, Linde, Bucaramanga, Colombia) con un flujo volumétrico constante de 1 mL min^{-1} . La cámara de ionización (EI, 70 eV) se mantuvo a 250 °C, el rango de masas fue m/z 30 - 400 u. El error de medición de masas de iones fue Δ ppm \approx 1 o menor. Los datos se procesaron con el *software ChromaTOF-HRT*, versión 1.90.60 (*Leco Corporation*, Saint Joseph, MI, EE. UU.). En el espectrómetro de masas HRMS *Orbitrap*TM (*Exactive Plus*, *Thermo Scientific*, Bremen, Alemania) se midieron las masas exactas de las moléculas protonadas $[M + H]^+$, los iones-aducto $[M + Na]^+$ y los iones-producto de DCF y sus impurezas con un error de Δ ppm $< 1,7$.

Calibraciones, exactitud del método y cuantificación de diclofenaco. Inicialmente, para la cuantificación de DCF se usó un estándar analítico (*Diclofenac Sodium Salt*, $\geq 98,5\%$, contenido de agua $\leq 2\%$, lote N° BCBS5195V), adquirido a Sigma-Aldrich (*Sigma-Aldrich*, Saint Louis, MO, EE. UU.). Empero, la cuantificación final de diclofenaco en el PFC, se realizó con un material de referencia certificado (CRM) [Diclofenaco, CAS N° 15307-79-6, *Diclofenac Sodium*, $C_{14}H_{10}Cl_2NO_2Na$, 99,24%, ISO *Guide 34 Reference Material*, pureza 99,24% (g/g), incertidumbre 0,50% (g/g), N° de lote G290008, fecha de expiración 21.11.2021], comprado a la empresa *Dr. Ehrenstorfer*, LGC Labor GmbH (Augsburgo, Alemania), que -por ser el CRM- tenía una pureza analítica más alta. Acetato de etilo, grado HPLC, FA y MeOH, grado LC-MS, se compraron a Merck (Darmstadt, Alemania). Acetonitrilo y MeOH, ambos, grado HPLC, fueron adquiridos a J.T. Baker (Ecatepec, México) y CH_2Cl_2 , grado HPLC, a Macron (Philipsburg, EE. UU.). El agua tipo I, se obtuvo en un sistema de purificación *Synergy*[®] UV *Purification System* (Millipore, Molsheim, Francia), disponible en el laboratorio.

La exactitud del método analítico se midió calculando el porcentaje de recuperación (%) de DCF a partir de una matriz fisicoquímicamente similar a la de la tableta del PFC analizado en este estudio. Para una muestra del *blanco* (control) *negativo* se usó un producto comercial, acetaminofén (500 mg, Industria Colombiana de Medicamentos, ICOM[®], registro sanitario de Invima

2012M-03437-R3), adquirido en el mercado local. El *blanco* (control) *negativo* se enriqueció con 10 µL de una solución de diclofenaco (CRM) (5000 µg mL⁻¹) en MeOH; la extracción se llevó a cabo una hora después de la adición del estándar. Se realizaron diez mediciones y el porcentaje de recuperación fue 93 ± 8%, con CV igual al 8%, así:

CRM	Recuperación, % (n = 10)										\bar{X}	s	CV, %
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
Diclofenaco	89	109	104	87	92	87	86	87	96	98	93	8	8

Para las calibraciones por el método cromatográfico con estándar externo, se llevó a cabo el siguiente procedimiento: una solución *stock* del CRM de DCF (5000 µg mL⁻¹) se preparó por su adición (5,06 mg) a MeOH grado HPLC (1 mL). Para el análisis y la cuantificación por HPLC-DAD, se prepararon soluciones de calibración en el rango de 10 - 400 µg mL⁻¹ (10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300 y 400 µg mL⁻¹). Para el análisis por LC/MS (UHPLC-ESI⁺-HRMS-*Orbitrap*), una solución de trabajo de 5 µg mL⁻¹ se diluyó así: 5 µL de la solución *stock* aforada a 5 mL con una mezcla metanol:agua tipo I (1:1 v/v). Para la cuantificación de DCF por UHPLC-ESI⁺-HRMS-*Orbitrap*, se prepararon las soluciones de trabajo en el rango de 20 - 250 µg mL⁻¹ (20, 40, 80, 100, 120, 160, 200 y 250 µg mL⁻¹). Para el *blanco* (control) *positivo* se usó DCF sódico (75 mg/ 3 mL, MK[®], presentación - ampolla, lote - T19143, fabricado por Tecnofar TQ S.A.S. y comercializado por Tecnoquímicas S.A. con el registro sanitario de Invima 2010 M-003535-R3), adquirido en el mercado local de Bucaramanga (Colombia).

Para la calibración por el método de adición de estándar, el CRM (DCF) en una concentración conocida se adicionó a los extractos metanólicos de las tabletas del PFC. Una solución de CRM de DCF (3,77 µL, 5000 µg mL⁻¹) fue aforada a 1 mL con el extracto de cada una de las muestras analizadas previamente. Las mezclas se analizaron luego por HPLC-DAD bajo las mismas condiciones operacionales descritas arriba.

El análisis estadístico se realizó usando el *software R* (Versión 3.6.1, *R Foundation for Statistical Computing*, Viena, Austria, www.R-project.org). El establecimiento

de diferencias honestamente significativas utilizó la comparación de corredores de error del 95% y la prueba de Tukey.

Obtención del éster metílico de diclofenaco. Una alícuota (15 µL) de solución *stock* de CRM de DCF (5000 µg mL⁻¹) se colocó en un vial ámbar (2 mL) e inmediatamente, se adicionó sulfato de dimetilo (200 µL), se introdujo un agitador magnético a la mezcla de reacción y el vial se cerró. La reacción se llevó a cabo a 60 ± 2 °C, durante 1 h, a 500 rpm. Posteriormente, el sistema se dejó enfriar a temperatura ambiente; la solución obtenida se diluyó a 1 mL. Seguidamente, la mezcla se diluyó 75 veces con MeOH:H₂O (1:1 v/v) y se filtró (0,22 µm) para su análisis por LC/MS.

Obtención de la γ -lactama de diclofenaco (derivado de indolinona). Diclofenaco (5,62 mg, CRM, *Dr. Ehrenstorfer*), se mezcló con una solución acuosa (5 mL) a pH < 2, ajustado con ácido clorhídrico diluido. Posteriormente, se llevó a cabo la extracción líquido-líquido por lotes, con acetato de etilo (5 mL), que se repitió dos veces más. Las fases orgánicas se combinaron, la mezcla se concentró en un rotoevaporador (T = 45 °C, 260 mbar). Del sólido obtenido, se pesaron 1,38 mg en un vial ámbar, que se calentaron en un baño de arena a diferentes temperaturas: 120 ± 5 °C (durante 15, 30 o 60 min) y 250 ± 2 °C (durante un minuto). El sólido obtenido se disolvió en acetato de etilo (1 mL) y se analizó por GC/MS; la misma solución se diluyó a 1 µg mL⁻¹ para su análisis por UHPLC-ESI⁺-HRMS-*Orbitrap*.

Resultados

Análisis de fracciones volátiles

Durante la primera etapa del trabajo (**Figura 1**), se realizó el análisis de la fase gaseosa (HS, *headspace*) de las tabletas del PFC para identificar por GC/MS las sustancias volátiles y volatilizables presentes. Se usó la técnica de microextracción en fase sólida en fase gaseosa (HS-SPME)^{21,22} y los resultados de análisis (**Figura 2**) de la fracción volátil de las tabletas permitieron diferenciar dos grupos de sustancias presentes, a saber: (1) *terpenoides* y otros metabolitos secundarios volátiles de plantas y (2) *compuestos exógenos* del material vegetal. El primer grupo lo constituyeron 6-metil-5-hepten-2-ona, anetol, metilchavicol y monoterpenoides (C₁₀), *e.g.*, limoneno, *p*-cimeno, mentol, carvona, así como hidrocarburos sesquiterpénicos, C₁₅H₂₄, α - y γ -cadinenos, α - y β -cubebenos, muurolenos, calacorenos, viridifloreño, calameno, calacoreno; sesquiterpenoles, C₁₅H₂₄O, α - y γ -cadinoles, carotol, α - y γ -muurololes y eudesmol, entre otros; también, se encontraron algunos ésteres metílicos de ácidos grasos, fitol y parafinas lineales. El segundo grupo de sustancias estaba conformado por compuestos, que no se hallan naturalmente en plantas, entre éstos, se detectaron 2-cloroetanol, etano-1,2-diol (etilenglicol), 2,6-dicloroanilina y 2,6-dicloro-*N*-fenil-bencenammina y trazas de plastificantes (*e.g.*, ftalato de dietilo).

Etano-1,2-diol (etilenglicol) ($t_R = 26,9$ min) y 2-cloroetanol ($t_R = 23,1$ min) son sustancias volátiles, polares, posibles solventes residuales, fácilmente detectables en matrices sólidas por técnicas HS^{23,24}. En el espectro MS de etilenglicol aparecen el ion molecular M⁺ en m/z 62 (3%) y el ion-producto (pico de base) CH₂=OH⁺ en m/z 31 (100%), típico para alcoholes primarios^{25,26}. En el espectro MS del 2-cloroetanol ($t_R = 23,1$ min), el ion M⁺ en m/z 80 (4%, ³⁵Cl) se detectó con la relación isotópica típica ³⁵Cl:³⁷Cl de $\approx 3:1$. El ion molecular M⁺ del 2-cloroetanol -bajo el impacto de electrones (EI, 70 eV, 35 μ A)-, se disocia en dos iones-producto complementarios, *i.e.*, [CH₂=OH]⁺ en m/z 31 (100%) y [CH₂Cl]⁺ en m/z 49 (6%, ³⁵Cl).

El compuesto aromático clorado, registrado en el cromatograma GC con el $t_R = 31,2$ min (**Figura 2B**), según su espectro MS, corresponde a la 2,6-dicloro-bencenammina (2,6-dicloroanilina). La presencia de dos

átomos de cloro en esta molécula se confirma con la distribución típica de intensidades de señales isotópicas en su ion M⁺, m/z 161 (100%, dos átomos de ³⁵Cl) : m/z 163 (³⁵Cl y ³⁷Cl) : m/z 165 (dos átomos de ³⁷Cl) $\approx 9:6:1$. La presencia de cloro en esta molécula se corrobora también por la aparición en su espectro MS de iones-producto en m/z 126 [(M - Cl)⁺, 10%] y m/z 125 [(M - HCl)⁺, 11%,]. La masa molecular impar (M⁺, m/z 161, ³⁵Cl) y los iones [(M - Cl) - HCN]⁺ en m/z 99 (10%) y [(M - 2Cl) - HCN]⁺ en m/z 63 (13%), indican la presencia en la molécula de un átomo de nitrógeno y dos de cloro.

El pico cromatográfico con $t_R = 47,8$ min (**Figura 2C**) corresponde a la 2,6-dicloro-*N*-fenil-bencenammina; la masa impar de su ion molecular M⁺ en m/z 237 (35%, ³⁵Cl) indica que hay un átomo de nitrógeno, mientras que la presencia de dos átomos de cloro se corrobora tanto por la distribución de señales isotópicas del ion M⁺, como por la formación de iones en m/z 202 [(M - Cl)⁺, 12%] y en m/z 167 [(M - 2Cl)⁺, 100%,]; el fragmento en m/z 140 (7%) [(M - 2Cl) - HCN]⁺ confirma la presencia en la molécula tanto de un átomo de nitrógeno, como de dos átomos de cloro. En los espectros MS de ambas aminas cloradas (**Figuras 2B y 2C**), los iones moleculares M⁺ son de intensidades alta y media, debido a la presencia de un anillo aromático en sus estructuras. Ambas sustancias son productos intermedios en la síntesis de diclofenaco²⁷. Un pico cromatográfico con $t_R = 36,1$ min corresponde a ftalato de dietilo (plastificante), su espectro MS contiene iones típicos en m/z 222 (M⁺, 1%), m/z 177 [34%, (M - OC₂H₅)⁺] y en m/z 149 (100%, C₈H₅O₃⁺); este último es un ion "diagnóstico", pico de base en los espectros MS de ftalatos (ésteres del ácido tereftálico)^{15,25}, que se pueden encontrar en muchos productos (tapas, recipientes, envolturas, productos químicos, solventes industriales, polímeros, perfumes, productos agroquímicos, etc.)²⁸.

Los cromatogramas (GC/MS) de las fracciones volátiles aisladas por HS-SPME de las tabletas del PFC de cuatro lotes diferentes (**Figura 2D**) fueron similares cualitativamente, salvo el de la muestra 1-01-F333-17 (**Figura 2D, a**), que tuvo la cantidad más alta de 2,6-dicloro-*N*-fenil-bencenammina ($t_R = 47,8$ min) en comparación con las demás muestras. Este compuesto, intermediario en la síntesis (**Esquema 1**)²⁷, pudo provenir de DCF no purificado.

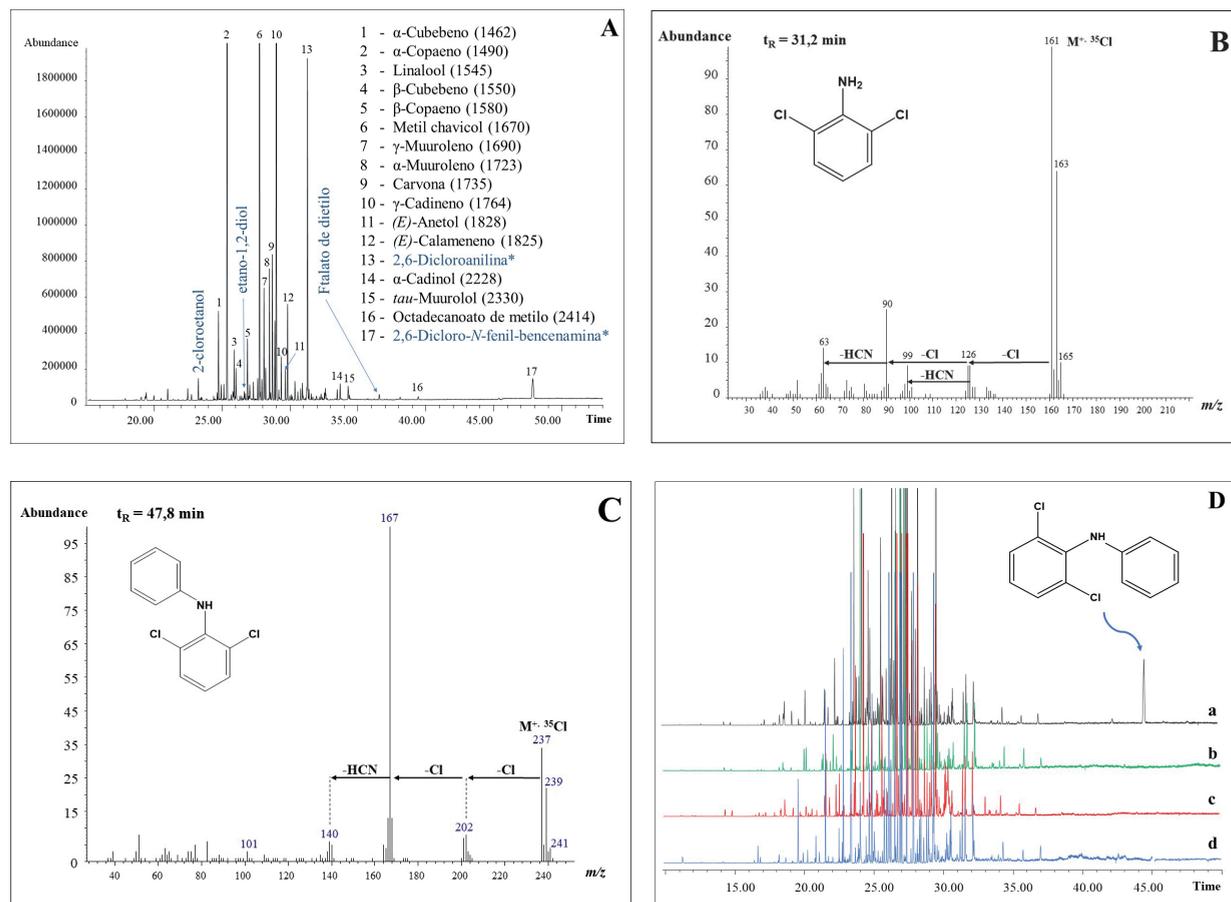
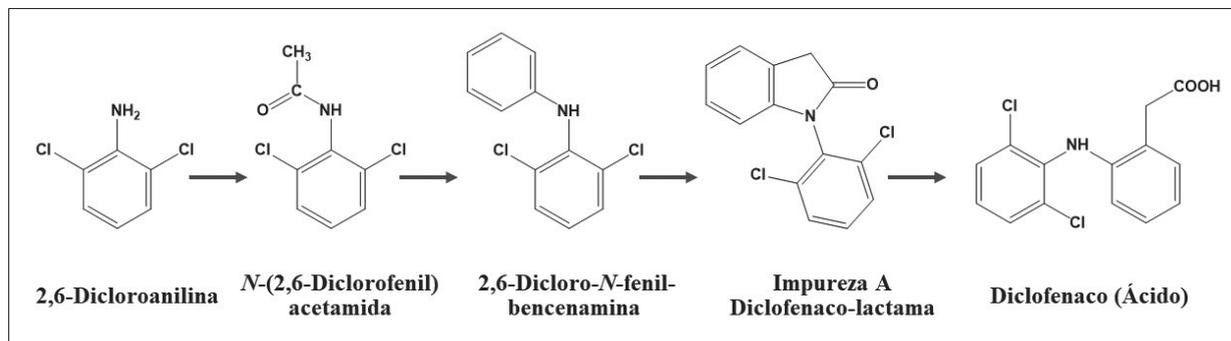


Figura 2. A. Perfil cromatográfico (TIC, GC/MS) de la fracción volátil obtenida por HS-SPME (PDMS/DVB, 65 μ m, 30 min, 50 $^{\circ}$ C) de una tableta pulverizada del PFC (Muestra 1-01-F333-17). Columna DB-WAX (60 m), *split* 1:30. Compuestos mayoritarios se identificaron con base en sus espectros MS (EI, 70 eV), patrones de fragmentación e índices de retención lineales (LRI)^{12,17-20}, que aparecen entre paréntesis. B. Espectro de masas (EI, 70 eV) de la **2,6-dicloroanilina** ($t_R = 31,2$ min) (*) y formación de iones-producto característicos en m/z 126 ($M - Cl$)⁺, m/z 125 ($M - HCl$)⁺, m/z 99 [($M - Cl$) - HCN]⁺, m/z 90 [($M - Cl$) - HCl]⁺ y en m/z 63 [($M - Cl - HCl$) - HCN]⁺. C. Espectro de masas de **2,6-dicloro-N-fenil-benzenamina** ($t_R = 47,8$ min) (EI, 70 eV) (*) y los iones característicos (pérdida sucesiva de dos Cl y de una molécula HCN), que se generan durante su EI (70 eV) y confirman la presencia en la molécula de un átomo de nitrógeno y dos de cloro. D. Comparación de perfiles cromatográficos (TIC, GC/MS) de las fracciones volátiles obtenidas por HS-SPME de las tabletas del PFC de cuatro lotes diferentes: **a** - Muestra 1-01-F333-17; **b** - Muestra 2-01-F460-17; **c** - Muestra 3-01-F463-17; **d** - Muestra 5-01-F500-18.



Esquema 1. Esquema general de la síntesis de diclofenaco²⁷ y sus intermediarios, que se pueden encontrar en un producto no purificado.

Análisis por GC/MS de los extractos de tabletas obtenidos con CH_2Cl_2

La siguiente etapa (**Figura 1**) de análisis de tabletas del PFC, fue la obtención de extractos con solventes orgánicos (CH_2Cl_2 y $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$), seguida de sus análisis por GC/MS, LC/MS y HPLC-DAD, para identificar y cuantificar DCF. La extracción con estos solventes permitió aislar sustancias más polares, poco o no volátiles, algunas, con los pesos moleculares más altos que de los compuestos volátiles aislados por HS-SPME.

En la **Figura 3A** aparece el cromatograma (GC/MS) del extracto en CH_2Cl_2 del PFC (Muestra 1-01-F333-17). Los cromatogramas (TIC, GC/MS) (**Figura 3B**)

de los extractos obtenidos de tabletas de cuatro lotes diferentes son cualitativamente similares (**Figura 3B**), ca. 20 sustancias se detectaron en ellos. El compuesto mayoritario (pico N° 8) fue la 1-(2,6-diclorofenil)-1,3-dihidro-2*H*-indol-2-ona (γ -lactama de DCF o derivado de indolinona), conocida también como impureza A, según la Farmacopea Europea²⁹. La impureza A puede provenir tanto de los productos de síntesis de DCF (intermediario) (**Esquema 1**), como -lo más frecuentemente- de su degradación térmica, acompañada de ciclización intramolecular y pérdida de agua³⁰. La termo-degradación de DCF puede generar varios compuestos (impurezas B y C, otros)²⁹.

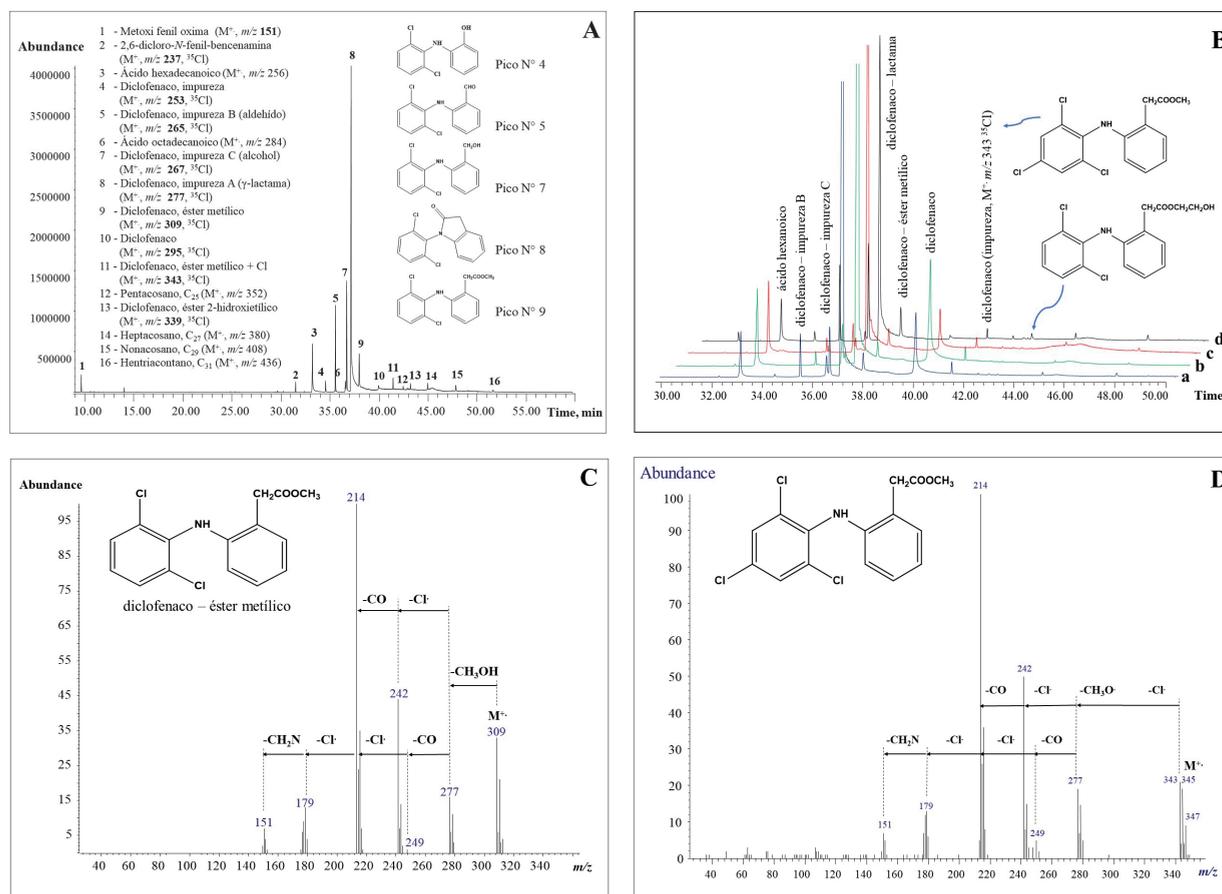
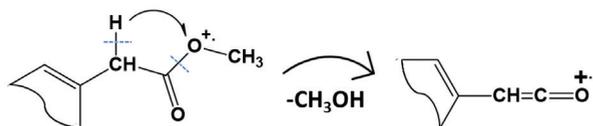


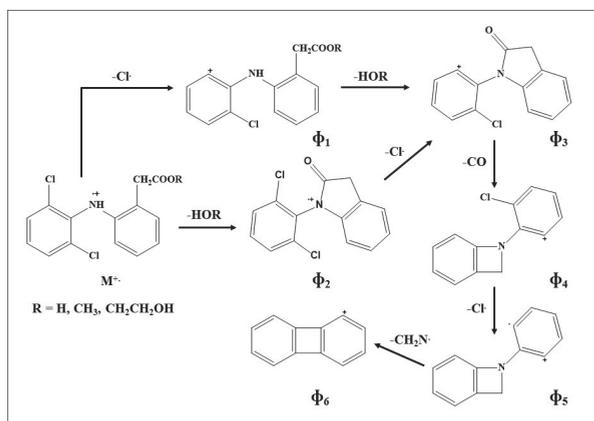
Figura 3. A. Perfil cromatográfico (TIC, GC/MS) del extracto (CH_2Cl_2) de tabletas pulverizadas del PFC. Muestra 1-01-F333-17. Columna DB-5MS (60 m). Inyección en modo *splitless* (250 °C, $V_{\text{iny}} = 2$ mL). Compuestos mayoritarios se identificaron con base en sus espectros MS (EI, 70 eV), los iones moleculares M^+ aparecen entre paréntesis. B. Comparación de cromatogramas de los extractos (CH_2Cl_2) de tabletas del PFC de cuatro lotes diferentes: a. Muestra 5-01-F500-18; b. Muestra 4-02-F463-17; c. Muestra 3-01-F463-17; d. Muestra 1-01-F333-17. C. Espectro MS (EI, 70 eV) del éster metílico de DCF. D. Espectro MS (M^+ , m/z 343, 25%, ^{35}Cl) de una impureza, que corresponde al éster metílico de diclofenaco (+ Cl).

En los cromatogramas GC/MS de los extractos de CH_2Cl_2 de tabletas del PFC se encontraron se encontraron sustancias denominadas impureza B (pico N° 5) e impureza C (pico N° 7), que son, respectivamente, 2-[(2,6-diclorofenil) amino] benzaldehído y 2-[(2,6-diclorofenil) amino]fenil metanol²⁹⁻³¹. Estas sustancias, que se generan por degradación térmica de DCF, se encontraron en todos los cromatogramas obtenidos por GC/MS de las muestras analizadas, junto con algunos ésteres de DCF (picos N° 9, 11 y 13, **Figura 3A**).

En el espectro MS del éster metílico del ácido 2-[2-[(2,6-diclorofenil) amino]fenil]acético (pico N° 9, **Figura 3C**), aparece el ion en m/z 277 (22%), producto de una reacción de migración-1,4 del hidrógeno en el grupo $-\text{CH}_2\text{COOCH}_3$, acompañada de una pérdida de la molécula de metanol $[\text{M} - \text{MeOH}]^+$ como sigue:



La aparición del ion ceteno $[\text{M} - \text{CH}_3\text{OH}]^+$ en m/z 277 (22%) confirma que el ácido es metilado: en su espectro MS se detectan también iones-producto en m/z 242, m/z 214 y m/z 179, típicos para DCF y sustancias relacionadas. El ion $[\text{M} - \text{CH}_3\text{OH}]^+$, posiblemente, se reagrupa a una estructura cíclica de indolinona (Φ_3) que, por la eliminación de CO, decae luego con formación del ion Φ_4 (**Esquema 2**).



Esquema 2. Patrón de fragmentación de diclofenaco y sus ésteres y la formación de iones característicos $\Phi_1 - \Phi_6$ en sus espectros MS (EI, 70 eV). Las masas exactas de iones típicos, medidos por HRTOF-MS, aparecen en la **Tabla 2**. Las masas nominales de iones y sus intensidades (%) en los espectros MS de DCF y sus derivados (impurezas A, B y C) detectados en los cromatogramas obtenidos por GC/MS de los extractos (CH_2Cl_2) de tabletas del PFC se reportan en la **Tabla 3**.

El pico N° 11 (**Figura 3D**) corresponde a otro compuesto relacionado con DCF, que, en vez de dos átomos de cloro, contiene tres. Esto se confirma por la presencia en su espectro MS de iones correspondientes a las pérdidas sucesivas de tres átomos de cloro, así: $[(\text{M} - \text{OCH}_3) - \text{Cl}]^+$, $[(\text{M} - \text{OCH}_3) - 2\text{Cl}]^+$, $[(\text{M} - \text{OCH}_3) - 3\text{Cl}]^+$, que aparecen, respectivamente, en m/z 277, m/z 242 y m/z 179. La distribución isotópica de señales en su ion molecular M^+ (m/z 343, 25%, ^{35}Cl) confirma la relación isotópica típica para la presencia de tres átomos de Cl en la molécula, a saber: $[3\ ^{35}\text{Cl}] : [2\ ^{35}\text{Cl}\ \text{y}\ ^{37}\text{Cl}] : [3\ ^{37}\text{Cl}] : [3\ ^{37}\text{Cl}] \approx 30 : 28 : 10 : 1$ (**Figura 3D**).

Estudio de espectros de masas de diclofenaco y sus derivados, obtenidos por ionización con electrones (EI, 70 eV)

En el **Esquema 2** se presenta el patrón de fragmentación de iones M^+ (EI, 70 eV) de DCF, sus ésteres y otros compuestos relacionados, detectados en los cromatogramas GC/MS de los extractos obtenidos con CH_2Cl_2 de tabletas del PFC (**Figuras 3**). Los iones $\Phi_2 - \Phi_6$, comunes en los espectros MS de DCF y sus derivados, las fórmulas elementales y masas exactas aparecen en la **Tabla 2**, mientras los nombres IUPAC de las sustancias, las masas nominales de los iones M^+ , iones-producto típicos y sus intensidades (%), se registran en la **Tabla 3**. La presencia de DCF en los extractos se confirmó también por GC/MS, operado en modo SIM, que detectó selectivamente los iones característicos (“diagnósticos”) de DCF en m/z 295 (M^+), m/z 242 (Φ_3) y m/z 214 (Φ_4) (los datos no se muestran).

La medición de masas exactas de iones característicos $\Phi_1 - \Phi_6$ (**Tabla 2**) se realizó en el equipo GC-HRMS, equipado con un analizador de masas de tiempo de vuelo de alta resolución HRTOF-MS ($R_s = 40000$), en el cual, gracias a varios reflectrones ubicados en el camino del haz de iones, se logra medir sus masas con un error cercano a 1 ppm o menor³²; esto permitió inequívocamente obtener las fórmulas elementales de iones-producto y moléculas ionizadas.

Es interesante observar, que la formación del ion Φ_6 a partir del fragmento Φ_5 (**Esquema 2**) sucede por la eliminación de una partícula neutra con la masa nominal 28 (m/z 179 - m/z 151 = 28), que puede corresponder a una de las siguientes especies moleculares: CO , N_2 , C_2H_4 o CH_2N . En este caso, solo las dos últimas especies, C_2H_4 o CH_2N , son posibles. La medición de las masas exactas -sin dar lugar a duda- confirmó la pérdida del ion Φ_5 de CH_2N^- y no de C_2H_4^- ; si lo último fuese cierto,

Hallazgo de diclofenaco en un producto fitoterapéutico a base de caléndula comercializado en Colombia

el error en la medición de la masa exacta del fragmento hipotético [$\Phi_5 - C_2H_4$]⁺ hubiera sido inaceptablemente grande (Δ ppm > 80) (Tabla 2). La medición de masas exactas de moléculas ionizadas o de sus iones-producto

permite obtener una prueba experimental contundente para hallar sus composiciones elementales, importantes para dilucidar las estructuras químicas³².

Tabla 2. Determinación de masas exactas medidas por HRTOF-MS y fórmulas elementales de iones característicos en los espectros de masas de diclofenaco y sus derivados.

Fragmentos (Esquema 2)	Masa nominal (³⁵ Cl)	Masa exacta (³⁵ Cl) *		
		Experimental (± s)	Error, Δ ppm	Fórmula
Φ_2	277	277,0055 ± 0,00013	0,01 - 1,08	C ₁₄ H ₉ NOCl ₂
Φ_3	242	242,0366 ± 0,00083	0,01 - 0,98	C ₁₄ H ₉ NOCl
Φ_4	214	214,0417 ± 0,00008	0,89 - 1,12	C ₁₃ H ₉ NCl
Φ_5	179	179,0728 ± 0,00002	0,89 - 1,10	C ₁₃ H ₉ N
Φ_6	151	151,0542 ± 0,00004	0,01 - 0,66	C ₁₂ H ₇
			81,4 - 82,1	C ₁₁ H ₅ N

* Se midieron las masas exactas de cada ion, por lo menos, en cinco experimentos independientes (n = 5).

Tabla 3. Iones característicos (*m/z*, I, %) en los espectros de masas, obtenidos por EI (70 eV), de diclofenaco y de compuestos relacionados en los cromatogramas de los extractos (CH₂Cl₂) de las tabletas del producto fitoterapéutico a base de caléndula, analizadas en este estudio.

Nº ^a	Compuesto	M ⁺ <i>m/z</i> (I, %)	<i>m/z</i> (I, %) ^b					
			Φ_1	Φ_2	Φ_3	Φ_4	Φ_5	Φ_6
4	2-[(2,6-Diclorofenil) amino] fenol	253 (³⁵ Cl, 50%)	218 (9) [M - Cl] ⁺	-	-	183 (100) [M - 2Cl] ⁺	154 (24) [M - 2Cl - CHO] ⁺	126 (24) [M - 2Cl - CHO - CH ₂ N] ⁺
5	2-[(2,6-Diclorofenil) amino]benzaldehído Impureza B^c	265 (³⁵ Cl, 67%)	230 (60) [M - Cl] ⁺	-	202 (32) [M - Cl - CO] ⁺	195 (18) [M - 2Cl] ⁺	167 (100) [M - 2Cl - CO] ⁺	139 (16) [M - 2Cl - CO - CH ₂ N] ⁺
7	[2-[(2,6-Diclorofenil) amino] fenil]metanol Impureza C^c	267 (³⁵ Cl, 26%)	232 (1) [M - Cl] ⁺	249 (2) [M - H ₂ O] ⁺	-	214 (100) [M - Cl - H ₂ O] ⁺	179 (20) [M - 2Cl - H ₂ O] ⁺	151 (6) [M - 2Cl - H ₂ O - CH ₂ N] ⁺
8	1-(2,6-Diclorofenil)-1,3-dihidro-2 <i>H</i> -indol-2-ona Impureza A^c	277 (³⁵ Cl, 67%)	242 (70) [M - Cl] ⁺	-	-	214 (100) [M - Cl - CO] ⁺	179 (19) [M - 2Cl - CO] ⁺	151 (8) [M - 2Cl - CO - CH ₂ N] ⁺
9	Éster metílico del ácido 2-[2-[(2,6-diclorofenil) amino]fenil]acético Diclofenaco-Me	309 (³⁵ Cl, 30%)	-	277 (22) [M - CH ₃ OH] ⁺	242 (44) [M - CH ₃ OH - Cl] ⁺	214 (100) [M - CH ₃ OH - Cl - CO] ⁺	179 (16) [M - CH ₃ OH - 2Cl - CO] ⁺	151 (10) [M - CH ₃ OH - 2Cl - CO - CH ₂ N] ⁺
10	Ácido 2-[2-[(2,6-diclorofenil) amino] fenil]acético Diclofenaco	295 (³⁵ Cl, 40%)	-	277 (13) [M - H ₂ O] ⁺	242 (43) [M - H ₂ O - Cl] ⁺	214 (100) [M - H ₂ O - Cl - CO] ⁺	179 (17) [M - H ₂ O - 2Cl - CO] ⁺	151 (12) [M - H ₂ O - 2Cl - CO - CH ₂ N] ⁺
11	Éster metílico del ácido 2-[2-[(2,4,6-triclorofenil) amino] fenil]acético ^d	343 (³⁵ Cl, 25%)	-	277 (15) [M - Cl - OCH ₃] ⁺	242 (48) [M - 2Cl - OCH ₃] ⁺	214 (100) [M - 2Cl - OCH ₃ - CO] ⁺	179 (17) [M - 3Cl - OCH ₃ - CO] ⁺	151 (9) [M - 3Cl - OCH ₃ - CO - CH ₂ N] ⁺
13	Éster 2-hidroxiético del ácido 2-[2-[(2,6-diclorofenil)amino] fenil]acético ^d	339 (³⁵ Cl, 26%)	-	277 (29) [M - C ₂ H ₆ O ₂] ⁺	242 (58) [M - C ₂ H ₆ O ₂ - Cl] ⁺	214 (100) [M - C ₂ H ₆ O ₂ - Cl - CO] ⁺	179 (15) [M - C ₂ H ₆ O ₂ - 2Cl - CO] ⁺	151 (8) [M - C ₂ H ₆ O ₂ - 2Cl - CO - CH ₂ N] ⁺

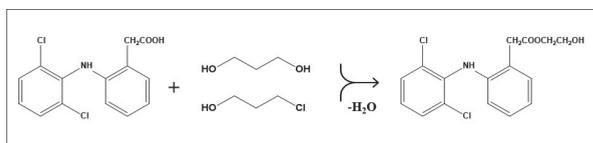
^a - Número de pico cromatográfico en la **Figura 3A**.

^b - Relación *m/z* e intensidad relativa (%) de los iones característicos cuyo origen se explica en el **Esquema 2**.

^c - Impurezas A, B, C, según la nomenclatura empleada por la Farmacopea Europea²⁹.

^d - Detectados en los cromatogramas e identificados con base en sus espectros de masas (EI, 70 eV) y patrones de fragmentación.

El estudio detallado de patrones de fragmentación de DCF y compuestos relacionados (**Esquema 2, Tablas 2 y 3**), permitió identificar la sustancia que corresponde al pico N° 13 en el cromatograma de la **Figura 3A**, *i.e.*, éster 2-hidroxiético del ácido 2-[2-[(2,6-diclorofenil) amino]fenil]acético (Pico N° 13). Es interesante observar, que en la fracción volátil de las tabletas del PFC, analizadas por HS-SPME-GC/MS, se encontraron dos alcoholes, etilenglicol y 2-cloroetanol (**Figura 2A**), que -eventualmente- hubieran podido reaccionar con el ácido (DCF) para formar su éster 2-hidroxiético, en cuyo espectro MS (EI, 70 eV) justamente aparecen los iones característicos $\phi_2 - \phi_6$, mientras que la masa molecular $[M^+, m/z 339 (16\%), ^{35}\text{Cl}]$ concuerda con la del éster 2-hidroxiético (**Esquema 3**):



Esquema 3. Obtención del éster 2-hidroxiético del ácido 2-[2-[(2,6-dicloro-fenil) amino]fenil]acético (diclofenaco), detectado en los cromatogramas GC de los extractos obtenidos con CH_2Cl_2 , de tabletas del PFC (**Figura 3A**, pico N° 13). En la fracción volátil de las tabletas analizadas por HS-SPME-GC/MS están presentes los dos alcoholes, etilenglicol y 2-cloroetanol (**Figura 2A**).

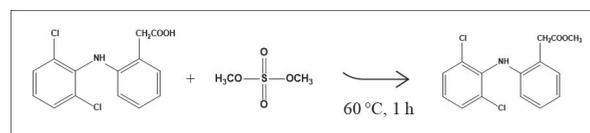
En los extractos de las tabletas del PFC, obtenidos con CH_2Cl_2 y analizados por GC/MS, se encontraron también ácidos grasos, palmítico (C_{16}) y esteárico (C_{18}), mientras que, en la fracción volátil de las mismas tabletas (HS-SPME), se hallaron sus ésteres metílicos. Entre otras sustancias, en los extractos (CH_2Cl_2) se hallaron hidrocarburos lineales (parafinas) de alto peso molecular, con número impar de átomos de carbono, C_{25} , C_{27} , C_{29} y C_{31} , cuyo origen en las tabletas no es claro.

Estudio de espectros de masas de diclofenaco y sus derivados, obtenidos por UHPLC-ESI⁺-HRMS-Orbitrap

La última parte del estudio (**Figura 1**) se enfocó en el análisis de extractos metanólicos de tabletas del PFC, por cromatografía líquida con diferentes sistemas de detección. El método HPLC-DAD^{29,33,34} se empleó para la cuantificación de DCF en tabletas por los métodos de estandarización externa y adición de patrón, mientras que el método LC/MS³⁵ (UHPLC-ESI⁺-HRMS-Orbitrap), se usó tanto para la cuantificación como para la identificación de DCF y compuestos relacionados. La cromatografía líquida, en comparación con la

de gases tiene una evidente ventaja en cuanto a las temperaturas que usa: son mucho más bajas tanto en el sistema de inyección como en la columna (30 °C), lo que permite evitar la degradación térmica del DCF (sustancia termolábil) y sus transformaciones, descritas en la literatura³⁶, por ejemplo, al éster metílico (cuando se usa MeOH como solvente), la descarboxilación (- CO_2), la deshidratación (- H_2O), o la ruptura de enlaces C-O o C-N, etc.; algunas de estas, pueden suceder en un inyector GC caliente ($\geq 250^\circ\text{C}$).

Para confirmar completamente la identidad del éster metílico de DCF encontrado en los extractos, se hizo el siguiente experimento: el CRM de diclofenaco se sometió a la reacción con sulfato de dimetilo a 60 °C (1 h), con agitación magnética (**Esquema 4**).



Esquema 4. Reacción de sulfato de dimetilo con diclofenaco y obtención de su éster metílico.

Luego, se obtuvieron el t_R y el espectro MS del producto de metilación de DCF (**Figura 4**). En el espectro *full scan* MS, obtenido por LC/MS, se detectaron iones-aducto $[M + \text{Na}]^+$, moléculas protonadas $[M + \text{H}]^+$ e iones-producto $[(M + \text{H}) - \text{OCH}_3]^+$ (**Figura 4B**), mientras que en el espectro MS de iones $[M + \text{H}]^+$, energizados y fragmentados en la cámara de colisiones activadas (HCD, N_2 , 10 V), se encontraron los iones característicos $[(M + \text{H}) - \text{CH}_3\text{OH}]^+$, $[(M + \text{H}) - \text{CH}_3\text{OH} - \text{CO}]^+$ y $[(M + \text{H}) - \text{CH}_3\text{OH} - \text{CO} - \text{Cl}]^+$ (**Figura 4C**); se determinaron sus masas exactas con errores muy bajos ($\Delta \text{ppm} < 1,7$), que permitieron hallar la composición elemental de la molécula y confirmar positivamente la identidad química del éster metílico de DCF. La fragmentación de las moléculas protonadas $[M + \text{H}]^+$ del éster metílico de DCF en la HCD del LC/MS guarda mucha similitud con la obtenida por ionización con electrones (GC/MS, EI, 70 eV) (**Figura 3C**).

La identificación de DCF encontrado en los extractos del PFC (**Figura 5**) fue completa, confirmatoria e inequívoca y se basó tanto en sus parámetros cromatográficos (t_R , LRI), como en los espectros MS obtenidos por técnicas GC/MS, GC/HRMS y LC/HRMS (patrón de fragmentación, masas exactas de iones, composición elemental y relación isotópica), que fueron idénticos a los del material de referencia certificado de DCF (CRM, Dr. Ehrenstorfer).

El valor LRI = 2484 de DCF, medido en la columna apolar (DB-5MS) (**Figura 3**), fue cercano al de la base de datos de NIST¹³; la fórmula condensada y la relación isotópica, obtenidas de los espectros HRMS de DCF presente en los extractos (**Figura 5A**), fueron idénticas a las del CRM de diclofenaco.

Se llevaron a cabo los experimentos importantes con los blancos *positivo* (diclofenaco comercial) y *negativo* (acetaminofén) (**Figura 5**), que confirmaron la validez de la estrategia analítica instrumental empleada en este estudio para detectar e identificar confirmatoriamente diclofenaco en el PFC comercializado en Bucaramanga (Colombia) (**Figura 5**).

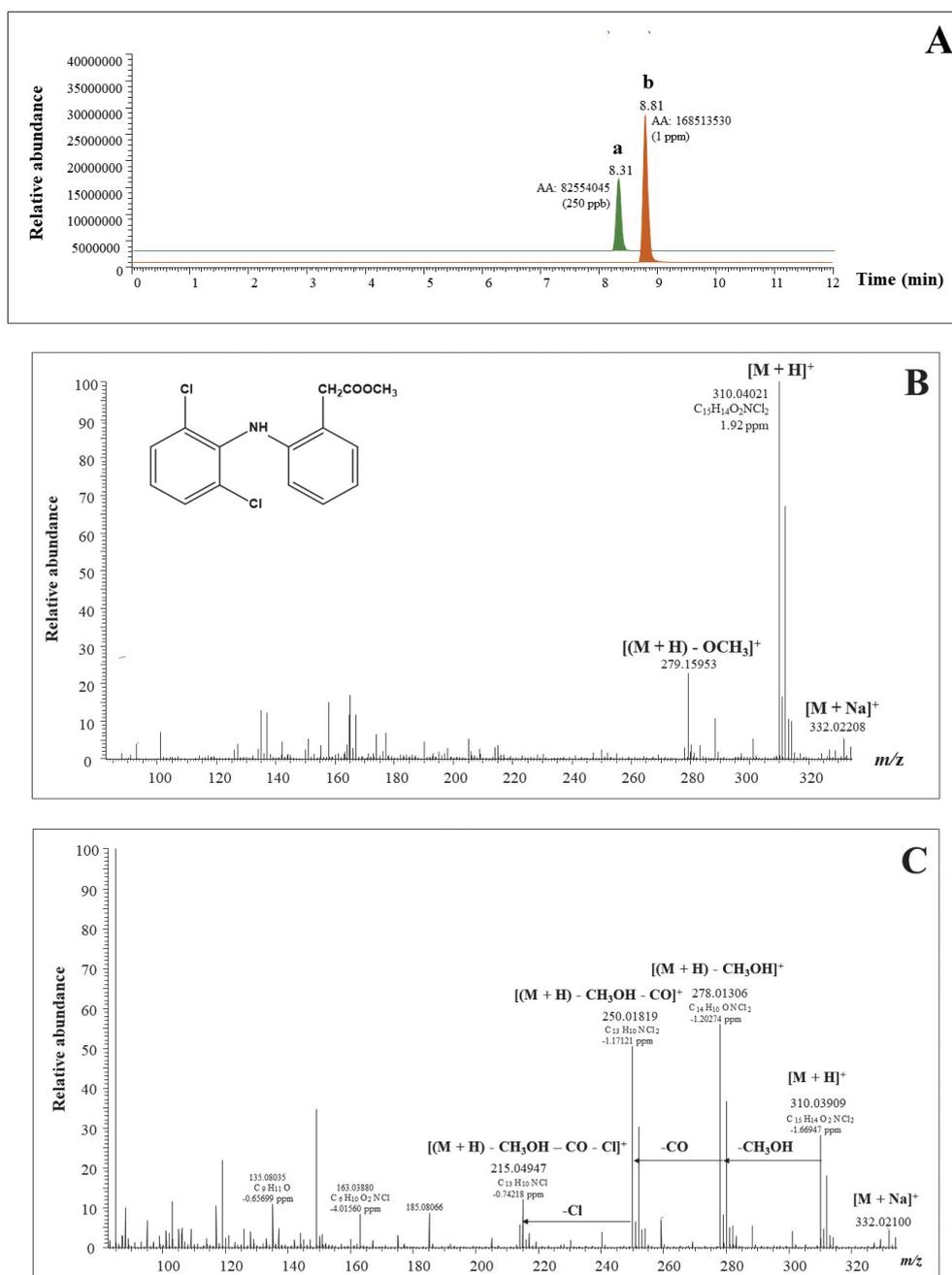


Figura 4. A. Corrientes iónicas extraídas (EIC, UHPLC-ESI⁺-HRMS-Orbitrap) de: **a** - diclofenaco y **b** - éster obtenido por metilación de DCF con sulfato de dimetilo. **B.** Espectro *full MS* del éster metílico de DCF; **C.** Espectro MS del ion $[M + H]^+$ del éster metílico de DCF, energizado y fragmentado en la HCD (N_2 , 10 eV) y los iones-producto característicos, que confirman su estructura.

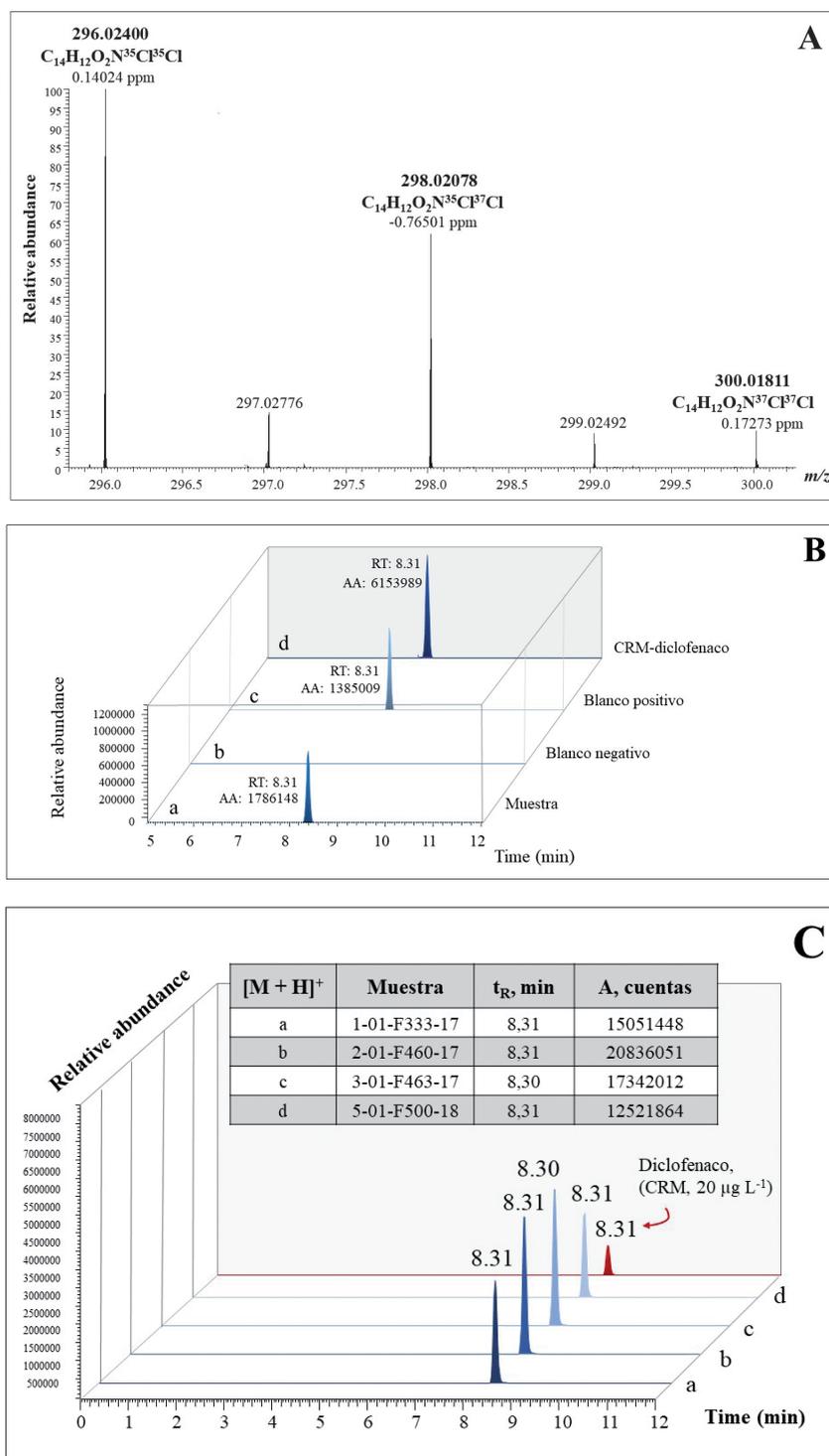


Figura 5. A. Espectro *full MS* de diclofenaco, obtenido por UHPLC-ESI⁺-HRMS-Orbitrap: región de masas (*m/z*) en donde se detecta la molécula protonada [M + H]⁺ de DCF y la relación isotópica de iones (³⁵Cl, ³⁵Cl; 100%) : (³⁵Cl, ³⁷Cl; 59.5%) : (³⁷Cl, ³⁷Cl; 10.6%) ≈ 9:6:1. Muestra 5-01-F500-18 del PFC. **B.** Comparación de las corrientes iónicas extraídas (EIC, UHPLC-ESI⁺-HRMS-Orbitrap), de las moléculas protonadas [M+H]⁺ de DCF (*m/z* 296.02396): **a.** El PFC, muestra 5-01-F500-18. **b.** *Blanco* (control) *negativo* - producto comercial de acetaminofén (Acetaminofén, ICOM®); **c.** *Blanco* (control) *positivo* - producto comercial de DCF (Diclofenaco sódico, MK®); **d.** CRM de DCF (*Dr. Ehrenstorfer*, Augsburgo, Alemania) y **C.** Comparación de las EIC de moléculas protonadas [M + H]⁺ de DCF de las muestras de cuatro lotes diferentes del PFC (véanse en la tabla) y del CRM de DCF (20 µg L⁻¹).

En los extractos de las tabletas del PFC se detectaron e identificaron por LC/MS sustancias relacionadas con el DCF; en la **Figura 6** aparecen las EIC de sus moléculas

protonadas $[M + H]^+$, a saber: la impureza C (ca. 0,1 mg/tableta) y el éster metílico de DCF (ca. 0,2 mg/tableta) (Muestra 1-01-F333-17).

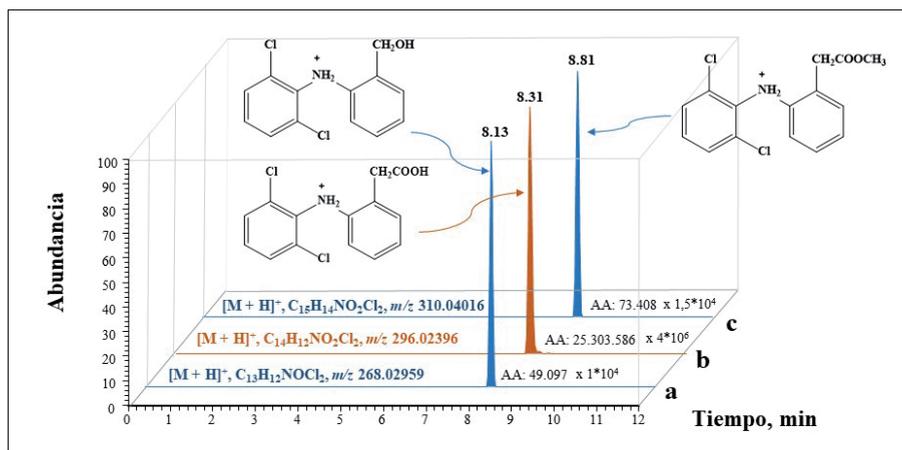


Figura 6. Corrientes iónicas extraídas (EIC) de la TIC, obtenida por UHPLC-ESI⁺-HRMS-Orbitrap, del extracto aislado por MeOH:H₂O (1:1 v/v) de tabletas del PFC (Muestra 1-01-F333-17), de: **a** - impureza C; **b** - DCF; **c** - éster metílico de DCF. Se reportan t_R (min) y áreas de picos cromatográficos (cuentas) reconstruidos (con factor de amplificación) con base en las EIC de moléculas protonadas $[M + H]^+$.

Cuantificación de diclofenaco en tabletas del PFC

En la **Tabla 4** se reportan los datos de la reproducibilidad de medición de los t_R y de las áreas cromatográficas, obtenidos por HPLC-DAD y LC/MS. Se observa una reproducibilidad alta de estos parámetros acorde con las GLP.

Tabla 4. Reproducibilidad de los tiempos de retención, t_R , y de las áreas cromatográficas de diclofenaco (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), analizado por HPLC-DAD ($\lambda = 274$ nm) y LC-MS [UHPLC-ESI⁺-HRMS-Orbitrap ($V_{cap} = +3,5$ kV)].

Método	Tiempo de retención, min			Área de pico, cuentas		
	t_R	$\pm s$	CV, %	A	$\pm s$	CV, %
HPLC-DAD	4,17*	0,01	0,24	4400*	295	6,7
LC/MS	8,31**	0,01	0,12	277**	2	7,4

* Promedio de once mediciones (n = 11).

** Promedio de siete mediciones (n = 7); área $\times 10^6$ (cuentas).

Tabla 5. Parámetros de las curvas de calibración de diclofenaco, obtenidos por HPLC-DAD ($\lambda = 274$ nm) y LC/MS [UHPLC-ESI⁺-HRMS-Orbitrap ($V_{cap} = +3,5$ kV)].

Método	Rango, $\mu\text{g mL}^{-1}$	m	b	r^2	LOD*, $\mu\text{g mL}^{-1}$	LOQ**, $\mu\text{g mL}^{-1}$
HPLC-DAD	10 - 400	48,36	-122,994	0,9949	0,30	0,80
LC/MS	0,02 - 0,25	308888	-967985	0,9953	0,009	0,03

* Nivel mínimo de detección, LOD = 3S/m.

** Nivel mínimo de cuantificación, LOQ = 10S/m.

Para cuantificar el DCF se usaron dos técnicas, HPLC-DAD y LC/MS (UHPLC-ESI⁺-HRMS-Orbitrap), siendo la primera recomendada por varias Farmacopeas^{29,33,34}. En la **Tabla 5** aparecen los principales parámetros de las curvas de calibración, así como los niveles mínimos de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) de DCF. Para su cuantificación por HPLC-DAD, se usó también el método de adición de estándar; el DCF se cuantificó tanto en las tabletas del PFC inmediatamente pulverizadas, como en las almacenadas en forma de polvo por cuatro meses, ello, para observar los posibles cambios con el tiempo. La técnica LC/MS tiene una ventaja sobre HPLC-DAD, porque permite no solamente identificar³⁵ los componentes de la mezcla, sino cuantificarlos, con una buena reproducibilidad (CV < 10%); la cuantificación por UHPLC-ESI⁺-HRMS-Orbitrap se basó en la medición de la corriente iónica extraída (EIC) de moléculas protonadas de DCF $[M + H]^+$. Los resultados de cuantificación de DCF por HPLC-DAD y por LC/MS, presentaron una buena concordancia, así como los obtenidos por dos diferentes métodos de calibración, *i.e.*, estandarización externa y adición de estándar (**Tabla 6**).

Tabla 6. Cantidad de diclofenaco (mg/tableta) determinada por HPLC-DAD ($\lambda = 274 \text{ nm}$) y por LC/MS (UHPLC-ESI⁺-HRMS-Orbitrap) en tabletas del PFC, adquirido en 2018 en el mercado local de Bucaramanga (Colombia).

Código interno (Tabla 1)	mg Diclofenaco / Tableta ($\bar{X} \pm s, n = 2$) ^a			
	Medición I	Medición II	Medición III	Medición IV
1-01-F333-17	31 ± 1	37 ± 2	39 ± 3	41 ± 3
2-01-F460-17	36 ± 1	40 ± 1	45 ± 1	44 ± 8
3-01-F463-17	42 ± 1	38 ± 1	41 ± 1	56 ± 9
4-02-F463-17	41 ± 4	47 ± 4	51 ± 5	50 ± 1
5-01-F500-18	35 ± 3	30 ± 7	33 ± 7	39 ± 2
6-02-F500-18	36 ± 7	38 ± 1	41 ± 1	41 ± 1
7-03-F500-18	41 ± 9	37 ± 2	39 ± 3	39 ± 3
8-04-F500-18	35 ± 2	39 ± 1	42 ± 1	46 ± 2
Promedio		39 ± 2		44 ± 4

^a Error estándar de la media, calculado según $t^*s / \text{raíz}(n)$ para $(n - 1)$ grados de libertad y un 95% de confianza. **Medición I:** muestra obtenida a partir de cinco tabletas escogidas al azar de cada caja del PFC, homogeneizada por pulverización y almacenada por cuatro meses en una bolsa sellada. Calibración por HPLC-DAD, usando el método de estándar externo. **Medición II:** muestra obtenida a partir de dos tabletas escogidas al azar de cada caja del PFC, homogeneizada por pulverización y procesada inmediatamente. Calibración por HPLC-DAD, usando el método de estándar externo. **Medición III:** muestra homogeneizada, obtenida a partir de dos tabletas escogidas al azar de cada caja del PFC, homogeneizada por pulverización y procesada inmediatamente. Calibración por HPLC-DAD, usando el método de adición de estándar. **Medición IV:** muestra obtenida a partir de cinco tabletas escogidas al azar de cada caja del PFC, homogeneizada por pulverización y almacenada por cuatro meses en una bolsa sellada. Calibración por UHPLC-ESI⁺-HRMS-Orbitrap, usando el método de estándar externo.

Adicionalmente, se realizó un experimento con el calentamiento de diclofenaco (CRM) a $120 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ (durante 15, 30 o 60 min) y a $250 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ durante un minuto; con esta última temperatura se reproducían las condiciones térmicas del puerto de inyección de un cromatógrafo de gases. Posteriormente, se llevó a cabo el análisis por GC/MS y LC/MS de los productos de termodegradación (**Figura 7**). La identidad de las sustancias obtenidas se estableció con base en sus espectros MS (patrones de fragmentación, medición de masas exactas,

relaciones isotópicas). Durante el calentamiento de DCF (CRM) se generaron varios compuestos. Algunos de ellos, también, se pueden encontrar entre los productos intermedios y colaterales de síntesis de DCF. Sin embargo, es importante diferenciar la procedencia de cada una de estas sustancias, es decir: ¿provinieron de la reacción de síntesis²⁷ de DCF (*i.e.*, sus impurezas e intermedios)? o ¿se formaron como artefactos en el puerto de inyección GC caliente ($\geq 250 \text{ }^\circ\text{C}$)?

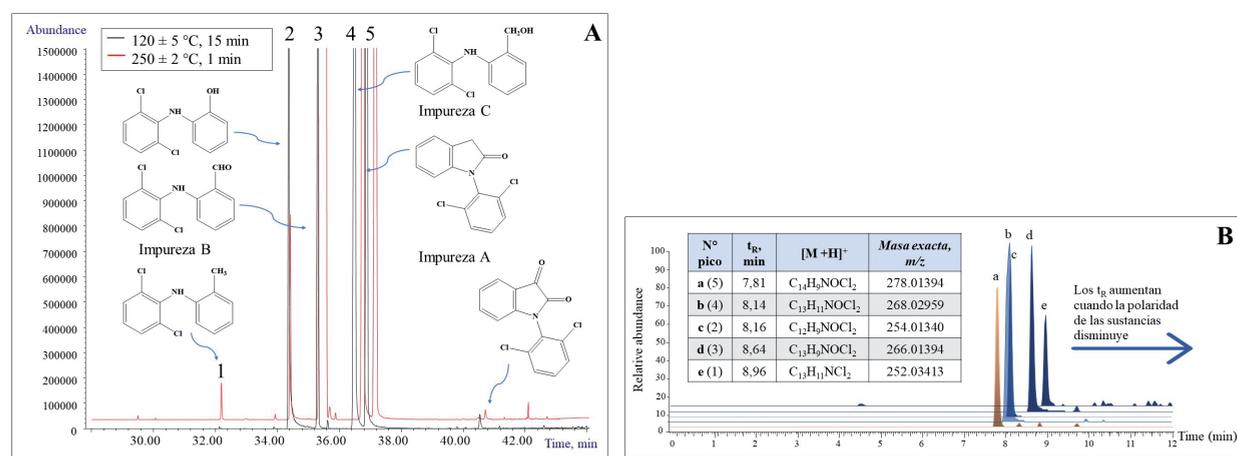


Figura 7. A. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/MS (EI, 70 eV) de DCF, calentado a $120 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 15 min, y a $250 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, durante un minuto. B. Cromatogramas de masas basadas en los EIC (UHPLC-ESI⁺-HRMS-Orbitrap) de moléculas protonadas $[M + H]^+$ de los productos de calentamiento de diclofenaco a $120 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 15 min; los números entre paréntesis (1 - 5) en la tabla corresponden a los de los picos de estas sustancias en el cromatograma obtenido por GC/MS (**Figura 7A**).

En promedio, en tabletas analizadas (> 70 tabletas), escogidas al azar de ocho cajas del PFC, adquirido en el mercado local (Bucaramanga, Colombia), se hallaron alrededor de 40 - 42 mg de diclofenaco (7 - 8%); con base en este hallazgo, se deduce que la toma de tres tabletas de este producto puede ascender a *ca.* 120 mg de diclofenaco, una cantidad que se acerca a la dosis máxima diaria para este medicamento³⁷ cuando está presente como sal sódica, lo que se determinó por difracción de rayos X³⁸. *Prescribers' Digital Reference* no recomienda dosis mayores de 150 mg/día para productos administrados oralmente que contienen diclofenaco sódico tales como Cataflam, Voltaren y Zorvolex³⁹. En las tabletas, usando LC/HRMS, se confirmaron la presencia y la identidad de los siguientes compuestos relacionados con DCF en cantidades totales no mayores de *ca.* 0,1 - 0,5 mg ($\leq 0,08\%$), a saber: la impureza A (lactama) [$t_R = 7,81$ min; $C_{14}H_9NOCl_2$, (M + H)⁺ en m/z 278,01394, Δ ppm = 0,92]; la impureza B (aldehído) [$t_R = 8,64$ min; $C_{13}H_9NOCl_2$, (M + H)⁺ en m/z 266,01394, Δ ppm = 1,01]; la impureza C (alcohol) [$t_R = 8,14$ min; $C_{13}H_{11}NOCl_2$, (M + H)⁺ en m/z 268,02959, Δ ppm = 0,87]; la impureza D (fenol) [$t_R = 8,16$ min; $C_{12}H_9NOCl_2$, (M + H)⁺ en m/z 254,01340, Δ ppm = 1,02] y los ésteres de DCF metílico [$t_R = 8,81$ min; $C_{15}H_{14}NO_2Cl_2$, (M + H)⁺ en m/z 310,04016, Δ ppm = 0,95] (**Figuras 6 y 7B**), así como 2-hidroxiético [$t_R = 8,19$ min; $C_{16}H_{16}NO_3Cl_2$, (M + H)⁺ en m/z 340,05072, Δ ppm = 1,05] y una impureza del éster metílico de DCF con tres átomos de cloro [$t_R = 5,57$ min; $C_{15}H_{13}NO_2Cl_3$, (M + H)⁺ en m/z 344,00119, Δ ppm = 1,05].

Discusión

Comparación de métodos de análisis instrumental (GC/MS y LC/MS) de diclofenaco

Los métodos de análisis instrumental se dividen en dos grupos: (1) *preliminares* o presuntivos que permiten obtener la identificación tentativa de una sustancia y (2) *confirmatorios*, conducentes a su identificación inequívoca. Entre los primeros figuran IR, UV-Vis, TLC, GC con sistemas de detección convencionales o HPLC con detectores no espectroscópicos. La identificación confirmatoria de una sustancia requiere obtener su “huella digital” a través de un conjunto de métodos espectroscópicos. Sin embargo, la situación se dificulta, cuando esta sustancia (llamada analito-*target*) se encuentra en una mezcla muy compleja o en presencia de muchas otras sustancias de diversa naturaleza química y en cantidades disímiles. El método de extracción y la técnica de análisis se

escogen según la naturaleza química del analito-*target* (peso molecular, polaridad, volatilidad y estabilidad térmica). La espectrometría de masas (MS, HRMS) juega un rol fundamental en el análisis, sobre todo, cuando se combina con la cromatografía (GC o LC)^{22,35}, ya que permite obtener los espectros MS únicos de cada sustancia en una mezcla compleja, partiendo de la cantidad muy pequeña de la muestra (mg y hasta μ g podrían ser suficientes). En este estudio se usaron los métodos modernos de GC y LC combinados con espectrometría de masas de alta resolución.

La técnica de HS-SPME-GC/MS, que, no solamente extrae las sustancias volatilizables de matrices complejas, sino las concentra sobre una fibra adsorbente, permitió detectar -en las tabletas analizadas- terpenos presentes en el PFC en bajas concentraciones, residuos de solventes e intermediarios de síntesis de diclofenaco; mientras en los respectivos extractos obtenidos con solventes (CH_2Cl_2 o MeOH) se detectaron los compuestos en concentraciones más altas, *e.g.*, diclofenaco, sus impurezas y algunas otras sustancias (ácidos grasos, parafinas).

Hay un asunto muy interesante para discutir. Al ver los cromatogramas obtenidos por GC/MS de los extractos de tabletas en CH_2Cl_2 , una primera y desprevista impresión que puede surgir es que el diclofenaco se encontraba en las tabletas “en rastros” (**Figura 3A**, pico N° 10), pero desde lejos no es cierto, ya que el DCF no solamente no se hallaba *en trazas* (< 1 ppm), sino estaba presente en cantidad apreciable, 7 - 8% en cada tableta (**Tabla 6**), cuyo peso principal lo conformaba la I_{β} -celulosa³⁸. En un estudio previo³⁰ sobre la esterilización de un producto inyectable de diclofenaco sódico, en un autoclave a 123 ± 2 °C, se observó la formación de lactama (derivado de indolinona, denominada la impureza A²⁹). En otro estudio³¹, los productos de degradación de DCF, mantenido en medio acuoso a 60 °C durante nueve semanas, fueron las tres impurezas A, B y C.

El análisis de muestras por GC/MS se realiza usando un sistema de inyección *split/splitless* mantenido a 250 °C. En el modo *splitless* la transferencia de vapores de la muestra a la columna cromatográfica es bastante lenta (*ca.* 1,0 min)⁴⁰, pero es un tiempo suficiente para que ocurran las transformaciones térmicas del DCF (**Figura 7A**). Por ende, existe un notorio inconveniente para analizar el DCF por GC/MS, que radica en su alta labilidad térmica, conducente a la formación de productos de ciclación intramolecular (impureza A) y de la reducción del grupo CH_2COOH a los de alcohol

(-CH₂OH, impureza C) y aldehído (-CHO, impureza B) y otros derivados, en el puerto de inyección *split/splitless* caliente^{40,41}. El uso de un sistema de inyección *cool on-column* (inyección de la muestra en frío directamente a la columna) podría evitar la degradación térmica de DCF, pero esto implicaría un cambio del *hardware* del equipo e instalación de un nuevo puerto de inyección (*on-column*) También, se puede -antes del análisis del DCF por GC- acudir a su derivación, e.g., convertirlo a su éster trimetilsilílico (TSM), pero es un paso adicional en la cadena analítica, que puede aumentar el error y la contaminación cruzada^{42,43}. Por eso, la cromatografía líquida es una opción, aunque es más difícil alcanzar la misma resolución en la columna HPLC, similar a la que se obtiene en una columna capilar GC o usando GCxGC^{44,45}. Aunque en las columnas HPLC la co-elución de sustancias es más frecuente y los espectros UV pueden resultar muy parecidos (e.g., DCF y su lactama), usando la técnica de acoplamiento LC/MS -una herramienta de separación mucho más fina, sobre todo, si se emplea la espectrometría de masas de alta resolución-, se puede “separar” los picos cromatográficos extrayendo las corrientes iónicas (EIC) -características para cada sustancia-, para que, de esta manera, los compuestos puedan ser identificados aunque coeluyen o tienen bien cercanos sus t_r (Figura 7B, picos b y c).

Sobre caléndula (*Calendula officinalis*)

El nombre genérico de *Calendula officinalis* (familia Asterácea) deriva del latín *calendae*, primer día del mes, aludiendo a que la planta florece casi todo el año. El nombre específico (*officinalis*) expresa su carácter medicinal. Originaria de Egipto y cultivada en Europa, desde el siglo XII, existe como subespontánea en la región mediterránea, fue introducida a Sur América en los tiempos de la Conquista. Contiene de un 0,2% a un 0,3% de aceite esencial, un 10% de materia mineral, carotenoides en abundancia, flavonoides, taninos, saponinas triterpénicas, entre otros grupos de componentes⁴⁶. La planta de caléndula está incluida en el “Vademécum colombiano de plantas medicinales”, que contiene las 119 plantas aprobadas por el Invima⁴⁷. Según el Vademécum, las indicaciones para el uso interno son antiinflamatorias, en tratamientos de alteraciones bucofaringeas; para uso externo se recomienda como antiinflamatorio, cicatrizante, como tratamiento tópico de inflamaciones de piel y mucosas⁴⁷. Sin embargo, ni en una revisión publicada en 2013 ni en su actualización hasta agosto de 2020 hecha en esta investigación, se encontró algún artículo científico que comprobara algún efecto anti-inflamatorio de *C. officinalis* por uso oral en

humanos⁴⁸. Tampoco se encontró algún estudio clínico que demuestre el efecto analgésico de *C. officinalis* por usos externo u oral.

Las flores y hojas de la *C. officinalis* se han empleado por muchos siglos tanto en la culinaria como en la medicina popular. Su uso como condimento aparece en la lista de sustancias reconocidas generalmente como seguras (GRAS) de la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) de los EE. UU.⁴⁹. En la medicina tradicional de muchos países la caléndula se ha utilizado para varios propósitos, en los que se le atribuyen efectos estimulante, antiespasmódico, emenagogo, o diaforético, o usos como ayudante en el tratamiento de la ictericia o el estreñimiento⁵⁰. Revisiones sobre la bioactividad de los extractos de *Calendula officinalis* contienen una lista amplia de resultados positivos de ensayos *in vitro*, que incluyen actividades antiinflamatoria, antibacteriana, anticancerígena, antifúngica, antigenotóxica, antioxidante, antiviral, cicatrizante, inmunoestimulante e insecticida^{51,52}. Sin embargo, no hay resultados de estudios clínicos que permitan comprobar la eficacia de los extractos de caléndula al aprovechar alguna de estas actividades biológicas para el tratamiento de alguna enfermedad. Por esto, una revisión hecha para *Natural Standard Research Collaboration* estableció que no hay suficiente evidencia científica para una lista de 90 aplicaciones farmacéuticas de *C. officinalis*, dentro de las que se incluyó la analgesia⁵³. La Agencia Europea de Medicamentos publicó en 2007 los resultados de un estudio en el que se examinó la eficacia comprobada de productos cuyo ingrediente fuese *C. officinalis* y hubiesen completado por lo menos 30 años de uso en medicina⁵⁴. La ayuda en la curación de heridas leves, o de inflamaciones de la mucosa oral o faríngea, o de úlceras de las piernas, fueron los usos como agente externo con eficacia verificada. Las aplicaciones de uso interno comprobadas fueron solamente aquellas dirigidas al tratamiento de la gastritis y de otros malestares del sistema digestivo relacionados con inflamaciones⁵⁴.

En el aceite esencial (0,3%), obtenido por arrastre con vapor, de flores de caléndula, cultivada en Massif Central, Francia, los compuestos mayoritarios eran sesquiterpenos, C₁₅H₂₄, y sesquiterpenoles, C₁₅H₂₆O, principalmente, δ-cadineno (12,1%), α-cadinol (25,5%) y α-muurolol (7,1%)⁵⁵. Las flores secas de plantas de caléndula, cultivada en Brasil, fueron destiladas con vapor y su fragancia se obtuvo por métodos HS-SPME y HS estático⁵⁶. En el aceite esencial prevalecieron γ-cadineno (8,9%), *epi*-α-muurolol (12,9%), α-cadinol (20,4%) y δ-cadineno (22,5%), mientras que, en la

fracción volátil aislada por HS-SPME, α -copaeno (15,1%), δ -cadineno (22,1%) y γ -cadineno (25,5%). En el extracto alcohólico de flores secas de caléndula cultivada en Colombia³⁸, se encontraron α - y γ -muurolenos, α - y γ -cadinenos, α -cadinol, β -eudesmol, oplopanona ($C_{15}H_{26}O_2$), viridiflorol, fitol, oleamida ($C_{18}H_{35}NO$) y otros sesquiterpenoles, en menor proporción. Algunos de estos compuestos se encontraron en fase vapor de las tabletas del PFC, analizado en este estudio por HS-SPME-GC/MS, sin embargo, la presencia de linalool, anetol, carvona y metilchavicol, que son metabolitos secundarios de plantas de otras familias botánicas, indica la contaminación o mezcla con material vegetal distinto al de la caléndula.

Los fitofármacos se preparan a partir plantas medicinales, que se deben cultivar bajo condiciones controladas de suelo, riego, presencia de malezas, evitando las afectaciones por enfermedades y plagas; en el cultivo no deben usarse pesticidas y el suelo debe ser libre de metales pesados, que las plantas -con facilidad- absorben⁵⁷. Las GMP requieren un análisis obligatorio de la materia prima para fabricar los fitofármacos, de sus principios activos, residuos de pesticidas, metales pesados, entre otras pruebas importantes. En las tabletas del PFC analizadas en este estudio, se encontraron cantidades pequeñas de algunos flavonoides, tifaneósido (40 - 60 $\mu\text{g/g}$), calendoflavósido (30 - 50 $\mu\text{g/g}$), isoquercetina (300 - 450 $\mu\text{g/g}$) y narcisina (150 -300 $\mu\text{g/g}$), presentes en cantidades variables y no en todos los lotes³⁸.

Sobre diclofenaco

En 1988 se aprobó en los EE. UU. el uso de diclofenaco para el tratamiento de artritis reumatoidea, osteoartritis y espondilitis anquilosante⁵⁸. Una vez se inició su consumo regular, se notó la afectación de hígado⁵⁹, sistema cardiovascular⁶⁰, sistema gastrointestinal^{61,62} y riñones⁶³. Entre noviembre de 1988 y junio de 1991 se reportaron a la FDA 434 casos de daño hepático por consumo de DCF. Una revisión de estos casos permitió seleccionar 180 en los que era clara la conexión entre consumo de diclofenaco y el daño hepático. En el 85% de los casos aparecieron síntomas de afectación del hígado, luego de seis meses de iniciar un tratamiento basado en el consumo de DCF. Solo en 5 (3%) de los 180 casos, los síntomas de daño hepático aparecieron un año después⁶⁴. En un estudio en el que se suministraron 25 mg de DCF tres veces al día durante siete días a un grupo de 20 voluntarios, se tomaron fotografías de la mucosa gástrica para evaluar su erosión⁶⁵. Estas imágenes mostraron que el consumo de DCF causó un aumento de erosiones gástricas en un factor de ocho

(de $0,5 \pm 0,2$ hasta $3,9 \pm 1,1$). Tal como sucede con otros AINES, el consumo de DCF tiene un riesgo alto de afectación severa del riñón. Una revisión de 2201 registros médicos seleccionó estudios que tuviesen los detalles sobre el tipo de AINES consumido y los daños renales acaecidos. La agrupación de los resultados de estos estudios sobre los riesgos relativos de generar daño renal agudo para los siete AINES registrados, entre los que estuvo el diclofenaco, fueron altos (1,58 - 2,11) y no hubo diferencias significativas entre cualquier pareja de AINES⁶⁶. Ciertas personas son hipersensibles a algunos medicamentos y casi inmediatamente desarrollan reacciones fuertes y variadas que pueden incluso llevar a la muerte. En un estudio de 806 casos de hipersensibilidad a drogas, se distinguieron 117 casos que correspondieron a reacción alérgica aguda y, entre estos, el mayor causante (48,7% de los casos) fue algún AINE. Entre estos, aspirina, dipirona y DCF, fueron los más frecuentes⁶⁷.

Como se puede apreciar, quien consuma un analgésico de origen natural, sin conocer que su componente activo es en realidad el DCF, no será consciente de los riesgos a que está exponiendo a su sistema cardiovascular, su hígado, riñones o tracto digestivo. Aunque hay efectos que aparecen prontamente, la afectación se agrava si el consumo es regular, continuo, como tendería a hacer -sin mucha preocupación- alguien que piense que está ingiriendo extracto de caléndula, 100%-natural e inocuo, tal como normalmente cree la gente sobre la medicina a base de plantas medicinales, que no hacen daño como los “químicos”. Además, si la persona consume otros medicamentos, puede haber una interacción farmacológica negativa. No se encontraron triterpenoides (faradiol, oleanano, maniladiol) o sus ésteres, en niveles por encima de los LOD de los equipos utilizados en esta investigación.

Sobre los medicamentos falsificados

La Asamblea de la Organización Mundial de la Salud (OMS) realizada en 1998 trató por primera vez el tema de los medicamentos falsificados. Este problema, que tiene impactos socioeconómicos y sobre la salud, ha crecido tanto, que varias publicaciones científicas lo denominan una pandemia⁶⁸. Por varias décadas se usaron varias denominaciones sobre las diferentes modalidades de este comercio ilegal, hasta que en la Asamblea de la OMS en 2017 se unificaron todas estas variantes en solo tres tipos de productos: (1) subestándar, (2) no-registrado/no-licenciado y (3) falsificado⁶⁹. Estos últimos son productos que deliberadamente/fraudulentamente falsifican su identidad, composición, o fuente. Según estimación

de la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo, OECD⁶⁴, el mercado creciente de bienes falsificados o piratas ya representó en 2016 (509 mil millones de dólares), 3,3% del comercio global. Dentro de estos bienes, 4,4 millardos de dólares que cruzaron las fronteras de los países correspondieron a productos farmacéuticos subestándar o falsificados. El 84% de la población mundial vive en los países que el Banco Mundial clasifica como de ingresos medio y bajo⁷¹. Un estudio de la OMS halló que en estos países el gasto anual en medicamentos falsificados fue de 30,5 millardos de dólares en 2016⁷². Este estudio revisó publicaciones científicas sobre productos farmacéuticos falsificados y encontró que el 10,5% de los productos obtenidos en el comercio en estos países fallaron las pruebas de composición química. El presente estudio es un ejemplo de análisis de un producto comercial de origen natural, cuyo principio activo -en realidad fue un antiinflamatorio analgésico de origen sintético, diclofenaco. En lugar de los 150 mg de extracto seco de caléndula que declara la etiqueta del PFC, se hallaron 40 mg de un compuesto sintético. El contenido de sustancias naturales (terpenos, flavonoides) no superó 1 mg/tableta. En la clasificación de la OMS correspondería tanto a productos “subestándar” (por no cumplir sus normas de calidad o sus especificaciones), como a productos “falsificados” (aquellos en los que la identidad, la composición o la fuente no corresponden a la realidad). La resolución de la Asamblea de la OMS de 2017 agrega que cuando un producto está en dos categorías, pero es el fabricante quien deliberadamente causa el incumplimiento de las especificaciones, el caso corresponde a un producto falsificado⁶⁹.

Conclusión

Usando la combinación de técnicas modernas de análisis instrumental, se determinó la composición química de sustancias orgánicas en tabletas del producto fitoterapéutico a base de caléndula (*Calendula officinalis*), adquirido en establecimientos legalmente constituidos, en Bucaramanga (Colombia). En la fracción volátil de las tabletas, obtenida por HS-SPME, se detectaron varios mono- y sesquiterpenoides, residuos de solventes y compuestos intermedios de la síntesis de diclofenaco. En los cromatogramas de los extractos, aislados con diclorometano y analizados por GC/MS y GC/HRMS, se detectaron tanto el diclofenaco como los compuestos relacionados, principalmente, γ -lactama (impureza A), que se forma por la reacción intramolecular de ciclación y pérdida de agua, en el inyector caliente (250°C) del GC. La identificación confirmatoria del diclofenaco se realizó con base en los criterios cromatográficos (t_R , LRI) y espectroscópicos,

i.e., los espectros de masas de alta resolución (HRTOF-MS, MS-*Orbitrap*) y usando el material de referencia certificado (CRM). Los compuestos relacionados del diclofenaco (impurezas A, B, C y algunos ésteres) se identificaron con base en sus espectros de masas, medición de masas exactas de iones-producto y moleculares, estudio de relaciones isotópicas y patrones de fragmentación. La cuantificación del diclofenaco se llevó a cabo por métodos de estandarización externa y adición de estándar (CRM), usando las técnicas HPLC-DAD y UHPLC-ESI⁺-HRMS-*Orbitrap*. El contenido promedio de diclofenaco en tabletas del producto fitoterapéutico a base de caléndula (*Calendula officinalis*) fue de *ca.* 40 - 42 mg/tableta (7 - 8%). El diclofenaco, un compuesto sintético de la familia de medicamentos llamados AINES, encontrado en el PFC analizado, no fue declarado en su etiqueta, que, según el Invima^{1,73} un producto fitoterapéutico “no podrá contener en su formulación principios activos aislados y químicamente definidos”, tal como es el caso del ácido 2-[2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil]acético (diclofenaco).

En esta investigación, que continúa, se detectó una cantidad muy baja (<1 mg) de flavonoides y no se hallaron (a niveles por encima del LOD de los equipos utilizados en la investigación) triterpenoides (*e.g.*, faradiol, oleanano, maniladiol, etc.) o sus ésteres, que son las sustancias presumiblemente responsables por la actividad antiinflamatoria de la caléndula. Para lograr un mayor control de calidad de los productos fitofarmacéuticos, se recomienda que la declaración de contenido de su etiqueta incluyese explícitamente componentes mayoritarios o característicos del ingrediente natural, independientemente de si se ha alcanzado el conocimiento de cuáles son las sustancias responsables por su actividad biológica. Las instituciones de control podrían involucrar las capacidades analíticas de los laboratorios universitarios y sus investigadores en las tareas de verificación de la composición de los productos fitoterapéuticos.

Agradecimientos

A la química, M. Sc. Deyanira Caballero, por su compromiso y una gran dedicación al Laboratorio para mantener sus estándares de calidad, sinceras gracias. Al Dr. Arvind Kumar, se le agradece su cooperación en los análisis TLC.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de interés.

Referencias

- Invima. 2020: <http://www.invima.gov.co>.
- Della Loggia R, Tubaro A, Sosa S, Becker H, Saar St, Isaac O. the role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta Med.* 1994; 60(6): 516-520. doi: <https://doi.org/10.1055/s-2006-959562>
- Hamburger M, Adler S, Baumann D, Förg A, Weinreich B. Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid esters from Marigold (*Calendula officinalis*). *Fitoterapia.* 2003; 74(4): 328-338. doi: [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(03\)00051-0](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(03)00051-0)
- Ukiya M, Akihisa T, Yasukawa K, Tokuda H, Suzuki T, Kimura Y. Anti-inflammatory, anti-tumor-promoting, and cytotoxic activities of constituents of marigold (*Calendula officinalis*) flowers. *J Nat Prod.* 2006; 69(12): 1692-1696. doi: <https://doi.org/10.1021/np068016b>
- Preethi KG, Kuttan G, Kuttan R. Anti-inflammatory activity of flower extract of *Calendula officinalis* Linn. and its possible mechanism of action. *Indian J Exp Biol.* 2009; 47(2): 113-120. doi: <https://doi.org/10.1515/JBCPP.2009.20.1.73>
- Flores D (Editor) Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): Common Uses, Risks and Effectiveness. *Pharmacology - Research Safety Testing and Regulation Series.* New York: Nova Science Publishers; 2017: 1-199.
- Sehajpal S, Prasad DN, Singh RK. Prodrugs of Non-steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): A long march towards synthesis of safer NSAIDs. *Mini Rev Med Chem* 2018; 18(14): 1199-1219. doi: <https://doi.org/10.2174/1389557518666180330112416>
- International Organization for Standardization. *General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories.* ISO/IEC 17025:2005.
- Ministerio de Salud y Protección Social. Manual de buenas prácticas de laboratorio de control de calidad de productos farmacéuticos. Guía de Evaluación. Resolución 3619 de 2013. 2013: 1- 73.
- Giannelli PC. Forensic Science: Chain of custody. Faculty publications. 1996; 345: 447-465.
- Angulo RD. Cadena de custodia en criminalística. Segunda Edición, Bogotá D. C.: Ediciones Doctrina y Ley Ltda.; 2007: 1 - 253.
- Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4th Edition, Carol Stream, IL: Allured Publishing; 2007: 1- 804.
- NIST. 2020: <https://webbook.nist.gov/chemistry>.
- Johnstone RA, Rose ME. Mass spectrometry for chemists and biochemists. Second Edition. Cambridge: Cambridge University Press, 1996: 1-501.
- McLafferty FW, Tureček F. Interpretation of Mass Spectra. 4th Edition, Mill Valley, California: University Science Books; 1993: 1-371.
- Maurer HH, Pfeleger K, Weber AA. Mass Spectral and GC Data of drugs, poisons, pesticides, pollutants, and their metabolites. Volume 1: Methods and Tables. Volume 2: Mass Spectra. Third revised and enlarged edition. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA. 2007; (Vol 1) 1 - 202; (Vol. 2) 2 - 1208.
- Stashenko E, Martínez JR. Identification of essential oil components. In: Hashemi SMB, Khaneghah AM, Sant'Ana AdeS (Editors). *Essential Oils in Food Processing: Chemistry, Safety and Applications.* 1st Edition. Chichester: Wiley & Sons; 2017: 57-117. doi: <https://doi.org/10.1002/9781119149392.ch3>
- Babushok VI, Linstrom PJ, Zenkevich IG. Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *J Phys Chem Ref Data.* 2011; 40(4): 043101. doi: <https://doi.org/10.1063/1.3653552>
- González FR, Nardillo AM. Retention index in temperature-programmed gas chromatography. *J Chromatogr A.* 1999; 842(1-2): 29-49. doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00158-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00158-2)
- Davies NW. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. *J Chromatogr.* 1990; 503: 1-24. doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)81487-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)81487-4)
- Pawliszyn J (Editor). *Applications of solid phase microextraction.* RSC chromatography monographs. Ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1999: 1-655.
- Pawliszyn J (Editor). *Handbook of solid phase microextraction,* Beijing: Chemical Industry Press, 2009: 1-410.
- Kolb B, Ettre LS. *Static Headspace-Gas Chromatography. Theory and Practice.* New York: Wiley-VCH, 1997: 1-298.
- Tankiewicz M, Namieśnik J, Sawicki W. Analytical procedures for quality control of pharmaceuticals in terms of residual solvents content: Challenges and recent developments. *Trends Anal Chem (TrAC).* 2016; 80: 328-344. doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.09.008>
- Kitson FG, Larsen BS, McEwen CN. *Gas Chromatography and Mass Spectrometry. A Practical Guide.* San Diego, CA: Academic Press, 1996, 1 - 381.
- Gerhards P, Bons U, Sawazki J, Szigan J, Wertmann A. *GC/MS in Clinical Chemistry.* Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 1999: 1-241.
- Hafeez F, Zahoor AF, Ahmad S, Ahmad M, Faiz S. Recent progress in the synthesis of diclofenac based NSAIDs analogs/derivatives. *Synth Commun.* 2019; 49 (3): 325-350. doi: <https://doi.org/10.1080/00397911.2018.1515367>
- Eichler C, Cohen EA, Little JC. Assessing human exposure to chemicals in materials, products and articles: The international risk management landscape for phthalates. *Env Sci Technol.* 2019; 53(23): 13583-13597. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03794>
- The European Pharmacopeia, 5th Edition, Direction de la Qualité de Médicament du Conseil de l'Europe (2), 2005: 1532-1534.
- Roy J, Islam M, Khan A, Das SC, Akhteruzzaman M, Deb AK, et al. Diclofenac sodium injection sterilized by autoclave and the occurrence of cyclic reaction producing a small amount of impurity. *J Pharm Sci.* 2001; 90(5): 541-544. doi: [https://doi.org/10.1002/1520-6017\(200105\)90:5<541::AID-JPS1011>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/1520-6017(200105)90:5<541::AID-JPS1011>3.0.CO;2-O).
- Galmier MJ, Bouchon B, Madelmont JC, Mercier F, Pilotaz F, Lartigue C. Identification of degradation products of diclofenac by electrospray ion trap mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2005; 38(4): 790-796. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.02.016>
- Ferrer I, Thurman EM (Editors). *Liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. Principles, tools, and applications for accurate mass analysis.* A series of monographs on analytical chemistry and its applications. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., Publication; 2009: 1-262.
- The United States Pharmacopeia. *National Formulary (USP 41, NF 36).* Volume 1. Rockville (MD): United States Pharmacopeial Convention; Diclofenac; 2018: 1254.
- The British Pharmacopeia. *The British Pharmacopeia Commission.* The Stationary Office. Volume 1, UK. 1999: 494-495.
- Kromidas S (Editor). *The HPLC-MS Handbook for Practitioners.* Weinheim: WileyVCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2017: 1-233.
- El Haj BM, Al Ainri AM, Hassan MH, Khadem RK, Marzouq MS. The GC/MS analysis of some commonly used non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in pharmaceutical dosage forms and in urine. *Forensic Sci Int.* 1999; 105(3): 141-153. doi: [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(99\)00106-1](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(99)00106-1)
- www.drugs.com/diclofenac.html. 2020.

38. Rojas JD. Drogas naturistas: estudio de caso, Trabajo de Grado, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia, 2019: 101-102.
39. <http://pdr.net/drug-summary/Voltaren-XR-diclofenac-sodium-2033.6043>.
40. Grob K. Split and Splitless Injection in Capillary GC, with Some Remarks on PTV Injection, 3rd Enlarged and Revised Edition, Heidelberg: Hüthig Buch Verlag GmbH; 1993: 1-547.
41. Jaeger H (Editor). Capillary Gas Chromatography – Mass Spectrometry in Medicine and Pharmacology, Heidelberg: Dr. Alfred Hüthig Buch Verlag GmbH; 1987: 1-308.
42. Toyo'oka T (Editor). Modern Derivation Methods for Separation Sciences, Chichester, UK: John Wiley and Sons Ltd; 1999: 1-298.
43. Blau K, Halket J (Editors). Handbook of Derivatives for Chromatography, Second Edition, Chichester, UK: John Wiley and Sons Ltd, 1993: 1-370.
44. Snow N (Editor). Basic Multidimensional Gas Chromatography, London, UK: Academic Press; 2020: 1-330.
45. Ramos L (Editor). Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography. Amsterdam: Elsevier; 2009: 1-328.
46. López de Bustamante FM. Plantas medicinales y aromáticas. Estudio, cultivo y procesado. Madrid: Mundi-Prensa; 1987: 125-128.
47. Ministerio de la Protección Social. Vademécum colombiano de plantas medicinales. Bogotá, D.C., Colombia, 2008: 53-55.
48. Di Lorenzo C, Dell'agli M, Badea M, Dima L, Colombo E, Sangiovanni E, et al. Plant food supplements with anti-inflammatory properties: A systematic review (II), Crit Rev Food Sci Nutr. 2013; 53(5): 507-516. doi: <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.691916>
49. Food and Drug Administration (FDA). Spices and other natural seasonings and flavorings. Code of Federal Regulations. 1997, Title 21 §182.10.
50. Verma PK, Raina R, Agarwal S, Kour H. Phytochemical ingredients and pharmacological potential of *Calendula officinalis* Linn. Review Article. Pharm Biomed Res, 2018; 4(2): 1-17. doi: <https://doi.org/10.18502/pbr.v4i2.214>
51. Muley BP, Khadabadi SS, Banarase NB. Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): A review. Trop J Pharm Res. 2009; 8(5): 455-465. doi: <https://doi.org/10.4314/tjpr.v8i5.48090>
52. Arora D, Rani A, Sharma A. A review on phytochemistry and ethnopharmacological aspects of genus *Calendula*. Pharmacog Rev. 2013; 7(14): 179-187. doi: <https://doi.org/10.4103/0973-7847.120520>
53. Basch E, Bent S, Foppa I, Haskmni S, Kroll D, Mele M, et al. (National Standard Research Collaboration), Marigold (*Calendula officinalis* L.). J Herbal Pharmacother. 2006; 6 (3-4):135-159. doi: https://doi.org/10.1080/J157v06n03_08
54. European Medicines Agency. Assessment report on *Calendula officinalis* L., flos. 2008. Contract N°: EMEA/HMPC/179282/2007.
55. Chalchat JC, Garry RP, Michet A. Chemical composition of essential oil of *Calendula officinalis* L. (Pot Marigold). Flav Fragr J. 1991; 6: 189-192. doi: <https://doi.org/10.1002/ffj.2730060306>
56. Gazim ZC, Rezende CM, Fraga SR, Filho BP, Nakamura CV, Garcia DA. Analysis of the essential oils from *Calendula officinalis* growing in Brazil using three different extraction procedures. Bras J Pharm Sci, 2008; 44(3): 391-395. doi: <https://doi.org/10.1590/S1516-93322008000300008>
57. Sharapin N. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Santafé de Bogotá, D.C: CYTED – Convenio Andrés Bello, Secretaría Ejecutiva del Convenio Andrés Bello (SECAB); 2000: 1-256.
58. Barthel HR, Axford-Gatley RA. Topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis. Postgrad Med. 2010; 122(6): 98-106. doi: <https://doi.org/10.3810/pgm.2010.11.2227>
59. Purcell P, Henry D, Melville G. Diclofenac hepatitis. Gut. 1991; 32(11): 1381-1385. doi: <https://doi.org/10.1136/gut.32.11.1381>
60. Hippisley-Cox J, Coupland C. Risk of myocardial infarction in patients taking cyclo-oxygenase-2 inhibitors or conventional non-steroidal anti-inflammatory drugs: population based nested case-control analysis. Brit Med J. 2005; 330(7504): 1366. doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.330.7504.1366>
61. Hippisley-Cox J, Coupland C, Logan R. Risk of adverse gastrointestinal outcomes in patients taking cyclo-oxygenase-2 inhibitors or conventional non-steroidal anti-inflammatory drugs: population based nested case control analysis. Brit Med J. 2005; 331(7528): 1310-1316. doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.331.7528.1310>
62. Richey F, Bruyere O, Ethgen O, Rabenda V, Bouvenot G, Audran M, et al. Time dependent risk of gastrointestinal complications induced by non-steroidal anti-inflammatory drug use: a consensus statement using a meta-analytic approach. Ann Rheum Dis, 2004; 63(7): 759-766. doi: <https://doi.org/10.1136/ard.2003.015925>
63. Whelton A, Hamilton CW. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: effects on kidney function. J Clin Pharm. 1991; 31(7): 588-598. doi: <https://doi.org/10.1002/j.1552-4604.1991.tb03743.x>
64. Banks A, Zimmerman H, Ishak K, Harter J. Diclofenac-associated hepatotoxicity: analysis of 180 cases reported to the food and drug administration as adverse reactions. Hepatology. 1995; 22(3): 820-827. doi: <https://doi.org/10.1002/hep.1840220320>
65. Yanaka A, Zhang S, Sato D, Tauchi M, Suzuki H, Shibahara T, et al. Geranylgeranylacetone protects the human gastric mucosa from diclofenac-induced injury via an induction of heat shock protein 70. Digestion. 2007; 75(2-3): 148-155. <https://doi.org/10.1159/000106756>
66. Ungprasert P, Cheungpasitporn W, Crowson C, Matteson E. Individual non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of acute kidney injury: A systematic review and meta-analysis of observational studies. Eur J Int Med. 2015; 26(4): 285-291. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2015.03.008>
67. Aun MV, Blanca M, Garro LS, Ribeiro M, Kalil J, Motta AA, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs are major causes of drug-induced anaphylaxis. J Allerg Clin Immunol: In Practice, 2014; 2(4): 414-420. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaip.2014.03.014>
68. Nayyar G, Breman J, Mackey T, Clark J, Hajjou M, Littrell M, et al. Falsified and substandard drugs: Stopping the pandemic. Amer J Trop Med Hyg. 2019; 100(5): 1058-1065. doi: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-098>
69. WHO. WHO Member State Mechanism on Substandard/Spurious /Falsely labelled/Falsified/Counterfeit (SSFFC) Medical Products. 2017; http://www.who.int/medicines/regulation/ssffc/A70_23-en1.pdf.
70. OECD/EUIPO. Trends in Trade in Counterfeit and Pirated Goods, Illicit Trade, OECD Publishing, Paris/European Union Intellectual Property Office, 2019. <https://doi.org/10.1787/g2g9f533-en>.
71. World Bank. How does the World Bank classify countries? Washington (DC): World Bank; 2016 (<https://datahelpdesk.worldbank.org/knowledgebase/articles/378834-how-does-the-world-bank-classify-countries>).
72. A study on the public health and socioeconomic impact of substandard and falsified medical products. Geneva: World Health Organization, WHO, 2017. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
73. Decreto 1156 de 2018. Por el cual se reglamenta el régimen de registro sanitario de productos fitoterapéuticos y se dictan otras disposiciones. Ministerio de Salud y Protección Social, República de Colombia. 2018: 1-25.