

"SINTESIS , SEPARACION Y PURIFICACION DE LAS  
FENIL-PIRIDINAS" Por: M. Ewert, L. C. Niño,  
A. T. de Kumpis y E. Ayuso

INTRODUCCION.

El presente artículo, forma parte del trabajo de Tesis: "Influencia del Solvente Orgánico sobre los Espectros Electrónicos de las 2,3 y 4 fenil-peridinas", que tiene como objeto, hallar una correlación existente entre los desplazamientos de las longitudes de onda de máxima absorción y el carácter químico del solvente empleado; como parte de las investigaciones mecano-cuánticas, que actualmente se realizan en la sección de Físico-química.

Se escogieron los tres isómeros de la fenil-piridina, para llevar un método de trabajo uniforme, que permitiera una comparación entre nuestros datos experimentales y los obtenidos por los Profesores José Luis Vilalvezes y Guillermo Hernández, en su trabajo de Tesis, quienes estudiaron la molécula de Bifenilo.

Los solventes empleados por los mencionados autores y sus métodos de purificación, son los mismos que hemos usado, para tener un mayor criterio de correlación entre los dos experimentos.

1. SINTESIS.

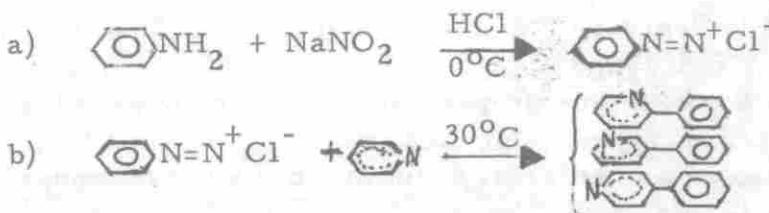
El método escogido en este trabajo, fué el de Haworth, Heilbron y Hey, que consiste en la acción de una solución ácida de cloruro de benceno-diazonio, preparada a partir de anilina<sup>(1)</sup>, sobre piridina a 30°C.

La reacción se completó por calentamiento durante 1 hora en baño de vapor de agua. A continuación, el pro-

ducto de la reacción fué tratado con NaOH acuoso y concentrado, extrayendo por decantación la capa superior piridínica. El siguiente paso que recomienda el autor, la extracción de los isómeros con éter fué omitido, con el fin de aumentar el rendimiento de los compuestos. La técnica indica luego una destilación fraccionada al vacío; esta parte fué modificada teniendo en cuenta, que el producto que se va a destilar contiene piridina, agua y otras sustancias volátiles, que por su bajo punto de ebullición, hacen la destilación al vacío tumultuosa y difícil de controlar. Por lo tanto, para obviar estos problemas, hicimos una destilación a presión normal ( 560 mm Hg ) hasta una temperatura de 110°C, para separar la mayor parte de sustancias que a baja presión son demasiado volátiles. Este procedimiento evita, también, que las bombas de vacío sufran daño por contaminación del aceite.

Una vez efectuada esta operación, la destilación al vacío se hace uniforme, sencilla y fácil de llevar a cabo. Se recogió la fracción que destiló entre 170° - 200°, a una presión de 200 mm de Hg (medida a la salida del refrigerante) y que contenía la mezcla de los tres isómeros en una mayor concentración.

Los resultados obtenidos con la síntesis antes mencionada, nos permiten recomendarla como un método sencillo y fácil para la producción de los tres isómeros de la fenilpiridina. Si bien el rendimiento total es bajo (15 - 20%), la utilización de reactivos tan comunes como piridina, anilina, nitrito de sodio, etc., hacen que éste método sea en extremo viable y económico. El rendimiento de la reacción es bajo, debido a que es necesario hacer la síntesis en dos pasos, el primero la formación del cloruro de benceno-diazonio ( compuesto instable a temperaturas mayores de 5°C ) y segundo, el goteo de esta solución sobre un baño de piridina a 30°C, según las reacciones expuestas a continuación :



La piridina tiene un efecto orientador orto-para<sup>(2)</sup> para las reacciones con las sales de cloruro de benceno-diazonio, pero hemos de tener en cuenta que en nuestro caso, estamos goteando una solución ácida de la sal de diazonio y que, por lo tanto, se irá formando la sal de piridinio que tiene un clásico efecto orientador a meta<sup>(3)</sup>. Esto nos explica, por qué en nuestro caso se forman los tres isómeros del compuesto.

Debido a la pequeña cantidad de sustancia necesaria para la determinación de los Espectros U V e I R, objetivo de nuestro trabajo, operamos tanto en el proceso de síntesis como en el de separación y purificación a escala micro.

Los espectrofotómetros y cromatógrafos, que actualmente posee el Departamento de Química, nos permitieron el desarrollo de esta nueva modalidad en la práctica de laboratorio.

## 2. SEPARACION.

Haworth, Heilbron y Hey<sup>(4)</sup> mencionan en su reporte un método de separación de los tres isómeros de la fenilpiridina, que se basa en la cristalización fraccionada, en acetona, de los picratos de los tres isómeros. Este método fué aplicado en el la boratorio encontrándose graves inconvenientes debido a su baja recuperación y a los numerosos pasos que implica una pureza aceptable; ya que una vez purificados los picratos se hace necesaria la descomposición de los mismos por una solución alcohólica de KOH y posterior purificación de las fenilpiridinas así obtenidas.

Teniendo en cuenta las anteriores consideraciones y ba-

sados en el hecho de que cada uno de los isómeros presenta polaridades diferentes, se investigaron otros métodos de separación y purificación; llegándose a la conclusión de que la cromatografía reunía las condiciones necesarias.

En investigaciones anteriores (5, 6), los tres isómeros fueron separados por cromatografía de columna, utilizando alúmina impregnada con una sal metálica. A continuación se purificaban los compuestos por ella retenidos.

En base a esta técnica, efectuamos en primer término, una cromatografía en capa delgada determinando el solvente adecuado por medio de varias pruebas. La mejor separación la obtuvimos sobre una placa de Silica Gel G activa, usando como eluente una mezcla de clohexano-éter en proporción 8:1.

Para determinar las franjas correspondientes a cada una de las fenilpiridinas, se reveló la placa con vapores de yodo.

Este método es útil como determinación cualitativa de los compuestos, pero una separación cuantitativa es poco recomendable; puesto que los límites de las franjas de cada isómero, no están bien definidos y el compuesto separado sería, bastante impuro.

Otra técnica cromatográfica que presenta una mayor facilidad de operación y mejores resultados es la cromatografía de gases. Este método de separación no ha sido reportado hasta ahora por autor alguno, por lo cual tuvimos la necesidad de estandarizar y acondicionar la técnica, aplicada a los tres isómeros de la fenilpiridina.

El instrumento utilizado fué el Cromatógrafo de Gases PERKIN-ELMER 820, con detector de conductividad térmica, que permite la recuperación total de los

compuestos inyectados. Este modelo es esencialmente analítico, pero hicimos algunos cambios y acondicionamos algunos elementos para convertirlo en semipreparativo y así poder separar y purificar las cantidades necesarias, para cumplir el objetivo de nuestro trabajo.

### ACONDICIONAMIENTO DEL INSTRUMENTO.

#### 1. Preparación de una columna semipreparativa. -

Para la cromatografía semipreparativa tuvimos la necesidad de preparar una columna cuyo diámetro y longitud nos permitiera inyectar una cantidad de muestra superior a la que se realizó con las columnas que posee el Departamento de Química en su Sección de Análisis Instrumental. El material escogido para la columna fué el aluminio, que presenta un bajo costo frente a otros materiales como acero inoxidable, etc., y que, además presenta poca reactividad y una gran maleabilidad para adaptarse al horno del cromatógrafo.

Las dimensiones de esta columna fueron : 1/4" de diámetro externo y 13 pies de longitud, que nos permiten inyecciones diez veces mayores que las admitidas por una columna analítica de 1/8" de diámetro y 6 pies de longitud.

Para aumentar la capacidad de la columna, se incrementó el porcentaje de fase líquida a un 20%, mientras que los analíticos solo tienen un 12%; se varió también el tamaño de la partícula del soporte sólido a una dimensión de 60-80 mallas ( las columnas analíticas tienen un soporte sólido de 80-100 mallas ).

En la preparación del empaque de la columna (conjunto de soporte sólido y fase líquida), se siguió la técnica que recomiendan McNair y Bonelli<sup>(7)</sup> y cuyos aspectos más fundamentales son :

- a) Tratamiento de la columna metálica con una solución

- de soda acuosa, con el fin de quitarle toda la materia grasa presente.
- b) Lavado con agua destilada, hasta respuesta negativa al papel tornasol.
  - c) Lavado con acetona y secado a temperatura ambiente.
  - d) Tapar uno de los extremos de la columna metálica con lana de vidrio y conectar a una línea de vacío, con el objeto de efectuar una succión por este extremo.
  - e) Colocar la columna metálica, en posición vertical y agregar por el extremo abierto el soporte sólido puro; al mismo tiempo se provoca la succión, y con un vibrador se mantiene la columna en vibración. Esta operación es necesaria para facilitar el perfecto empaque de la columna.
  - f) Una vez empacada la columna, se procede a extraer todo el soporte sólido, para conocer la cantidad exacta de éste y poder así calcular la cantidad de fase líquida requerida para la preparación del empaque.
  - g) Teniendo ya las cantidades de fase líquida y soporte sólido, se disuelve la fase líquida en cloroformo y se agrega lentamente el soporte sólido. Se calienta esta mezcla en un evaporador rotatorio, para extraer todo el cloroformo presente y también para que las partículas del empaque adquieran un tamaño uniforme, al igual que su espesor de fase líquida. De esta forma el "empaque" presenta una apariencia regular que no difiere en mucho del soporte sólido ya que no deben presentarse grumos, lo cual indicaría un calentamiento insuficiente.
  - h) Con el empaque preparado, se procede a llenar la columna siguiendo la misma técnica antes descrita, tapando al final ambos extremos de la columna con lana de vidrio. La columna se enrolla luego, teniendo la precaución de no hacer codos demasiado agudos, ni

círculos cuyo diámetro sea menor de 3 pulgadas; de lo contrario, la columna quedará más comprimida en estas secciones.

- i) Por último, se lleva a cabo el proceso de "purgado" de la columna, que consiste en general, en calentar la misma a una temperatura ligeramente inferior a la máxima permitida por la fase líquida y pasar a través de ella una corriente muy rápida de gas para extraer el exceso de fase líquido y todas las impurezas.

Este tratamiento debe durar entre 24 y 36 horas. La columna queda así, lista para el trabajo cromatográfico.

## 2. Variaciones en la inyección de muestra.-

La teoría de la cromatografía de gases, nos indica que el incremento en la cantidad de muestra inyectada, trae como resultado una disminución en la eficiencia de la columna para separar los componentes de una mezcla. - Esto nos explica, por qué la inyección en el caso analítico no fué mayor del 10  $\mu$ l, mientras que en el semipreparativo llegó a 50  $\mu$ l, sacrificando así la eficiencia de la columna, por la cantidad de muestra inyectada.

## 3. Modificación de la corriente del detector.

Como consecuencia del aumento en la cantidad de inyección para la cromatografía semipreparativa, la corriente que pasa por los filamentos del detector tuvo que ser disminuida de 150 mamp a 100 mamp; para evitar que sufriera daño los mismos por el aumento de muestra. - Aunque esto significa una pérdida en la sensibilidad de la respuesta del detector, queda compensada por la cantidad de muestra inyectada.

## 4. Calentamiento térmico de la salida del detector.

Puesto que la temperatura en el interior del detector se mantiene constante a  $265^{\circ}\text{C}$ , es lógico suponer que

compuestos con puntos de ebullición cercanos a este valor, puedan condensarse fácilmente a temperatura ambiente.

Esto sucede con los conductos de salida del detector a la atmósfera; por lo cual, fué necesario calentarlos mediante el empleo de una resistencia eléctrica, para evitar que a medida que los compuestos salgan, se condensen en el tubo y se obtengan mezclas de varias sustancias que ya habían sido separadas en la columna. La temperatura de la resistencia se mantuvo por encima de la temperatura del detector.

Fué necesario colocar un tubo de vidrio entre la resistencia y la salida del detector, para aislar esta última, ya que posee corriente proveniente de los circuitos eléctricos del instrumento. (Esquema No.1)

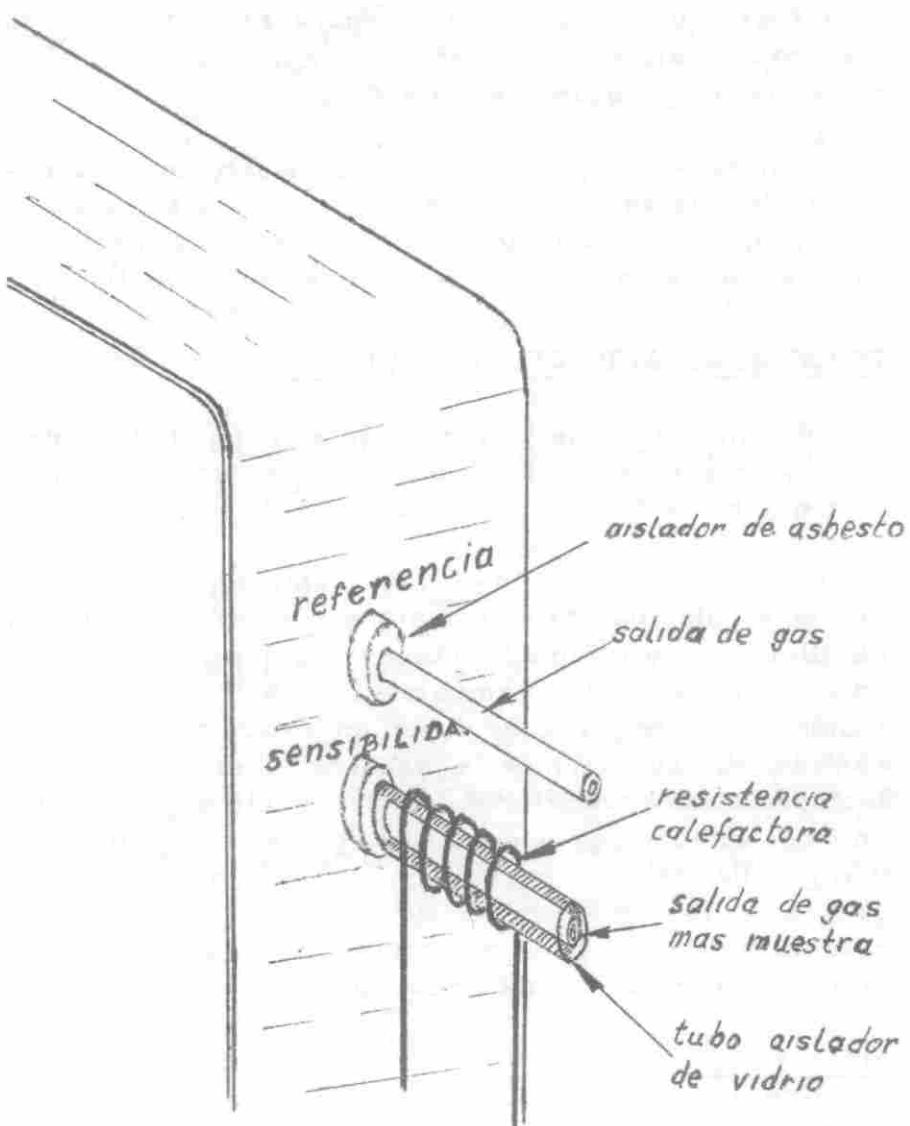
### ESTANDARIZACION DE LA TECNICA:

Son numerosos los factores que se deben tener presentes, cuando se trata de estandarizar una técnica nueva y que no se halla en la literatura.

Para la cromatografía de gases son importantes: el tipo y polaridad de la sustancia a separar y punto de ebullición de la misma, factores que determinan el tipo de columna, flujo, temperaturas en el inyector, columna y detector, que se deben emplear, así como la cantidad de inyección de la muestra. Pero aún, con las condiciones anteriores, es necesario experimentar un buen número de veces para llegar a las condiciones óptimas de trabajo, puesto que la teoría nos permite prever sólo con aproximación como afectarán las variaciones de uno de los parámetros, antes citados, la separación de los componentes de una mezcla.

Selección de la columna. - En razón de los puntos de ebullición tan cercanos de las fenilpiridinas (Ver tabla III), la separación cromatográfica no puede basarse en

FIG. 1.- DETALLE DEL DETECTOR DEL CROMATOGRAFO MODELO 820 ACONDICIONADO PARA LA CROMATOGRAFIA SEMI-PREPAREATIVA.



esta propiedad física. En cambio, las polaridades de estos compuestos son marcadamente diferentes, lo que nos permite pensar que una columna con fase líquida polar, pueda efectuar una buena separación. Esta conclusión fué confirmada por el uso de columnas de fase líquida no polar como el APIEZON (hidrocarburos de alto peso molecular) y también de columnas de baja polaridad como el SE30 (Siliconas) que dieron resultados negativos. En vista de esto, utilizamos una columna con fase líquida polar como es la B D S (Poliéster de succinato de butanodiol), cuyo soporte sólido específico es el Chromosorb W. El resultado de esta separación se encuentra en el Apéndice y corresponde al cromatograma analítico del producto de la síntesis de los tres isómeros.

Es de notar que la bibliografía consultada <sup>(8)</sup> recomienda la fase líquida B D S para separaciones de ácidos grasos, ésteres y éteres, pero que no está indicada para separaciones de compuestos aromáticos heterocíclicos, como es nuestro caso. En cambio recomienda como fase líquida el tipo SE 30, antes mencionado y el XE60 (nitrilo de silicona) <sup>(9)</sup> <sup>(10)</sup>, que son compuestos no polares.

#### Determinación de las temperaturas. -

a. Del Inyector. - Es de conocimiento general que la temperatura del inyector debe facilitar una vaporización casi instantánea de la muestra inyectada. De esta forma, se hace necesario conocer previamente el punto de ebullición de los compuestos a separar, para mantener la temperatura en el inyector 10°C aproximadamente por encima de éste.

b. De la columna. - En principio, la columna debe tener una temperatura ligeramente inferior al punto de ebullición de las sustancias. Pero en nuestro caso, la temperatura máxima permitida por la columna, es -

225°C, lo que supone trabajar a 40°C por debajo del punto de ebullición de las fenilpiridinas.

Esto tiene la ventaja, de permitir un mayor número de procesos de solubilización de la muestra en la fase líquida, aumentando la eficiencia de ésta en la separación cromatográfica.

c. Del Detector. - Debe ser tal que no permita la condensación de la sustancia en el mismo y por ende, ligeramente superior al punto de ebullición.

#### Flujo de Gas Transportador. -

Se escogió como gas transportador el Helio, debido, a su facilidad de arrastre de la muestra. El flujo del mismo fue el mínimo permitido por el detector, con el objeto de facilitar una mayor separación de los compuestos, porque aumenta el tiempo de retención de los mismos.

#### Recolección de Muestras. -

En la separación cromatográfica, las muestras fueron recogidas sobre la pared interior de un tubo de ensayo pequeño y a temperatura ambiente. El tiempo de recolección de las sustancias está relacionado con la separación de los picos cromatográficos; esto es, en una buena resolución de los picos se puede recoger la muestra desde el momento inicial de detección de la sustancia hasta que ésta haya salido completamente.

En nuestro caso, sólo nos fué posible recoger fracciones en la parte correspondiente al máximo de cada pico, debido a que los tres isómeros salían en un pico ancho dividido en tres partes. Este resultado se debió a una mayor proporción del isómero 2, que cubría los otros picos, y a que los tiempos de retención de los tres compuestos son bastante cercanos. (Ver Apéndice, Cromatograma semipreparativo).

## TABLA I

Cantidad de Muestra Inyectada :	50 ul
Tipo de Columna :	B D S
Diámetro :	1/4 "
Longitud :	13'
Soporte Sólido :	Chromosorb W.
Fase Líquida :	Poliéster de succinato de butanodiol 20%
Temperatura del Inyector :	265°C
T. del Detector :	265°C
T. de la Columna :	210°C
Corriente en el Detector :	100 mamp.
Atenuación :	8
Flujo de Helio :	22,2 ml/min

3. PURIFICACION.

Las fracciones recogidas por el método anteriormente descrito, fueron sometidas a un proceso de cromatografía analítica, con el fin de determinar la pureza de cada uno de los compuestos.

Los resultados obtenidos daban un isómero en mayor proporción que los otros, pero con cantidades considerables de los otros dos.

Como en la técnica espectrofotométrica es necesario utilizar compuestos con el máximo grado de pureza posible, estos resultados no eran satisfactorios. Así fué necesario someter cada fracción a un método de purificación, que en esencia es el mismo de la cromatografía semipreparativa; con la diferencia de que se disminuyó la cantidad de muestra de 50  $\mu$ l a 20  $\mu$ l.

Esto con el fin, de aumentar la eficiencia de la columna y obtener una mejor separación, para aumentar el grado de pureza de las sustancias.

Los isómeros 2 y 3 de la fenilpiridina fueron purificados tres veces y para el isómero 4 sólo se necesitaron dos purificaciones; éstas últimas fueron llevadas a cabo solubilizando este compuesto en piridina, puesto que es sólido a temperatura ambiente.

Las cantidades aproximadas obtenidas de los tres isómeros fueron :

2 - Fenilpiridina : 50  $\mu$ l

3 - Fenilpiridina : 40  $\mu$ l

4 - Fenilpiridina : 20 mgr.

Con las fracciones finales de los isómeros purificados

se determinaron cromatogramas analíticos ( Ver Apéndice ), con los cuales nos fué posible calcular el grado de pureza de los compuestos obtenidos. Este cálculo fué hecho siguiendo el método de triangulación de picos y su resultado se dió como porcentaje relativo.

TABLA II

CONSTANTES FISICAS DE LAS FENILPIRIDINAS

Propiedad	2 Fenil- piridina	3 Fenil- piridina	4 Fenil- piridina
Punto de - Fusión (a)			70°C
Punto de - ebullición(b)	264°C	264°C	270°C
Densidad (a)	1	1	
Apariencia(a)	Aceite in coloro	Aceite in coloro	Sólido blanco
Pureza Obte- nida (a)	99.7 %	99.3 %	100 %
Momento Di- polar Debye (c)	1.71	2.45	2.50

- a) Datos experimentales obtenidos en este trabajo,
- b) Lange, Hand book
- c) Sobczyk, Trans. Faraday Soc. 57, 1042 ( 1961 )

TABLA III

## CONDICIONES CROMATOGRAFICAS

Tipos de Análisis	Muestra y Cantidad	Tipo de tro.	Diáme ro,	Long- itud	T. del Inyector	T. del Detector	Cte. columna	T. de la columna	Cte. del nua	Ate- na	Flujo de Helio
			Colum na	pulg.	Pies						
Purifi cación 3)	1) 2f. p. impura 3f. p. 4f. p.	BDS " " " "	1/4	13	265°C	265°C	210°C	100	8	22,2	
							mamp				ml/min
Determi- nación del grado de pureza	2, 3 y 4 f. p. purifi- cadas 0, 2 ul	BDS	1/8	12	270°C	275°C	212°C	150	2	24,0	
							mamp				ml/min

Nota. - f. p. = Fenilpiridina

### C. IDENTIFICACIÓN.

Un método moderno de identificación de compuestos es la determinación de sus Espectros en el Infrarrojo, observando la forma general de los picos y en nuestro caso las sustituciones características de compuestos orto, meta y para.

Los isómeros 2 y 3 de la fenilpiridina son líquidos, por lo tanto sus espectros fueron determinados por el método de película; el isómero 4 es sólido y su espectro fué determinado por el método de pastilla utilizando 1,8 mg del compuesto en 300 mg de KBr. El instrumento utilizado fué un Espectrofotómetro Infrarrojo PERKIN-ELMER Modelo 137.

La literatura (11) menciona los espectros IR de los isómeros 2 y 4, los cuales coinciden totalmente con los que obtuvimos experimentalmente; de esta manera pueden considerarse identificados. Por otra parte, teniendo en cuenta que la síntesis esta dirigida a la obtención de los tres isómeros, que las concentraciones relativas en la mezcla corresponden a la literatura y que el orden de salida en el cromatograma corresponde al orden de polaridad de los compuestos, concluimos que el otro espectro obtenido corresponde a la 3 fenilpiridina; además, esto queda comprobado en la región comprendida entre 1.200 m u y 1.500 m u, cuyas bandas corresponden exactamente a la sustitución meta en el anillo piridínico (Apéndice, Espectros IR de los tres isómeros ).

Nuestro Agradecimiento a la Sección de Análisis Instrumental; en especial a la Dra. Ruth de Estrada y al Dr. Manuel Rozo del Instituto de Investigaciones Tecnológicas, por su colaboración durante la investigación .

Bibliografía

1. Gatterman y Wieland. " Prácticas de Química " , pag. 278.
2. Calderon E. " Determinación de Estructuras Moleculares " Métodos Básicos de Síntesis Orgánica, pag.179
3. Hine J. , " Physical Organic Chemistry " , Mc Graw Hill, New York, 1961 , pag. 471.
4. Haworth J.H. , Heilbron I.M. , Hey D.H. , J. Chem. Soc. 352 ( 1940 )
5. Chumakov Yu. I. , Lugovskoi E.V. , URSS , 180, 601 ( Cl. C07d ) March 26 , 1966
6. Michio Okuda , Nippon Kagaku Zasshi , 82, 1287-90 ( 1961 )
7. Mc Nair H.M. , E.J. Bonelli , " Basic Gas Chromatography " Varian Aerograph , pag. 223 , 1968.
8. Ettre L.S. , Averill W. , Kabot F.J. , " Gas Chromatography Analysis of Fatty Acids " , Gas Chromatography applications pag. 4, 1964.
9. Wilk S. et. al. Clin, Chim. Acta, 10 # 2 , pag. 193 August , 1964.
10. Fales H.M., Anal. Biochem. 3 , pag. 337, March 1962.
11. Colección Satdler de Espectros.

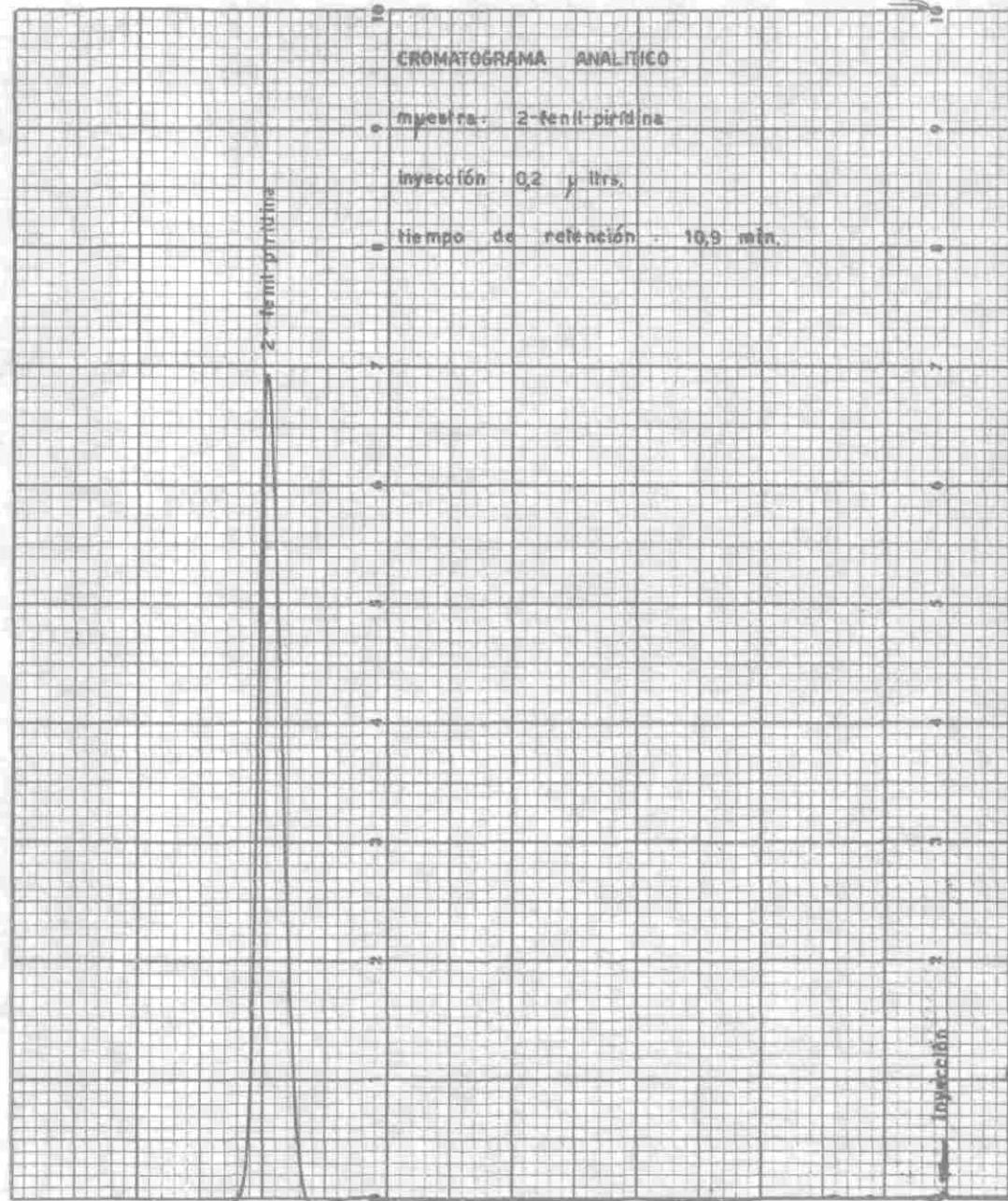
El equipo usado en este trabajo, fué adquirido; gracias a préstamos del BID.

CROMATOGRAMA ANALITICO

muestra: 2-terti-pirolina

inyección: 0.2  $\mu$  ltrs.

tiempo de retención: 10.9 min.



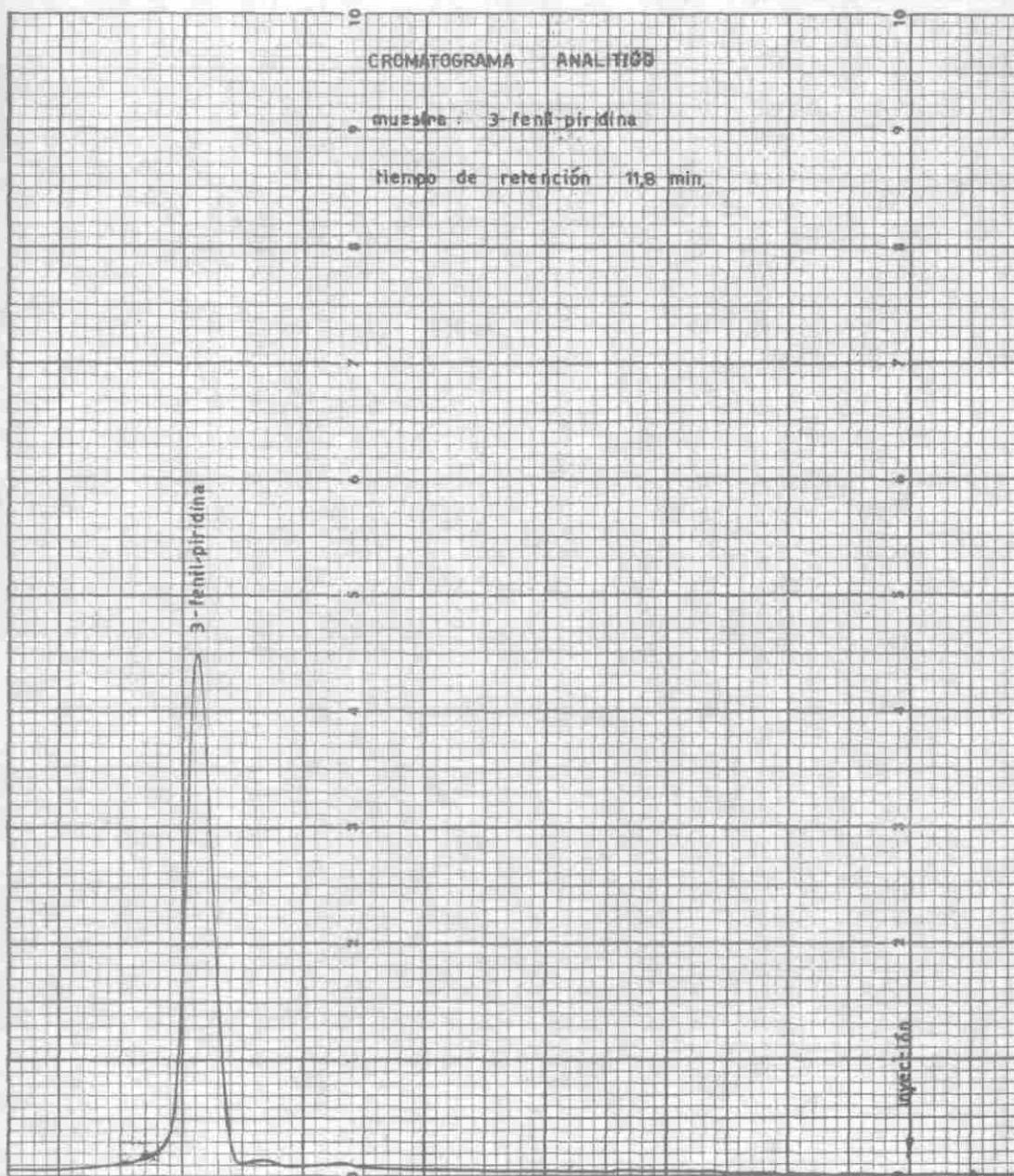
CHROMATOGRAMA ANALITICO

Muestra : 3-fenil-piridina

Tiempo de retención 11.8 min.

3-fenil-piridina

injetada



CHROMATOGRAMA ANALITICO

muestra : solución de 4-fenil-piridina

en piridina

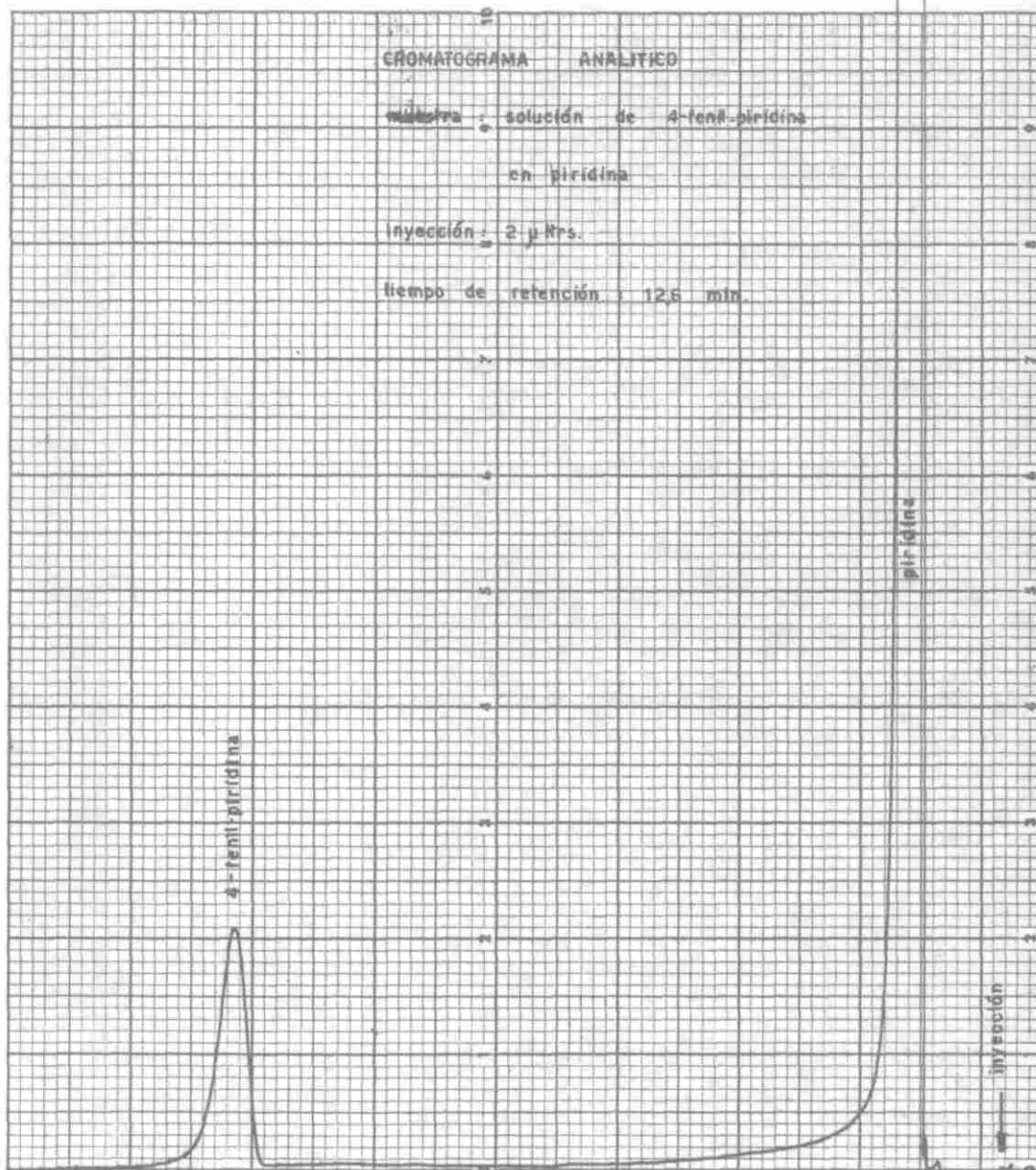
inyección : 2  $\mu$  lrs.

tiempo de retención : 12,6 min.

4-fenil-piridina

inyección

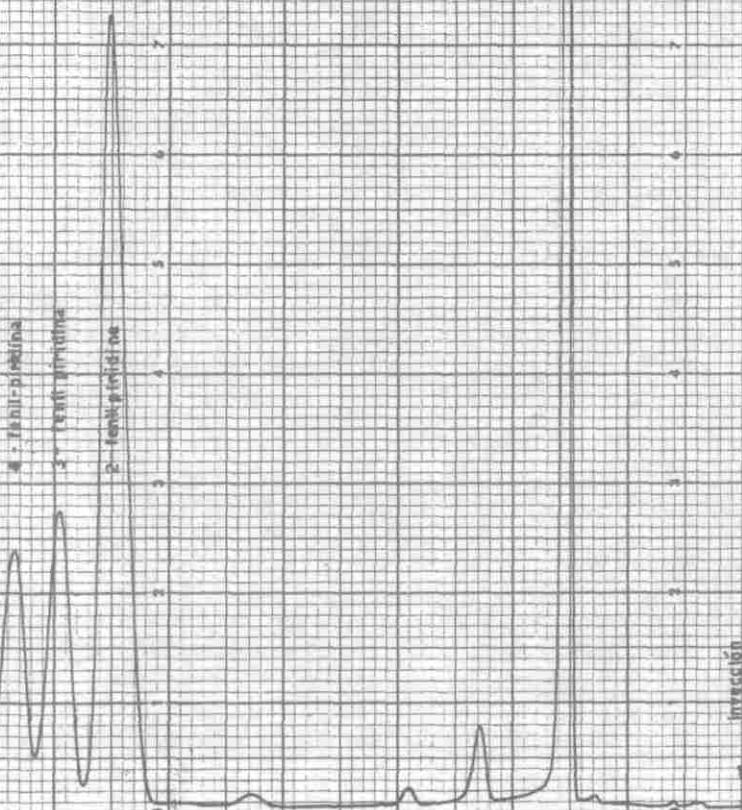
piridina



CHROMATOGRAM ANALYTIC

muestra - producto de la síntesis

inyección : 0.4 microlitros.



CHROMATOGRAMA

SEMI-PREPARETIVO

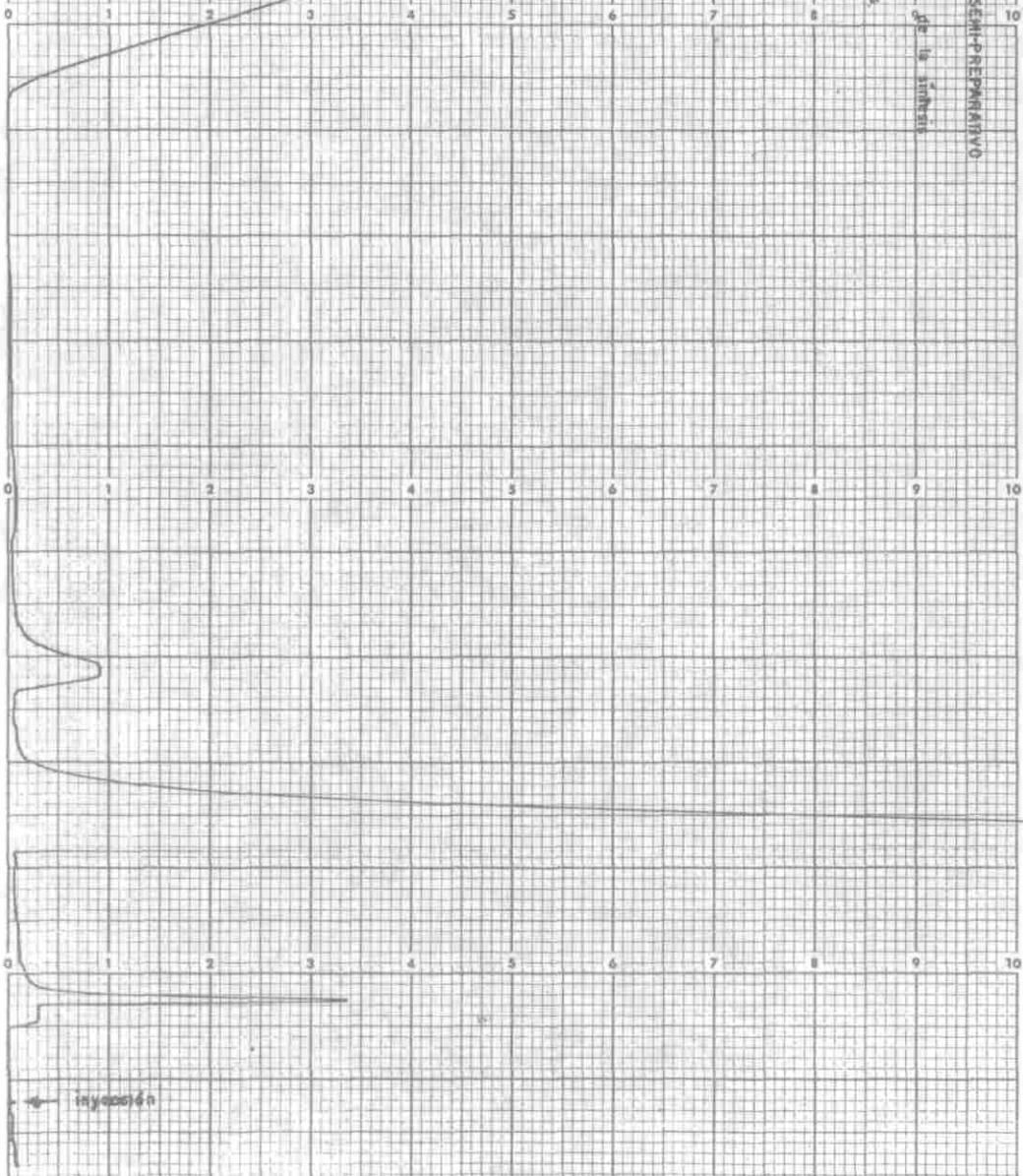
mucha = producto de la síntesis

injeción = 50  $\mu$ lts.

2-fenil-piridina

2-fenil-piridina

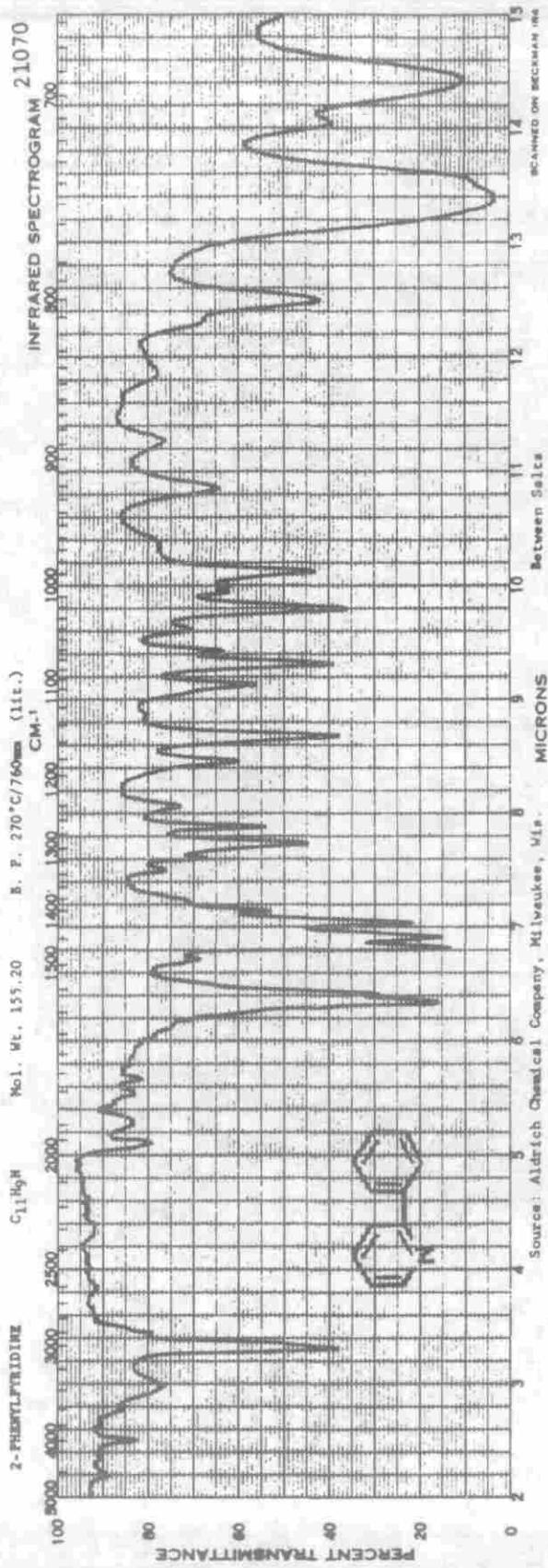
2-fenil-piridina

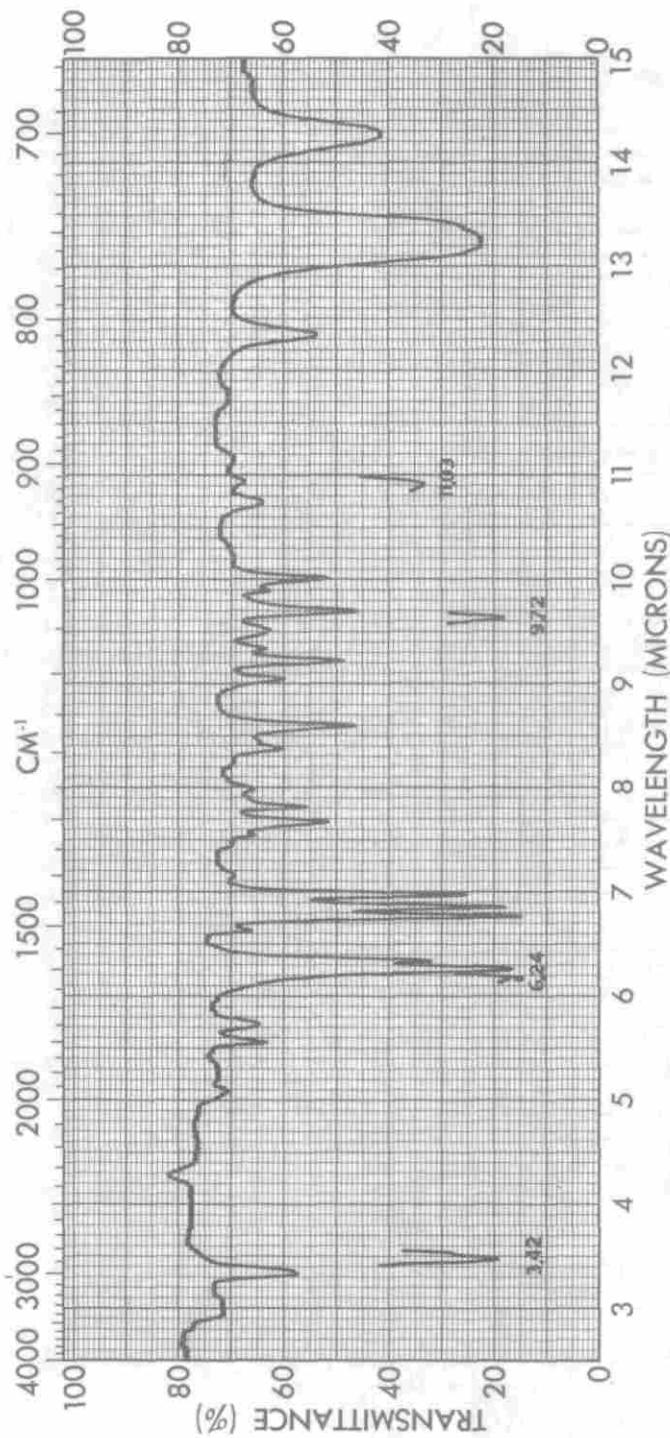


SADTLER

STANDARD SPECTRA

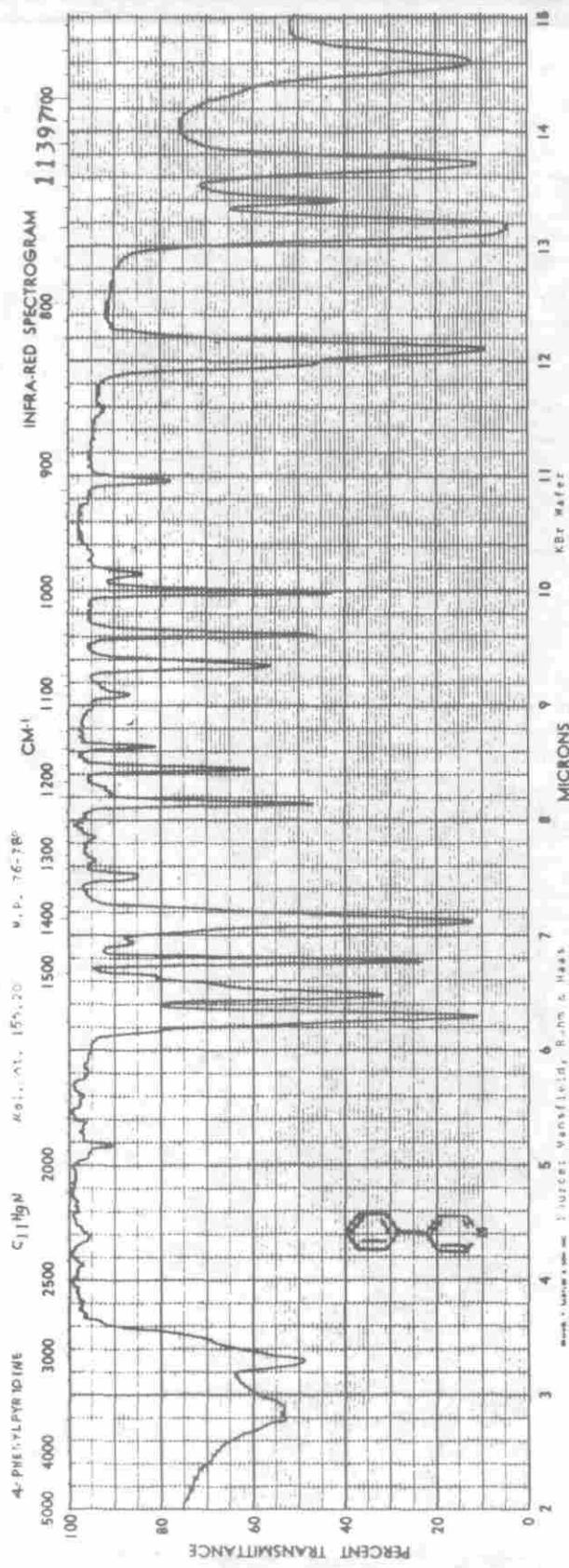
MIDGE I DUNN





SPECTRUM NO.	ORIGIN	LEGEND	REMARKS
SAMPLE	2 - tenk - piridina	Inst. Perkin Elmer	
	PURITY	cromatográfica	mod. 137
	PHASE	líquida	DATE
	THICKNESS	pelicula	OPERATOR E. Ayuso

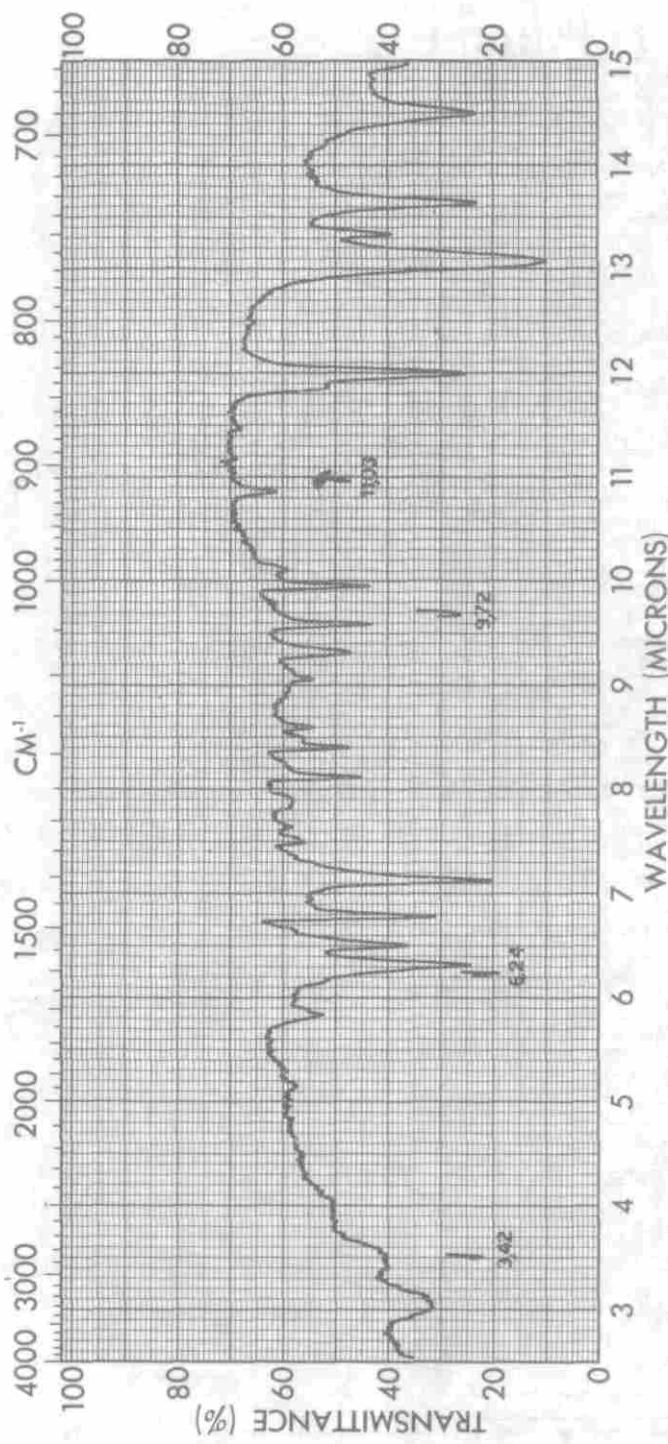
SPECTRUM NO.  
SAMPLE \_\_\_\_\_



STANDARD SPECTRA



MINI-GET EDITION



SPECTRUM NO. \_\_\_\_\_  
SAMPLE \_\_\_\_\_

SPECTRUM NO. _____	ORIGIN _____	LEGEND _____	REMARKS _____
SAMPLE 4 - fenil-piridina	1.		conc. : 1,5 mg./s. en
PURITY cromatográfica	2.		300 de KBr
PHASE sólida		DATE _____	Inst. Perkin Elmer
THICKNESS _____		OPERATOR A.T. de Kumpf	mod. 137

