

T  
544.92  
L864S  
1978  
F.C.C. QQ

091  
Ed  
UES BIBLIOTE  
  
INVENTARIO: 10

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

"SEPARACIÓN DE CAFÉINA POR CROMATOGRFÍA EN CAPA FINA  
Y CUANTIFICACIÓN POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN"

TESIS

PRESENTADA POR:

ANA MARIBEL ODETTE LÓPEZ HERNÁNDEZ

PREVIA A LA OPCIÓN DEL TÍTULO DE:

LICENCIADA

EN

QUÍMICA Y FARMACIA

ENERO 1978

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMÉRICA



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
CONSEJO DE ADMINISTRACIÓN PROVISIONAL

SECRETARIO:

DR. RAFAEL ANTONIO OVIDIO VILLATORO

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANO:

DR. AMILCAR AVENDAÑO Y ORTIZ

SECRETARIA:

DR. MARIA GLADYS DE MENA GUERRERO

ASESOR

DRA. ELIZABETH BANEGAS DE SALAZAR

JURADO DE TESIS

DRA. LETICIA CALDERON DE MACHADO

DRA. ALICIA PINEDA NUÑEZ

DRA. SILVIA RUTH MARTINEZ

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elizabeth Banegas de Salazar, por su colaboración y oportuna dirección. A las Dras. Miembros del Jurado Calificador y a todas las personas que en una u otra forma demostraron su interés en este trabajo, contribuyendo así a su realización.

# DEDICATORIA

A DIOS TODOPODEROSO

A MIS PADRES:	Roberto López Barrera y Teresa Hernández de López con amor, respeto y gratitud
A MI ABUELITA:	Con cariño y respeto
A MIS HERMANOS:	Con cariño
A MIS PROFESORES:	Con respeto y agradecimiento
A MIS FAMILIARES, COMPA ÑEROS Y AMIGOS:	Con afecto sincero

# Í N D I C E

	<u>Pag. #</u>
I - INTRODUCCIÓN	1
A) OBJETIVO	2
B) GENERALIDADES	3
C) REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
II - PARTE EXPERIMENTAL	16
A) EQUIPO	17
B) METODOLOGÍA	17
C) MÉTODOS	20
1. METODO PROPUESTO	20
2. METODO OFICIAL	24
3. FORMULAS ESTADISTICAS APLICADAS	25
III - RESULTADOS	26
IV - DISCUSIÓN	61
V - CONCLUSIONES	72
VI - BIBLIOGRAFÍA	75

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		<u>Pag. #</u>
I	COMPOSICION DE LAS FORMULAS PATRON ELABORADAS	18
II	CONTROL DE CALIDAD REALIZADO A LAS MATERIAS PRIMAS UTILIZADAS EN LA ELABORACION DE FORMULAS PATRON	27
III	SISTEMAS DE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA PARA SEPARAR CAFEINA EN SUS DIVERSAS COMBINACIONES	19
IV	ABSORBANCIAS OBTENIDAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CAFEINA q.p. EN CLOROFORMO A 276 nm	28
V	COMPORTAMIENTO DE LOS SISTEMAS CROMATOGRAFICOS ENSAYADOS EN LA SEPARACION DE LA FORMULA PATRON A.	32
VI	COMPORTAMIENTO DE LOS SISTEMAS CROMATOGRAFICOS ENSAYADOS EN LA SEPARACION DE LA FORMULA PATRON B	33
VII	COMPORTAMIENTO DE LOS SISTEMAS CROMATOGRAFICOS ENSAYADOS EN LA SEPARACION DE LA FORMULA PATRON C.	33
VIII	CUANTIFICACION DE CAFEINA EN LA FORMULA PATRON A, USANDO EL METODO PROPUESTO PREVIA SEPARACION CON LOS SISTEMAS CROMATOGRAFICOS SELECCIONADOS	46

IX	CUANTIFICACION DE CAFEINA EN LA FORMULA PATRON B, USANDO EL METODO PROPUESTO PREVIA SEPARACION CON LOS SISTEMAS CROMATOGRAFICOS SELECCIONADOS .	47
X	CUANTIFICACION DE CAFEINA EN LA FORMULA PATRON C, USANDO EL METODO PROPUESTO PREVIA SEPARACION CON LOS SISTEMAS CROMATOGRAFICOS SELECCIONADOS .	48
XI	CUANTIFICACION DE CAFEINA EN LAS FORMULAS PATRON, USANDO EL METODO OFICIAL	49
XII	DESCRIPCION DE LAS FORMULAS COMERCIALES ANALIZADAS	50
XIII	CUANTIFICACION DE CAFEINA EN LAS FORMULAS COMERCIALES APLICANDO EL METODO PROPUESTO Y EL MEJOR SISTEMA CROMATOGRAFICO EN CADA CASO.	60



## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		<u>Pag. #</u>
1	CURVA DE CALIBRACION DE CAFEINA EN CLORO- FORMO A 276 nm.	29
2	ESPECTRO DE ABSORCION ULTRAVIOLETA DE CA- FEINA QUIMICAMENTE PURA EN CLOROFORMO SIN PREVIA CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA	30
3	ESPECTRO DE ABSORCION INFRARROJO DE CAFEINA QUIMICAMENTE PURA EN DISCO DE BROMURO DE PO- TASIO	31
4	CROMATOGRAFIA DE LA FORMULA PATRON A SEPARA- DA POR SISTEMA II	34
5	CROMATOGRAMA DE LA FORMULA PATRON A SEPARA- DA POR SISTEMA IV	35
6	CROMATOGRAMA DE LA FORMULA PATRON A SEPARA- DA POR SISTEMA VI	36
7	CROMATOGRAMA DE LA FORMULA PATRON A SEPARA- DA POR SISTEMA VIII	37
8	CROMATOGRAMA DE LA FORMULA PATRON B SEPARA- DA POR SISTEMA II	38
9	CROMATOGRAMA DE LA FORMULA PATRON B SEPARA- DA POR SISTEMA IV	39

FIGURA		<u>Pag. #</u>
10	CROMATOGRAMA DE LA FORMULA PATRON B SEPARADA POR SISTEMA VI.	40
11	CROMATOGRAMA DE LA FORMULA PATRON B SEPARADA POR SISTEMA VIII.	41
12	CROMATOGRAMA DE LA FORMULA PATRON C SEPARADA POR SISTEMA II.	42
13	CROMATOGRAMA DE LA FORMULA PATRON C SEPARADA POR SISTEMA IV.	43
14	CROMATOGRAMA DE LA FORMULA PATRON C SEPARADA POR SISTEMA VI.	44
15	CROMATOGRAMA DE LA FORMULA PATRON C SEPARADA POR SISTEMA VIII.	45
16	CROMATOGRAMA DE LA FORMULA COMERCIAL 1 SEPARADA POR SISTEMA IV.	51
17	CROMATOGRAMA DE LA FORMULA COMERCIAL 2 SEPARADA POR SISTEMA VIII.	52
18	CROMATOGRAMA DE LA FORMULA COMERCIAL 3 SEPARADA POR SISTEMA VI.	53
19	CROMATOGRAMA DE LA FORMULA COMERCIAL 4 SEPARADA POR SISTEMA VI.	54
20	CROMATOGRAMA DE LA FORMULA COMERCIAL 5 SEPARADA POR SISTEMA IV.	55

FIGURA

Pag. #

21	ESPECTRO DE ABSORCION ULTRAVIOLETA DE CA- FEINA SEPARADA DE LA FORMULA COMERCIAL 2 POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA CON SISTE- MA II.	56
22	ESPECTRO DE ABSORCION ULTRAVIOLETA DE CA- FEINA SEPARADA DE LA FORMULA COMERCIAL 2 POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA CON SISTE- MA VIII.	57
23	ESPECTRO DE ABSORCION ULTRAVIOLETA DE CA- FEINA SEPARADA DE LA FORMULA COMERCIAL 3 POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA CON SISTE- MA VI.	58
24	ESPECTRO DE ABSORCION ULTRAVIOLETA DE CA- FEINA SEPARADA DE LA FORMULA COMERCIAL 5 POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA CON SISTE- MA IV.	59

## 1. INTRODUCCIÓN

47

## A) OBJETIVO:

En los últimos años se ha hecho muy frecuente el uso de cafeína como principio activo, y, en la mayoría de los casos, como coadyuvante en la elaboración de numerosos medicamentos que utilizan sus propiedades estimulantes. Se encuentra en productos analgésicos, antigripales y tranquilizantes, que, en su mayoría son productos de venta libre que se expenden en la forma farmacéutica de tabletas.

Hasta la fecha, los métodos de análisis existentes, oficiales o no, son tediosos de alto costo y presentan el problema de la separación de cafeína en mezclas; siendo esta la principal razón que motiva la búsqueda de métodos sencillos y prácticos que la separen y cuantifiquen en productos farmacéuticos.

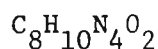
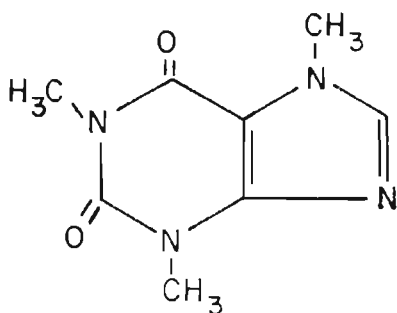
Siendo la Cromatografía en Capa Fina una técnica de separación sencilla, rápida y segura, se investigó sobre posibles sistemas adecuados que pudieran separarla en mezclas de aspirina, cafeína y fenacetina (APC), APC + antihistamínicos y APC + barbitúricos, para luego cuantificarla por Espectrofotometría de Absorción; - teniendo presente los requerimientos de exactitud y precisión que debe cumplir un método analítico.

## B) GENERALIDADES:

La Cafeína es un alcaloide derivado de las xantinas que se obtiene del café, del té, o bien puede prepararse sintéticamente; también se encuentra en el guaraná, mate y kola. 1/

Su nombre químico es: 3,7 Dihidro - 1, 3, 7 trimetil -1H - Purina -2, 6 - diona 2/

Posee la siguiente estructura química:



$$P.M. = 194.2 \quad \underline{3/}$$

No posee hidrógenos reemplazables, razón por la cual carece de propiedades ácidas. 4/

1/ Martindale. The Extra Pharmacopoeia. Twenty six edition. The Pharmaceutical Press, London 1973.

2/ The Merck Index, Ninth edition, Merck & Co. Inc. Rahway N.J. U.S.A. 1976.

3/ Clarke, E.G. C. "Isolation and Identification of Drugs", 3rd. ed, Vol. 1, The Pharmaceutical Press, London 1969.

4/ Higuchi, T. and Brochmann. Hanssen E. "Pharmaceutical Analysis" - Interscience Publishers, New York, 1961.

Sinónimos son: guaranina, metilteobromina y teína <sup>5/</sup> ; 1, 3, 7 trimetilxantina y 2, 6 dioxipurina <sup>6/</sup> .

#### Propiedades Físicas:

Solubilidad. Soluble 1 en 60 de agua, 1 en 2 de agua hirviendo, 1 en 130 de etanol y 1 en 7 de cloroformo, escasamente soluble en eter; más soluble en ácidos diluidos <sup>7/</sup> .

punto de fusión: 235° - 237° <sup>8/</sup> .

#### Características Espectroscópicas:

- Espectro de absorción UV en Acido Clorhídrico 0.1 N, máximo a 272 nm ( $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  cerca de 470).
- Espectro de absorción en etanol máximo a 273 nm ( $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 519$ ).
- Espectro de absorción IR. Cafeína base, en disco de bromuro de potasio. Los picos principales son A = 1658 ó 1695, B 745 <sup>9/</sup> .  
(Ver figura N° 3).

<sup>5/</sup> Clarke E. G.C. "Isolation and Identification of Drugs", 3rd ed., vol. 1, The Pharmaceutical Press, London, 1973.

<sup>6/</sup> The Merck Index, Ninth edition, Merck & Co. Inc. Rahway N.J. U.S.A. 1976

<sup>7/</sup> Clarke E.G.C. "Isolation and Identification of Drugs" 3rd. ed., vol. 1, The Pharmaceutical Press, London 1973.

<sup>8/</sup> Clarke E.G.C. "Isolation and Identification of Drugs" 3rd. ed., Vol. 1. The Pharmaceutical Press, London 1973-

<sup>9/</sup> Clarke E.G.C. "Isolation and Identification of Drugs" 3rd. ed., Vol. 1, The Pharmaceutical Press, London 1973.

La Cafeína posee acción estimulante poderosa sobre el sistema nervioso central, produciendo un estado de *insomnio*, incrementando la actividad mental, muscular, respiratoria y renal, entre otras. Se estima que la dosis letal para el hombre es de - 10 gm 10/ , 11/.

### C. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

En el análisis químico de la Cafeína los libros oficiales, en su mayoría la han cuantificado mediante volumetría en medio no acuoso, usado como disolvente ácido acético glacial y como titulante ácido perclórico 0.1 N, debido a su carácter débilmente básico, - detectando el punto final mediante un indicador adecuado o potenciométricamente. Se ha aplicado este método directamente, o separándola previamente de sus frecuentes combinaciones con salicilatos y benzoatos. 12/, 13/, 14/, 15/, 16/, 17/, 18/.

---

10/ Martindale. The Extra Pharmacopoeia. Twenty six ed. The Pharmaceutical Press, London 1973.

11/ Clarke E. G.C. "Isolation and Identification of Drugs" 3rd.ed., vol. 1, The Pharmaceutical Press, London 1973.

12/ Especificaciones para la Inspección de la Calidad de las Preparaciones Farmacéuticas. Segunda edición de la Farmacopea Internacional. Organización Mundial de la Salud. Ginebra, 1970.

13/ Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos, 4a. ed. Ed. Talleres Gráficos de la Nación SC. de P.E. y R.S. México D.F. 1974.

14/ The United States Pharmacopeia. Nineteenth Revisión (USP XIX). Ed. Twinbrock Parway Inc. 1975.

15/ The United States Pharmacopeia. Eighteenth Revision (USP XVIII). Ed. Twinbrock Parway Inc. 1970.



Haciendo reaccionar cafeína con yodo en un medio ácido, se ha obtenido formación de un peryoduro insoluble ( $C_8H_{10}N_4 \cdot HI \cdot I_4$ ); la cantidad de yodo consumido está dependiendo, en parte, de la cantidad de yodo en exceso presente durante la valoración <sup>19/</sup> .

La Farmacopea Italiana ha utilizado valoración yodométrica en la cuantificación de Cafeína en tabletas directamente, o con previa separación, valorando el exceso de yodo con tiosulfato de sodio - 0.1 N <sup>20/</sup> .

---

<sup>16/</sup> Pharmacopoea Helvética. Editio Sexta vol II. Edition Francaise. Edition Office Central Federal des Imprimeres et Du Materie. Berne 1971.

<sup>17/</sup> The Pharmacopoeia of Japan. Eighth Edition. Part I English -- Edition. Ministry of Health and Welfare 1971.

<sup>18/</sup> Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana. Ottava Edizione (F.U. VIII) I volume. Ed. Instituto Poligráfico dello Stato R.V. Roma 1972.

<sup>19/</sup> Higuchi T. and Brochmann-Hanssen E.; "Pharmaceutical Analysis" Interscience Publishers, New York 1961.

<sup>20/</sup> Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana. Ottava edizione (F.U. VIII) III Volume (Formulario Nazionale) Ed. Instituto Poligráfico dello Stato P.V., Roma 1973.

Son muchas las sustancias que contienen nitrógeno, razón por la cual el método Kjeldahl no es muy específico como un medio de analizar cuantitativamente preparaciones farmacéuticas de cafeína directamente, pero sí mediante previa separación. Compuestos relativamente lábiles como amidas y aminas pueden determinarse. Una determinación de nitrógeno por el método Kjeldahl sin destilación es aplicable también a Cafeína, la técnica es descrita en Connors 21/ .

Sin embargo, la Farmacopea Helvética y el AOAC han incluido como método de análisis para Cafeína en productos farmacéuticos y en productos naturales, la determinación de su contenido de nitrógeno por el método Kjeldahl tradicional 22/ , 23/

Debido a que la Cafeína se ha encontrado generalmente en diversas mezclas con analgésicos, antipiréticos, tranquilizantes, antihistamínicos, etc, y ante la dificultad de cuantificarla directamente, se ha hecho necesario separarla previamente. En su mayoría, los libros oficiales lo han hecho mediante extracciones

---

21/ Connors, Kenneth A., "A Textbook of Pharmaceutical Analysis" John Wiley and Sons, U.S.A. 1967.

22/ Pharmacopoea Helvética, Editio Sexta, vol II. Edition Francaise Edition Office Central Federal des Imprimeres et Du Materie, Berne 1971.

23/ Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. AOAC. Tenth Edition Ed. Board. Washington 1965.

sucesivas con solventes orgánicos y posteriormente la han cuantificado por volumetría 24/, 25/, 26/, 27/, gravimetría 28/, - 29/, 30/, 31/, 32/, 33/, 34/, espectrofotometría 35/, 36/ y Kheldahl 37/.

- 
- 24/ Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana. Ottava edizione (F.U. VIII) II volume Ed. Instituto Poligráfico dello Statto - P.V. Roma 1972.
- 25/ Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana. Ottava edizione (F.U. VIII) III volume (Formulario Nazionale), Ed. Instituto Poligráfico dello Statto P.V., Roma 1973.
- 26/ Especificaciones para la Inspección de la Calidad de las Preparaciones Farmacéuticas. Segunda edición de la Farmacopea Internacional. Organización Mundial de la Salud. Ginebra, 1970.
- 27/ The Pharmacopoeia of Japan. Eighth edition. Part I. English edition. Ministry of Health and Welfare, 1971.
- 28/ The United States Pharmacopeia. Eighteenth Revision (USPXVIII) Ed. Twinbrock Parway Inc. 1970.
- 29/ The United States Pharmacopeia. Nineteenth Revision (USP XIX) Ed. Twinbrock Parway Inc. 1975.
- 30/ Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos. 4a. ed., Ed. Talleres Gráficos de la Nación S.C. de P.E. y R.S. México D.F., 1974. .
- 31/ The National Formulary, ed. XI Mack Printing Company Easton P.A. U.S.A. 1960.
- 32/ The National Formulary, ed. XIII, Mack Printing Company, Easton P.A., U.S.A. 1970.
- 33/ British Pharmaceutical Codex. The Pharmaceutical Press, London 1973.
- 34/ Official Methods of Analysis of the Association of Official - Agricultural Chemists. AOAC. Tenth edition, Ed. Board Washington, 1965.
- 35/ The Pharmacopoeia of Japan, Eighth edition, Part II, English edition, Ministry of Health and Welfare, 1971.
- 36/ Igual que 34.
- 37/ Igual que 34.

La cromatografía de partición también ha sido aplicada para la separación de estas mezclas y se ha cuantificado Cafeína espectrofotométricamente 38/, 39/, 40/ .

Muchos han sido los trabajos realizados a fin de separar y cuantificar Cafeína a partir de sus diversas combinaciones en productos farmacéuticos, extractos vegetales y bebidas suaves; haciendo uso de las diversas técnicas de extracción y separación combinadas con métodos cuantitativos espectrofotométricos.

Algunos investigadores se han interesado en la separación y cuantificación de Cafeína en mezclas farmacéuticas que contienen analgésicos, antipiréticos, antihistamínicos, barbituratos y sales de codeína. El método más frecuentemente usado ha sido separación - por cromatografía en columna y cuantificación espectrofotométrica. Generalmente se han usado 2 ó 3 columnas en la separación y la determinación se ha hecho en Cloroformo a 276 nm 41/, 42/, 43/.

---

38/ The National Formulary, ed. XIII, Mack Printing Company Easton P.A., U.S.A. 1970.

39/ The National Formulary, ed. XIV, Mack Printing Company Easton P.A. U.S.A. 1975.

40/ Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. AOAC. Tenth ed. Ed. Board Washington 1965

41/ Heuermann R.F., J. Assoc. Offic. Agr. Chemists, 43(2), 243-247 1960.

42/ Smith G., J. Assoc. Offic. Agr. Chemists, 43(2), 241-243, 1960.

43/ Levine J., J. Assoc. Offic. Agr. Chemists, 45(2), 254-255, 1962

También se ha aplicado cromatografía en columna para separar mezclas de Cafeína con Carisoprodol \* y Fenacetina. La determinación se hace al IR en solución de Cloroformo a 3390 nm <sup>44/</sup> .

Se ha descrito un método colorimétrico para determinación directa de los componentes de mezclas de APC en el cual la cafeína se ha determinado como fosfomolibdato en acetona a 440 nm, habiéndose determinado la concentración mediante curva de calibración. El método ha sido aplicado tanto a tabletas como a cápsulas, y en medicamentos que se agregan comunmente a esta mezcla como alcaloides, barbituratos y antihistamínicos, los cuales no interfieren en la determinación <sup>45/</sup> .

Se ha desarrollado un método colorimétrico para determinación de Cafeína en preparados farmacéuticos usando como reactivo desarrollador de color p-dimetilaminobenzaldehído en ácido clorhídrico, verificándose la determinación a 595 nm en etanol o metanol para obtener un color más estable <sup>46/</sup> .

---

<sup>44/</sup> Allen L., J. Pharm. Sci., \*Carisoprodol (isopropil meprobamato), relajante del músculo esquelético. 63(3), 912 - 916, 1974.

<sup>45/</sup> Pankratz R.E. and Bandelin F. J., J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed., 45 (6), 364 - 366, 1956

<sup>46/</sup> Vachek J. and Kakac B., Csl. Farm. 23 (7), 280 - 281, 1974.

Se ha propuesto un método CCF - Colorimétrico para en sayo de cafeína en productos farmacéuticos, productos naturales y bebidas suaves. Cromatografía en Capa Fina se hizo sobre sílica gel G, usando como solvente desarrollador, benceno: acetona - (30:70) en atmósfera de amoníaco; se localizaron las manchas con reactivo de Dragendorff seguido por nitrato de plata al 2% en ácido sulfúrico al 5% y se extrajeron las manchas de cafeína - en solución acuosa, que se trató luego con solución de thiophen en ácido acético glacial y ácido sulfúrico. El color desarrollado se determinó en alcohol a 540 nm en un espectrocolorímetro 47/ .

Se ha propuesto un método para separación, identificación y cuantificación de mezclas de cafeína con propifenazona y salicilamida. La separación de los farmacos se realiza por Cromatografía en Capa Fina sobre sílica gel GF<sub>254</sub>, usando como solvente desarrollador, éter. La visualización de las manchas se hizo con luz U.V. (254 nm) . Se identificaron los farmacos por comparación de sus R<sub>f</sub> con los R<sub>f</sub> de sus correspondientes estandares y determinando sus espectros de absorción. Se realizó la determinación de Cafeína en etanol a 273 nm 48/

---

47/ Khafagy S.M., Metwally S.A. and Rofael N., J Drug Res. Egypt, 6(1), 75 - 82, 1974.

48/ Soeterboek S.M. and Thield M. Van. Pharm. Weekbl. 109 (40), 962-965, 1974.

La cromatografía en Capa Fina se ha aplicado para identificar - los componentes de tabletas de Carisoprodol, fenacetina y Cafeína usando sílica gel GF<sub>254</sub> como adsorbente y acetato de etilo como solvente desarrollador. Cafeína y Fenacetina se revelaron con - luz U.V. de onda corta (253.7 nm), carisoprodol se reveló con - reactivo de vainillina al 5% en ácido sulfúrico 49/ .

Conine F. y Paul J. Han reportado aplicación de cromatografía en capa fina a la separación de mezclas de cafeína, cocaína, aspirina, codeína, heroína, diamorfina, 6 acetyl morfina y morfina sobre placas de sílica gel básica usando como solvente desarrollador, etanol: alcohol isopropílico: xileno: cloroformo (1:1:2:4). La localización de las manchas se hizo con iodoplatinato y cloramina T excepto para aspirina que se localizó con vapores de - iodo. 50/.

Se ha utilizado cromatografía en capa fina para separar cafeína, teofilina y teobromina. La separación se realizó sobre sílica - gel G con acetona: cloroformo: butanol: solución acuosa al 25% de amoníaco (3:3:4:1) como solvente desarrollador, las manchas se localizaron usando una solución de cloruro férrico, iodo en acetona y solución acuosa y ácido tartárico (1:1) 51/ , 52/ .

---

49/ Allen L., J. Pharm. Scie, 63(3) 912-916, 1974

50/ Analytical Abstract, vol 28 (1), 1E7

51/ Analytical Abstract, vol 28 (5), 5E10

52/ Stahl E. "Thin-layer Chromatography" A. Laboratory Handbook 2a. ed. Springer - Verlag, Berlin, Heidelberg - New York, 1969.

Stahl <sup>53/</sup> ha recomendado diversos sistemas de cromatografía en capa fina para separar cafeína en:

A: Mezclas de Xantinas:

I - Soporte: Sílica gel G

Solvente: ciclohexano : acetona (40 : 50)

II - Soporte: Sílica gel G

Solvente: Acetona: cloroformo: n - butanol: hidróx. de amonio al 25% (30 : 30 : 40 : 10)

III - Soporte: Sílica gel G buferizada a pH 6.8

Solvente: Cloroformo: alcohol al 96% (90 : 10)

IV - Soporte: Sílica gel G

Solvente: Acetato de etilo: metanol: ácido acético (80: 10 : 10)

V - Soporte: Sílica gel HF<sub>254</sub>

Solvente: Cloroformo: acetona: metanol (30: 30:30 )

VIII - Cromatografía Bidimensional de Xantinas:

Soporte: Sílica gel GF<sub>254</sub>

Solvente A: Benceno: acetona (30 + 70)

---

<sup>53/</sup> Stahl E. "Thin - Layer Chromatography" A Laboratory Handbook 2a. ed. Springer - Verlag, Berlin - Heilderberg - New York, 1969.



Saturación de la Cámara mediante colocación de una pequeña placa con hidróxido de amonio al 25% dentro de ella.

Solvente B: Cloroformo: etanol: ácido fórmico (88:10:2)

X - Soporte: Sílice gel HF<sub>254</sub> preparada con solución de piperazina.

Solvente: Isopropanol: Cloroformo: Piperazina acuosa al 10% (60: 20: 20)

B: Mezclas Farmacéuticas:

a) Tabletas de Aspirina, Cafeína, Fenacetina y Salicilamida, se usa:

VI Soporte: Sílica gel HF<sub>254</sub>

Solvente: Metanol: ácido acético: eter: benceno (1:18: 60: 120).

b) Tabletas de Cafeína, amonipirina, fenacetina y bencilmandelato: se recomienda el Sistema I que se usa para mezclas de Xantinas <sup>54</sup>/

---

<sup>54</sup>/ Stahl E., Thin-Layer Chromatography "A Laboratory Handbook, 2a. ed., Springer - Verlag, Berlin- Heidelberg New York. 1969.

Randerath <sup>55/</sup> también ha recomendado sistemas cromatográficos para separar cafeína en mezclas de xantinas y en mezclas farmacéuticas:

Así, para separar mezcla de Cafeína, teofilina, teobromina y antipirina, recomienda el sistema III que ha remitido Stahl.

Para separar alcaloides y productos farmacéuticos alcalinos:

VII Soporte: Capas de sílica con sustancia fluorescente

Solvente: Metanol: acetona: trietanolamina (10: 10: 0.3)

Para separar preparados farmacéuticos combinados:

a) Tabletas de aminofenazona, antipirina, cafeína y fenacetina:

IX Soporte: Sílice gel G.

Solvente: Cloroformo con 1% de etanol.

b) Tabletas de Aspirina, Cafeína y Fenacetina

XV Soporte: Sílica gel G con sustancia fluorescente ZS Super

Solvente: Benceno; eter; ácido acético glacial: metanol

(120: 60: 18: 1)

---

<sup>55/</sup> Randerath K. Enciclopedia de la Química Industrial "Cromatografía de Capa Fina" Tomo 8, Ed. Artes Gráficas Grijilmo S.A., España, 1970.

## II. PARTE EXPERIMENTAL

## A. EQUIPO.

- Balanza analítica Mettler H78AR
- Lámpara de luz ultravioleta de onda corta y onda larga Ultra Violets Products Inc. UVSL25
- Equipo Cromatográfico Desaga
- Centrífuga IEC modelo HN-5
- Estufa Thelco modelo 16
- Espectrofotómetro Perkin Elmer 124 U.V. - Visible doble haz
- Registrador Perkin Elmer 56
- Espectrofotómetro Perkin Elmer 55 U.V. - Visible, un haz
- Espectrofotómetro Infrarrojo 467 con rejilla
- Cristalería necesaria

## B. METODOLOGIA.

Con el objeto de tener una referencia, se elaboraron tres formulaciones patrón de tabletas conteniendo Cafeína en sus combinaciones más frecuentes, cuya composición se describe en la Tabla I. Las materias primas utilizadas en su elaboración se analizaron previamente, (Tabla II).

TABLA 1. COMPOSICION DE LAS FORMULAS PATRON ELABORADAS

Fórmula	Forma Farmacéutica	Composición (Mg. por tableta)	
A	Tabletas	Cafeína	125.8
		Aspirina	62.9
		Fenacetina	50.3
		Excipientes c.s.p.	1 tableta
B	Tabletas	Cafeína	30.0
		Aspirina	68.8
		Fenacetina	49.1
		Difenhidramina clorh	3.2
		Excipientes c.s.p.	1 tableta
C	Tabletas	Aspirina	253.5
		Cafeína	67.7
		Fenobarbital	31.5
		Excipientes c.s.p.	1 Tableta

NOTA: Como excipiente llevan almidón, talco y estearato de magnesio en proporción adecuada.

En la revisión bibliográfica realizada se encontraron quince sistemas cromatográficos en capa fina recomendados para separar Cafeína en sus diversas combinaciones (Tabla III).

TABLA III . SISTEMAS DE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA PARA SEPARAR CAFEINA EN SUS DIVERSAS COMBINACIONES

Sistema N°	Adsorbente	Solvente Desarrollador
I	Sílica gel G	Ciclohexano: acetona (40 : 50)
II	Sílica gel G	Acetona: cloroformo: n-butanol:hidrox amonio al 25% (30: 30: 40: 10)
III	Sílica gel G buferizada a p.H 6.8	Cloroformo: alcohol al 96% (90:10)
IV	Sílica gel G	Acetato de etilo:metanol: ác. acético glacial (80: 10 : 10)
V	Sílica gel HF <sub>254</sub>	Cloroformo: acetona: metanol (30: 30: 30)
VI	Sílica gel HF <sub>254</sub>	Metanol: ác. acético: eter: benceno (1:18: 60: 120)
VII *	Capas con sust. fluorescente	Metanol: Acetona: trietanolamina (1: 1: 0.03)
VIII	Sílica gel GF <sub>254</sub>	A = benceno: acetona (30:70) en atmósfera de NH <sub>3</sub> B = Cloroformo: etanol: ac. fórmico (88: 10: 2)
IX	Sílica gel G	Cloroformo con 1% de etanol
X	Sílica gel HF <sub>254</sub> - en sol. de piperazina	Isopropanol:cloroformo: piperazina acuosa al 10% (60: 20 : 20)
XI	Sílica gel G	Sln. fuerte de amoníaco: metanol (1.5 : 100)
XII	Sílica gel GF <sub>254</sub>	Eter etílico
XIII	Sílica gel básica	Etanol: alcohol isopropílico: xileno: cloroformo (1: 1: 2: 4)
XIV	Sílica gel GF <sub>254</sub>	Acetato de etilo
XV	Sílica gel G con 2% de sust. ZS super	Benceno: eter: ac. acético glacial metanol (120:60:18:1)

\* Por no especificar la bibliografía el tipo de adsorbente a utilizar, se realizó el ensayo con sílica gel GF.

Los catorce sistemas mencionados se ensayaron, en primer lugar, en la fórmula patrón A. Los sistemas que separaron Cafeína en esta fórmula se ensayaron, a su vez, en las fórmulas patrón B y C, (tablas V, VI y VII) (figuras N°s. 4 - 15). Seleccionados así los sistemas adecuados para separar Cafeína en las fórmulas patrón, se procedió a su cuantificación previa separación cromatográfica (tabla VIII, IX y X). Para determinar la exactitud y buen funcionamiento de los sistemas aplicados en cada caso, se usó el método gravimétrico previa extracción con solvente, que es el método oficial del British Pharmaceutical Codex para determinación de tabletas compuestas de aspirina (Tabla XI).

Luego, el sistema que dió la mejor cuantificación en cada caso, se aplicó a las correspondientes muestras comerciales (Tablas XII y XIII) (fig. N°s. 16 - 20).

## C. MÉTODOS.

### 1. METODO PROPUESTO.

SEPARACION CROMATOGRAFICA EN CAPA FINA Y CUANTIFICACION ESPECTROFOTOMETRICA.

#### 1. Solución testigo de Cafeína

- a) Pesar exactamente 75 mg de cafeína químicamente pura previamente deseada a 80°C durante cuatro horas.

- b) Transferir cuantitativamente a un balón volumétrico de 25 ml con ayuda de cloroformo. Disolver y aforar.

## 2. Preparación de la Muestra

- a) Pesar no menos de 20 tabletas, obtener peso promedio, pulverizarlas finamente y pesar con exactitud una cantidad de polvo, de tabletas equivalentes a 75 mg de Cafeína.
  - b) Transferir cuantitativamente a un balón volumétrico de 25 ml con ayuda de 15 ml de cloroformo. Dejar en reposo por 15 min. para extraer completamente los principios solubles, agitando ocasionalmente.
  - c) Filtrar la solución a través de un pequeño círculo de papel filtro recubierto con algodón en un embudo de vidrio; recoger el filtrado directamente dentro de un balón volumétrico de 50 ml.
  - d) Lavar el balón de 25 ml, el filtro, el embudo y el agitador con porciones de 5 ml de cloroformo; recoger los lavados dentro del balón de 50 ml. Aforar con cloroformo.
- ## 3. Preparar soluciones testigo de Aspirina, Fenacetina, Difenhidramina Clorhidrato y Fenobarbital para identificar



las manchas en el cromatograma.

4. Separación por cromatografía en capa fina.

- a) Aplicar 4  $\mu$ lts. del testigo de cafeína; un volumen equivalente a aproximadamente 10  $\mu$ g de cada uno de los testigos correspondientes a los componentes de la mezcla a separar; y 8  $\mu$ lts de la solución de la muestra sobre una placa de sílica gel GF<sub>254</sub> ó HF<sub>254</sub>, según el caso, previamente activada a 105°C durante 1 hora.
- b) Introducir la placa dentro de un tanque cromatográfico, el cual se saturó previamente con el solvente adecuado, según el caso.
- c) Terminada de correr la placa, sacarla de la cámara y dejar que seque a temperatura ambiente.
- d) Observar la placa bajo luz ultravioleta de onda corta. Delimitar las zonas correspondientes a los testigos, a la muestra y la de sílica que va a servir de blanco.

5. Cuantificación espectrofotométrica.

- a) Transferir cuantitativamente las zonas correspondientes al testigo de Cafeína y a la Cafeína de la muestra a su correspondiente tubo de ensayo de capacidad adecuada, provisto de un tapón.

- b) Agregar a cada tubo 10 ml de cloroformo exactamente -  
medidos. Tapar bien el tubo, agitar moderadamente repe-  
tidas veces y centrifugar durante 10 minutos.
- c) Determinar la absorbancia de las soluciones sobrenadan-  
tes en un espectrofotómetro adecuado, en celdas de 1  
cm de espesor a una longitud de onda de 276 nm. llevan-  
do el blanco de sílica.

## 6. Cálculos

$$\text{mg de Cafeína /tableta} = \frac{A_M \times Ct \times \text{F.D.} \times \bar{P}}{At \times \text{P.M}}$$

Donde:

$A_M$  = Absorbancia de la muestra

$Ct$  = Concentración del testigo

F.D = Factor de dilución

$\bar{P}$  = Peso promedio

$At$  = Absorbancia del testigo

PM = Peso muestra

## 2. METODO OFICIAL

METODO OFICIAL DEL BRITISH PHARMACEUTICAL CODEX. GRAVIMETRICO  
PREVIA EXTRACCION CON SOLVENTE.

- a) Pesar no menos de 20 tabletas, determinarles peso promedio, pulverizarlas finamente y pesar con exactitud una cantidad de polvo equivalente a una tableta.
- b) Transferirla a un erlenmeyer de 50 ml, agregar 10 ml de ácido sulfúrico diluido y hervirla bajo un condensador de reflujo durante 60 minutos.
- c) Enfriar, agregar 10 ml de agua y extraer con porciones sucesivas de 30 ml de cloroformo, hasta que la extracción sea completa.
- d) Lavar los extractos clorofórmicos combinados, con tres porciones sucesivas de 20 ml de hidróxido de sodio 1N. Lavar luego con 20 ml de agua y descartar los lavados.
- e) Evaporar el cloroformo y secar el residuo de cafeína anhidra a peso constante a 105°C.
- f) El peso del residuo, es el peso de cafeína en la muestra analizada.

## 3. FORMULAS ESTADISTICAS APLICADAS

Media ( $\bar{X}$ ) :

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

en donde:

$x_i$  = valor del porcentaje sobre lo rotulado de Cafeína  
en la muestra

$\bar{X}$  = media de los porcentajes de cafeína

$n$  = número de determinaciones

Desviación Estandar

$$\delta = \frac{\sum_{i=1}^n \sqrt{(x_i - \bar{x})^2}}{n}$$

### III. RESULTADOS

TABLA II. CONTROL DE CALIDAD REALIZADO A LAS MATERIAS PRIMAS UTILIZADAS EN LA ELABORACION DE FORMULAS PATRON.

Materia Prima	Especificaciones según		Resultado
=====			
Cafeína *	USP	XIX	Aprobado
Aspirina	USP	XIX	Aprobado
Fenacetina	USP	XVIII	Aprobado
Difenhidramina Clorh.	USP	XVIII	Aprobado
Fenobarbital	USP	XVIII	Aprobado
Almidón	USP	XVIII	Aprobado
Talco	USP	XVIII	Aprobado
Estearato de Magnesio	USP	XVIII	Aprobado

\* En el ensayo, el punto final se detectó usando como indicador, cristal violeta T.S.

TABLA IV. ABSORBANCIAS OBTENIDAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES  
DE CAFEINA EN CLOROFORMO A 276 nm

Concentración µg/Ml	Absorbancia * 276 nm	Coefficiente de Extinción calculado
5	0.240	480
10	0.486	486
15	0.726	484
20	0.940	470
25	1.170	468
	$E_{cm}^{1\%}$	<hr/> 477.6

\*Cada absorbancia es el promedio de tres determinaciones, realizadas usando un Espectrofotometro Perkin Elmer Coleman 55 de un solo haz con lectura digital.

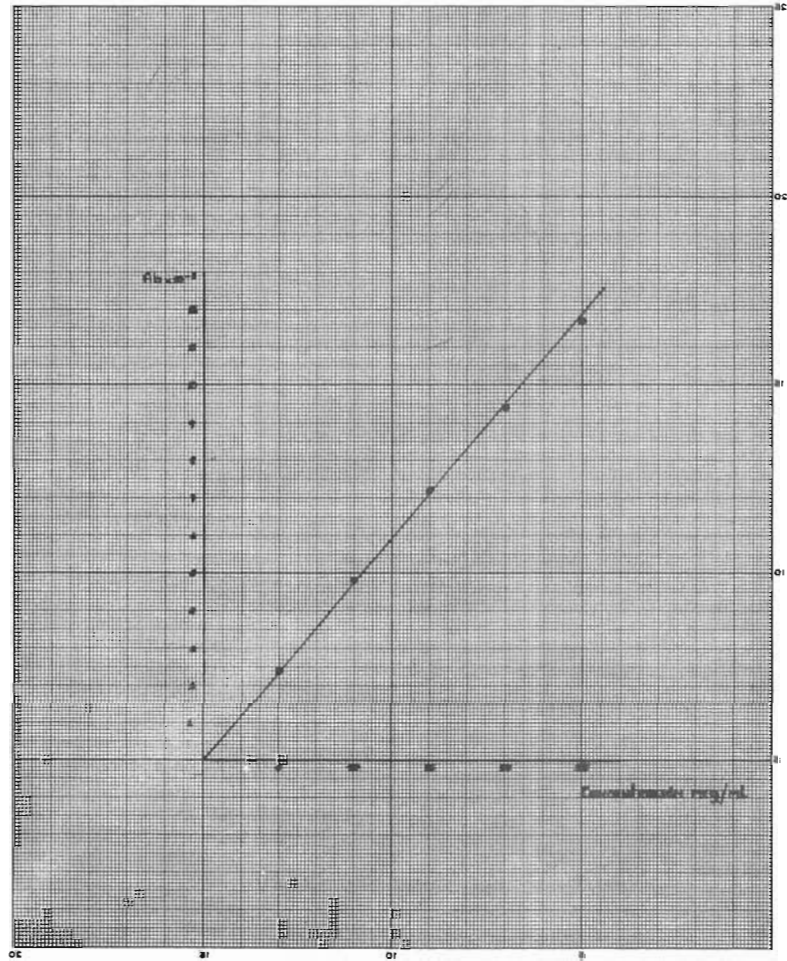


FIG. N.º 1. CURVA DE CALIBRACION DE CAFEINA EN CLORO-  
FORMO A 276 nm (Datos en Tabla IV).



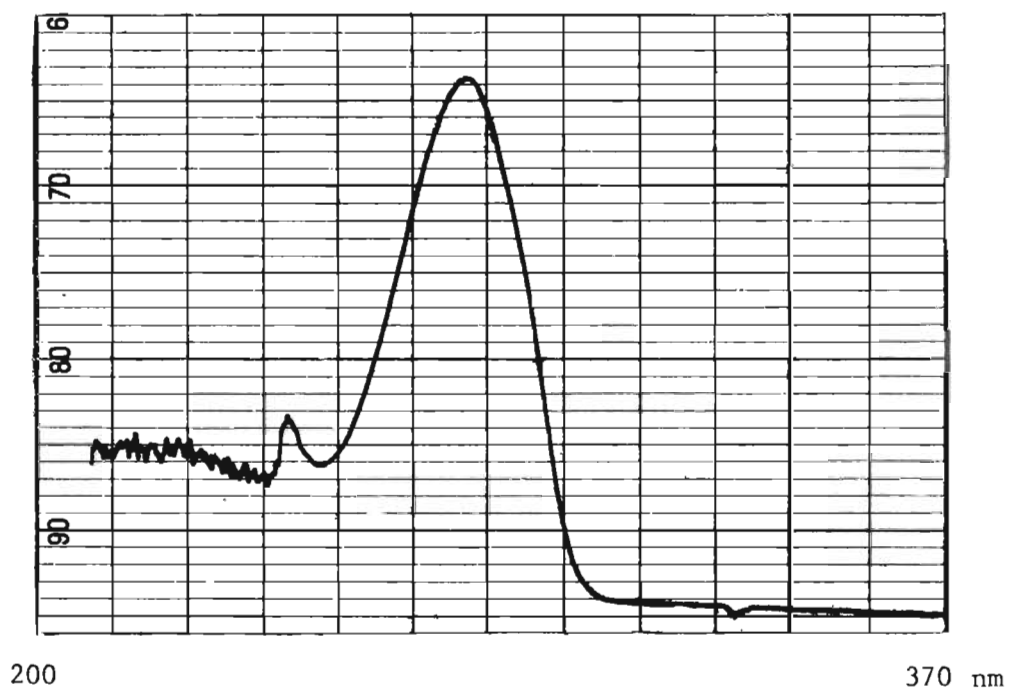


FIG. N° 2. ESPECTRO DE ABSORCION ULTRAVIOLETA DE CAFEINA -  
QUIMICAMENTE PURA SIN PREVIA CROMATOGRAFIA EN  
CAPA FINA A UNA CONCENTRACION DE 1.2 mcg/ml EN  
CLOROFORMO.

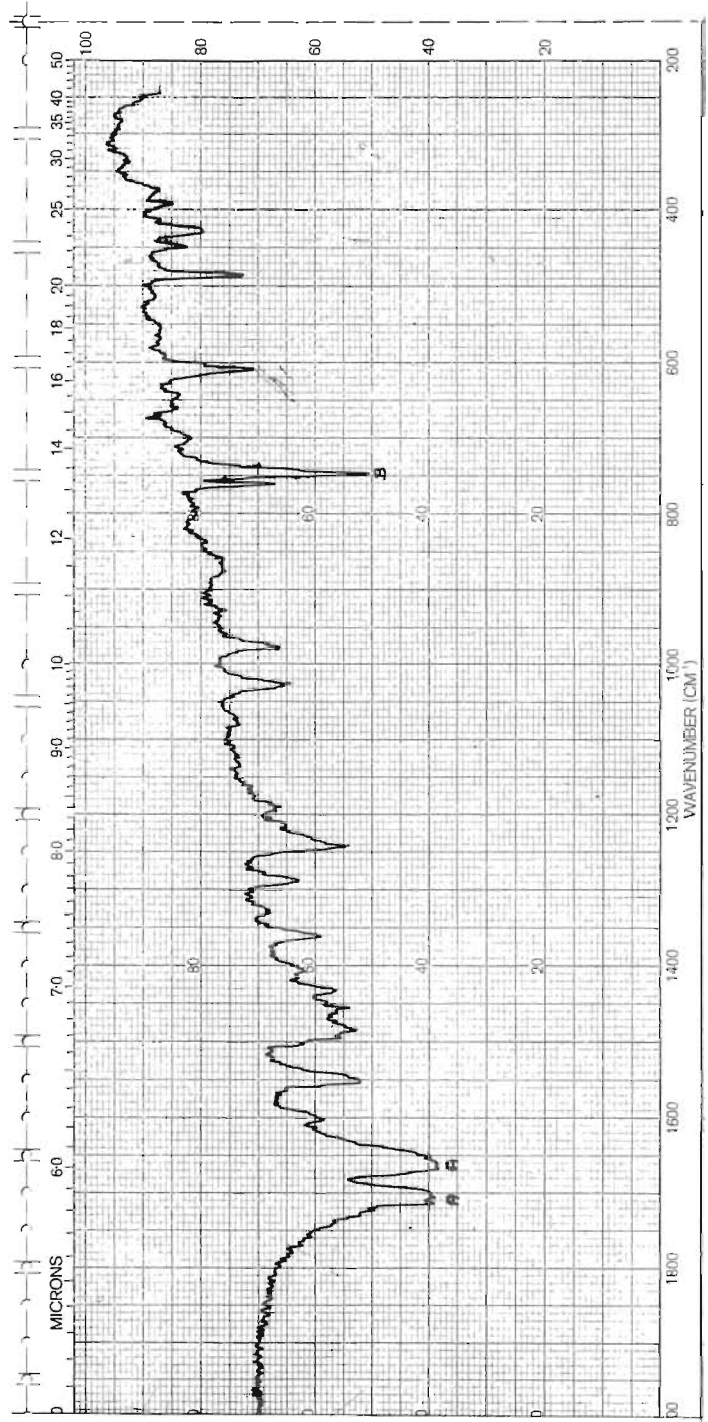


FIG. N: 3 ESPECTRO INFRARROJO DE CAFEINA QUIMICAMENTE PURA EN DISCO DE BROMURO DE POTASIO.

TABLA V. COMPORTAMIENTO DE LOS SISTEMAS CROMATOGRÁFICOS ENSAYADOS  
(TABLA III) EN LA SEPARACIÓN DE LA FÓRMULA PATRÓN A.

Sistema N°	Resultado
I	No separa la mezcla
II	Separa a los tres componentes
III	No separa la mezcla
IV	Separa a los tres componentes
V	No separa la mezcla
VI	Separa a los tres componentes
VII	Solamente separa a Fenacetina
VIII	Separa a los tres componentes
IX	No separa la mezcla
X	Solamente separa a Aspirina
XI	No separa la mezcla
XII	Solamente separa a Fenacetina
XIII	No separa la mezcla
XIV	Separa a los tres componentes

TABLA VI. COMPORTAMIENTO DE LOS SISTEMAS CROMATOGRÁFICOS ENSAYADOS EN LA SEPARACIÓN DE LA FÓRMULA PATRÓN B.

Sistema N°	R e s u l t a d o
II	Separa Cafeína y Aspirina; Fenacetina y Difenhidramina Clorh. corren juntas
IV	Separa a los cuatro componentes
VI	Separa perfectamente a los cuatro componentes
VIII	Separa perfectamente Cafeína y Fenacetina; Aspirina y Difenhidramina Clorh. corren juntas
XIV	Separa solamente a Fenacetina

TABLA VII. COMPORTAMIENTO DE LOS SISTEMAS CROMATOGRÁFICOS ENSAYADOS EN LA SEPARACIÓN DE LA FÓRMULA PATRÓN C.

Sistema N°	R e s u l t a d o
II	Separa perfectamente los tres componentes
IV	Separa solamente a Cafeína
VI	Separa perfectamente Cafeína solamente
VIII	Separa perfectamente los tres componentes
XIV	Separa solamente a fenobarbital







CAFEINA ST	MEZCLA	ASPIRINA ST.	FENACETINA ST
 x	   x	 x	     x

FIG. N° 4. SEPARACION CROMATOGRAFICA EN CAPA FINA DE LA FORMULA PATRON "A" DISUELTA EN CLOROFORMO, - REALIZADA POR EL SISTEMA II; ADSORBENTE, SILICA GEL GF<sub>254</sub>; SOLVENTE DESARROLLADOR, ACETONA: CLOROFORMO: n, BUTANOL: HIDROXIDO DE AMONIO AL 25% (15: 15: 20: 5); REVELADOR, U.V. 254.

$$R_f \text{ Cafeína} = 0.552$$

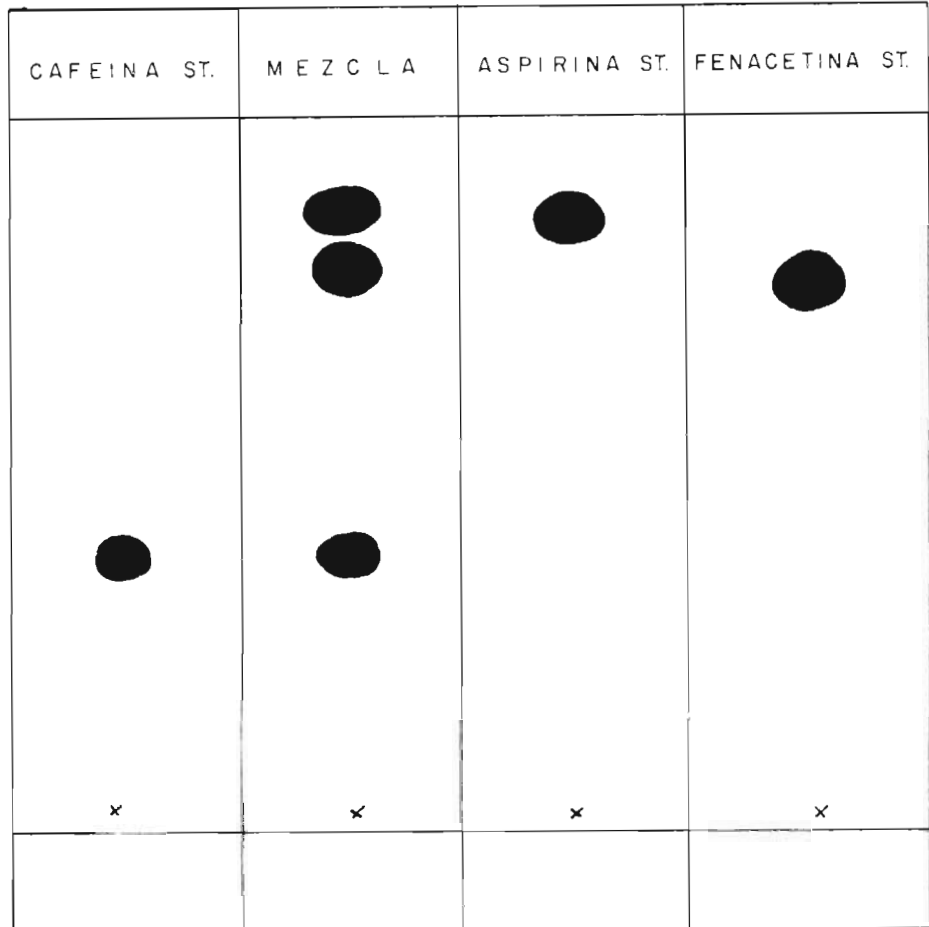


FIG. N° 5. SEPARACION CROMATOGRAFICA EN CAPA FINA DE LA FORMULA PATRON "A" DISUELTA EN CLOROFORMO, REALIZADA POR EL SISTEMA IV: ADSORBENTE, SILICA, GEL GF<sub>254</sub>; SOLVENTE DESARROLLADOR, ACETATO DE ETILO: METANOL: ACIDO ACETICO GLACIAL (80: 10: 10); REVELADOR, UV<sub>254</sub>

$$R_f \text{ Cafeína} = 0.401$$





CAFEINA ST	MEZCLA	ASPIRINA ST	FENACETINA ST.
 x	 x	 x	 x

FIG. N.º 6. SEPARACION CROMATOGRAFICA EN CAPA FINA DE LA FORMULA PATRON "A" DISUELTA EN CLOROFORMO, REALIZADA POR EL SISTEMA VI: ADSORBENTE, SILICA, GEL HF<sub>254</sub>; SOLVENTE DESARROLLADOR, METANOL: ACIDO ACETICO: ETER: BENCENO (1: 18: 60: 120) ; REVELADOR, UV<sub>254</sub>

$$R_f \text{ Cafeína} = 0.142$$

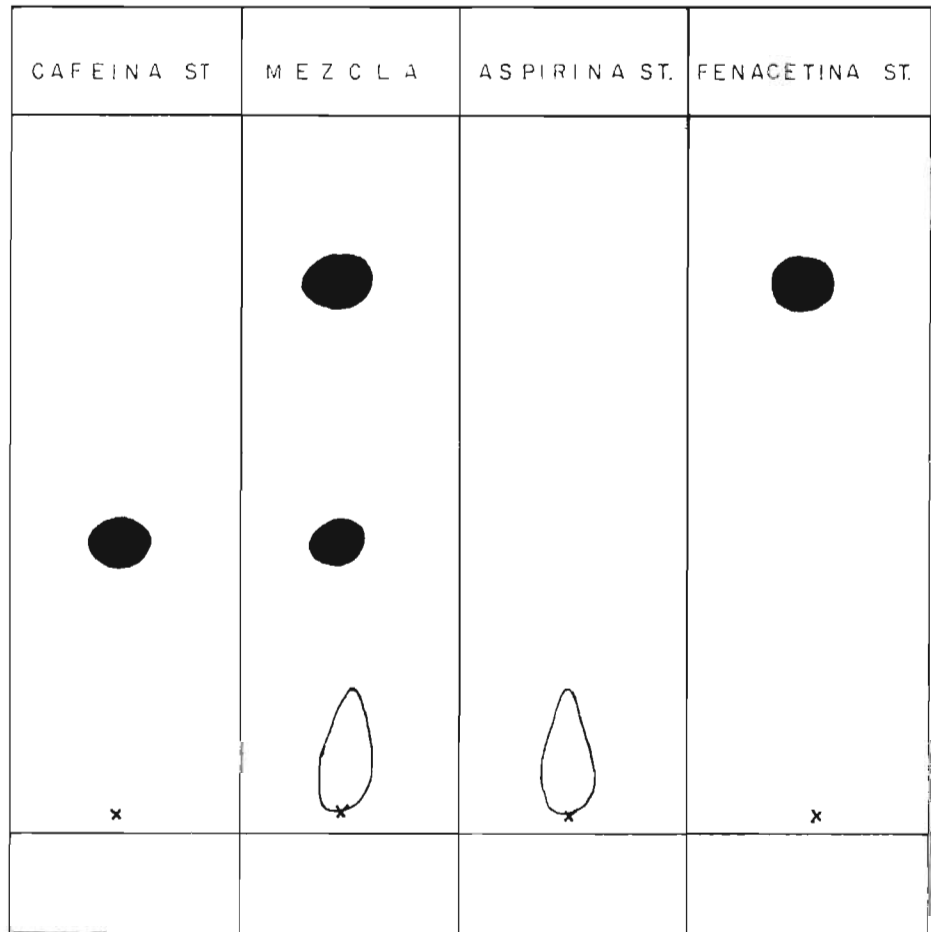


FIG. N.º 7. SEPARACION CROMATOGRAFICA EN CAPA FINA DE LA FORMULA PATRON "A" DISUELTA EN CLOROFORMO, REALIZADA POR EL SISTEMA VIII: ADSORBENTE, SILICA GEL GF<sub>254</sub>; SOLVENTE DESARROLLADOR, BENCENO: ACETONA (30 : 70); REVELADOR, UV<sub>254</sub>

$$R_f \text{ Cafeína} = 0.428$$








ASPIRINA ST.	CAFEINA ST.	MEZCLA	FENACETINA ST.	CLORH DIFEN- HIDRAMINA ST.
				
x	x	x	x	x

FIG. N.º 8, SEPARACION CROMATOGRAFICA EN CAPA FINA DE LA FORMULA PATRON "B" DISUELTA EN CLOROFORMO, REALIZADA POR EL SISTEMA II; ADSORBENTE, SILICA GEL GF<sub>254</sub>; SOLVENTE DESARROLLADOR, ACETONA: CLOROFORMO: n-BUTANOL: HI-DROXIDO DE AMONIO AL 25% (15: 15: 20: 5); REVELADOR UV<sub>254</sub>  $R_f$  Cafeína = 0.644











ASPIRINA ST	CAFEINA ST.	MEZCLA	FENACETINA ST.	CLORH. DIFEN- HIDRAMINA ST.
 	 	 	 	 

FIG. N° 9. SEPARACION CROMATOGRAFICA EN CAPA FINA DE LA FORMULA PATRON "B" DISUELTA EN CLOROFORMO, REALIZADA POR EL SISTEMA IV: ADSORBENTE, SILICA GEL GF<sub>254</sub>; SOLVENTE DESARROLLADOR, ACETATO DE ETILO: METANOL: ACIDO ACETICO GLACIAL ( 80: 10: 10); REVELADOR UV<sub>254</sub>

$$R_f \text{ Cafeína} = 0.333$$









ASPIRINA ST.	CAFEINA ST.	MEZCLA	FENACETINA ST.	CLORH DIFEN- HIDRAMINA ST.
				
				
				
x	x		x	
		x		x

FIG. N° 10. SEPARACION CROMATOGRAFICA EN CAPA FINA DE LA FORMULA PATRON "B" DISUELTA EN CLOROFORMO, REALIZADA POR EL SISTEMA VI; ADSORBENTE, SILICA GEL HF<sub>254</sub>; SOLVENTE DESARROLLADOR. METANOL: ACIDO ACETICO . ETHER: BEN-CENO (1: 18: 60: 120); REVELADOR UV<sub>254</sub> .

$$R_f \text{ Cafeína} = 0.133$$










ASPIRINA ST.	CAFEINA ST.	MEZCLA	FENACETINA ST.	CLORH. DIFEN- HIDRAMINA ST.
				
				
 x	 x	 x	 x	 x

FIG. N° 11. SEPARACION CROMATOGRAFICA EN CAPA FINA DE LA FORMULA PATRON "B" DISUELTA EN CLOROFORMO, REALIZADA POR EL SISTEMA VIII; ADSORBENTE, SILICA GEL GF<sub>254</sub> ; SOLVENTE DESARROLLADOR, BENCENO: ACETONA (30: 70); REVELADOR, UV<sub>254</sub> .

$$R_f \text{ Cafeína} = 0.441$$

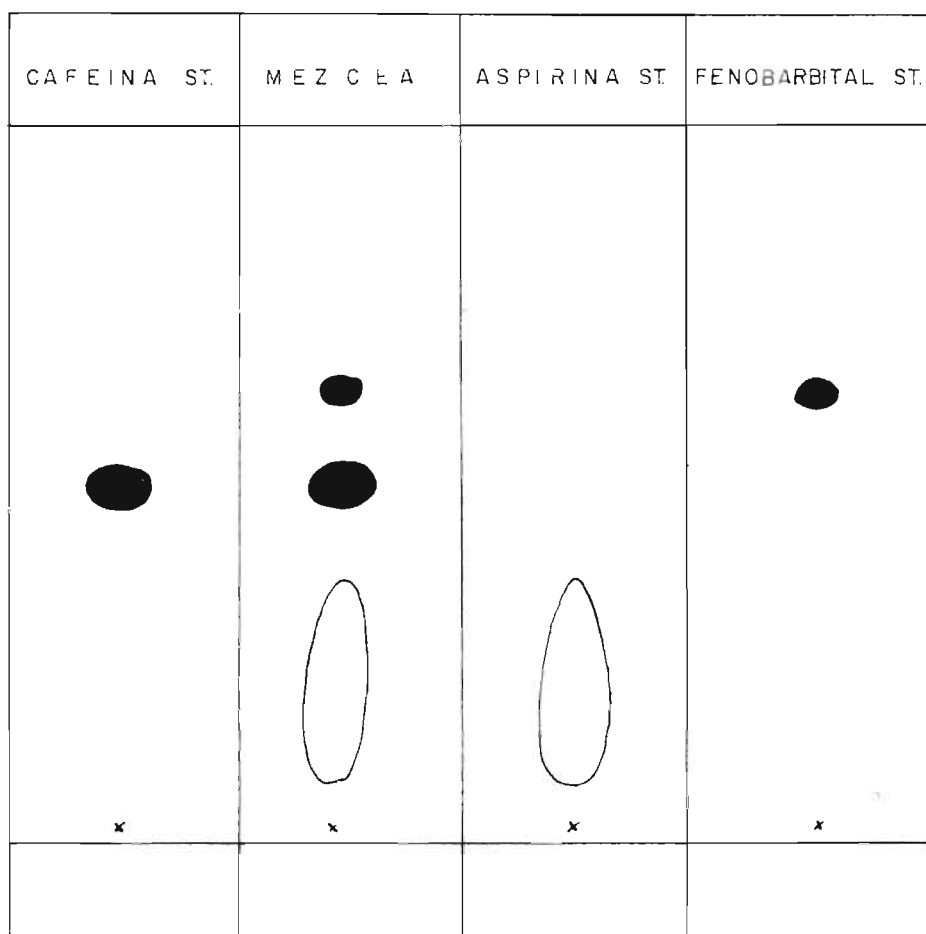


FIG. N° 12. SEPARACION CROMATOGRAFICA EN CAPA FINA DE LA FORMULA PATRON "C" DISUELTA EN CLOROFORMO, REALIZADA USANDO EL SISTEMA II: ADSORBENTE, SILICA GEL GF<sub>254</sub>; SOLVENTE DESARROLLADOR, ACETONA: CLOROFORMO: n- BUTANOL: HIDROXIDO DE AMONIO AL 25% (15: 15: 20: 5)

$$R_f \text{ Cafeína} = 0.564$$






CAFEINA ST.	MEZCLA	ASPIRINA ST.	FENOBARBITAL ST.
 x	  x	 x	 x

FIG. N.º 13. SEPARACION CROMATOGRAFICA EN CAPA FINA DE LA FORMULA PATRON "C" DISUELTA EN CLOROFORMO REALIZADA POR EL SISTEMA IV: ADSORBENTE, SILICA GEL GF<sub>254</sub>; SOLVENTE DESARROLLADOR, ACETATO DE ETILO: METANOL: ACIDO ACETICO GLACIAL (80: 10: 10)

$$R_f \text{ Cafeína} = 0.439$$






CAFEINA ST.	MEZCLA	ASPIRINA ST.	FENOBARBITAL ST.
 x	  x	 x	 x

FIG. N° 14. SEPARACION CROMATOGRAFICA EN CAPA FINA DE LA FORMULA PATRON "C" DISUELTA EN CLOROFORMO REALIZADA POR EL SISTEMA VI: ADSORBENTE, SILICA GEL HF<sub>254</sub>; SOLVENTE DESARROLLADOR, METANOL: ACIDO ACETICO, ETHER, BENCENO (1: 18: 60: 120) .

$$R_f \text{ Cafeína} = 0.150$$


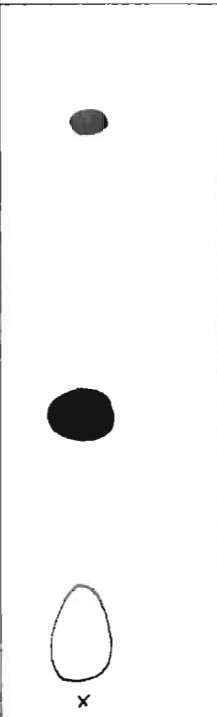

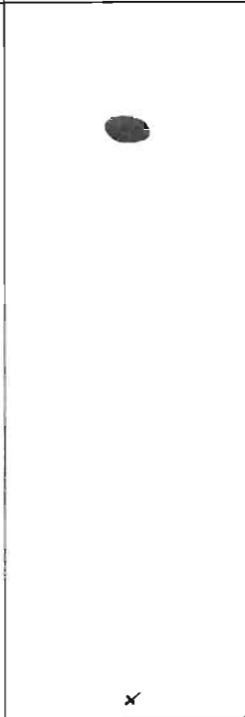
CAFEINA ST.	M E Z C L A	ASPIRINA ST.	FENOBARBITAL ST.
			

FIG. N° 15. SEPARACION CROMATOGRAFICA EN CAPA FINA DE LA FORMULA PATRON "C" DISUELTA EN CLOROFORMO REALIZADA POR EL - SISTEMA VIII: ADSORBENTE, SILICA GEL GF<sub>254</sub>; SOLVENTE DESARROLLADOR, BENCENO: ACETONA (30: 70).

$$R_f \text{ Cafeína} = 0.421$$



TABLA VIII. CUANTIFICACION DE CAFEINA EN LA FORMULA PATRON A,  
USANDO EL METODO PROPUESTO PREVIA SEPARACION CON  
LOS SISTEMAS CROMATOGRAFICOS SELECCIONADOS .

Sistema Cromatográfico	Mg Rotulados	Mg Encontrados	% sobre lo rotulado	Desviación Estandar
II	125.8	120.51	95.79	0.64
IV	125.8	105.24	83.65	2.65
VI	125.8	120.38	95.69	1.4
VIII	125.8	125.22	99.53	0.45

TABLA IX. CUANTIFICACION DE CAFEINA EN LA FORMULA PATRON B,  
 USANDO EL METODO PROPUESTO PREVIA SEPARACION CON  
 LOS SISTEMAS CROMATOGRAFICOS SELECCIONADOS .

Sistema Cromatográfico	Mg Rotulados	Mg Encontrados	% sobre lo rotulado	Desviación Estandar
II	30.0	26.40	88.0	0.18
IV	30.0	29.24	97.46	0.32
VI	30.0	25.97	86.57	0.37
VIII	30.0	28.37	94.57	0.28

TABLA X. CUANTIFICACION DE CAFEINA EN LA FORMULA PATRON C,  
USANDO EL METODO PROPUESTO PREVIA SEPARACION CON  
LOS SISTEMA CROMATOGRAFICOS SELECCIONADOS .

Sistema Cromatográfico	Mg Rotulados	Mg Encontrados	% sobre lo rotulado	Desviación Estandar
II	67.7	67.19	99.24	0.28
IV	67.7	65.50	96.75	0.22
VI	67.7	68.45	101.11	0.19
VIII	67.7	65.19	96.29	1.10

TABLA XI. CUANTIFICACION DE CAFEINA EN LAS FORMULAS PATRON  
USANDO EL METODO OFICIAL

Fórmula Pa- trón	Mg Rotulados	Mg Encontrados	% sobre lo rotulado	Desviación Estandar
A	125.8	110.06	87.49	0.53
B	30.0	31.83	106.1	4.71
C	67.7	37.4	55.24	5.20

TABLA XII. DESCRIPCION DE LAS FORMULAS COMERCIALES ANALIZADAS.

Laboratorio	Componentes Medicamentosos	Mg. Rotulados por Tableta
1	Aspirina	325.0
	Clorprofen Piridamina Maleato	2.0
	Cafeína Anhidra	15.0
	Gel Hidróxido de Aluminio	64.0
	Excipiente CSP	1 tableta
	Color Verde	
2	Aspirina	500.0
	Cafeína anhidra	27.5
	Excipiente CSP	675.0
3	Aspirina	200.0
	Fenacetina	200.0
	Fosfato de Codeína	10.0
	Cafeína	50.0
	Fenobarbital	25.0
	Tiamina	10.0
	Excipiente CSP	1 tableta
4	Aspirina	200.0
	Fenacetina	200.0
	Fosfato de Codeína	10.0
	Cafeína anhidra	50.0
	Luminal	25.0
5	Aspirina	324.0
	Cafeína anhidra	16.2
	Fenilefrina Clorhidrato	5.0
	Fenindamina Tartrato	10.0
	Gel Hidróxido de Aluminio y Carbonato de Magnesio Co. deseados	64.8
	Excipiente	117.8

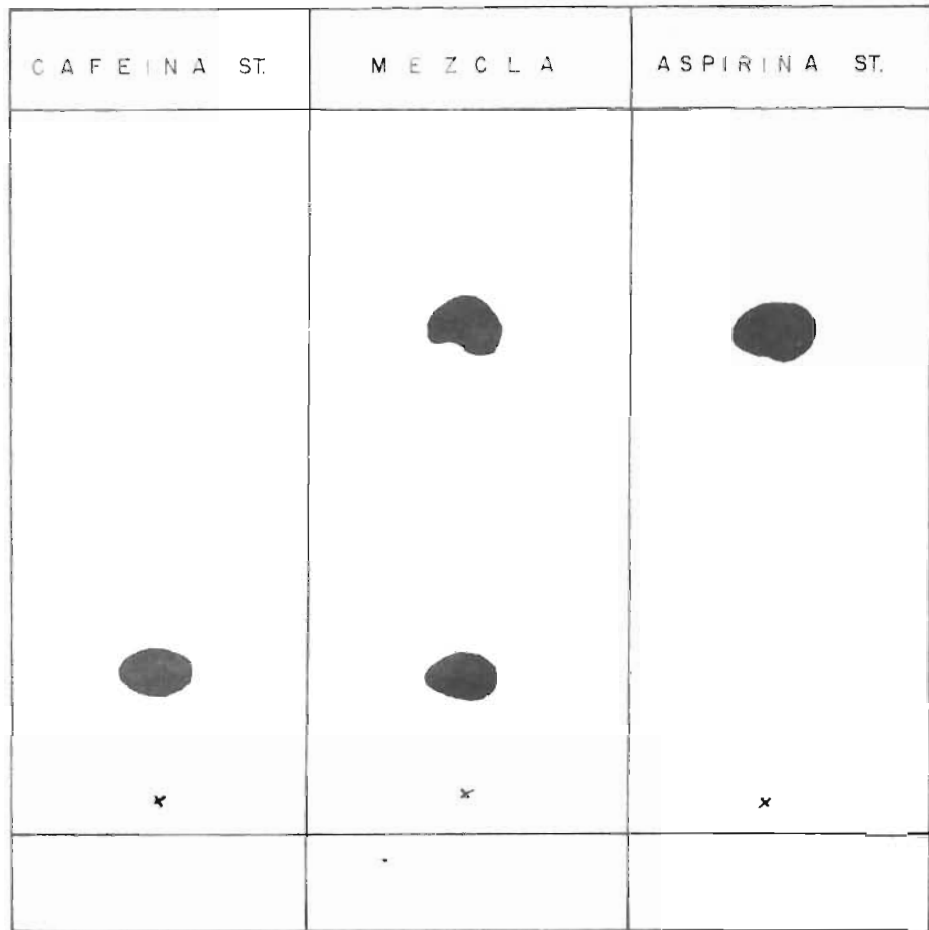


FIG. N.º 16. SEPARACION CROMATOGRAFICA EN CAPA FINA DE LA FORMULA COMERCIAL I DISUELTA EN CLOROFORMO, REALIZADA POR EL SISTEMA IV: ADSORBENTE, SILICA GEL GF<sub>254</sub>; SOLVENTE - DESARROLLADOR, ACETATO DE ETILO: METANOL: ACIDO ACETICO GLACIAL (80: 10: 10); REVELADOR UV<sub>254</sub> .

$$R_f \text{ Cafeína} = 0.400$$

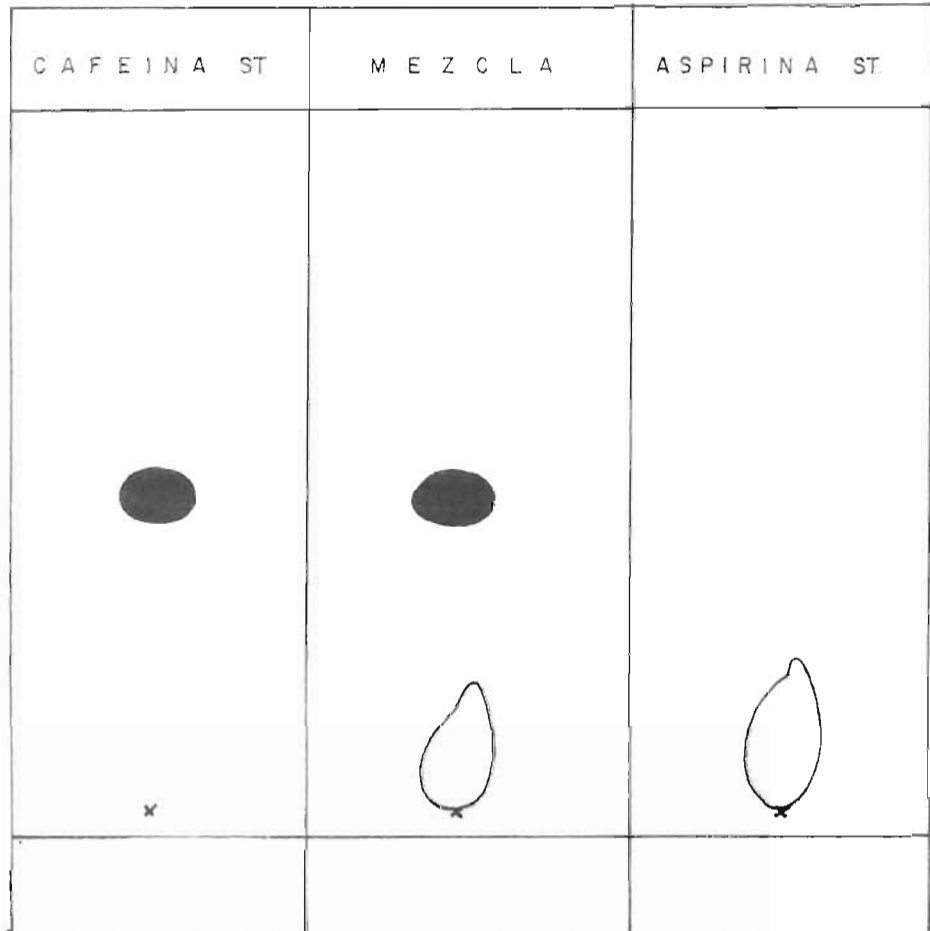


FIG. N° 17. SEPARACION CROMATOGRAFICA EN CAPA FINA DE LA FORMULA COMERCIAL 2 DISUELTA EN CLOROFORMO, REALIZADA POR EL SISTEMA VIII: ADSORBENTE, SILICA GEL GF<sub>254</sub>; SOLVENTE DESARROLLADOR, BENCENO: ACETONA (30 : 70) EN ATMOSFERA DE AMONIACO. REVELADOR UV<sub>254</sub>.

$$R_f \text{ Cafeína} = 0.466$$

ASPIRINA ST.	CAFEINA ST.	M E Z C L A	FENACETINAST	FENOBARBITAL ST.
●		●		●
		●	●	
	●	●		
x	x	x	x	x

FIG. N° 18. SEPARACION CROMATOGRAFICA EN CAPA FINA DE LA FORMULA COMERCIAL 3 DISUELTA EN CLOROFORMO, REALIZADA POR EL SISTEMA VI: ADSORBENTE, SILICA GEL HF<sub>254</sub>; SOLVENTE DESARROLLADOR, METANOL: ACIDO ACETICO: ETHER: BENCENO (1: 18: 60: 120); REVELADOR, UV<sub>254</sub>.

$$R_f \text{ Cafeína} = 0.111$$













ASPIRINA ST.	CAFEINA ST.	M E Z C L A	FENACETINA ST.	FENOBARBITAL ST.
				
				
				
x	x	x	x	x

FIG. N° 19. SEPARACION CROMATOGRAFICA EN CAPA FINA DE LA FORMULA COMERCIAL 4 DISUELTA EN CLOROFORMO, REALIZADA POR EL SISTEMA VI: ADSORBENTE, SILICA GEL HF<sub>254</sub>; SOLVENTE - DESARROLLADOR, METANOL: ACIDO ACETICO: ETER: BENCENO (1: 18: 60: 120).

$$R_f \text{ Cafeína} = 0.140$$

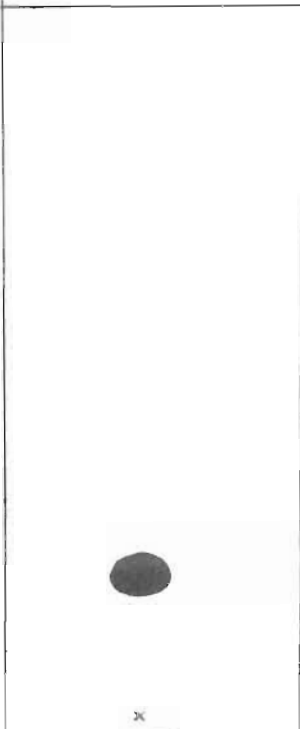
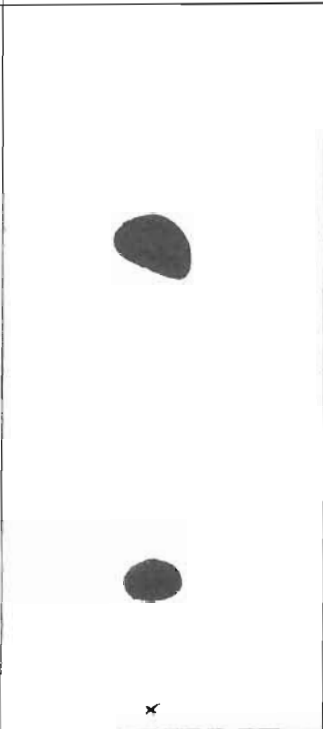
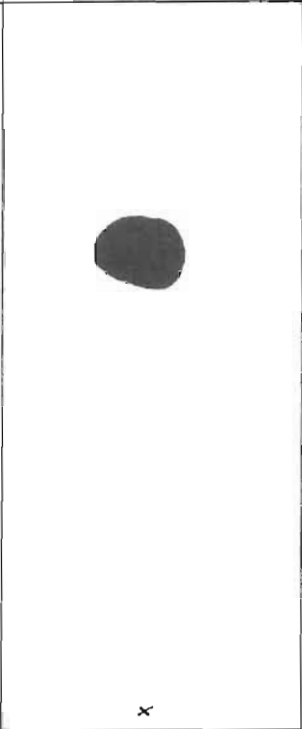
C A F E I N A ST.	M E Z C L A	A S P I R I N A ST.
 <p data-bbox="458 1018 531 1081">●</p> <p data-bbox="480 1165 502 1197">x</p>	 <p data-bbox="764 682 837 745">●</p> <p data-bbox="771 1018 844 1081">●</p> <p data-bbox="793 1165 815 1197">x</p>	 <p data-bbox="1062 682 1135 745">●</p> <p data-bbox="1099 1165 1121 1197">x</p>

FIG. N° 20. SEPARACION CROMATOGRAFICA EN CAPA FINA DE LA FORMULA COMERCIAL 5 DISUELTA EN CLOROFORMO, REALIZADA POR EL SISTEMA IV: ADSORBENTE, SILICA GEL GF<sub>254</sub>; SOLVENTE - DESARROLLADOR, ACETATO DE ETILO: METANOL: ACIDO ACETICO GLACIAL (80: 10: 10); REVELADOR, UV<sub>254</sub>.

$$R_f \text{ Cafeína} = 0.382$$

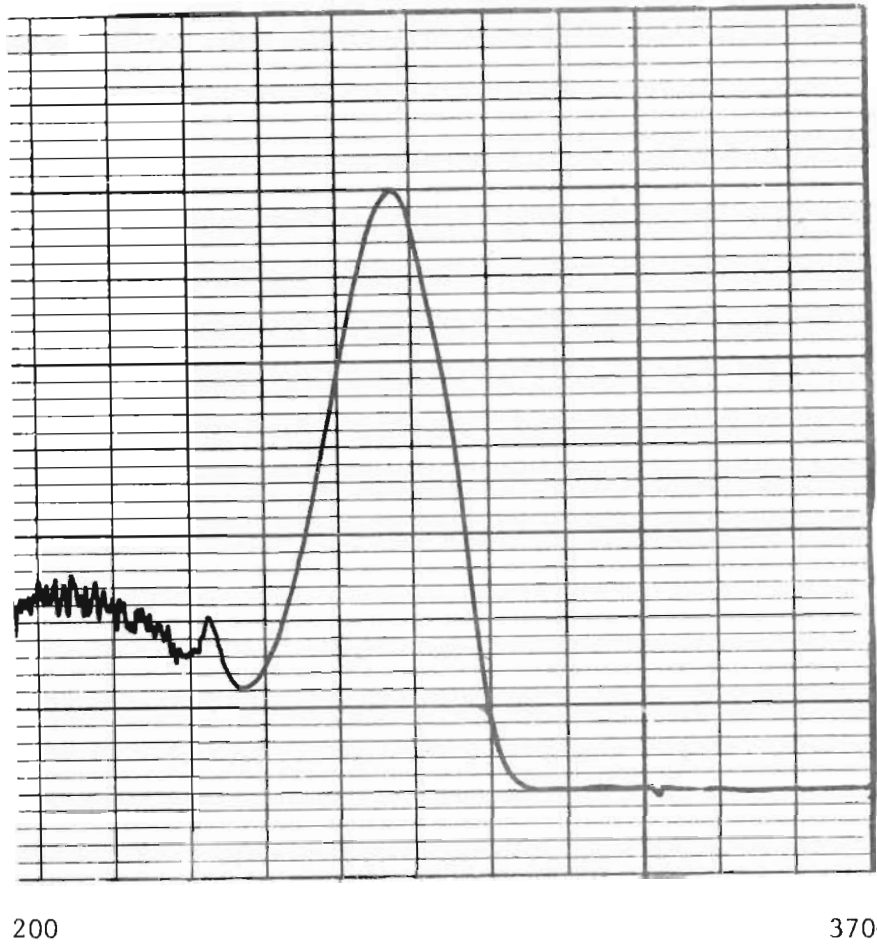


FIG. N° 21 . ESPECTRO DE ABSORCION ULTRAVIOLETA DE CAFEINA SEPARADA DE LA FORMULA COMERCIAL 2 POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA CON SISTEMA II. CONCENTRACION 1.2 mcg/ml EN CLOROFORMO.

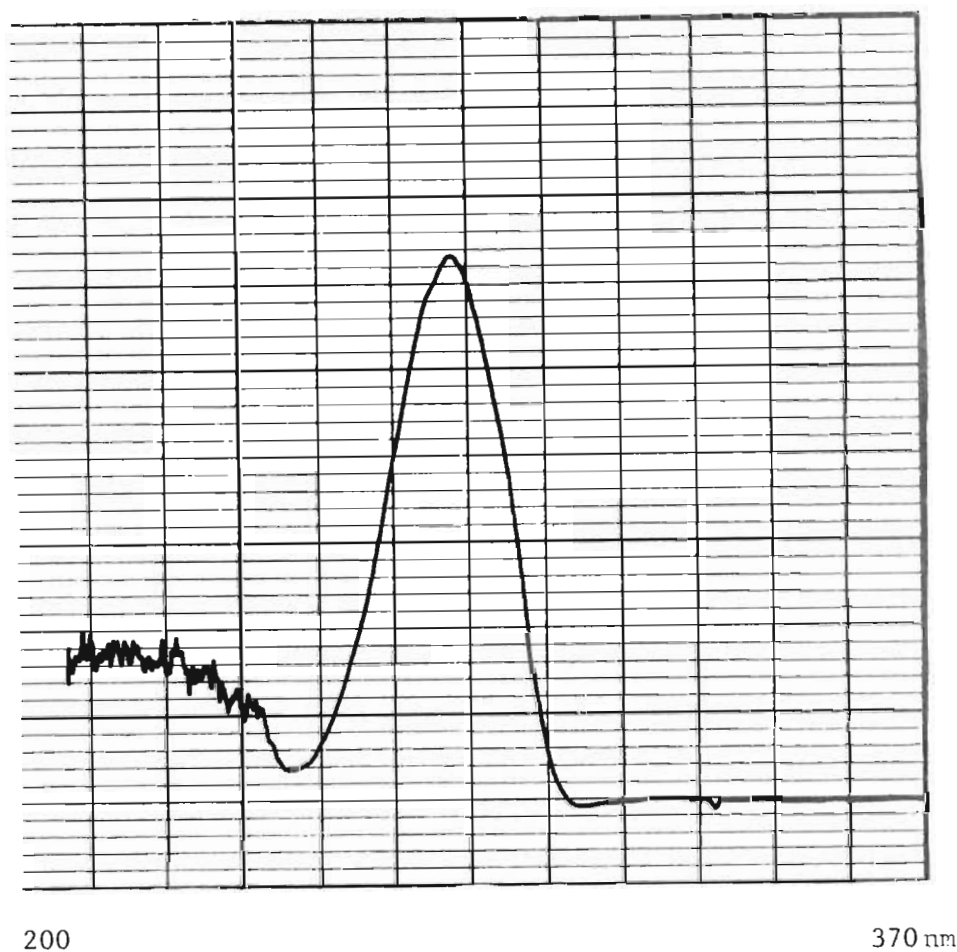
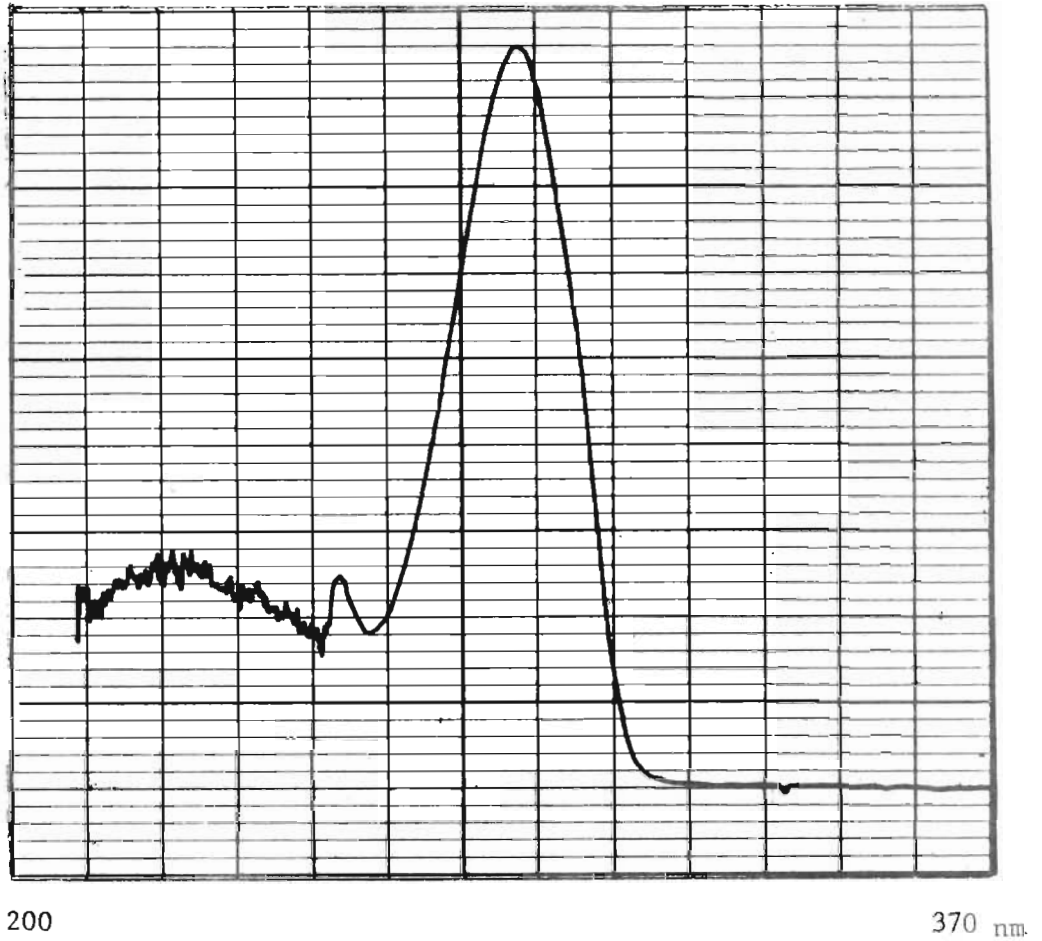


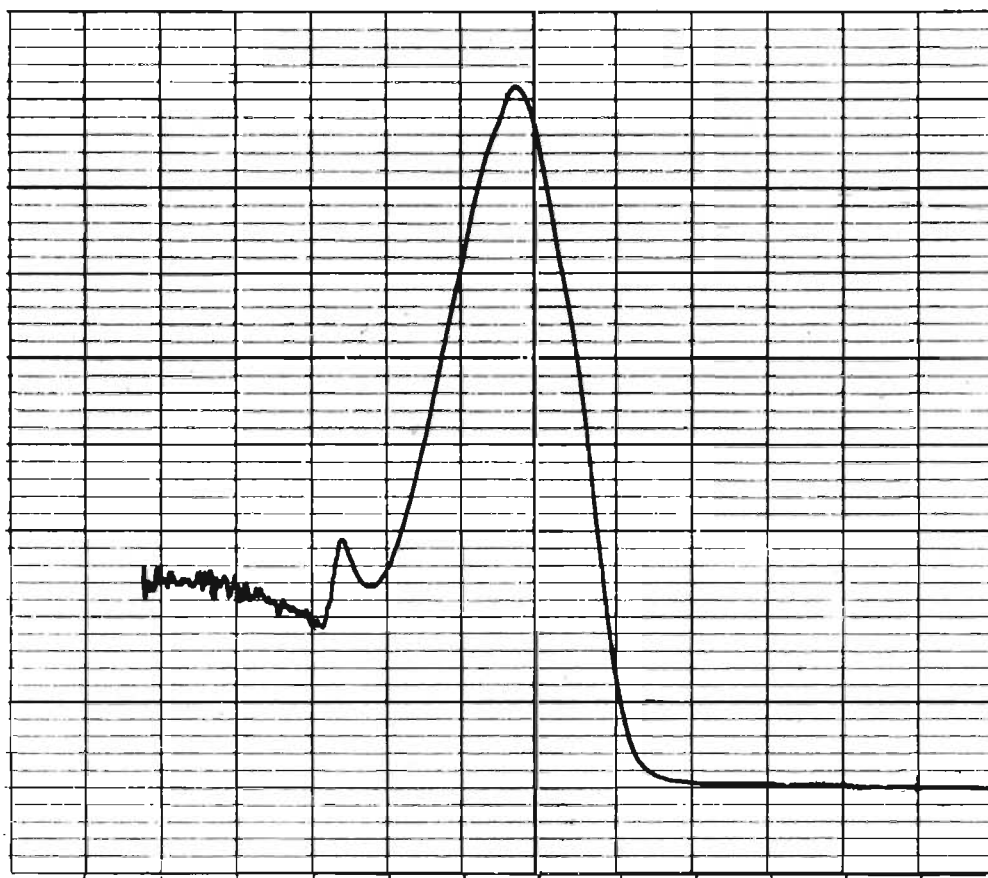
FIG. N° 22. ESPECTRO DE ABSORCION ULTRAVIOLETA DE CAFEINA SEPARADA DE LA FORMULA COMERCIAL 2 POR CROMATOLOGRAFIA EN CAPA FINA CON SISTEMA VIII. CON - CENTRACION 1.2 mcg/ml EN CLOROFORMO.



200

370 nm

FIG. N° 23. ESPECTRO DE ABSORCION ULTRAVIOLETA DE CAFEINA SEPARADA DE LA FORMULA COMERCIAL 3 POR CROMATO-  
GRAFIA EN CAPA FINA CON SISTEMA VI. CONCENTRA-  
CION 1.2 mcg/ml.



200

370<sub>nm</sub>

FIG. N° 24. ESPECTRO DE ABSORCION ULTRAVIOLETA DE CAFEINA SEPARADA DE LA FORMULA COMERCIAL 5, POR CROMATOLOGRAFIA EN CAPA FINA, CON SISTEMA IV. CONCENTRACION 1.2 mcg/ml EN CLOROFORMO.

TABLA XIII CUANTIFICACION DE CAFEINA EN LAS FORMULAS COMERCIALES APLICANDO EL METODO PROPUESTO Y EL MEJOR SISTEMA CROMATOGRAFICO EN CADA CASO.

Fórmula Comerc.	Sistema Cromat.	Mg Cafeína Rotulada por tabl.	Mg Cafeína encontrados	% sobre lo rotulado	Desviación Estandar
1	IV	15.0	7.53	50.2	0.13
2	VIII	27.5	26.88	97.74	0.39
3	VI	50.0	49.85	99.7	0.50
4	V	50.0	50.6	101.2	0.22
5	IV	16.2	13.52	83.45	0.08

## DISCUSSION



De acuerdo a su aplicación en la bibliografía consultada, los sistemas cromatográficos encontrados se clasificaron en cinco grupos:

- a) Sistemas recomendados para separar cafeína en mezclas con teofilina y teobromina: I, II, III, IV, V, VII, VIII y X.
- b) Sistemas recomendados para separar cafeína en mezclas con aspirina y fenacetina (APC): I, VI, IX, XIV y XV
- c) Sistema recomendado para separar cafeína en mezclas con fenacetina, propifenazona y salicilamida: XII.
- d) Sistema recomendado para separar cafeína en mezclas con alcaloides como cocaína y derivados naturales y sintéticos del opio, tales como: morfina, codeína, heroína, diamorfina y 6-acetilmorfina: XIII.
- e) Sistema recomendado para cromatografía en capa fina de bases nitrogenadas aplicable a cafeína: XI.

En el grupo "a" se obtuvo separación de cafeína en las fórmulas patrón A, B, C con los sistemas: II, IV y VIII (Tablas V, VI y VII).

En el grupo "b" solamente el sistema VI proporcionó una buena resolución de cafeína en las tres fórmulas patrón. El sistema XIV funcionó bien, solamente en la fórmula patrón A.

Los sistemas cromatográficos XII, XIII y XI, se ensayaron en la fórmula patrón A, pero ninguno logró separar esta mezcla; razón por la que no se ensayaron en las fórmulas patrón B y C.

La interpretación del comportamiento de cada uno de los sistemas cromatográficos ensayados se hizo en base a los siguientes conceptos:

Cromatografía en capa fina es una cromatografía de adsorción en donde las diferencias en el comportamiento de adsorción-desorción de los componentes de una mezcla en solución sobre una fase sólida estacionaria, permiten la separación de dichos componentes.

Los compuestos orgánicos tienen diversos grados de adsorción en los adsorbentes cromatográficos dependiendo de su carácter ácido, básico o neutro y de sus grupos funcionales. Así, compuestos ácidos (aspirina y fenobarbital) son más fuertemente adsorbidos que los compuestos básicos (cafeína y difenhidramina clorh.) y éstos, más que los compuestos neutros (fenacetina).

Esta fuerza de adsorción ocasiona efectos de desplazamiento en relación inversa: compuestos ácidos son menos desplazables que los compuestos básicos y éstos, menos desplazables que los compuestos neutros. Con respecto a la polaridad del solvente necesaria para lograr

ción inversa: compuestos ácidos son menos desplazables que los compuestos básicos y éstos, menos desplazables que los compuestos neutros. Con respecto a la polaridad del solvente necesaria para lograr una resolución aceptable: compuestos ácidos requieren de solventes de mayor polaridad para ser desplazados que los compuestos de naturaleza básica.

En las figuras N<sup>o</sup>s. 4 - 15, se muestra gráficamente la separación de cafeína obtenida con cada uno de los cuatro sistemas seleccionados (II, IV, VI y VIII) en cada una de las fórmulas patrón elaboradas.

En el sistema II, se cambió el adsorbente sílica gel G por sílica gel GF para una mejor visualización de las manchas al revelarlas.

En cuanto al solvente desarrollador, acetona: Cloroformo: n-butanol: hidróxido de amonio al 25% (30: 30: 40: 10) es un solvente de mediana polaridad al que el hidróxido de amonio le da cierto carácter básico necesario para desplazar la cafeína que es un compuesto débilmente básico.

El sistema II funcionó bien en la separación de cafeína de las tres fórmulas patrón, obteniéndose los valores de  $R_f$ : 0.552, 0.644 y 0.564 para las fórmulas patrón A, B y C respectivamente (fig. 4, 8 y 12), Desarrollo del cromatograma, 90 minutos.

En el sistema IV también se cambió el adsorbente recomendado por sílica gel GF, por la misma razón que en el sistema anterior. El solvente desarrollador acetato de etilo: metanol: ácido acético glacial (80: 10: 10) es de una polaridad bastante alta y medianamente ácido, siendo esta acidez la razón del corto desplazamiento de cafeína.

El sistema dió buena resolución para Cafeína, en las tres fórmulas patrón, obteniéndose los valores de  $R_f$ : 0.401, 0.333 y 0.439 en la fórmula A, B y C, respectivamente (fig. 5, 9, y 13). Desarrollo del cromatograma: 40 minutos.

En el sistema VI se usó como adsorbente sílica gel HF. El solvente desarrollador metanol: ácido acético: eter: benceno (1: 18: 60 : 120) presenta una polaridad mediana por la alta proporción en que se encuentran los componentes muy poco polares con respecto a los muy polares, (metanol y ácido acético) y presenta un carácter más ácido que el sistema anterior, siendo éste carácter ácido la razón por la que cafeína presentó con este sistema el desplazamiento más corto.

Pero, en resumen, el sistema fue efectivo en la resolución de cafeína en las fórmulas patrón ensayadas. Los  $R_f$  obtenidos para cafeína fueron: fórmula patrón A,  $R_f = 0.142$ ; fórmula patrón B,  $R_f = 0.133$ ; fórmula patrón C,  $R_f = 0.150$  (figuras 6, 10 y 14). Desarrollo del Cromatograma: 30 minutos.

El sistema VIII consistió en una cromatografía bidimensional, técnica aplicada en la separación de mezclas complejas.

En pruebas preliminares se realizó la cromatografía bidimensional en las tres fórmulas patrón comprobándose que el solvente A, benceno: acetona (30:70) en atmósfera de amoníaco era capaz de separar por sí mismo la cafeína en las tres mezclas, razón por la que los ensayos cromatográficos posteriores, previos a la cuantificación, se realizaron usando solamente este solvente en una cromatografía en capa fina tradicional.

En el solvente benceno: acetona (30:70) en atmósfera de amoníaco la saturación de la cámara con vapores de amoníaco es fundamental para la separación de cafeína en las mezclas ensayadas; si la concentración de amoníaco en la cámara no es la adecuada, la cafeína no se separa de la aspirina cuya mancha se extiende hasta sobreponerse con la de cafeína; ya que en este sistema, el amoníaco es el que le da el carácter básico necesario para separar la cafeína de la aspirina, que por su carácter ácido queda retenida en el punto de aplicación.

La saturación de la cámara debe hacerse de la siguiente manera: una hora antes de introducir la placa dentro de la cámara cromatográfica colocar en un beaker de 10 ml, solución de hidróxido de amonio al 25% y a la vez, en otro beaker el solvente desarrollador, el cual unos cuarenta minutos después se vierte directamente en la cámara. Durante

todo este tiempo la cámara debe permanecer perfectamente cerrada.

El sistema VIII permitió una buena resolución de la cafeína en las fórmulas patrón, obteniéndose para cafeína los siguientes  $R_f$ : 0.428, 0.441 y 0.421, para fórmulas patrón A, B y C respectivamente (Fig. 7, 11 y 15) . Desarrollo del cromatograma: 40 minutos.

Las placas deben activarse siempre debidamente para evitar retención de agua por parte de la sílica que podría traer como consecuencia - alteraciones en el proceso de adsorción-desorción, transformándolo en un mecanismo de reparto.

En general, las placas se revelaron bajo luz ultravioleta de onda corta (254 nm) por ser el método más práctico y rápido de revelado, además ofrece la ventaja, sobre los reveladores químicos, de no alterar la estructura de los compuestos ensayados por ninguna reacción química evitando así la pérdida de manchas cuantificables. El uso de adsorbentes con sustancias fluorescentes favoreció el revelado de cafeína que no es fluorescente, pero que apareció como una mancha oscura sobre el fondo fluorescente.

Con respecto a la variación observada en los  $R_f$  de cafeína obtenidos usando el mismo sistema cromatográfico en las diferentes muestras, esto se debe a diversos factores difíciles de controlar como: la actividad del adsorbente, la saturación de la cámara, las condiciones

ambientales durante el desarrollo, la temperatura y la cantidad de muestra que influye en su valor. Por esta razón los valores de  $R_f$  no bastan por sí solos para identificar inequívocamente a una sustancia porque son valores difícilmente reproducibles.

En las figuras 21-24 se presenta el espectro de absorción de cafeína luego de ser separada por cada uno de los sistemas seleccionados, a partir de algunas de las fórmulas comerciales ensayadas. Esto de muestra, en primer lugar, la perfecta separación de cafeína en cada mezcla; luego, que los solventes desarrolladores no ocasionan desplazamiento en su máximo de absorción al ultravioleta. Además constituyen una identificación confiable y segura comparándolo con el espectro de cafeína *st* en la figura N° 2.

En la información bibliográfica oficial obtenida, se encontró que uno de los solventes más usados en determinación espectrofotométrica de cafeína es el cloroformo a longitudes de onda de 272, 274 ó 276 nm. Para determinar el máximo de absorción ultravioleta de cafeína en cloroformo se le determinó su espectro de absorción, máximo que resultó estar a 276 nm, (fig. N° 2), siendo esta longitud de onda la utilizada para la cuantificación de cafeína en este trabajo.

En la Bibliografía consultada no se encontró el coeficiente de extinción de cafeína en cloroformo. Con el propósito de calcularlo se elaboró una curva de calibración con cafeína *st* a concentraciones en el -

rango de 5 a 25  $\mu\text{g/ml}$  en cloroformo a 276 nm. En la figura N° 1 puede notarse que la curva cumple la Ley de Beer. El coeficiente de extinción calculado experimentalmente fue de 477.6 (tabla N° IV).

Analizando los resultados obtenidos en la cuantificación de la fórmula patrón A (Tabla VIII) en base a los valores de Desviación Estándar obtenidos se deduce que el sistema cromatográfico que da resultados más reproducibles en la cuantificación es el sistema VIII, y también es el más exacto dando un % de 99.53 % sobre lo rotulado de cafeína.

El sistema II también se puede considerar aceptable para cuantificación de cafeína en la fórmula patrón A, pues aunque es menos reproducible, es bastante exacto.

Comparando los resultados del sistema VIII con los obtenidos con el método oficial del BPC en la fórmula patrón A (tabla XI) se observa que el método propuesto es más exacto y reproducible, además de que es más rápido; lo mismo puede afirmarse del sistema II aunque su exactitud y reproducibilidad sea menor que la del sistema VIII.

El sistema VI también es bastante exacto aunque menos reproducible que los mencionados anteriormente.

El sistema II resultó ser el menos confiable para cuantificar cafeína en la fórmula patrón A.



En los resultados contenidos en la tabla IX se observa que el sistema cromatográfico IV es el más exacto en la cuantificación de cafeína en la fórmula patrón B, aunque es menos reproducible que los sistemas II y VIII.

Comparándolo con el método oficial, éste es más exacto pero tiene una Desviación Estandar de 4.71 que indica una baja reproducibilidad.

Analizando la cuantificación de las fórmulas patrón C (Tabla X) se aprecia que los cuatro sistemas cromatográficos permitieron una cuantificación exacta, siendo el mejor, el sistema VI que además fue el más reproducible; siguiéndole en exactitud el sistema II, y en reproducibilidad el sistema IV.

Con respecto al método oficial, en esta mezcla los resultados obtenidos son bajísimos; no es aplicable a cuantificación de cafeína en mezclas con aspirina y fenobarbital.

Comprobada así, por comparación con el método oficial del BPC la exactitud y precisión de los sistemas cromatográficos en el método propuesto, se procedió a su aplicación en los productos comerciales cuya composición se detalla en la tabla XII. En las figuras 16-20 se presentan gráficamente sus correspondientes cromatogramas. Las figuras 21 - 24 corresponden a los espectros de absorción de cafeína separada de las muestras comerciales con los cuatro sistemas cromato-

gráficos.

Respecto a los componentes de las fórmulas comerciales 1, 3, 4 y 5 que no fueron considerados en las fórmulas patrón, no ocasionaron problema en la separación de cafeína debido a que todos son poco solubles o insolubles en cloroformo, que fue el solvente utilizado en la preparación de las muestras.

Se comprobó en general, que para obtener una cuantificación reproducible y exacta, los factores importantes en la cromatografía de absorción en capa fina son:

- a) Uniformidad en el espesor de la capa de adsorbente.
- b) Delimitación de círculos de diámetros semejantes alrededor de las manchas reveladas para raspar cantidades de sílica equivalentes.

## CONCLUSIONES

- Para separar y cuantificar cafeína en mezclas de aspirina, cafeína y fenacetina (APC), el sistema cromatográfico óptimo es el sistema VIII: solvente desarrollador, benceno: acetona (30: 70); adsorbente, sílica gel GF<sub>254</sub>; extracción de la sílica con cloroformo y determinando la absorbancia a 276 nm.
  
- En mezclas de APC con antihistamínicos, el procedimiento óptimo para separar y cuantificar cafeína es previa cromatografía en capa fina usando como solvente desarrollador, acetato de etilo: metanol: ácido acético glacial (80: 10: 10); adsorbente, sílica -- gel GF<sub>254</sub>; extracción de la sílica con cloroformo y determinación de la absorbancia a 276 nm.
  
- En mezclas de cafeína, aspirina y fenobarbital, la óptima separación cromatográfica y cuantificación de cafeína se obtiene con el sistema VI: solvente desarrollador, metanol: ácido acético: eter: benceno (1: 18: 60: 120); adsorbente, sílica gel HF<sub>254</sub>; extracción de la sílica con cloroformo y determinación de la absorbancia a 276 nm.
  
- = La confiabilidad y aplicabilidad de estos procedimientos se fundamenta en los mejores resultados obtenidos con respecto al método oficial ensayado, el cual además de ser tedioso, es poco preciso debido a la formación de emulsiones difíciles de romper.

- El método oficial del British Pharmaceutical Codex no es aplicable para cuantificar cafeína en mezclas con aspirina y fenobarbital.
  
- La técnica propuesta es rápida, sencilla y económica, no requiere de equipo sofisticado, pues en la actualidad, la mayoría de los laboratorios de Control de Calidad cuentan con un espectrofotómetro; y el equipo para cromatografía en capa fina es sencillo y de bajo costo.

## BIBLIOGRAFIA

- Allen L., J. Pharm. Scie, 63 (3), 912- 916, 1974.
- Analytical Abstract, vol 28 (1), 1E7.
- Analytical Abstract, vol 28 (5), 5E10.
- British Pharmaceutical Codex. The Pharmaceutical Press, London 1973.
- Clarke, E.G.C. Isolation and Identification of Drugs, 3rd. ed., vol 1, The Pharmaceutical Press, London 1969.
- Connors, Kenneth A., A Textbook of Pharmaceutical Analysis, John Wiley and Sons, U.S.A. 1967.
- Especificaciones para la Inspección de la Calidad de las Preparaciones Farmacéuticas. Segunda edición de la Farmacopea Internacional . Organización Mundial de la Salud. Ginebra, 1970.
- Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos, 4a. ed., Ed. Talleres Gráficos de la Nación S.C. de P.E. y R.S. México D.F. 1974.
- Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana. Ottava edizione (F.U. VIII) II volume. Ed. Istituto Poligrafico dello Statto P.V. Roma, 1972.
- Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana. Ottava edizione (F.U. VIII) III volume (Formulario Nazionale). Ed. Istituto Poligrafico dello Stato P.V. Roma 1973.
- Folleto "Cromatografía en Papel y en Capa Delgada" por Xorge Alejandro Domínguez, monografía N° 16. Depto. de Asuntos Científicos, Secretaría General de la O.E.A. Washington D.C. 1975.

- Heuermann R.F., J. Assoc. Offic. Agr. Chemists, 43 (2), 243-247, 1960.
- Higuchi, T. and Brochmann - Hanssen E. "Pharmaceutical Analysis" Interscience Publishers, New York, 1961.
- Khafagy S.M., Metwally S.A. and Rofael N., J. Drug. Res. Egypt, 6(1), 75 - 82, 1974.
- Levine J., J. Assoc. Offic. Agr. Chemists, 45(2), 254- 255, 1962.
- Martindale. The Extra Pharmacopoeia. Twenty six edition. The Pharmaceutical Press. London 1973.
- Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. AOAC Tenth edition, Ed. Board, Washington, 1965.
- Pankratz R.E. and Bandelin F. J., J. Am Pharm. Assoc. Sci. Ed., 45(6), 364-366, 1956.
- Pharmacopoea Helvética . Editio sexta, vol II. Edition Francaise. Edition Office Central Fédéral des Imprimés et Du Materie. Berne, 1971.
- Randerath K. Enciclopedia de la Química Industrial "Cromatografía de Capa Fina". Tomo 8, Ed. Artes Gráficas Grijilmo S.A., España, 1970.
- Smith G., J. Assoc. Offic. Agr. Chemists, 43(2), 241-243, 1960.
- Soeterboek S.M. and Thiel M. Van, Pharm Weekbl, 109 (40), 962-965, 1974.



- Stahl, E. "Thin-layer Chromatography" A Laboratory Handbook 2a. ed. Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, 1969.
- The Merck Index, Ninth edition, Merck & Co. Inc. Rahway N.J., U.S.A. 1976.
- The National Formulary, ed. XI, Mack Printing Company, Easton P.A. U.S.A., 1960.
- The National Formulary, ed XIII, Mack Printing Company, Easton P.A., U.S.A., 1970.
- The National Formulary, ed. XIV, Mack Printing Company, Easton P.A., U.S.A., 1975.
- The Pharmacopoeia of Japan. Eighth edition, Part. I. English edition, Ministry of Health and Welfare, 1971.
- The Pharmacopoeia of Japan. Eighth edition, Part. II, English edition. Ministry of Health and Welfare, 1971.
- The United States Pharmacopeia. Eighteenth Revision (USP XVIII). Ed. Twinbrock Parway Inc. 1970.
- The United States Pharmacopeia. Nineteenth Revision (USP XIX) Ed. Twinbrock Parway Inc. 1975.