



# Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

GENERALIDADES E IDENTIFICACION POR  
CROMATOGRAFIA EN PLACA FINA DE  
CLORODIAZEPOXIDO CONSIDERADO COMO  
PSICOTROPICO.

440

IRMA YOLANDA TIRADO TIRADO

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1 9 7 6



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Tesis  
LAB \_\_\_\_\_  
AÑO \_\_\_\_\_  
FECHA \_\_\_\_\_  
PROF. \_\_\_\_\_

~~415~~ 414



QUÍMICA

**JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE:** Q.F.B. IGNACIO DIEZ DE URDANIVIA.  
**V O C A L :** Q.F.B. ETELVINA MEDRANO DE JAIMES.  
**SECRETARIO:** Q.F.B. CESAR A. DOMINGUEZ CAMACHO.  
**1er.SUPLENTE:** Q.F.B. ENRIQUE CALDERON.  
**2do.SUPLENTE:** Q.F.B. ANA MARIA MENDEZ.

**Sitio donde se desarrolló el tema:** Universidad Nacional Autónoma  
de México.

**Sustentante :** Irma Yolanda Tirado Tirado

**Asesor del tema:** Q.F.B.César A. Domínguez C.

A MIS QUERIDOS PADRES: PORQUE A ELLOS LES  
DEBO TODO.

A MI ESPOSO GUILLERMO POR SU CONSTANTE AYUDA  
Y APOYO.

A MI HIJO LUIS GUILLERMO CON MI CARINO.

A MIS QUERIDOS HERMANOS:

MARI	CARLOS	ROSA ELBA
FLORI	JUAN	MARTITA
GLORIA	FRANCISCO	SILVIA
LIDIA ROSA		

**A MIS ABUELITOS :**  
**POR TODA SU TERNURA**

**AL SEÑOR LICENCIADO:**

**DON PEDRO OJEDA PAULLADA**

**PROCURADOR GENERAL DE LA REPUBLICA.**

AL CENTRO MEXICANO DE  
ESTUDIOS EN FARMACODEPENDENCIA.

**AL Q.F.B. CESAR DOMINGUEZ :**  
**POR SU GRAN AYUDA COMO ASESOR DE**  
**ESTA TESIS.**

**AL Q.F.B. IGNACIO DIEZ DE U.**

**A LA Q.F.B. ETELVINA MEDRANO**

**MUCHAS GRACIAS**

## **Contenido.**

**I. Introducción**

**II. Generalidades sobre Clordiazepóxido**

**III. Generalidades sobre Cromatografía.**

**IV. Descripción de los sistemas Cromatográficos en placa fina  
para la identificación de Clordiazepóxido.**

**V . Desarrollo práctico de la Cromatografía en la identifica-  
ción de Clordiazepóxido.**

**VI. Consideración final.**

## I

**Introducción**

Diariamente los periódicos de México y de todo el mundo nos enteran de noticias relacionadas con el tráfico de drogas y también del resultado que éstas producen en sus millones de víctimas. Así vemos que continuamente aparecen cadáveres de menores y jóvenes desadaptados, que fallecen por una sobredosis de droga.

Las estadísticas que de vez en cuando presentan algunos organismos oficiales de países civilizados, proporcionan una cifra inconcebible sobre el creciente aumento del consumo de droga adquirida principalmente por los jóvenes. Esta situación se ha convertido en un problema médico-social y de tipo legal muy grave, ya que estas sustancias independientemente de la dependencia que producen actúan sobre la mente atrofiando algunos centros nerviosos.

No obstante la gran lucha por parte de los gobiernos de muchos países por aniquilar esta mafia de traficantes, tal parece que se trata de una guerra sin fin y aunque continuamente atrapan bandas, decomisan drogas o destruyen plantíos, la mafia vuelve con nuevos bríos.

De lo mencionado anteriormente emana el interés de los Químicos Legistas quienes deben contar con la mayor cantidad de recursos técnicos adecuados a la problemática actual.

El objetivo de este trabajo es el de ensayar las técnicas cromatográficas disponibles para la identificación de Clorodiazepóxido y en base a los resultados obtenidos seleccionar el sistema más apropiado así como determinar si es posible su aplicación como una herramienta más de trabajo en Química Legal.

Este trabajo también incluye conceptos generales referentes a las diversas técnicas cromatográficas así como información relacionada con las propiedades, el uso y la obtención de Clorodiazepóxido.

La cromatografía es una técnica de identificación que ofrece -

las ventajas de rapidez, exactitud, alta sensibilidad y economía; por lo que actualmente es una valiosa herramienta de trabajo para varias ciencias como la Química, Biología, Medicina, etc.

La cromatografía permite la rápida identificación de compuestos inorgánicos, así como orgánicos en los cuales se encuentran enzimas, proteínas y compuestos químicos sintéticos.

Particularmente la cromatografía es importante en Química Legal debido a que es una técnica de gran versatilidad que permite la identificación rápida de diversos compuestos farmacológicos.

Dentro de las drogas de las que se está haciendo abuso actualmente se encuentran las psicotrópicas que se caracterizan por actuar sobre la mente. Estas sustancias introducidas en el organismo modifican el estado afectivo y la percepción. Por estas características que posee el Clorodiazepóxido ha sido considerado como una droga psicotrópica.

El Clorodiazepóxido (Clorhidrato de 7-cloro, 2-metilamino, 5-fenil, 3H-1,4 benzodiazepin, 4-óxido), comercialmente conocido como "Librium", es un compuesto clasificado en la farmacología como un tranquilizante que provoca dependencia física y psíquica a sus consumidores. (15).

En México el Clorodiazepóxido aparece en el Código Sanitario Vigente como un producto de venta restringida y su uso debe estar bajo vigilancia médica.

II

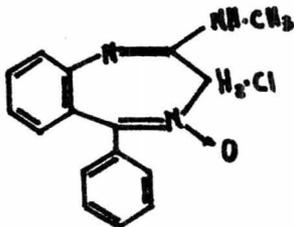
**Generalidades  
sobre Clordiazepóxido.**

a) Reseña histórica.

Las benzodiazepinas a las cuales pertenece el Clorodiazepóxido fueron sintetizadas por vez primera en el año de 1933, reportándose una cierta actividad relajante en músculo esquelético y propiedades bloqueantes de los reflejos espinales en algunos animales.

En 1960 Sandall y colaboradores reportaron que el Clorodiazepóxido producía amansamiento o docilidad en ciertas especies de animales cuando se administraba en pequeñas dosis a las cuales otras drogas producían ataxia o hipnosis moderada.

Cook y Kellher repitieron este mismo experimento empleando hombres en vez de monos y encontraron que el Clorodiazepóxido disminuía la ansiedad.

b) Fórmula.

Clorodiazepóxido.

c) Propiedades físicas.

Punto de fusión:	236°C
Peso molecular:	299.8
Solubilidad.	
Soluble en:	Agua
	Etanol
Insoluble en:	Hexano

Apariencia:	Polvo cristalino
Color:	Incoloro
Sabor:	Ligeramente amargo

#### d) Propiedades Químicas.

El Clorodiazepóxido pertenece al grupo de las benzodiazepinas que se caracterizan por ser un sistema anular heterocíclico formado por la unión de un anillo bencénico y un anillo heptagonal que contiene dos átomos de nitrógeno. Los principales derivados poseen un grupo fenilo en la posición 5 y un cloro en la posición 7. (Clorodiazepóxido, Diazepam y Oxazepam.).

Es inestable a la luz solar y en solución posee un tiempo de vida muy corto.

#### e) Propiedades farmacológicas.

Las benzodiazepinas poseen propiedades farmacológicas similares, siendo las diferencias de carácter cuantitativo. Aquí debe señalarse que el Clorodiazepóxido es mucho más potente que el Meprobamato (16) en todos sus efectos, cuando se aplica a animales, incluyendo al hombre, aunque en los primeros, dicha potencia varía según el efecto estudiado, la especie animal y el método utilizado.

Por ejemplo en el ratón la acción tranquilizante y relajante muscular del diazepam es alrededor de cinco veces mayor que la del clorodiazepóxido y de tres con respecto al oxazepam, mientras que para la acción anticonvulsionante el primero y el último lo son diez veces más que el segundo. (15). En cambio en la rata y en el mono la eficacia de las tres drogas es más o menos la misma. En lo que res -

pecta al hombre, referido al alivio de los estados de ansiedad y tomando en cuenta las dosis respectivas, el diazepam es dos veces más potente que el clordiazepóxido, mientras que el oxazepam es algo menos potente que el anterior. (14). Sin embargo el efecto relajante muscular y anticonvulsivo del clordiazepóxido es superior al de los otros dos. (19).

A continuación se hace una breve descripción de las principales alteraciones fisiológicas producidas por el clordiazepóxido en diversos organismos.

#### Acción tranquilizante.

En animales (rata, ratón, perro) disminuye la actividad motora, tiene efectos calmantes, es capaz de domar al mono Rhesus y otros animales salvajes (leones, tigres), en forma mucho más potente que el meprobamato; esta droga junto con el clordiazepóxido aumenta el efecto hipnótico de los barbitúricos y del alcohol. A dosis elevadas (200 mg/día) produce ataxia y sueño, en tanto que en cantidades excesivas produce la muerte por parálisis respiratoria. (15).

El clordiazepóxido posee baja acción inhibitoria sobre la respuesta condicionada en el mono y algo mayor en la rata. En cambio es un potente relajante muscular debido a la acción depresora de los reflejos espinales que origina, en forma más intensa que el meprobamato. También inhibe la rigidez en los gatos descerebrados.

En el hombre, posee acción tranquilizante al igual que el meprobamato, pero al parecer es más efectivo en los estados de ansiedad; calma también la tensión y alivia el insomnio (5). Aunque químicamente diferente del meprobamato, el clordiazepóxido actúa farmacológicamente igual, pero con una potencia mayor. La inyección intravenosa-

produce sueño sin llegar a la anestesia general. El clorodiazepóxido al igual que el diazepam y el oxazepam debe clasificarse como tranquilizante debido a que no produce manifestaciones extrapiramidales y ocasiona somnolencia así como estado de ebriedad. (14).

#### Acción anticonvulsionante.

El clorodiazepóxido es un potente anticonvulsionante en animales de experimentación. En el ratón es capaz de abolir las convulsiones producidas por el electroshock, pentilentetrazol y la estricnina. En el hombre también se observa dicha acción anticonvulsionante, sobre todo en el estado de mal epiléptico (convulsiones subintrantes).

#### Alteraciones en el electroencefalograma.

Tanto en animales como en el hombre el clorodiazepóxido a pequeñas dosis no modifica el electroencefalograma, con dosis mayores (150 a 200mg/día) produce una disminución de la frecuencia y aumento en la amplitud de las ondas (sincronización), mezclado con períodos de actividad rápida de bajo voltaje (desincronización). Dosis elevadas producen un electroencefalograma de sueño. (14 y 18).

La sensación de sueño producida por el clorodiazepóxido es semejante a la del estado normal y los pacientes muestran lenguaje defectuoso ataxia e incoordinación.

Por otra parte la reacción de despertar por estimulación de la formación reticular y por estímulo sensorial (acústica) es bloqueada por el clorodiazepóxido (15).

#### Acción en el cerebro.

En cerebro medio:

El clorodiazepóxido tiene acción depresora sobre el sistema activa-

dor ascendente reticular, lo que está demostrado por la elevación - del umbral de estimulación eléctrica, y por la desincronización que provoca en el electroencefalograma. Esta acción depresora es más potente que la correspondiente al meprobamato, pero mucho menos potente que la de la clorpromacina, por lo que dicho modo de acción no explica por completo los efectos tranquilizantes del clorodiazepóxido.

En el sistema límbico:

La lesión de los núcleos septales hace a la rata muy irritable y hostil, lo que es atenuado y bloqueado por acción del clorodiazepóxido. En el gato con electrodos implantados, el clorodiazepóxido provoca una disminución de la actividad eléctrica espontánea del hipocampo, núcleo amigdaloides y septum, además el umbral de estimulación de dichas formaciones es elevado por la administración de esta droga (16).

Estos experimentos señalan la posibilidad de que dicha droga actúe como tranquilizante por depresión de los centros rinencefálicos, cuyo papel en las reacciones emocionales es conocido, pero para poder confirmar ésto se requieren investigaciones posteriores.

En el sistema Nervioso Autónomo:

El clorodiazepóxido no afecta al Sistema Nervioso Autónomo, ya que los efectos que producen la adrenalina y la acetilcolina sobre la presión arterial no son modificados. Carece de acción antihistamínica por lo que debe clasificarse como tranquilizante propiamente dicho.

Acción en el sistema cardiovascular.

En los animales (perro), la inyección intraperitoneal e intrave

nosa de clordiazepóxido a dosis elevadas provoca un descenso de la presión arterial y de la frecuencia y fuerza de contracción del corazón. A bajas dosis inyectadas o por administración oral el clordiazepóxido no causa alteración significativa del sistema.

#### Acción tóxica.

El clordiazepóxido es una droga poco tóxica y de este rasgo - deriva la popularidad de su uso, sin embargo es capaz de provocar - reacciones adversas y también fenómenos de dependencia.

#### f) Metabolismo.

El metabolismo del clordiazepóxido ha sido estudiado mediante las técnicas de marcado con carbonos radioactivos, a continuación se hace una breve descripción de las principales etapas que sigue dentro del organismo.

##### 1o. Absorción.

En perros una dosis simple oral produce niveles elevados en sangre durante 24 horas, y aún después de 48 horas se encuentra en cantidades medibles. Su máxima concentración en sangre es encontrada a las 8 horas y se excreta lentamente en la orina en cantidades de aproximadamente el 12% durante 96 horas.

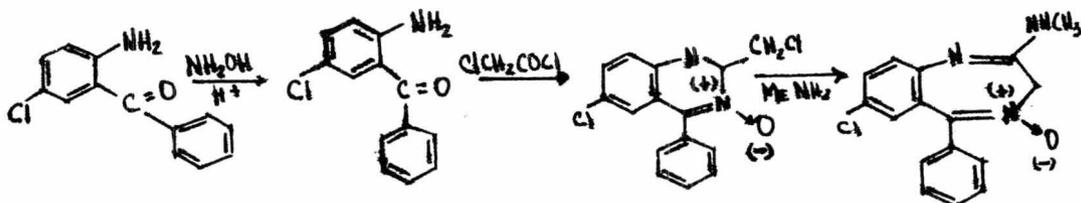
En el hombre se encuentran efectos similares a los anteriores - y la absorción se efectúa con facilidad cuando se administra por - vía oral o parenteral. La absorción en el tracto digestivo es muy rápida y aparece en sangre a los pocos minutos; su concentración en plasma llega al máximo a las 2 horas aproximadamente, para descender y desaparecer a los 3 o 4 días. (12).

Esta rápida absorción condiciona el comienzo también rápido de



solución de metilamina en metanol en hielo seco para dar el 1,4 diazepam,4-óxido ó Clorodiazepóxido. El clorodiazepóxido se separa de la solución con éter de petróleo.(2).

Este proceso de obtención se esquematiza a continuación:



#### h) Presentación.

Se encuentra en el mercado en forma de grageas de 5,10 y 25mg, y en tabletas de 5 y 10mg,conteniendo no menos del 99% de la droga. También se encuentra en cajas que contienen una ampollita con polvo liofilizado y trae otra ampollita de solvente;es de uso exclusiva - mente intramuscular.Para inyección intravenosa se usa como solvente una ampollita de 10ml de agua bidestilada.

#### i) Usos.

El uso del clorodiazepóxido es muy amplio,hasta llegar a sobre pasar en nuestro país al del meprobamato.

El clorodiazepóxido se utiliza especialmente en el tratamiento de las neurosis,algunos casos de psicosis y en casos de alcohólicos.

En el caso de neurosis se usa como tranquiizante menor,princi palmente en aquellos que presentan ansiedad,tensión emocional,histe ria,reacciones obsesivas y estados depresivos con tensión.También - se emplea en pacientes con trastornos emocionales que son consecuen

cia de las enfermedades orgánicas.

En psicosis, aunque se considera como tranquilizante menor y no posee acción antipsicótica, es útil como coadyuvante de otras drogas sobre todo en los estados depresivos que van acompañados de ansiedad, en cuyo caso puede suministrarse junto con las drogas antidepresivas para el tratamiento de la esquizofrenia, como son las fenotiazinas, aunque por lo general no se hace necesaria esta medida. (5).

El tratamiento de alcohólicos con clordiazepóxido ha llegado a ser muy popular, particularmente por aliviar los síntomas de alcohólicos retirados o alcohólicos en episodio combativo, para aliviar la ansiedad y la tensión que llegan a presentarse en esa etapa (3).

#### j) Vías de administración.

Se emplea generalmente por vía oral; las vías parenterales, intramuscular y aún intravenosa, se utilizan en estados de intensa excitación psíquica, en las indicaciones quirúrgicas y obstétricas, así como en el estado de mal epiléptico.

#### k) Dosis.

La dosis usual es de 10mg 3 veces/día; el límite es de 5 a 25mg-4 veces/día.

En pacientes severamente disturbados deberá dárseles una dosis hasta de 100mg/día. En alcohólicos se les administran dosis hasta de 200 a 300mg/día en el tratamiento anti-alcoholismo. La máxima dosis oral usada es de 500mg/día. Debe recordarse que a mayor dosificación es más probable el peligro de producir dependencia física.

### 1) Contraindicaciones.

El clordiazepóxido produce trastornos nerviosos, gastrointestinales, hematológicos, adversos y fisiológicos.

Las manifestaciones nerviosas consisten en somnolencia, ataxia, cefalea, alteraciones de la memoria, astenia, trastornos que se exageran en los ancianos especialmente; algunas veces se han observado reacciones como excitación o irritabilidad psíquica. (11).

Los trastornos gastrointestinales provocan sequedad en la boca náuseas y constipación; en algunos casos puede producirse aumento del apetito y voracidad.

Los trastornos hemáticos, excepcionales, consisten en leucopenia y aún agranulocitosis. Las manifestaciones alérgicas son urticaria y erupciones cutáneas morbiliformes.

Los trastornos fisiológicos consisten en impedimento de la función sexual, vértigo, aversión a la luz, irregularidad menstrual y ovulatoria.

Todos estos trastornos ceden con la supresión del medicamento o la disminución de la dosis.

Los envenenamientos con esta droga son muy raros, de 22 intentos de suicidio por pacientes que ingirieron de 0.2 a 2.25 gramos al mismo tiempo ninguno murió, quedando todos adormecidos y apacibles (9). Posteriormente fueron despertados y pudieron hablar, comer e ingerir líquidos; aunque la respiración, la presión sanguínea y el pulso fueron un poco lentos. Es importante hacer notar que esta dosis se encuentra abajo del grado letal. En un caso fatal, una persona que ingirió clordiazepóxido se le encontró un nivel en plasma de 1.9 mg.

### Dependencia.

La administración de clordiazepóxido dá lugar a dependencia - psíquica y física con tendencia al aumento de la dosis, pudiendo producirse por la supresión un síndrome de abstinencia que comprende - excitación, insomnio, temblores y aún convulsiones.(8).

### Estímulo del apetito.

El clordiazepóxido tanto en hombres como en animales(rata, pe- rro) tiene un efecto estimulante del apetito, llegando a ser voraces y por lo tanto a aumentar de peso.No se conoce el modo de acción de la droga a este respecto.

### Alteración del estado de ánimo.

Un tipo de estímulo que puede también producir el clordiaze - póxido algunas veces, es que los pacientes llegan a estar locuaces y excitados, tienen un elevado sentido de euforia y pueden parecer co- mo embriagados.Pueden estar atáxicos así como confusos y delirar.

## III

**Generalidades  
sobre Cromatografía.**

a) Reseña histórica.

La primera aplicación de Cromatografía se atribuye al biólogo ruso Tswett, quien en el año de 1906 desarrolló algunos experimentos que consistieron en hacer pasar una solución de pigmentos verdes, - procedentes de plantas, a través de una columna de vidrio empacada con yeso finamente dividido. Estos pigmentos fueron depositados en la parte alta de la columna y movidos por la influencia de una corriente de petróleo ligero que actuaba como solvente en movimiento (1).

Tswett observó que a lo largo de la columna se formaban franjas horizontales de diferente color, y que los pigmentos más afines por el yeso formaban las franjas superiores, en tanto que los menos afines formaban las inferiores, de aquí que se le haya denominado a este experimento "Cromatografía por absorción en columna".

Estas experiencias permanecieron durante algún tiempo como curiosidades, hasta que Martin y Synge introdujeron la técnica de "Cromatografía de partición en columna", cuyo principio está fundamentado en la distribución o partición de los componentes de una mezcla en una sustancia común contenida en el medio o soporte y en el solvente que fluye hacia la parte inferior de la columna.

Sin embargo los resultados obtenidos no eran del todo satisfactorios y en 1944 Consden, Gordon y Martin desarrollaron la técnica de cromatografía en papel o de "Columna abierta" que puede considerarse como una cromatografía de partición.

Podemos decir que la cromatografía adquirió formalidad hasta el año de 1958, cuando Stahl estandarizó los procedimientos de cromatografía existentes a esa fecha y además demostró la aplicación de

la cromatografía en capa fina y las ventajas que esta técnica ofrece.

Para terminar mencionaremos que los últimos adelantos en esta materia han sido la implementación de la cromatografía de gases y el desarrollo de las resinas de intercambio iónico. El primero de ellos es una técnica que emplea un gas como solvente y permite el análisis de mezclas de gases, líquidos volátiles o sólidos; en tanto que el segundo desarrollo permite la separación de productos por fisión nuclear. (1).

#### b) Clasificación de técnicas cromatográficas.

Los diferentes sistemas de cromatografía pueden clasificarse dentro de 4 grupos principales:

- 1) Cromatografía por partición.
- 2) Cromatografía por filtración.
- 3) Cromatografía por adsorción.
- 4) Cromatografía por intercambio iónico.

##### 1) Cromatografía por partición.

Esta técnica está basada en la separación de mezclas de sustancias por medio de la distribución del soluto entre un solvente en movimiento y un líquido estacionario, que es mantenido sobre un soporte sólido. Esta distribución obedece la ley de Partición, de aquí el nombre con que se conoce este tipo de cromatografía.

Dentro de esta misma clasificación podemos identificar dos sistemas diferentes, el que emplea como solvente en movimiento un líquido (cromatografía líquido/líquido) y el que emplea un gas (cromatografía gas/líquido).

La verdadera cromatografía por partición sólo es influenciada por la relativa solubilidad de los compuestos en la fase estacionaria y en la fase en movimiento, aunque normalmente existe una cierta combinación con la adsorción del compuesto. Es importante anotar que la adsorción varía proporcionalmente con la polaridad de las sustancias.

Los soportes más comúnmente usados son papel filtro, celulosa y sílica gel húmeda. Estos materiales pueden disponerse en hojas, en columna empacada o en capa fina respectivamente.

## 2) Cromatografía por filtración.

Esta técnica es una forma particular de la cromatografía líquido/líquido y la separación está basada en las diferencias de tamaño molecular de las sustancias.

Para la realización de este método se requiere de un tipo especial de gel llamado Sephadex, el cual es un polisacárido que se caracteriza por su estructura uniformemente reticulada. Este gel es empacado en columnas para cromatografía y a través de ella se hace pasar la mezcla de la sustancia por separar. Esta mezcla es forzada a pasar mediante continuos lavados.

Las moléculas más pequeñas son filtradas a través de los poros del gel en tanto que las mayores son arrastradas por los lavados al rededor de las partículas de gel. Como resultado de esto las moléculas van saliendo al final de la columna en orden decreciente de tamaño, obteniéndose así la deseada separación.

### 3) Cromatografía por adsorción.

Esta técnica está basada en las diferencias de intensidad del fenómeno adsorción-desorción que existe entre las sustancias que componen una mezcla y que se mueven en un solvente a través de una fase sólida estacionaria que sirve como soporte y permite la separación.

La separación de las sustancias depende de las características polares de cada una de ellas, lo que permite ser retenidas mediante fuerzas electrostáticas en la superficie activa del adsorbente. La superficie activa del adsorbente es originada por defectos en el cristal del mismo y su intensidad depende tanto de la magnitud de la superficie del grano como del número de las irregularidades que presenta.

La cromatografía por adsorción generalmente es llevada a cabo usando una capa de algunos óxidos metálicos hidratados o sales metálicas, siendo las más usadas la sílica gel y la alúmina.

Es importante seleccionar adecuadamente tanto el adsorbente como el solvente ya que la afinidad de un cierto componente por el adsorbente puede impedir su desplazamiento a través de la fase estacionaria o bien en el caso contrario puede suceder que debido a la poca afinidad, el componente se desplace tan rápidamente que no ocurra una buena separación. La regla general es usar solventes y muestras de la misma polaridad y usar adsorbentes de elevada actividad para sustancias no polares y adsorbentes de baja polaridad para sustancias polares.

#### 4) Cromatografía por intercambio iónico.

Esta nueva técnica cromatográfica emplea materiales especiales los cuales contienen grupos reactivos asociados con iones lábiles - capaces de intercambiarse con iones del medio que los rodea. Normalmente el proceso se lleva a cabo en medio acuoso y los materiales - de intercambio son regenerables. Los más usuales son tipos especiales de resinas sintéticas, algunos tipos de geles y celulosas tratadas.

Como su nombre lo sugiere, esta técnica es empleada para la separación de sustancias iónicas abarcando desde las inorgánicas, orgánicas y polielectrolitos tales como las enzimas, proteínas, hormonas, etc.

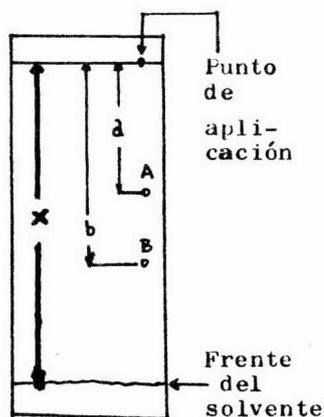
Los diferentes materiales usados en este tipo de separación - son seleccionados de acuerdo al tamaño molecular de las sustancias - por separar. La reticulación más fina es obtenida en las resinas sin - téticas, por lo que son empleadas en la separación de iones inorgáni - cos, en tanto que los geles y la celulosa debido a su más amplia re - ticulación son empleados en la separación de electrolitos.

La técnica consiste en hacer pasar la mezcla a través de una - columna empacada; esta mezcla es colocada en la parte superior de la columna y es forzada a pasar mediante un eluyente cambiando las con - diciones de éste, tales como pH y temperatura, se van obteniendo ti - nas franjas de un mismo soluto a lo largo de la columna.

#### c) El factor Rf.

Dentro de las más importantes propiedades de la cromatografía - debe mencionarse que para un sistema cromatográfico dado, el movi -

miento relativo de un compuesto con respecto al del frente del solvente es un valor reproducible y específico de dicha sustancia. En cromatografía de papel este valor se conoce como  $R_f$ .



$$R_f(A) = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto A}}{\text{Distancia recorrida por el frente del solvente.}}$$

$$R_f(A) = \frac{a}{X} \quad ; \quad R_f(B) = \frac{b}{X}$$

Frecuentemente ocurre que el frente del solvente corre más allá de las orillas del papel, por lo que en muchas ocasiones se acostumbra referir la distancia recorrida por el compuesto problema a la recorrida por una sustancia estándar en este caso denominada (X), debido a esto último esta relación es conocida como valor  $R_x$ .

$$R_x(A) = \frac{\text{Distancia recorrida por la sustancia A}}{\text{Distancia recorrida por la sustancia estándar X}} = \frac{a}{X}$$

## IV

Descripción de los sistemas Cromatográficos en placa fina para la identificación de Clorodiazepóxido.

a) Sistemas de identificación.

En la literatura se encuentran reportados los siguientes sistemas cromatográficos para la identificación de Clorodiazepóxido(4).

Sistema #1.

Método general para la identificación de bases nitrogenadas.

Preparación de las placas.-Las placas de vidrio de 20cmx20cmx2 mm. se cubren con una capa consistente de 30g de sílica gel tipo G- en 60ml de agua,obteniéndose una capa de 0.25mm que se deja secar a 110°C durante 1 hora, o bien puede ponerse en desecador durante toda la noche.

Preparación de las muestras.-Se toma 1,0 microlitro de una solución al 1% de clorodiazepóxido en ácido acético 2N.

Solvente.-Se emplea una solución de amoniaco-metanol(1.5:100). La solución deberá cambiarse después de haber corrido dos cromatogramas.

Equilibración.- El solvente deberá permanecer en la cámara inicialmente cerrada durante 1 hora a fin de saturar la atmósfera.

Desarrollo.-Ascendente en un tanque de 21cmx21cmx10cm.Las paredes del tanque deben ser cubiertas con papel filtro para disminuir la evaporación.El tiempo de corrimiento es de 30 min.

Reveladores:

- 1) Luz ultravioleta.
- 2) Spray acidificado de Iodoplatinato
- 3) Diazotización seguida por spray de Beta naftol alcalino o - Spray de N-1 naftil etilen diamina.
- 4) Spray diazotizado de P-nitroanilina-Hidróxido de sodio.
- 5) Reactivo de Dragendorff.

- 6) Reactivo de P-dimetil amino benzaldehido.
- 7) Reactivo de Iodo-Tetracloruro de carbono.
- 8) Reactivo de Marquis.
- 9) Vapores de dióxido de nitrógeno.
- 10) Reactivo de permanganato de potasio.

#### Sistema #2.

Método para la identificación de antihistaminas y clorodiaze -  
póxido.

Preparación de las placas.-Las placas de vidrio se cubren con una capa consistente de 30g de óxido de aluminio tipo G en 30ml de agua y se secan a 80°C durante 45 min, o bien ponerse en desecador.

Preparación de las muestras.-Tomar de 10 a 50 microlitros (1 a 20 microgramos) de extracto en etanol.

Solvente.-Acido acético:Butanol:Eter butílico (10:40:80).

Desarrollo.-Ascendente hasta que el solvente llegue a una distancia de 10cm.

Revelador;

Reactivo de Iodoplatinato (Spray)

#### Sistema #3.

Método para identificación de Clorodiazepóxido, fenotiazinas y compuestos relacionados.

Preparación de las placas.-Las placas de vidrio se cubren con una capa de 25g de sílica gel tipo G en 50ml de agua y se secan a 80°C durante 30 min. o bien ponerse en desecador toda la noche.

Preparación de las muestras.- Tomar de 10 a 50 microlitros (1-20 microgramos) del extracto en etanol.

Solvente.-Hidróxido de amonio:Benceno:Dioxano (5:60:35).

Desarrollo.-Ascendente hasta que el solvente llegue a una distancia de 10cm.

Revelador:

Reactivo de Iodoplatinato(Spray).

b) Preparación de los reveladores.

Para el sistema #1:

1) Se emplea una lámpara de luz ultravioleta cuya longitud de onda sea de 254 milimicras.

2) Se prepara adicionando 2ml de HCl a 100ml. de reactivo de Iodoplatinato.El reactivo de Iodoplatinato se prepara adicionando 0.25g de cloruro de platino más 5g. de Ioduro de potasio a una suficiente cantidad de agua para formar 100ml.

3) El beta Naftol alcalino consiste en una solución al 4% de beta naftol en sosa 2N.

El N-1 naftil etilen diamina se prepara disolviendo 100g de N-1 naftiletilen diamina en suficiente etanol para formar una solución de 100ml.

La diazotización se lleva a cabo exponiendo la muestra a vapores de óxido de nitrógeno y después se rocía con el spray.

4) Se requiere de la preparación de dos soluciones:

a.-Mezclar 5ml. de una solución al 0.3% de P-nitroanilina en HCl.Luego agregar 5ml de una solución al 5% de nitrito de sodio en agua.

b.-Preparar una solución al 20% de carbonato de sodio en agua.

La muestra se rocía sucesivamente con a y con b.

5) Se requiere de la preparación de dos soluciones:

a.-Mezclar juntos 2g de subnitrito de bismuto,25ml de ácido acético y 100 ml de agua.

b.-Disolver 40g de Ioduro de potasio en 100 ml de agua.

Se mezclan 10 ml de cada una de las soluciones y se agregan 20 ml. de ácido acético y 100 ml de agua.

6) Se disuelve 1g de P-dimetil aminobenzaldehido en 100 ml de etanol y se agregan 10ml. de HCl.

7) Se disuelve 1g de Iodo en suficiente tetracloruro de carbono para obtener 100 ml. de solución.

8) Reactivo de Marquis.- ( $H_2SO_4$  + Formaldehido). A 1ml de solución acuosa de formaldehido (34-38%) se le agregan 100ml de  $H_2SO_4$  - concentrado (97%).

9) Se producen por adición de amoniaco sobre torneladura de cobre y se expone la placa a los vapores que emanan.

10) Se disuelve 1g de permanganato de potasio en suficiente agua para formar 100 ml de esta solución, la cual debe protegerse de la luz.

El valor Rf del clorodiazepóxido en este sistema es de 0.67.

Revelador del sistema #2.

Reactivo de Iodoplatinato.- Se disuelven 0.25g de cloruro de platino y 5g de Ioduro de potasio en suficiente agua para formar 100 ml.

Por este sistema el valor Rf del Clorodiazepóxido es de 0.1.

Revelador del sistema #3.

Spray de Iodoplatinato.- Se prepara igual que el anterior.

Valor Rf : 0.7.

c) Factores que influyen en el resultado.(10 y 17).

A continuación se hace un breve análisis de la influencia que pueden tener los principales elementos que intervienen en la cromatografía.

#### Adsorbente.

La pureza del adsorbente así como la preparación del mismo son los factores más importantes que deben vigilarse para obtener resultados óptimos y reproducibles.

La presencia de trazas de impurezas afecta significativamente la marcha del cromatograma debido principalmente a que ocupan parte de los centros activos e impiden el libre desarrollo de la muestra. Una de las principales impurezas es el agua que queda ocluida durante la preparación de la placa, ocupando gran parte de los centros activos, por lo que se hace necesario efectuar un calentamiento a fin de eliminarla por evaporación, a este proceso se le denomina activación.

La activación debe realizarse en dos pasos, el primero de ellos consiste en exponer la placa al aire durante aproximadamente 20 min posteriormente se somete a un calentamiento de 105-110°C durante 30 min. en una estufa, en esta forma se evita la cuarteadura de la película y la adhesión imperfecta del adsorbente.

#### Disolvente.

La principal característica que se requiere de estos productos es que tengan un elevado grado de pureza. La selección del solvente adecuado es producto de la experiencia, aunque existe una cierta preferencia por determinados tipos de eluyentes.

### Agentes aglutinantes.

La sílica gel más apropiada para este tipo de trabajo es la catalogada como sílica gel GF 254, la cual contiene yeso como aglutinante y además está mezclada con una sustancia luminosa inorgánica no eluible, que da una intensa fluorescencia al ser excitada con luz ultravioleta de onda corta. De este modo las sustancias separadas pueden hacerse visibles sin necesidad de rociarlas con reactivos de tinción que puedan alterarlas químicamente.

### Aplicación de las muestras.

Es recomendable aplicar la solución problema en varias porciones pequeñas sucesivas y secar cada porción antes de proseguir. Las gotas se aplican con una pipeta especial (división en microlitros) a una distancia de 1.5 cm del borde inferior. Los puntos de goteo deberán estar separados mínimo 1.5 cm uno del otro. Normalmente se emplean muestras de 5 a 10 microlitros y los puntos de partida son marcados de antemano mediante el uso de un lápiz de punta afilada.

### Desarrollo del cromatograma.

Es indispensable que el recipiente donde se lleve a cabo el cromatograma cierre herméticamente y la cámara se encuentre saturada antes de efectuar el corrimiento, ya que de otra forma se requerirá de una mayor cantidad de disolvente para que el frente llegue a la distancia señalada.

El espesor de la película debe ser uniforme ya que si éste aumenta la distancia recorrida por el disolvente será menor y viceversa, por lo que irregularidades en el espesor conducen a resultados erróneos. El tamaño de la película y la inclinación de la placa con respecto al tanque son otros factores que deben considerarse para la obtención de resultados reproducibles. (13).

d) Selección del sistema.

A continuación se hace un análisis de los sistemas de identificación considerando los factores más importantes de cada uno de ellos.

Sistema #1.

Este sistema presenta el inconveniente de ser un método general para la identificación de bases nitrogenadas.

Por otro lado, los diferentes reactivos que intervienen son conseguidos con gran facilidad, su costo es relativamente bajo y dispone de un buen número de reveladores que en un momento dado pueden ayudar a corroborar el resultado.

Sistema #2.

Presenta el inconveniente de usar reactivos difíciles de conseguir en el mercado nacional, independientemente de su elevado costo debido a su naturaleza.

Presenta un mayor grado de dificultad al elaborar la placa con óxido de aluminio y tiene como único revelador el reactivo de Iodo-platinato (en spray).

Como ventaja tenemos que se trata de un método un poco más específico que el anterior.

Sistema #3.

Tiene el inconveniente de ser también un método general de identificación para fenotiazinas y compuestos relacionados y emplea como único revelador el reactivo de Iodoplatinato, que como habíamos mencionado en el caso anterior difícilmente se consigue y su costo es elevado. Los resultados no son siempre observados con claridad debido al intenso color morado de los compuestos de Iodo.

En base al análisis anterior y efectuando un balance de los -

factores favorables y desfavorables de cada uno de los sistemas se llegó a la selección del sistema #1 que es el que presenta el mayor número de condiciones favorables.

V

Desarrollo práctico de la Cromatografía en  
la identificación de Clordiazepóxido.

a) Análisis cromatográfico de materia prima.

La técnica seguida para desarrollar la cromatografía ya ha sido descrita en el capítulo anterior y únicamente se hará mención de que en lugar de emplear placas de vidrio de 20cmx20cmx2mm se usaron de 20cmx6cmx2mm, debido a la facilidad para manipular y preparar las placas con la capa de sílica gel.

Se colocaron tres muestras en cada placa para mayor seguridad en los resultados.

Después de haberse efectuado los corrimientos, se llevó a cabo el revelado de la muestra con diferentes tipos de reactivos, a continuación se anotan los resultados obtenidos con cada uno de ellos (Tabla #1).

De la anterior serie de reveladores, el reactivo de Dragendorff (en spray), es el que ofrece las mayores ventajas tanto por la claridad con que se revelan las manchas como por el tiempo que permanecen visibles. Este revelador ofrece también la ventaja en el sentido de que las pruebas en las que no hubo revelador por aplicación de otros reactivos (vapores de dióxido de nitrógeno) pudieron hacerse visibles mediante el rocío con el reactivo de Dragendorff. Debido a las grandes ventajas que presenta este revelador los cromatogramas posteriores fueron revelados exclusivamente con este reactivo.

De acuerdo a los resultados obtenidos el valor Rf encontrado es de 0.67.

b) Análisis cromatográfico de Clorodiazepóxido en tabletas.

El análisis cromatográfico de Clorodiazepóxido se llevó a cabo

también en tabletas, cuyo contenido de material activo era de 10mg.- cada tableta que es su forma comercial. Estas tabletas son fabricadas bajo el nombre comercial de Sivium.

La separación del Clorodiazepóxido se hizo mediante una serie de extracciones siguiendo la técnica que a continuación se describe.

Procedimiento:

- 1) Se pulverizan las tabletas en un mortero (0.1 gramo)
- 2) Se disuelven en 25 ml de agua.
- 3) Se alcaliniza con sosa hasta un pH de aproximadamente 7.5
- 4) Se extrae con 60ml de cloroformo en 4 porciones.
- 5) Se evapora el extracto en baño María hasta sequedad.
- 6) Se disuelven los cristales de clorodiazepóxido en 9.9g de ácido acético.

Se sigue la misma técnica que para el análisis cromatográfico de clorodiazepóxido como materia prima, revelando con el reactivo de Dragendorff.

Los resultados obtenidos se encuentran en la tabla #2.

### c) Identificación de clorodiazepóxido en mezclas.

Esta identificación se llevó a cabo preparando una serie de 60- mezclas diferentes de clorodiazepóxido con varios productos farmacéuticos de uso común.

La preparación de las muestras se realizó de manera similar a las del caso anterior, usándose también como único revelador el reactivo de Dragendorff.

La composición de las mezclas así como los resultados de las mismas se enlistan en la tabla #3.

En las tablas 4 y 5 se encuentran las mezclas desconocidas (an-

tes del análisis) que me fueron entregadas en calidad de problemas por el maestro asesor.

Tabla #1

Tipo de revelador.	Observaciones	Rf (tres muestras por placa.
Luz ultravioleta	Aparición de manchas oscuras	0.67 ; 0.67 ; 0.68
Spray acidificado de iodoplatinato	Aparición de manchas color violeta que desaparecen rápidamente.	0.68; 0.67 ; 0.67
Diazotización seguida por reactivo de beta naftol alcalino	No hubo revelado	- - -
Spray diazotizado de P-nitro anilina-hidróxido de sodio	No hubo revelado	- - -
Reactivo de Dragendorff	Aparición de manchas color naranja muy precisas. Desaparecen después de aproximadamente 8 horas.	0.67 ; 0.67 ; 0.67
Reactivo de F-dimetil aminobenzaldehído	Aparición de manchas difusas de color café tenue. Desaparecen inmediatamente.	0.67 ; 0.68 ; 0.67
Reactivo de Iodotetracloruro de carbono.	Aparición de manchas café-amarillentas que desaparecen rápidamente	0.67 ; 0.67 ; 0.68
Reactivo de Marquis.	No hubo revelado	- - -
Vapores de dióxido de nitrógeno.	No hubo revelado	- - -
Reactivo de permanganato de potasio.	Manchas violeta muy tenue que desaparecen en pocos minutos.	0.67 ; 0.67 ; 0.67



Tabla #3

Clorouiazepóxido con:	Observaciones	Valor Rf	Resultado
Antipirina	2 manchas	0.67;0.23	Positivo
Bromocaína	2 manchas	0.67;0.5	Positivo
Benzedrina	1 mancha	0.67	Positivo
Neomelubrina	2 manchas	0.67;0.4	Positivo
Clorhidrato de Lidocaína	2 manchas	0.67;0.58	Positivo
Clorhidrato de escopolamina	2 manchas	0.68;0.64	Positivo
Fosfato de codeína	2 manchas	0.67;0.18	Positivo
Clorhidrato de piridoxina	2 manchas	0.67;0.35	Positivo
Pantotenato de estreptomina	1 mancha	0.68	Positivo
Barbital	1 mancha	0.66	Positivo
Barbital sódico	1 mancha	0.67	Positivo
Acido acetyl salicílico	1 mancha	0.69	Positivo
Citrato de cafeína	1 mancha	0.68	Positivo
Trigomicina	1 mancha	0.67	Positivo
Bromhidrato de escopolamina	2 manchas	0.68;0.65	Positivo
Neomelubrina	2 manchas	0.67;0.4	Positivo
Penicilina	1 mancha	0.69	Positivo
Succinato de hidrocortizona	1 mancha	0.68	Positivo
Diyododihidroxiquinolina	2 manchas	0.67;0.14	Positivo
Clorhidrato de piridoxina	2 manchas	0.67;0.3	Positivo

Tabla #4.

Mezcla	Observaciones	Rf	Resultado
Bacitracina+Clorodiazepóxido	1 mancha	0.68	Positivo
Citrato de cafeína+Clorodiazepóxido	1 mancha	0.68	Positivo
Cloruro de potasio+Cloruro de amonio+Trifosfato de calcio + cafeína	-	-	Negativo
Trigomicina+Clorodiazepóxido	1 mancha	0.67	Positivo
Acido acetil salicílico+Trigomicina	-	-	Negativo
Neomelubrina+Clorodiazepóxido	2 manchas	0.67;0.4	Positivo
Diyododihidroxiquinolina + Clorodiazepóxido	2 manchas	0.67;0.1	Positivo
Succinato de hidrocortizona +Clorodiazepóxido	1 mancha	0.68	Positivo
Penicilina+Clorodiazepóxido	1 mancha	0.69	Positivo
Clorhidrato de Lidocaína+Clorodiazepóxido	2 manchas	0.68;0.6	Positivo
Cafeína+Ac acetil salicílico+Clorodiazepóxido	1 mancha	0.69	Positivo
Clorhidrato de Lidocaína+Ac acetil salicílico+Clorodiazepóxido	2 manchas	0.68;0.6	Positivo
Citrato de cafeína	-	-	Negativo
Ac acetil salicílico+Succinato de hidrocortizona	-	-	Negativo
Ac acetil salicílico+Neomelubrina	1 mancha	0.45	Negativo
Clorhidrato de escopolamina +Clorodiazepóxido	2 manchas	0.68;0.6	Positivo
Clorhidrato de Lidocaína+Clorodiazepóxido	2 manchas	0.67;0.5	Positivo
Citrato de cafeína+Clorhidrato de Lidocaína	1 mancha	0.57	Negativo

Tabla# 5

Mezcla	Observaciones	Valor Rf	Resultado
Pantotenato de estreptomina+Clorodiazepóxido	1 mancha	0.68	Positivo
Bacitracina+Clorodiazepóxido	1 mancha	0.67	Positivo
Penicilina	-	-	Negativo
Neomelubrina	1 mancha	0.56	Negativo
Clorhidrato de escopolamina+Clorodiazepóxido	2 manchas	0.69;0.64	Positivo
Clorhidrato de piridoxina +Clorodiazepóxido	2 manchas	0.67;0.34	Positivo
Penicilina+Citrato de cafeína+Clorodiazepóxido	1 mancha	0.68	Positivo
Pantotenato de estreptomina	-	-	Negativo
Clorhidrato de piridoxina +Bacitracina+Clorodiazepóxido	1 mancha	0.68	Positivo
Ac acetil salicílico+Citrato de cafeína+Clorhidrato de escopolamina+Penicilina +Clorodiazepóxido	2 manchas	0.69;0.62	Positivo
Ac acetil salicílico+Clorhidrato de piridoxina	1 mancha	0.32	Negativo
Clorhidrato de lidocaína+ Neomelubrina+Penicilina + Clorodiazepóxido	2 manchas	0.68;0.5	Positivo
Ac acetil salicílico+Citrato de cafeína+Clorhidrato de escopolamina+Penicilina +Clorodiazepóxido.	2 manchas	0.68;0.63	Positivo
Ac acetil salicílico+Citrato de cafeína+Clorhidrato de escopolamina+penicilina +Clorodiazepóxido	2 manchas	0.69;0.64	Positivo
Cocaína+Clorodiazepóxido	1 mancha	0.67	Positivo
Extracto de opio+Clorodiazepóxido	1 mancha	0.67	Positivo

Tabla #5 (continúa)

Mezcla	Observaciones	Valor Rf	Resultado
Cocaína+Extracto de opio +10% Morfina	-	-	Negativo
Extracto de opio+20% morfina	-	-	Negativo

## d) Observaciones de los resultados.

Debido a la presencia de algunos fármacos y otros compuestos químicos, en algunos casos el corrimiento del Clorodiazepóxido se ve afectado de diversa manera y por consiguiente el valor de su Rf; por lo que para efectos de resultados se consideró una tolerancia de  $\pm 0.02$  del valor estándar del clorodiazepóxido, que para este sistema es de 0.67.

También se llega a presentar el caso de que aparecen más de una mancha revelada pero presentando valores Rf muy diferentes, lo que nos ayuda a la identificación del auténtico corrimiento del Clorodiazepóxido.

Los resultados ya han sido presentados en las tablas anteriores en donde puede observarse la efectividad del método. De las sesenta mezclas ensayadas no hubo resultados falsos, tomando en cuenta la tolerancia.

V

**Consideración**

**final**

a) Conclusiones.

En base a los resultados obtenidos se concluyen los siguientes - puntos:

- 1o. Que el método de identificación cromatográfica para bases ni trogenadas puede ser aplicado para la identificación de Clorodiazepóxido.
- 2o. La especificidad del método empleado queda demostrada al hacer la identificación de Clorodiazepóxido en mezclas de drogas y fármacos de uso común.
- 3o. Los resultados obtenidos por este método son reproducibles.
- 4o. Esta técnica de identificación proporciona resultados rápida mente.
- 5o. La técnica seguida no requiere de equipo complicado ni de re activos de elevado costo.
- 6o. Es un método de elevada sensibilidad ya que identifica Clorodiazepóxido en cantidades hasta de 1 microgramo.

b) Recomendaciones.

La identificación de clorodiazepóxido por Cromatografía en placa fina puede ser recomendado como un método de utilidad para los Químicos legistas, sobre todo por la rapidez que se requiere en muchas ocasiones.

Se sugiere que para los casos en los cuales se sospecha la presencia de Clorodiazepóxido, se empleen reacciones de orientación como reacciones colorimétricas, microcristalizaciones, etc. y aún cuando es-

tas reacciones resulten negativas, se recomienda confirmar la presencia de Clordiazepóxido por el método de Cromatografía en placa fina.

## Bibliografía.

- 1.- Abbott David y R.S. Andrews  
An introduction to Chromatography.  
2nd. edition Longmans Green & Co. 1970. Gran Bretaña.
- 2.-Acheson R.M.  
An introduction to the chemistry of heterocyclic compounds.  
2nd. edition. Interscience publishers; John Wiley & sons.  
New York U.S.A. 1967.
- 3.- Cirilli M. y Praigny  
Tratamiento de los estados de excitación especialmente en alcohólicos, con el Clordiazepóxido.  
IV Congreso Mundial de Psiquiatría.  
Excerpta Médica Foundation. Dordrecht, 1967, 68.
- 4.- Clarke E. G. C.  
Isolation and identification of drugs.  
London. The pharmaceutical Press. 1967
- 5.- Daneman E.A.  
Double blind study with diazepam, chlordiazepoxide and placebo in the treatment of psychoneurotic anxiety.  
J.M.A. Georgia, 1969, 53, 55.
- 6.- Darling. H.F.A.  
Comparative study of diazepam and chlordiazepóxide in psychoneurotic patients.  
Dis. Nerv. Syst. 1963, 24, 501.
- 7.- Domino E.F.  
Human pharmacology of tranquilizing drugs.  
Clin. Pharmacol. & therap. 1962, 3, 599.

8.- Essig C.L.

Addiction to nonbarbiturate sedative & tranquilizing drugs.  
Clin Pharmacol. & Therap. 1969,5,334.

9.- Goodman & Gilman

The pharmacological basis of therap.  
3rd edition Mc Millan Con. New York . 1970

10.- E. Hitman.

Chromatography.  
Keinhold Publishing Co. New York .1961.

11.- Holister L.E.

Chlordiazepoxide is newly admiteds **schizophrenics**.  
Dis. Nerv. Syst.1963,24,1-4

12.- Koechlin,B.A. Schwartz,M.A.

The metabolic fate of C<sup>14</sup> labeled chlordiazepoxide in man,dog  
and in the rat.  
J.Pharmacol. & Therap. Experimental.1965,148,339.

13.-Liderer E. y Liderer M.

Chromatography.  
Areview of principles and applications.  
Elsevier Publishing Co. New York.1960

14.- Lewis,J.

An introduction to Pharmacology.  
3rd edition. E.S. Livingstone Ltd. Edinburgh,1965.

15.- Litter,M

Farmacología experimental y clínica  
4a edición. El Ateneo.Buenos Aires.1972.

16.- Randall,L.O.

Pharmacology of Chlordiazepoxide (Librium)  
Dis.New.Syst. (suppl.7),1961,22,7.

- 17.- Stahl, E., Dunnschicht.  
Chromatographie.  
Springerverlang, Berlin 1962.
- 18.- Swinyard, E.A. y Castellion.  
Anticonvulsant properties of some benzodiazepines.  
J. Pharmacol. & Exper. Therap., 1965, 151, 369.
- 19.- Tobin, J.M. & Lewis N.D.C.  
New Psychotherapeutic agent, Chlordiazepoxide. .  
Use in treatment of anxiety states and related symptoms.  
J.A.M.A. 1960, 174, 1242.