

**UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA**  
**INCORPORADA A LA U.N.A.M.**  
**Ciencias Químicas**

**"VALORACION SEMICUANTITATIVA DE  
BENZOCAINA POR CROMATOGRAFIA  
EN CAPA"**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**  
**QUIMICO FARMACEUTICO**  
**BIOLOGO**  
**PRESENTA**

**MIGUEL EDUARDO LUNA GUESSO**

**MEXICO, D.F.**

**1969**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis 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.

**BIBLIOTECA FAC. DE QUIMICA**

**UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA**

**INCORPORADA A LA U.N.A.M.**

**Ciencias Químicas**

**"VALORACION SEMICUANTITATIVA DE  
BENZOCAINA POR CROMATOGRFIA  
EN CAPA"**

**MIGUEL EDUARDO / LUNA GUESSO**

**MEXICO, D.F.**

**1969**

**A MIS PADRES  
CON GRATITUD Y CARIÑO**

**A MIS HERMANAS**

Agradezco a la Sra. Q.F.B. Araceli Sánchez de Corral su valiosa cooperación y dirección de este trabajo y en general, doy mis más sinceros agradecimientos a todas las personas que en una u otra forma colaboraron para que esta tesis se hiciera posible.

**"VALORACION SEMICUANTITATIVA DE  
BENCOZAINA POR CROMATOGRAFIA EN CAPA"**

**I.- INTRODUCCION**

**II.- ANTECEDENTES HISTORICOS**

**III.- GENERALIDADES**

**IV.- PARTE EXPERIMENTAL**

**V.- COMENTARIOS**

**VI.- RESULTADOS**

**VII.- CONCLUSIONES**

**VIII.- BIBLIOGRARIA**

## INTRODUCCION:

La aplicación de la Cromatografía en capa delgada en la separación de mezclas complejas de medicamentos, ha sido de mucha utilidad en el trabajo del laboratorio de control de medicamentos, ya que sustancias ó mezclas medicamentosas difíciles de determinar por otros métodos, ó bien que su determinación se hace por técnicas laboriosas, con el uso de la Cromatografía en capa delgada, el trabajo se simplifica en una forma notable, sin sacrificar la exactitud de la técnica.

El objeto principal del desarrollo del trabajo que a continuación se expondrá, es la valoración-semicuantitativa de la Benzocaína contenida en un preparado farmacéutico, el cual se puede considerar como una mezcla compleja de medicamentos, puesto que en su formación interviene una cantidad apreciable de sustancias.

Lo que indujo al empleo de la Cromatografía en capa delgada para separar Benzocaína, fué el hecho de que en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos no existiera ninguna valoración de esta sustancia, lo que motivó el intento de buscar una técnica para su cuantificación; naturalmente el interés de la Empresa, donde se realizó la investigación, de establecer un método para poder controlar éste fármaco.

El trabajo realizado, que más adelante se dará a conocer, es una valoración semicuantitativa de la Benzocaína, lográndose con este tipo de técnica, resultados satisfactorios.



## CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA.

### ANTECEDENTES HISTORICOS:

Es increíble que no obstante que el principio físico-químico de la Cromatografía en Capa Delgada - se descubrió hace 27 años, fué hasta hace aproximadamente unos 7 años cuando se aceptó como método analítico en el laboratorio de control.

La primera publicación referente a esta técnica, fué hecha por el Botánico ruso M. Tswell en 1903, la cual contiene un estudio de más de 100 adsorbentes usadas en unión con algunos solventes diferentes. Descripciones más amplias y detalladas respecto a este método - se encuentran contenidas en una publicación hecha por --- Tswell en el año de 1906. Fué en Varsovia en el mismo año, cuando Tswell logró la separación de pigmentos vegetales, al pasarlos en forma disuelta a través de una columna llena de yeso precipitado, formándose bandas coloridas separadas unas de otras.

Aunque el descubrimiento de este método - se hizo con compuestos coloridos, posteriormente se demostró que era aplicable a casi todo tipo de sustancias.

Fué hasta 1931 cuando Kuhn y Lederer separaron los carotenos y xantófilos en una columna de alúmina y carbonato de calcio y así la potencialidad del método de Tswell estaba finalmente realizada.

Paralelamente a la publicación de Tswell, -

Gropprateroeder descubrió el método aplicado al papel. En esta variación del método de Towell se emplean tiras de papel filtro, en las cuales se introducen los extremos en el solvente y la muestra por separar se coloca en el extremo inferior. Este método depende principalmente de la capilaridad, que en este caso es la fuerza impulsora principal, ésta puede ser ascendente ó descendente, ó bien cuando los productos resultan enzimados se aplica la técnica bidimensional.

La Cromatografía en Capa Delgada tiene su primer esbozo con Zechmeister en 1933, cuando este autor hacía el intento de reducir la columna en que trabajaba a 1 mm. de diámetro. Y fué hasta 1938 con Izmailov y Schraiber que utilizaron un aditamento que consistía en una capa de alúmina de 2 mm. de espesor, la cual se depositaba sobre una placa de vidrio; el método se basaba en la aplicación de gotas del extracto vegetal en el centro de la placa, apareciendo posteriormente anillos concéntricos por la adición de un solvente.

En el año de 1954 cuando Stahl estudiando un sistema para separación de extractos vegetales en pequeñas cantidades, convencido de que las técnicas usuales de esa época no eran las adecuadas para lograr su fin, se dedicó a ensayar nuevos métodos, llegando en 1958 al perfeccionamiento de la técnica que hoy en día se conoce como Cromatografía en Capa Delgada.

## GENERALIDADES

### ANESTÉSICOS LOCALES:

Los anestésicos locales son sustancias con capacidad de interrumpir la conducción nerviosa, cuando se aplica en una concentración suficiente sobre el tejido nervioso. Un buen anestésico local debe reunir ciertas propiedades: no debe irritar al aplicarse localmente, y tiene que producir anestesia sin lesionar la estructura nerviosa; la mayor parte de los anestésicos que en la actualidad se usan, llenan estos dos requisitos. Además, la toxicidad general de un anestésico local, debe ser baja, porque estos medicamentos son absorbidos en su sitio de aplicación, e inmediatamente se dirigen al torrente sanguíneo.

### BENZOCAINA:

La benzocaína es un anestésico local, poco soluble en agua, debido a esta propiedad, es absorbido con lentitud en los tejidos, por lo tanto poco tóxico, puede por esta razón aplicarse directamente en heridas y superficies ulceradas. Por la lentitud con que son absorbidas, es causa de que permanezcan bastante tiempo en el sitio de aplicación, lo cual explica su acción anestésica prolongada.

Químicamente tiene estrecha relación con los anestésicos del grupo de la procaína, pues es un éster del ácido p-aminobenzoico, el alcohol esterificado carece de grupo amino, por consiguiente no forma sales solubles.

#### FORMULA:

Sinónimos: Anestesia, p-aminobenzoato -  
de etilo, ester etílico del ácido p-amino benzoico.

#### PROPIEDADES FISICAS:

Polvo blanco, inodoro, finamente cristalino,  
inalterable al aire, punto de fusión de 90-91° C, peso mo-  
lecular - 165.19

#### PROPIEDADES QUIMICAS:

Poco soluble en agua 1:2500 aprox.; fran-  
camente soluble en alcohol 1:8 aprox.; en éter 1:4 aprox.  
en cloroformo 1:2 aprox., escasamente soluble en aceite -  
de oliva 1:50 aprox., soluble en ácidos diluidos, Las so-  
luciones para inyecciones son preparadas por disolución a-  
séptica en aceite, el cual ha sido previamente esterilizado  
a 150° C por una hora.

#### REACCIONES:

De las reacciones de la benzocaína la que  
más interesa en este trabajo es la HIDROLISIS, ya que  
el motivo principal de esta tesis, fué la determinación de la  
hidrólisis en la benzocaína. Tanto el mecanismo como los  
productos intermedios de la reacción hidrolítica son los --  
mismo que en la esterificación. Se ha podido demostrar  
que la reacción de esterificación es catalizada igualmente -  
por iones oxhidrilo ó por iones hidrógeno, si bien la este-  
rificación catalizada por las bases no es un proceso prác-  
tico, el empleo de bases para la reacción inversa, tiene -

en cambio, evidentes ventajas. Cuando un ester se calienta con agua que contenga una cantidad ligeramente superior a un equivalente de hidróxido sódico, la hidrólisis con liberación del ácido orgánico y del alcohol, va seguida de la combinación del ácido con el alcali, con lo cual el ácido es eliminado del sistema en equilibrio provocando el desplazamiento de este.

La combinación de una reacción reversible con el subsiguiente paso irreversible, asegura que la reacción se lleve a cabo en forma completa. De aquí que la hidrólisis alcalina (saponificación) sea el modo más eficaz para escindir los esteres.

Investigaciones realizadas por T. Higuchi y I. Lachman sobre la reducción del grado de hidrólisis de la benzocaína en solución, reportan que dicha hidrólisis puede ser reducida más de una quinta parte por la adición de 2.5 % de cafeína, la cual forma un complejo soluble con la benzocaína.

#### ENSAYOS DE IDENTIDAD:

a) Una solución acuosa de benzocaína al 2 % ligeramente acidulada con ácido clorhídrico diluido, - precipita por la adición de unas gotas de solución reactivo de yodo.

b) Disuélvase 50 mg. de benzocaína con dos gotas de ácido acético calidad reactivo y cinco gotas de ácido sulfúrico calidad reactivo, se percibe un olor agradable de acetato de etilo.

c) Disuélvase 20 mg. de benzocaína en 10 ml. de agua con ayuda de unas gotas de ácido clorhídrico dil. y añádase a la solución cinco gotas de solución acuosa de nitrito de sodio al 10 % y dos mililitros de solución de 100 mg. de beta naftol calidad reactivo, en cinco mililitros de hidróxido de sodio calidad reactivo, se forma un precipitado rojo naranja.

#### ENSAYOS DE PUREZA.

a) por desecación sobre ácido sulfúrico durante tres horas, la benzocaína no pierde más de 1 % de su peso.

b) Por incineración, el p-amino benzoato de etilo no dá residuo superior al 0.1 %.

c) Cloruro: Añádase unas gotas de nitrato de plata a una solución de 200 mg. en cinco mililitros de alcohol etílico (96 %), previamente acidulado con unas gotas de ácido nítrico diluido. No se aprecia enturbiamiento inmediato.

d) Acido libre: Disuélvase en 10 ml. de alcohol neutro, un gramo de p-amino benzoato de etilo, la solución que se obtiene es límpida ó incolora. Dilúyase esta solución con 10 ml. de agua destilada, agréguese dos gotas de solución alcohólica de fenostaleína y una gota de solución 0.1 N de sosa, aparece un color rojo.

e) Metales pesados: No contiene más de 10 partes por millón.

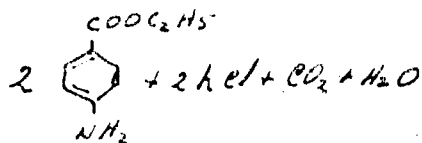
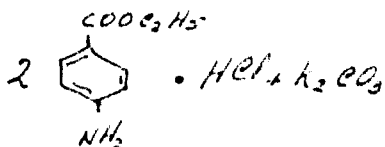
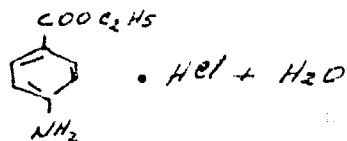
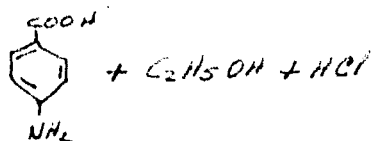
### USOS:

La benzocaína puede usarse en espulsores, sola ó mezclada con talco estéril. Es liposoluble, por lo tanto puede incorporarse con soluciones aceitosas, pomadas ó supositorios.

### PREPARACION DE BENZOCAINA:

En un matraz de 250 ml. se disuelven 10 g. de benzocaína en 50 ml. de etanol, se satura la solución con ácido clorhídrico gaseoso y seco. Una vez saturada la solución se coloca a refluxo durante una hora; al enfriarse cristaliza el clorhidrato de benzocaína, el cual se filtra al vacío, lavando con un poco de alcohol. Para obtener la base libre se disuelve en agua y se alcaliniza con carbonato de potasio, usando como indicador fenolftaleína, operación en la que se desprende abundante bióxido de carbono. Se enjuaga el precipitado y se seca sobre plata poroso en desecador de vacío con cloruro de calcio.

### REACCIONES:



## CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA.

En principio todos los métodos cromatográficos de separación, son similares: una fase móvil que pasa sobre ó a través de una fase estacionaria y que transporta diferentes sustancias con distintas velocidades en la dirección del flujo. En la base de su funcionamiento, la cromatografía en capa delgada no difiere con los otros tipos.

### TECNICA:

#### Material.

- 1.- Placas de vidrio.
- 2.- Soporte para placas.
- 3.- Aplicador.
- 4.- Cámara de saturación.
- 5.- Desecador.
- 6.- Plantilla.
- 7.- Micropipetas.
- 8.- Gradilla.
- 9.- Estufa.

#### Reactivos.

- 1.- Adsorbente.
- 2.- Solventes.
- 3.- Revelador.



La técnica simplificada de Cromatografía - en capa delgada, es la siguiente:

Las placas de vidrio perfectamente limpias se colocan sobre su soporte, procurando que estas no queden separadas unas de otras. Se prepara una suspensión con el adsorbente adecuado y el líquido para completar la suspensión, el líquido en cuestión puede ser: agua, cloroformo, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, etc. Una vez hecha la suspensión, se trasvasa al depósito del aplicador, este aplicador está diseñado de manera que el espesor de la capa del adsorbente pueda ser regulado. Se pasa el aplicador con la suspensión en su interior a través de la superficie de las placas, procurando hacer esta operación en un sólo movimiento uniforme para evitar deformidades en la superficie del adsorbente, cuando el exceso del líquido usado para hacer la suspensión se evapora, hecho que se pone de manifiesto por la desaparición de la brillantez de la placa, se colocan las placas en la gradilla y se introducen en una estufa a  $100^{\circ}$  C por espacio de treinta minutos, con el fin de activar las placas. Se denomina activación de las placas, al hecho de eliminar el líquido de las mismas, para que al correr las muestras con el solvente, las sustancias en estudio tengan el menor número de interacciones en su desplazamiento. Una vez efectuada la activación, se guardan las placas en un desecador, ya que si se quedan expuestas al medio ambiente, estas pueden absorber más del 10 % de su peso en humedad.

Se pueden preparar placas demasiado activadas, calentadas a  $150^{\circ}$  C por 3-4 horas. La alta activación únicamente vale la pena si el cromatograma es corrido en una atmósfera carente de humedad y si es usado un solvente anhidro. Cuando se emplea la alta activación de adsorbentes, el peligro de descomposición de sustancias es grande.

Después del secado de las placas, estas quedan listas para ser usadas, procediendo entonces con la plantilla a delinear los bordes laterales con una aguja de disección, ya que casi siempre estos quedan deteriorados por las manipulaciones de las placas y una placa en mal estado provoca una ascensión del solvente en una forma irregular. Se marca también con una raya delgada la distancia que va a recorrer el solvente.

La muestra problema en solución, con ayuda de una micropipeta se coloca sobre la capa de Sílica Gel a una distancia de 1.5 cm. del borde inferior de la placa en un volumen pequeño que oscile entre 2 - 5  $\mu$ l y a una concentración de la sustancia de 0.1 - 1.0 %.

En caso de que se vaya a hacer una determinación cuantitativa, es recomendable sustituir las micropipetas por microjeringas, las cuales son de mayor exactitud en la medida del volumen que se va a aplicar.

Colocada la muestra en la placa, se procede al desarrollo de ésta en la cámara de saturación, la cual en su interior contiene el solvente adecuado para el caso. Con el fin de que la ascensión sea uniforme y más

rápida, las paredes interiores de la cámara se cubren con papel filtro, lográndose con ésto una saturación completa, teniendo como resultado una separación más eficaz de los diferentes componentes de la muestra, que si se trabaja con una cámara sin saturación.

Cuando la cámara está perfectamente saturada se introduce en ella la placa de vidrio en la cual se aplicó la muestra que se va a separar, se tapa la cámara, el solvente en estas condiciones ascenderá por capilaridad a través del adsorbente, hasta la marca superior llamada frente del solvente, separando simultáneamente las diferentes sustancias contenidas en la muestra. Cuando el solvente llega a la marca superior, la placa se retira de la cámara y se deja evaporar el solvente al medio ambiente.

Una vez seca la placa se revelan los componentes de la muestra, este revelado se lleva a cabo de diferentes formas según el tipo de sustancia que se investiga:

- a) Usando luz U. V.
- b) Con reactivos químicos
- c) Con sustancias corrosivas.

Al revelar el cromatograma, se conocerá la distancia recorrida por la sustancia problema y la relación de esta distancia con la del frente del solvente, se le denomina  $R_f$ .

$$R_f = \frac{\text{Distancia del punto de aplicación a la mancha.}}{\text{Dist. del punto de aplicación al frente del solvente.}}$$

La documentación y el archivo de los cromatogramas se puede hacer mediante cualquiera de los métodos siguientes:

- a) Caléndolo con un papel transparente.
- b) Fotografándolo.
- c) Empleando el rofo de una suspensión plástica en aerosol.

La determinación cuantitativa de los cromatogramas en capa delgada se hace por los siguientes métodos.

- a) Por comparación visual.
- b) Por métodos fotográficos.
- c) Por métodos fotodensitométricos.
- d) Por métodos autoradiográficos.
- e) Por extracción de la mancha y posterior valoración espectrofotométrica.

PART R EXPERIMENTAL

## APARATOS Y SUSTANCIAS.

**Aparatos:** Equipo especial para cromatografía en capa delgada de la marca "Desaga".

**Reactivos:**

**Metanol.**

**Acetato de Etilo. U.S.P.**

**Piridina. U.S.P.**

**Cloroformo. U.S.P.**

**Etanol.**

**Sílica gel "G". Merck.**

**Yodo metálico.**

**Problema:** Medicamento que se administra en forma de aerosol y que contiene:

**Benzocaína.**

**Sulfa.**

**Cloruro de Benzalkonio.**

**Ciclamato de sodio.**

**Sacarina sódica**

**Aceite esencial de anís.**

**Alcohol de 96 G.L.**

**Propilen glicol.**

## PREPARACION DE PLACAS.

**Preparación de la suspensión de Sílica - Gel "G":** Se pesan 80 g. de Sílica Gel "G", y dentro de un pequeño mortero se efectúa la suspensión con 60 ml. de agua, la suspensión no debe hacerse con movimientos

demasiado vigorosos, a fin de evitar la formación de burbujas, las cuales provocan al preparar las placas, una superficie irregular, la cual ocasionaría variaciones en el  $R_f$  de la benzocaína. Esta suspensión se transfiere dentro del aplicador.

Las placas se colocan sobre su soporte el cual debe estar apoyado en una superficie perfectamente nivelada, este objeto es difícil de lograr en la mesa de trabajo del laboratorio, por lo tanto es conveniente mandar confeccionar una plancha de acero de las mismas dimensiones que el soporte, y de esta forma obtener una superficie sin desniveles.

Las placas en número de cinco de  $0.20 \times 0.20$  m, al igual que las dos terminales de  $0.20 \times 0.05$  m. son colocadas sobre el soporte; las placas se limpian perfectamente con alcohol para remover la grasa que pudieran tener, y la cual impide que en ciertas partes de la placa, la suspensión acuosa de Sílica Gel "G" al vidrio.

El aplicador se coloca en la primera placa previo ajuste del espesor de la capa de Sílica Gel "G", este ajuste se hace a 0.25 mm. accionando los tornillos del aplicador. Desplazando el brazo del aplicador en sentido contrario al que sigue la dirección de aplicación, queda en contacto la suspensión de Sílica Gel "G" con la placa de vidrio, é inmediatamente después se efectúa con un movimiento "uniforme", el recorrido del aplicador hasta la última placa, sin ejercer presión sobre el aplicador du

rante este desplazamiento, terminada esta operación se dejan las placas sobre el soporte algunos minutos hasta que la placa se torne opaca, en este momento, se colocan las placas dentro de una gradilla y en posición vertical para facilitar la evaporación del agua, se introduce ésta en una estufa durante 30 minutos a una temperatura de  $100^{\circ}$  C., - al cabo de este tiempo se retiran y se enfrían dentro de un desecador, quedando listas para usarlas. Para lograr cromatogramas reproducibles se debe procurar que estas placas no estén dentro del desecador más de dos días sin usarse.

El rayado y delimitación de la placa se efectúa como se explicó en generalidades.

#### PREPARACION DE LA SOLUCION PROBLEMA Y TIPO.

Todas las soluciones usadas en este trabajo se hacen con etanol  $96^{\circ}$  G. L.

#### SOLUCION TIPO

Se hace en primer lugar una solución de Benzocaína al 1 %, ya que en esta concentración teórica la encontramos en nuestra solución problema, a partir de esta solución se hace la dilución.

Solución A: Benzocaína al 1 %

Solución B: 1 ml. solución A (10 mg) — aforar a 10 ml.

De la solución B se pipetea 0.05 ml. e--



equivalentes a una concentración de 50 mg. y será esta cantidad la que se coloque en el punto de aplicación de la muestra.

La misma dilución que se hizo con la solución tipo se hace con la solución problema. Teóricamente se aplicó la misma concentración de benzocaina en el tipo y en el problema.

#### SISTEMAS DE SOLVENTES USADOS

La primera parte del trabajo experimental, tiene como objeto principal encontrar el solvente ó el sistema de solventes adecuados para lograr una buena separación de la muestra problema, para lograr este efecto, - se ensayaron los sistemas que a continuación se describen.

Sistema de solvente	Proporción
1.- Cloroformo U.S.P. - Metanol U.S.P.	(80:10)
2.- Cloroformo U.S.P. - Metanol U.S.P.	(80:15)
3.- Cloroformo U.S.P. - Metanol U.S.P.	(70:30)
4.- Cloroformo - Acetato de etilo	(75: 25)
5.- Benceno - Piridina - Etanol	( 70 : 40 : 30).
6.- Cloroformo	

Como se dijo anteriormente, la placa se raya y delimita y se procede a aplicar la muestra de la solución tipo y problema, las que con anterioridad se prepa

raron, se toman con la pipeta especial graduada en 10 secciones, cada sección equivale a 0.01 ml. Se pipetea 0.05 ml. (50 mcg.) de ambas muestras, las cuales se encuentran a la misma concentración teórica, se colocan en la capa de sílica, procurando no maltratar demasiado la misma, esta operación se hace con el problema y con el tipo; aplicadas las muestras se efectúa el desarrollo del cromatograma ó sea la migración a través de la sílica con ayuda de diferentes sistemas de solventes en los cuales la sustancia por analizar es soluble en ellos.

Tres cámaras se saturan de preferencia - con un día de anticipación con los siguientes sistemas de solventes:

Cámara 1 Cloroformo U.S.P. -Metanol U.S.P.

(80 : 10 ) 150 ml.

Cámara 2 Cloroformo U.S.P. -Metanol U.S.P.

(80 : 15 ) 150 ml.

Cámara 3 Cloroformo U.S.P. -Metanol U.S.P.

(70 : 35 ) 150 ml.

Cuando la cámara se encuentra perfectamente saturada, lo cual se puede saber cuando el papel-filtro introducido en la cámara en forma de U, se encuentra impregnado del solvente, pero si la cámara se preparó con un día de anticipación, es obvio que para el día siguiente esta cámara estará perfectamente saturada. Esta parte (saturación), de la cromatografía en placa delga

#

da tiene mucha importancia dando varios puntos de vista:

En primer lugar; si la cámara está perfectamente saturada se podrán obtener resultados reproducibles, hecho que no se logra cuando existe una saturación deficiente.

Si la cámara no está lo suficientemente saturada, se observan frecuentemente después de revelar el cromatograma, variaciones del Rf de la sustancia en estudio en la misma placa.

Otra ventaja de la que se puede hacer mención respecto a la saturación es la velocidad con la que asciende el solvente, siendo ésta notablemente mayor cuando hay saturación que cuando no la hay.

Se utilizan tres placas a las cuales les ha sido aplicada la misma cantidad de solución problema y de solución tipo, estas placas se introducen verticalmente dentro de las cámaras 1, 2 y 3, se cierran perfectamente y se desarrolla el cromatograma con un frente de solvente de 10 cm.

Cuando el solvente asciende hasta la marca en un tiempo aproximado de 40 minutos, la placa se retira de la cámara y se expone al medio ambiente, a fin de que el solvente se evapore.

Una vez evaporado el solvente se procede al revelado, este revelado se efectúa con vapores de yodo, esto se logra en una cámara de saturación, introdu-

da tiene mucha importancia desde varios puntos de vista:

En primer lugar; si la cámara está perfectamente saturada se podrán obtener resultados reproducibles, hecho que no se logra cuando existe una saturación deficiente.

Si la cámara no está lo suficientemente saturada, se observan frecuentemente después de revelar el cromatograma, variaciones del  $R_f$  de la sustancia en estudio en la misma placa.

Otra ventaja de la que se puede hacer mención respecto a la saturación es la velocidad con la que asciende el solvente, siendo ésta notablemente mayor cuando hay saturación que cuando no la hay.

Se utilizan tres placas a las cuales les ha sido aplicada la misma cantidad de solución problema y de solución tipo, estas placas se introducen verticalmente dentro de las cámaras 1, 2 y 3, se cierran perfectamente y se desarrolla el cromatograma con un frente de solvente de 10 cm.

Cuando el solvente asciende hasta la marca en un tiempo aproximado de 40 minutos, la placa se retira de la cámara y se expone al medio ambiente, a fin de que el solvente se evapore.

Una vez evaporado el solvente se procede al revelado, este revelado se efectúa con vapores de yodo, ésto se logra en una cámara de saturación, introdu-

ofiendo una pequeña cantidad de yodo metálico; esta cámara se cierra herméticamente y cuando la cámara está saturada de vapores de yodo, entonces se introduce la placa por revelar, aparece al cabo de unos minutos unas manchas de color amarillo y la mancha de benzocaína del problema es identificada como tal porque es la que queda a la misma altura de la mancha de benzocaína de la muestra tipo.

Este cromatograma también se puede revelar por aspersión, utilizando una solución de yodo en cloroformo al 0.5 %.

Siendo la mejor de estas dos formas de revelar la benzocaína, la primera, puesto que se obtienen manchas mejor definidas y de mayor intensidad.

Los Rf obtenidos de la benzocaína con los distintos sistemas de solventes fueron:

SISTEMA EMPLEADO	PROPORCION
1)	
Cloroformo U.S.P. - Metanol U.S.P.	( 80 : 10 )
2)	
Cloroformo U.S.P. - Metanol U.S.P.	( 80 : 15 )
3)	
Cloroformo U.S.P. - Metanol U.S.P.	( 70 : 35 )

S i s t e m a	Rf. x 100
1	40
2	80
3	100

Con los sistemas de solvente 1 y 2 después de revelar el cromatograma, se logró la separación de la benzocaína, pero al hacer una observación ouidadaosa, se encontró que abajo y junto a la mancha de benzocaína, existía otra mancha que podía pertenecer a cualquiera de los componentes del medicamento en cuestión, - entonces el siguiente paso sería lograr la separación de la benzocaína de esa otra mancha.

Con el sistema 3 la benzocaína fué arrastrada hasta el frente del solvente, por lo tanto este sistema quedó descartado.

Se aumentó la polaridad del sistema de solventes con el objeto de lograr la separación completa de la benzocaína, utilizando para este fin los siguientes:

SISTEMA DE SOLVENTE	PROPORCION
3)	
Cloroformo - Acetato de etilo	( 75 : 25 )
5)	
Benceno - Piridina - Etanol	( 70 : 40 : 30 )
S i s t e m a	Rf.    α    100
4	80
5	90

Lográndose una buena separación con benceno - piridina - etanol, donde la mancha de benzocaína quedó completamente separada.

Al observar detenidamente el cromatogra-

ma se vió que la mancha de benzocaína proveniente de la solución problema era de un color amarillo más intenso - que la mancha correspondiente a la solución tipo, naturalmente esto no es admisible, por lo tanto se repitieron los cromatogramas varias veces, y siempre la mancha problema era de color más intenso que el tipo.

Este problema se podía deber a que junto con la mancha de benzocaína proveniente de la solución del medicamento, otra sustancia medicamentosa que tenía un Rf. semejante al de la benzocaína, era la que hacía que la mancha de benzocaína del problema se viera más intensa.

El problema que ahora se presentaba era el de separar las dos manchas, las cuales tenían el mismo Rf.

Para lograr este fin, se hizo uso de un artificio que consistió en lo siguiente:

Se hizo el desarrollo del cromatograma empleando un solvente de baja polaridad, en este caso se utilizó únicamente cloroformo, y el frente del solvente fué de 15 cm. con el objeto de lograr una mejor separación.

El cromatograma se desarrolló en este solvente, una vez que el cloroformo ha llegado al frente, la placa se saca y se expone al medio ambiente, con el fin de que el cloroformo impregnado en la capa de sílica, pueda evaporarse totalmente, una vez logrado este efecto,

la placa se introduce de nueva cuenta en la cámara saturada con cloroformo y el oromatógrama se desarrolla nuevamente. Se saca la placa, se evapora el cloroformo y se revela dicha placa con vapores de yodo.

En esta forma sí se logra la completa separación de la benzocaina y la mancha que impedía hacer una determinación veraz, por estar ambas manchas superpuestas.

Esta separación está ejemplificada en las fotografías que a continuación se exponen.



En vista de que el producto en el cual está contenida la benzocaína se encuentra a un pH de 9 -- 9.5 y a ese pH la benzocaína es susceptible a hidrólisis, no se tenía la certeza de que la mancha correspondiente al problema fuera de benzocaína, pues también podría ser de p-aminobenzoato de sodio, por lo tanto, se preparó una placa para comprobar este hecho, colocándose en la placa el problema frente a un tipo de p-aminobenzoato de sodio, además se pusieron tipos de benzocaína a diferentes pH.

Solvente - Cloroformo

Revelador - Vapores de Yodo

Lugar

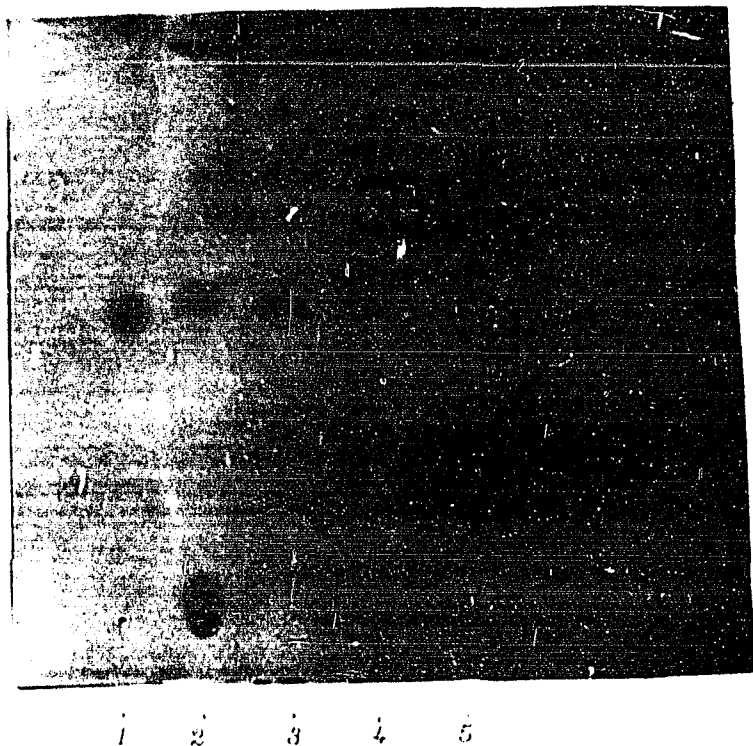
- 1.- Benzocaína pH 11
- 2.- Problema
- 3.- Benzocaína pH 5
- 4.- Benzocaína sin ajustar pH
- 5.- p-aminobenzoato de sodio.

El desarrollo del cromatograma se hizo en las condiciones antes especificadas. (Figura I) .

En otra placa, con el fin de efectuar la de terminación semicuantitativa, se pusieron cantidades decrecientes de benzocaína, cada tipo frente a un problema, - las cantidades de benzocaína son las siguientes. (Figura I I).

El objeto de colocar en la placa testigos de benzocaína a diferentes  $pH$ , y cuya concentración teórica es la misma que la indicada en el problema, es con el fin de comprobar la hidrólisis del éster. Se podía apreciar en primer lugar que la mancha de benzocaína del problema está notablemente disminuida en comparación con la mancha tipo de benzocaína sin ajustar el  $pH$ , la cual fué preparada el mismo día que se desarrolló el cromatograma. De los tipos de benzocaína a los que se ajustó el  $pH$ , en el que se aprecia un mayor grado de hidrólisis es el que tiene  $pH$  de 11.

FIGURA 1

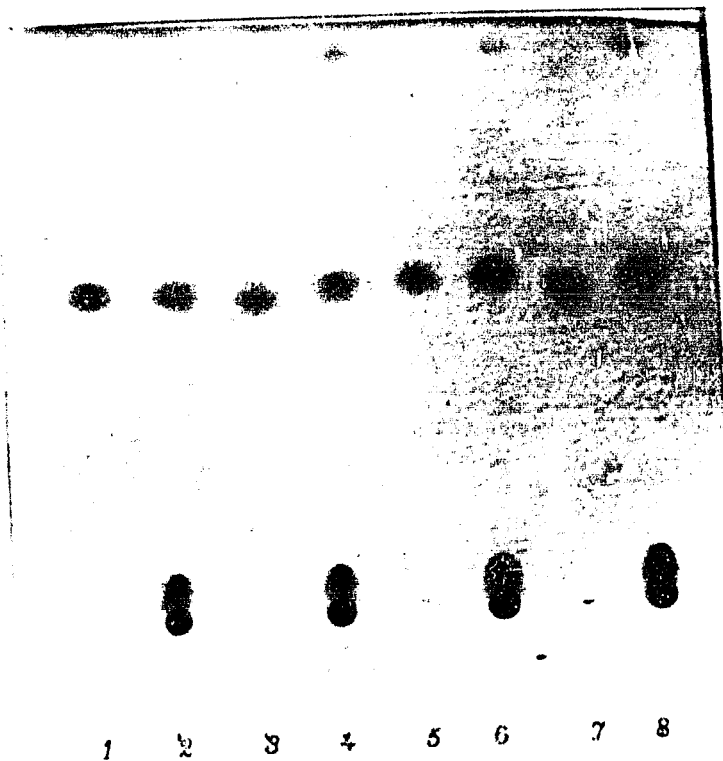


Lugar:

- 1.- Tipo 45 mcg.
- 2.- Problema
- 3.- Tipo 40 mcg.
- 4.- Problema
- 5.- Tipo 35 mcg.
- 6.- Problema
- 7.- Tipo 30 mcg.
- 8.- Problema

El cromatograma se desarrolló en las mismas condiciones.

FIGURA II.



## COMENTARIOS

Este trabajo se realizó como se dijo anteriormente, en producto terminado con forma farmacéutica de "AEROSOL", en el cual la benzocaína es un consti tuyente de importancia en la fórmula de este medicamento, siendo por este motivo, el interés de la Empresa de con tar con una técnica para su determinación. Además se tenía la duda de que a un pli tan elevado como en el que se encuentra esta solución ( 9 - 9.5 ), siendo la benzo caína un ester, esta sustancia podría sufrir una hidrólisis total, originando este hecho principalmente, el ensayo de la cromatografía en capa delgada para la determina — ción del grado de hidrólisis de la benzocaína.

## RESULTADOS:

A pesar de ser esta valoración semicuan titativa, los resultados obtenidos son satisfactorios.

Para llevar a cabo la determinación, se — hace uso de la plantilla empleada para ayudar a aplicar la muestra, rayar y delimitar los filos de la placa, ya que — esta plantilla en el centro tiene dibujados unos círculos de diferentes diámetros que van desde 3 mm. hasta 25 mm., siendo esta plantilla de un material plástico transparente ; este aditamento se puede colocar sobre el cromatograma revelado sin maltratar la capa de sílica, y así sobrepo — ner alguno de los círculos de la plantilla que sea del ta — maño de la mancha, de esta forma, conociendo el tamaño

de la mancha tipo, podemos por comparación saber aproximadamente el porcentaje de determinada sustancia en un medicamento.

La cantidad aproximada de benzocaína existente en el problema la podemos conocer haciendo la comparación de las manchas tipo con las manchas problema - en la Figura No. IV. La mancha de los tipos que coincide en tamaño e intensidad con la mancha problema es la que está en el lugar No. 3, cuya concentración de benzocaína es de 40 mcg., ésta concentración equivale a un - 80 % de benzocaína en la solución problema aproximadamente.

### CONCLUSIONES:

Podemos concluir en primer lugar, que la benzocaína si es hidrolizada en el medicamento en solución esta hidrólisis fué de un 20 % aproximadamente. El medicamento que se empleó para el trabajo experimental tenía un tiempo de cuatro meses de elaborado, por lo tanto, el grado de hidrólisis es grande para el poco tiempo que tiene el producto en el mercado.

Puede suceder que aunque la concentración de anestésico sea baja, la anestesia local pueda lograrse debido a que el medicamento contiene en su fórmula --- FREN que también actúa como anestésico.

Existen dos aspectos de la técnica que va

le la pena mencionar : la economía y la rapidez; respecto al primer punto, no es indispensable la compra del equipo completo, ya que éste no puede improvisar; tocante al segundo punto, si se cuenta con un poco de organización, es decir preparando todo lo necesario con un día de anticipación, esta técnica se realiza en un tiempo relativamente corto, pues teniendo las placas preparadas y la cámara de desarrollo saturada con el solvente adecuado, únicamente se tiene que aplicar la solución problema y tiempo, desarrollar el cromatograma dentro de la cámara perfectamente saturada con el solvente; el tiempo de desarrollo teniendo el frente del solvente 15 cms., es de aproximadamente 40 minutos y finalmente el revelado con vapores de yodo que no tarda más de 5 minutos. Siendo por estos motivos, la cromatografía en capa delgada, principalmente el tiempo, una técnica de gran ayuda en el laboratorio de control de medicamentos.

Un aspecto importante en el desarrollo de esta técnica, es la saturación de la cámara, hecho en el cual debe prestarse una especial atención, pues como se comentó con anterioridad, de la saturación de esta cámara, depende en gran parte la reproducibilidad de los resultados, al decir reproducibilidad nos referimos principalmente a la obtención constante del  $R_f$  en una determinada sustancia. En el caso específico de esta técnica, habrá dos factores de suma importancia en la reproducibilidad del  $R_f$  en un cien por ciento, ya que hubo variaciones pequeñas del  $R_f$  entre una placa y otra, pues midien

do la distancia recorrida por la benzocaina a partir del punto de aplicación de la muestra, la diferencia entre una placa y otra oscila entre 1 - 3 mm., que realmente no es mucha diferencia, teniendo en cuenta el hecho de que se efectuaron dos ascensiones del solvente consecutivas - en una misma placa, con la evaporación del solvente, preliminar a cada nueva ascensión del mismo.

B I B L I O G R A F I A :

- 1.- *Babbitt J.M. - Thin Layer Chromatography, 1964.*
- 2.- *Egon Stahl - Thin Layer Chromatography, 1965.*
- 3.- *Goodman and Gullman - The Pharmacological Basis of Therapeutics, 1965.*
- 4.- *Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos, 3a. Edición, 1962.*
- 5.- *Farmacopea Británica - 25o. Edición, 1967.*
- 6.- *Randerath K - Thin Layer Chromatography, 1963.*