

Tesis de Posgrado

Aplicación de nuevas técnicas cromatográficas al estudio de aceites esenciales

Labat, Jorge

1952

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Química de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Labat, Jorge. (1952). Aplicación de nuevas técnicas cromatográficas al estudio de aceites esenciales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0703_Labat.pdf

Cita tipo Chicago:

Labat, Jorge. "Aplicación de nuevas técnicas cromatográficas al estudio de aceites esenciales". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1952. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0703_Labat.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FISICAS Y NATURALES

"APLICACION DE NUEVAS TECNICAS CROMATOGRAFICAS AL
ESTUDIO DE ACEITES ESENCIALES"

Libro: 703

Trabajo de tesis presentada por
Jorge Labat
para optar al título de Doctor en Química

-1952-

A MIS PADRES

TRABAJO DE TESIS DIRIGIDO POR EL
PROFESOR Dr. ADOLFO L. MONTE

Sean estas breves líneas portadoras de mi agradecimiento al Dr. Adolfo L. Montes, quién con su reconocida capacidad científica y profundo conocimiento del tema, hizo posible la realización del presente trabajo.

Quiero también agradecer a las autoridades de la Dirección Nacional de Química por haberme facilitado los laboratorios de esa repartición, y a aquellos compañeros que en una u otra forma me brindaron su espontánea colaboración.

Señores profesores:

Pongo a vuestra disposición el presente estudio con el cual opto al título de Doctor en Química. En él, he querido experimentar dentro de un campo del análisis químico que día a día presenta nuevas aplicaciones : el análisis cromatográfico. Y que tiene la rara virtud de no involucrar insalvables dificultades instrumentales, como comunmente ocurre con las nuevas técnicas analíticas. Se presenta así un campo fructífero para el egresado e investigador novel que quiera iniciarse en esta especialidad.

La principal virtud de este trabajo radica en su faz experimental. Están ausentes de él toda especulación teórica. Se han estudiado nuevas técnicas y se las ha aplicado a la resolución de problemas reales.

- I N D I C E G E N E R A L - .

	Página
A.- <u>PARTE TEORICA</u>	
I . Evolución de la Cromatografía	1
II . Principios	3
a) Procedimiento - Teorías	3
b) Aplicabilidad	4
c) Terminología - El valor R	5
d) Clasificación	8
III . Métodos	
a) Aparatos	10
b) Absorbentes, solventes y eluyentes	11
IV . Dos nuevas técnicas cromatográficas: el "chromatostrip" y el "chromatobar"	14
B.- <u>PARTE EXPERIMENTAL</u>	
I . Aplicación del "chromatostrip" a la separación e identificación de alde- hidos y cetonas.	
a) Resolución de mezclas binarias	17
b) Determinación de los valores R _f	29
c) Resolución de mezclas ternarias	31

	Página
d) Aplicación al estudio de aceites esenciales	32
e) Empleo de bandas cromatográficas	35
II Separación de semicarbazonas	38
III Resolución de mezclas binarias de 3-5 dinitro benzoatos de alquilo	40
IV Separación e identificación de fenoles	48
a) Aplicación a aceites esenciales	51
b) Aplicación varias - Cuadro de valores R_f	52
V Aplicación a la separación e identificación de algunos terpenos	55
C.- <u>Conclusiones</u>	58
D.- <u>Bibliografía</u>	59

PARTE TEORICA

I.- Evolución de la cromatografía

Las obras clásicas referentes al análisis cromatográfico consideran al botánico ruso Tswett como el iniciador del método (1) y (2)

Sin embargo varias investigaciones recientes (3) (4) indican que la migración diferencial de un soluto a través de un medio poroso, era conocida antes de que Tswett describiera sus clásicas separaciones cromatográficas de pigmentos vegetales.

Así en 1850¹⁸⁵⁰ F.F. Runge analizó mezclas de colorantes sobre papel secante y se interesó en las posibilidades del uso del ascenso capilar de ciertas disoluciones en bloques de madera ya que así se produce la separación de los solutos.

Goppelsroeder, discípulo de Schonbein, investigó más tarde dicha posibilidad y sus primeras publicaciones coincidieron con las de Tswett.

Schonbein, a quién generalmente se lo considera como el iniciador del análisis capilar de los compuestos inorgánicos, mostró que si se introduce una tira de papel en agua que contenga sales inorgánicas, el agua asciende por el papel llevando consigo las sales. El frente líquido avanza por lo general más que los cationes inorgánicos, los cuales se mueven independientemente según su estado relativo de difusibilidad.

Sin embargo recién en 1941 se estableció que el viejo método de Schonbein en papel, era idéntico en principio al método de separación cromatográfica efectuada en columna.

Hubo aún que esperar cinco años para que Liesegang utilizara una zona de absorción inicial angosta para la redisolución de mezclas en papel. El mismo ideó la cromatografía bidimensional.

En cuanto al método de separación en columna, tampoco encontró inmediata aplicación a pesar del éxito de Tswett al resolver pigmentos vegetales en componentes entonces desconocidos.

A esta demora contribuyeron (1) (10) : la creencia sostenida por la escuela alemana, de que la absorción podría alterar o descomponer compuestos lábiles como los pigmentos vegetales; la necesidad de macro cantidades no siempre disponibles para el análisis y la guerra de 1914 que impidió la

difusión de las publicaciones (la obra de Tswett fue escrita en ruso)

Cuando el caroteno -hidrocarburo cristalino considerado durante más de un siglo como una sustancia homogénea- fué separado en dos hidrocarburos isoméricos por Kuhn y Lederer en 1931, los métodos de absorción cromatográfica recibieron un notable impulso. A ello también contribuyeron los clásicos estudios sobre enzimas de Willstätter y su escuela.

Se continuó con el estudio de otros carotenoides (Winterstein y Karrer) se pasó al campo de las vitaminas y con el desarrollo de nuevos y activos absorbentes se investigaron toda clase de sustancias en el campo de la química orgánica; se resolvieron mezclas de elementos, de iones inorgánicos y aún de isótopos.

Los primeros ensayos sobre cromatografía inorgánica en columna fueron efectuados por G.M. Schwab y sus colaboradores en 1937.

Y así llegamos a la época actual en la que el viejo método de Tswett, constituye la base de los métodos de análisis denominados "por migración diferencial" (5). Se han introducido numerosas modificaciones en aparatos, métodos y denominaciones, pero el fundamento es el mismo.

Una idea de la extensión de las publicaciones al respecto lo da la obra de Lederer (6) que refiriéndose solo a los progresos efectuados durante el decenio 1939-1949, contiene más de quinientas citas bibliográficas

Además de las ya citadas, creo conveniente mencionar aquí otras obras especializadas: la de Zechmeister (7), la de Williams (8), y la reciente de H.J. Cassidy, volumen V de una serie acerca de técnicas de la química orgánica.

Anualmente se publican una larga serie de revisiones sobre esta materia, pero dada la gran extensión de las publicaciones a que se refieren sería más conveniente que abarcaran solo determinados campos o aplicaciones a fin de evitar repeticiones y estirilizar esfuerzos.

II.- Principios

Los métodos cromatográficos están basados en la migración diferencial de un soluto a través de un sistema polifásico, migración que está condicionada por la distribución reversible del soluto entre la fase móvil y la fase fija.

La velocidad de migración de un soluto relativa al flujo del solvente, es una propiedad del sistema en estudio, en tanto que el grado de resolución de una mezcla depende del procedimiento empleado en la migración. El procedimiento clásico consiste en absorber en la columna cromatográfica una pequeña cantidad de solución, de modo de formar una angosta zona inicial. Se hace pasar entonces el solvente para hacer migrar el soluto a través de la fase de absorción. El solvente migra o bien por capilaridad o con ayuda de succión. En casos recientes se han utilizado también la corriente eléctrica como sin flujo de solvente y la fuerza magnética.

Los diferentes componentes del soluto migran a distintas velocidades según su selectiva distribución entre ambas fases, y se separan unos de otros en distintas zonas o bandas. Las zonas pueden separarse mecánicamente y recuperarse los solutos con solventes adecuados, o también suele hacerse pasar nuevos solventes a través de la columna y recoger separadamente el percolado de las distintas fracciones.

La formación de un cromatograma se puede variar de varias maneras, empleando columnas de diferente capacidad y calidad de absorción, combinadas con mezclas de solventes de distinta afinidad para el absorbente y para el soluto. En cuanto a éste, interesa fundamentalmente la proporción relativa de sus componentes. En general las porciones posteriores de una zona contaminan las siguientes. Aquellas pueden ser: pequeñas porciones del constituyente principal, pero a veces son fracciones grandes del componente menor y por consiguiente su revelación y recuperación se hace difícil y a veces imposible. Esta separación es más rápida cuando el menor constituyente forma la zona más o menos absorbida y como regla general es recuperable, cuando forma la zona menos absorbida.

Una zona está enteramente libre de todos los constituyentes más absorbidos que le preceden(o siguen). Se puede obtener entonces una separación absoluta de mezclas, cuando se efectúa con dos líquidos inmiscibles de los cuales uno actúa como fase fija y el otro como fase móvil invirtiendo este orden.

El primer intento de describir racionalmente las características más importantes del proceso de adsorción cromatográfica mediante un estudio teórico se debe a Wilson (10) quién recién en el año 1940 formula la ecuación diferencial correcta que rige el mencionado proceso (incluyendo formación y revelado del cromatograma).

Esta teoría fué luego perfeccionada por De Vault, Weiss y Gluechauf.

Casi simultaneamente Martín y Singe formularon su teoría, asimilando la columna cromatográfica a una columna de destilación.

N. Mittelman ha publicado una revisión completa de todos estos ensayos teóricos.

b) Aplicabilidad

El primer objetivo del análisis cromatográfico ha sido la resolución de mezclas, es decir la separación, aislación e identificación de sus constituyentes. Este objetivo está limitado a aquellas sustancias que no sufren descomposición al absorberse en una dada columna. Su aplicación primaria es la preparación de sustancias en cantidades suficientes para un análisis físico, químico o biológico subsiguiente.

Una sustancia es considerada cromatograficamente homogénea, cuando absorbida en columnas de distintos absorbentes y tratada con varios solventes, presenta una única banda. Tal comportamiento indica la pureza química de la sustancia en estudio. En ciertos casos de excepción, una sustancia simple puede dar origen a un cromatograma homogéneo (ej: formación y descomposición de una sal en la columna).

También se puede recurrir a la columna cromatográfica para decidir la identidad o no identidad de dos sustancias. Se prepara una solución de ambas y se cromatografía : la aparición de dos zonas revela la no identidad. Si se quiere saber si alguna de ellas es idéntica a una tercera conocida, se agrega una cantidad de esta a la solución y se compara. La zona correspondiente aparecerá más ancha.

Otros objetivos lo constituyen la purificación de sustancias y la concentración de productos de soluciones muy diluidas. Ej: aislación de pigmentos urinarios, de Koschara, y la concentración de alcaloides descrita por Fink.

También el laboratorio de contralor de productos técnicos hace uso de éste método para revelar la presencia de adulterantes. Ej: detección de materia colorante artificial en vinos (12).

Recientemente Calvin y sus colaboradores (13) emplearon métodos cromatográficos para seguir las transformaciones químicas y metabólicas de compuestos carbonados marcados con isótopos.

Finalmente se ha aplicado la cromatografía como ayuda en la determinación de estructuras moleculares y en la regeneración de sustancias de sus productos de adición.

c) Terminología - El valor R

La dependencia de la mayoría de las separaciones cromatográficas de unos pocos mecanismos o fenómenos de distribución, ha llevado a la amplia acepción de términos como : cromatografía por intercambio iónico, por partición y por adsorción, que incluyen las denominaciones clásicas de cromatografía en columna y sobre papel.

Sin embargo al referirse a los distintos detalles y etapas operatorias, como así también a la diversidad de dispositivos, se ha recurrido a una variada sinonimia que creemos necesario aclarar, antes de abordar el estudio experimental.

Así el pasaje inicial o incorporación de una sustancia en solución

a través del sistema se denomina indistintamente: adsorción inicial (denominación que usaremos en nuestros casos), filtración de la solución, absorción de la mezcla, formación de zonas, etc.

Para el pasaje de solvente fresco a través de la capa adsortiva, aunque comunmente se lo denomina desarrollo del cromatograma, se ha también propuesto: lavado de sustancias adsorbidas, irrigación con solvente fresco, formación de cromatograma, etc.

Pero también se suele denominar desarrollo del cromatograma, por analogía con el desarrollo de una fotografía, la formación de derivados coloreados de solutos incoloros separados por adsorción, mediante el agregado de agentes químicos.

Esta última operación es mejor denominarla revelado o maduración.

Para el líquido o solución que emerge de una columna intercambiadora A. Cotello propone el nombre de efluente (del inglés "effluent") y el de influente para la solución que entra a la columna (16).

Por la ambigüedad del término "cromatografía incolora" Strain ha propuesto sin mayor éxito, reemplazarlo por el de eografía (indica resolución de una mezcla en componentes más pequeños (39)). Además propone denominar zonas, en lugar de bandas, a las regiones del material absorbente que contiene los solutos resueltos o separados.

Nosotros usaremos indistintamente ambas denominaciones, llamando anillos a las bandas de espesor menor que 5 mm.

Recientemente se sugirió el término de cromatografía superficial para la separación de solutos en delgadas capas de adsorbentes (ej: el chromatostrip" ver página 15).

En general un cromatograma en columna es un adsortograma (sortograma) y en papel: papergrama (24).

Otras denominaciones empleadas respecto a la técnica usada son: electro y quimiocromatografía: ionografía que incluye separación de iones por intercambio y migración eléctrica de los mismos sobre papel; "cromatografía progresiva" que incluye las técnicas de separación

por elución fraccionada y "cromatografía en caliente" sugerida para las efectuadas a altas temperaturas; "salting out chromatography" que se refiere a la mayor adsorción del material proteico presente en una solución, por agregado de sal a la misma.

El valor R .- Las moléculas de un soluto migran a través de una columna de adsorción con una velocidad que es determinada por el flujo del solvente y por la relación de las moléculas en solución a aquellas adsorbidas(14). Sobre esta base, la distancia recorrida por las bandas del soluto, está también relacionada a la distancia recorrida por el solvente. Así tenemos :

$$\frac{\text{Cantidad de soluto no absorbida}}{\text{Cantidad de soluto absorbida}} = \frac{\text{Distancia recorrida soluto}}{\text{Distancia recorrida solvente}} = R$$

La constante R se determina de varias maneras según el tipo de absorbente. Con absorbentes de superficie activa R se determina de acuerdo al límite frontal de las bandas no simétricas y se representa por R_f .

En el presente trabajo nos referiremos al valor R_f con el mismo significado. Pero el "modus operandi" cambia cuando previamente se efectúa la adsorción y luego se hace pasar solvente fresco (desarrollos)

En este caso usamos -sin pretender proponer su empleo- el término R_D para significar la altura alcanzada por una substancia, respecto del largo total de la tira.

Otras denominaciones usuales son: R_M ; R_G ; R_L así definidas (se emplean en la cromatografía sobre papel) :

$$R_G = \frac{R_f \text{ de un azúcar}}{R_f \text{ de la glucosa}} \quad R_L = \frac{R_f \text{ aminoácido}}{R_f \text{ leucina}} \quad R_M = \log (1/R-1)$$

En muchas investigaciones los valores de R_f se han publicado sin referencia a la temperatura, el pH, o la concentración de la solución o líquido de lavaje. Sin embargo todas estas condiciones influyen en la velocidad de migración; por lo tanto deben establecerse (15)

Además algunos autores miden la distancia recorrida por el soluto hasta el límite frontal de la banda y otros hasta el centro de gravedad de la misma.

Bate-Smith han estudiado las condiciones necesarias para obtener valores seguros de R_F trabajando sobre papel (15) :

- 1) debe trabajarse con la misma partida de papel que previamente ha de estabilizarse.
- 2) debe controlarse la temperatura a $\pm 0,5$ °C.
- 3) el tiempo de corrido debe ser constante.
- 4) paralelamente debe trabajarse con una substancia control; si los valores de ésta difieren en más que 0,02 la corrida debe descartarse y usarse solventes frescos.

En nuestro estudio hemos tenido especial cuidado en la preparación de las tiras, concentración de las soluciones t tiempo de desarrollo, haciendo especial mención de la distancia respecto de la cual se mide el R_F , factor este casi siempre olvidado en las distintas publicaciones.

d) Clasificación

Ya hemos dicho que casi todas las separaciones cromatográficas, pueden distribuirse en tres tipos cuya designación está ampliamente aceptada.

La cromatografía por intercambio iónico se funda como su nombre lo indica, en el empleo de intercambiadores iónicos de gran velocidad de intercambio y alta reversibilidad de acción.

Pueden ser minerales (zeolitas) y orgánicos (resinas sintéticas).

F.J. Meyers (17) publicó una revisión sobre sus propiedades y Ana Cotello efectuó un elogiado trabajo sobre preparación de resinas de este tipo con materias primas argentinas.

El principio es el siguiente : simultaneamente con la adsorción, ciertos iones son separados de la fase fija, siendo llevados por el solvente que los intercambia con algunos de los que traía en solución.

Los intercambiadores catiónicos se han usado intensamente en la sepa-

-ración de las tierras raras (en escala analítica e industrial), en la aislación de los productos de la desintegración atómica y en la resolución de una gran variedad de mezclas de naturaleza orgánica.

Los intercambiadores aniónicos han sido empleados con éxito en la aislación de los ribonucleótidos y de sus problemas de isomerización; en la aislación de aminoácidos por flujo de solvente, etc.

La cromatografía por partición está caracterizada por una fase no móvil y no miscible con el solvente, de modo que el soluto se distribuye entre ambas fases líquidas de acuerdo a su coeficiente de partición.

Ej: agua o nitrometano en sílica gel o tierras de diatomeas.

Esta designación fué introducida por Lester Smith, pero el tipo de columna fué usado previamente por Martín y Singe en la preparación de aminoácidos acetilados. El mismo Martín (18) plantea una discusión sobre la denominación de cromatografía de partición.

El uso de este tipo de columna es análogo en principio a la extracción por contra corriente y muy útil en la resolución de mezclas de compuestos que se descomponen sobre superficies activas; ej: separación de penicilinas.

Como ejemplo de las variaciones posibles de esta técnica, citaré el ejemplo de los ácidos orgánicos que han sido separados por partición entre sílica gel más agua y cloroformo; entre Celite más metanol y éter de petróleo; entre hidrocarburos sobre tierra de diatomeas especialmente preparadas y metanol-agua-acetona; entre sílica gel agua y butanol-cloroformo. Además se incluyen en este tipo todas las separaciones sobre papel que emplean solventes inmiscibles con agua.

Y finalmente tenemos la "cromatografía por adsorción" el tipo clásico, que incluye los estudios efectuados desde la época de Tswett hasta la actual. Constituyen ejemplos de cromatografía por adsorción, las técnicas que estudiaremos más adelante: el chromatostrip y el chromatobar.

Las variaciones más importantes de procedimiento dentro de este tipo son: la "cromatografía líquida o fluyente" de Reichstein-Ruzicka que efectúa el desarrollo hasta aparición de un soluto en el percolado y su

continuación: el método del "límite cromatográfico" de Tiselius que identifica y valora los solutos en eluato e efluente en forma continua, sea por métodos gravimétricos, volumétricos, ópticos, potenciométricos o por toque (14).

III.- MÉTODOS

a) Aparatos . La gran variedad de aparatos de adsorción se incluye en la clasificación que sigue, debida a H.H. Strain (18)

- 1) Tubos con adsorbente sólido estacionario; columnas de adsorción, de partición, de intercambio iónico
- 2) Caso anterior más electrodos ; columna electrocromatográfica.
- 3) Columna de sólidos porosos coherentes, sin envoltura de vidrio; el "chromatobar" (barra cromatográfica).
- 4) Películas delgadas de sólidos en polvo, depositados sobre tiras de vidrio; cromatografía radial superficial; "cromatostrip"
- 5) Tiras de papel de filtro; cromatografía en papel.
- 6) Lo anterior más electrodos ; electrocromatografía.
- 7) Hojas planas de papel; cromatografía bidimensional.
- 8) Discos de papel ; cromatografía radial.
- 9) Papel impregnado con varios adsorbentes.
- 10) Discos de varios tejidos entre bastidores.

Y además se han empleado hojas tubulares, pilas de papel de filtro, etc.

Debemos mencionar aquí los variados aparatos ópticos y eléctricos usados en la detección de solutos en el eluato por los métodos ya descritos (ej: medidas continuas de la densidad óptica y del índice de refracción del efluente) y en la detección de sustancias incoloras o dosajes de coloreadas directamente en el cromatograma.

Así se han desarrollado recientemente técnicas para detectar sustancias separadas en papel basadas en : fotometría, espectrometría de rayos β , medidas de alta frecuencia y de átomos radioactivos producidos

en la mezcla o en el cromatograma por medio de irradiación con neutrones en la pila atómica.

b) Adsorbentes, solventes y eluyentes

Para la elección de un dado dado adsorbente, dentro del empirismo de estos métodos, debe considerarse: que retenga cantidades significativas de las sustancias a resolverse; que estas sustancias puedan migrar a través de la columna al tratarlas con solvente fresco; y finalmente ser eluidas completamente con solventes polares; que el adsorbente no descomponga ninguno de los materiales que se empleen; que sea insoluble en los distintos solventes y de un tamaño de partículas que permita la rápida y uniforme percolación.

Según Zechmeister y Cholnoky (18) estos tamaños varían de uno a diez micrones en los adsorbentes por ellos usados. En nuestro trabajo hemos empleado ácido silícico de 100 mallas que equivale a partículas veinte veces más grandes que las anteriores.

Según Kolthoff la capacidad adsorptiva de una dada sustancia depende del método de preparación, del tratamiento o activación posterior, del tamaño de las partículas y de los solventes usados para la adsorción.

Robinson (19) los clasifica según el mecanismo íntimo de las separaciones en :

- 1) intercambiadores iónicos : zeolitas y resinas sintéticas
- 2) de partición : agua o nitrometano sobre gel silícico o tierra de diatomeas; cloroformo sobre vidrio molido, etc.
- 3) sustancias activas (que pueden transformarse en adsorbentes de intercambio iónico por adsorción preliminar de ácidos o bases).
Se dividen a su vez en (6) :

Fuertes : alúmina, carbón, tierras absorbentes.

medianos : silicatos alcalinos-gel silícico-ácido silícico-
óxidos e hidróxidos alcalinos.

fosfato tricálcico-carbonatos alcalinos y alcalino

térreos - óxido de titanio - óxido de manganeso .
azúcares (sacarosa, almidón, inulina).

inferiores: sulfato de bario y óxidos de estaño, thorio, berilio y zinc.

En 1939 Erlenmeyer introdujo el uso de los adsorbentes de tipo orgánico (20). Sus trabajos de adsorciones y separaciones sobre oxina y ácido violúrico son ejemplos de las posibilidades de su empleo.

Debemos mencionar finalmente a R.O. Bach quién introdujo el uso del sulfuro de zinc como adsorbente cromatográfico para separar iones de metales pesados. (21) y (22) .

Según Strain (23) la clasificación anterior es arbitraria y poco útil, pues algunas sustancias pueden actuar de varias maneras, según la naturaleza del soluto o solvente.

En cada caso el comportamiento se pone en evidencia por el tipo de curva o isoterma de adsorción. Representando la concentración en la fase sólida en función de la concentración en la fase líquida, se obtienen tres tipos distintos de curvas. (23).

Con el objeto de aumentar la velocidad de percolación, manteniendo las propiedades adsorptivas, se suele mezclar los adsorbentes con otras sustancias denominadas "filter aid" que tienen propiedades adsorptivas más débiles. Ej: el Hyflo Super Cel de la casa Johns Manville, que es una tierra silicosa especialmente preparada.

En nuestro estudio hemos usado bentonita agregada al ácido silícico en distintas proporciones.

En cuanto a los solventes y eluyentes, se los suele ordenar en una serie, comenzando por aquellos que permiten una adsorción más fuerte. Los últimos términos de esta serie -denominada elutrópica- son por lo tanto los mejores eluyentes, aunque el orden puede alterarse ligeramente según el adsorbente y adsorbido de que se trate. Como ejemplos de eluyentes se tienen: alcoholes, éteres, compuestos halogenados, benceno y mezclas de alcoholes y ácidos orgánicos en piridina. Como solventes: éter de petróleo, tetracloruro y sulfuro de carbono, acetona y benceno, que ocupa un término medio en la serie.

c) Localización de sustancias incoloras

A excepción de las 2-4 dinitrofenilhidrazonas, las restantes sustancias que hemos estudiados en el presente trabajo son incoloras o ligeramente coloreadas. Interesa entonces efectuar una ligera revisión de los métodos usados en la cromatografía de sustancias incoloras, en especial aquellos empleados por nosotros o vinculados a ellos.

1) Métodos ópticos

Karrer y Schöpp (24) y Winsterstein y Schon (25) usaron luz ultravioleta filtrada para identificar algunas sustancias incoloras que presentan fluorescencia. Este método, erróneamente denominado ultracromatografía, está limitado en su uso porque solo pocas sustancias incoloras fluorescen en la región de luz visible, cuando se las activa con luz ultravioleta. (29).

Se ha ideado hacer fluorescente la columna por el agregado de pequeñas cantidades de sustancias que lo sean, de modo que al excitarla con distintas longitudes, aparecen como manchas sobre fondo fluorescente.

Así Brockman y Volpers (26), iniciadores del método, usaron morina y berberina. En el capítulo referente a derivados de alcoholes, usamos ácido silícico pretratado con Rodamina G., según un método de White y Dryden (27).

También se han empleado sustancias fluorescentes inorgánicas. Así Sease (28) usó columnas de sílice mezcladas con sulfuro doble de zinc y cadmio y fosfato de zinc, técnica que empleamos en el capítulo referente a compuestos terpénicos.

Recientemente Harvalik (29) efectuó observaciones en la región infrarroja, revelando las sustancias que adsorben por medio de un detector especial. A este método lo denominó infracromatografía y una observación similar en la región ultravioleta sería ultracromatografía que no corresponde con la anterior definición de Karrer. En cambio denomina "fluocromatography" cuando se utiliza cualquier fuente de luz convenient-

te y la luz emitida por la columna es de mayor longitud de onda que la anterior.

2) Métodos químicos

Aquí debemos incluir los métodos basados en el tratamiento de la columna, bandas o papel, con reactivos que reaccionen con el absorbato dando coloración. En la mayoría de los casos el reactivo se aplica con un pulverizador especial.

Una variante es el método del pincel, propuesto por Zechmeister (30) que consiste en practicar la reacción con un pincel sobre una angosta franja, una vez que la columna ha sido separada de la envoltura de vidrio.

Strain(33) ideó tratar la sustancia a cromatografiar de modo ~~de~~ agregarle un grupo cromóforo fácilmente separable: pasa así al campo de separación de pigmentos.

Se ha propuesto también (Martín y Singe) el uso de indicadores de pH. Así ramsey y Patterson (31), en la cromatografía de ácidos orgánicos usan una columna de ácido silícico pretratado con verde de bromocresol, mientras que otros autores(32), prefieren aplicar este reactivo una vez efectuada la separación.

IV.- Nuevas técnicas : el "chromatostrip" - el "chromatobar"

En el año 1949 Meinhard y Hall(34) publicaron un trabajo sobre cromatografía radial superficial de iones inorgánicos, efectuada sobre porta objetos recubiertos con sustancia adsorbente. Anteriormente Flood(35) y Hoph(36) habían ideado aumentar la fuerza adsorbente del papel de filtro impregnándolo con distintas sustancias. Es decir, que la celulosa no era ya el material adsorbente, sino que desempeñaba el rol mecánico de sostén. Esta técnica, con abrir nuevas posibilidades a la cromatografía sobre papel estaba limitado por el pequeño número de adsorbentes que podían usarse y es así que en 1951 Kirchner, Miller y Keller,(32) reemplazaron el papel de filtro por tiras de vidrio, inspirándose en el método de Meinhard y Hall pero modificándolo en este sentido: el adsorbente, mez-

clado con un agente ligante se aplica sobre tiras de vidrio que luego son activadas y desarrolladas en tubos de prueba, de un modo análogo al introducido por Rockland y Dunn(37) en el estudio de aminoácidos sobre papel.

Esta técnica, para la cual se ha propuesto el nombre de "cromatostrip" es la que hemos empleado preponderantemente en el presente trabajo. Hemos adoptado un tipo "standard" de tiras, más largo que el propuesto por los autores mencionados, para poder efectuar varios desarrollos consecutivos y aumentar el poder resolutivo.

También hemos ensayado macro tiras, a los efectos cuantitativos que se mencionarán en su oportunidad. Además ha sido necesario modificar algunos detalles operatorios.

El "chromatobar".- En la columna cromatográfica clásica el material adsorbente se coloca dentro de un tubo cilíndrico de vidrio. Se presenta así una dificultad para aplicar los distintos reactivos que se emplean en el revelado de sustancias incoloras. Esta dificultad se elimina en parte por extrusión del material adsorbente fuera de la columna de vidrio, operación esta algo engorrosa. Por este y otros inconvenientes Miller y Kichner han ideado eliminar totalmente la envoltura de vidrio(39) construyendo una barra rígida constituida por el material adsorbente y yeso de París, que se sostiene por una varilla de vidrio concéntrica. A su vez la barra se apoya sobre un dispositivo denominado "distribuidor de solventes" que no es más que un vaso de precipitados con tres orificios en el fondo y provisto de tres patas de vidrio que actúan de sostén. El vaso se llena con el mismo material adsorbente y sobre este se apoya la columna. Se facilita así una distribución y ascenso uniforme del solvente.

La substancia a cromatografiar se pulveriza en la base de la barra que junto con el distribuidor se colocan dentro de una probeta más alta que la barra pero menos que la varilla de vidrio. Esta se toma por una agarradera. En el fondo de la probeta se coloca el solvente que asciende por capilaridad, primero a través del distribuidor y luego alcanza

la barra.

Se ha propuesto el nombre de "chromatobar" para este tipo de columna. De esta manera se evita en la cromatografía de sustancias incoloras su detección por cortes arbitrarios de columna o localización por fluorescencia, extrusión de la columna fuera de la envoltura de vidrio y en fin, otros métodos de igual finalidad ya descriptos. Una primera solución sería el uso del "Chromatostrip" ya descripto (pág 15), pero cuando se hace necesario recuperar sustancias separadas en cantidades suficientes para otros ensayos confirmativos, los autores recurren al "chromatobar".

Comentario : Hemos ensayado esta nueva técnica tal como se ha propuesto. Es evidente que si bien se evitan los inconvenientes mencionados surgen otros muy importantes. Así la preparación de una tal columna es larga y engorrosa. El yeso fragua rápidamente y como se trabaja con molde, es fácil la formación de zonas de distinta cohesión.

Además el método de secado y activación insume diez horas.

Se aconseja recurrir al "chromatostrip" como operación previa para estudiar las posibilidades cromatográficas de una mezcla dada, ensayar solventes y otras condiciones antes de pasar a la barra. Esto no es lícito suponerlo a priori, porque el comportamiento de una sustancia puede ser distinto en la tira -donde se usa almidón como agente ligante- que en la barra, donde se emplea yeso.

Estas consideraciones nos han llevado al reemplazo del "chromatobar" en los casos en que era necesario su empleo, por tiras o bandas de vidrio de 35 x 5 cm., recubiertas de adsorbente al igual que el chromatostrip. Una tira de este tipo -a la que denominaremos bandas cromatográfica, equivale a 15 "strip". Se pueden preparar y desarrollar simultáneamente cuatro de estas macro tiras en la misma probeta, de modo de poder aislar suficientes cantidades de sustancias como para efectuar otros ensayos confirmativos. En el próximo capítulo daremos ejemplos de su uso en la separación de 2-4 dinitrofenilhidrazonas.

Consideremos que las ventajas del "chromatobar" con respecto a la columna clásica, las presenta también la banda cromatográfica, siendo su preparación más rápida y simple.

P A R T E E X P E R I M E N T A L

Capítulo I .- Aplicación del "chromatostrip" a la separación de 2-4 dinitrofenilhidrazonas de aldehidos y cetonas.

A H.H.Strain le corresponde el haber sido el iniciador del método de separación cromatográfica de aldehidos y cetonas como 2-4 dinitrofenilhidrazonas, al separar /ionona de alcanfor.(40)

En el mismo año (1935) Lucas y sus colaboradores separaron los aldehidos acético y propiónico (41) y más tarde Roberts y Green resolvieron una serie de aldehidos y cetonas de bajo peso molecular (42) usando como solventes benceno y éter de petróleo en la proporción de 1 a 2 y como solvente para los desarrollos, éter de petróleo con 4 % de éter etílico.

Sobre el mismo tema publicó un trabajo J.W.White (43), pero más amplio, con el objeto de aplicarlo al estudio de un aceite esencial de manzana (44). Usó como solventes para los desarrollos distintos porcentajes de hexano en éter etílico, según el tipo de aldehido o cetona involucrado.

Recientemente A.L.Montes (45) utilizó esta técnica en la separación de aldehidos y cetonas presentes en aceites esenciales, introduciendo algunas modificaciones en el tipo de columna, material adsorbente y solventes a emplearse.

También se han efectuado separaciones de este tipo sobre papel impregnado con ácido silícico (46) y (47).

Nos proponemos a continuación estudiar la aplicabilidad del "chromatostrip", es decir, de tiras de vidrio impregnadas con el material adsorbente, a mezclas de aldehidos y cetonas presentes en aceites esenciales.

Se estudiarán cromatográficamente las 2-4 dinitrofenilhidrazonas puras; sus mezclas binarias y ternarias especialmente preparadas y se darán ejemplos de aplicación al análisis de las fracciones carbonílicas de aceites esenciales actualmente en estudio.

Método : La mezcla adsorbente está constituida por 4 partes de ácido silícico de la casa Lopal que pasa por un tamiz de 100 mallas (corresponde a un 60% del producto comercial) y 1 parte de bentonita que es un silicato de la siguiente composición : SiO_2 56%; Al_2O_3 13,4%; Fe_2O_3 3,2%; OCa 2,1%; OMg 4,75%; H_2O 23,4% .

Se efectuaron ensayos con distintos porcentajes de silícico-bentonita resultando la anterior la más aconsejable (comportamiento similar presenta una mezcla de ácido silícico de 200 mallas y bentonita en la proporción de 3:1).

Solventes : a fin de standardizar el método usamos en todos los casos benceno para la adsorción inicial. Para los desarrollos el mismo benceno, ligroína con 20% de éter etílico y una mezcla de ambos en partes iguales. La ligroína se obtuvo destilando éter de petróleo y recogiendo la fracción que destila entre 65-85 °C.

El material adsorbente se aplica sobre tiras de vidrio de 220 mm por 15 mm, aunque la altura útil de la tira es de 200 mm.

Procedimiento.

1) Preparación de las tiras : hemos seguido el procedimiento aconsejado por Kirchner (32) con ligeras variantes.

Se pesan y mezclan intimamente en seco 19 gramos de á. silícico-bentonita (4:1) con 1 gramo de almidón que actúa como agente ligante. Se agregan 36 ml. de agua, se homogeneiza la pasta, y con continua agitación se calienta en baño de agua a 85°C, durante 110 segundos. Al cabo de este tiempo la masa comienza a espesarse, pero se continua la operación otros 30 segundos. Se interrumpe el calentamiento, se agregan 10 ml. de agua con agitación, quedando la pasta lista para su aplicación. Para ello se dispone la tira de vidrio entre otras dos colocadas 0,5 mm. más alto y se aplica la pasta con pincel. Se alisa posteriormente de modo que resulte un espesor homogéneo y se lleva a estufa durante 40 minutos a 110 °C (con estufa con circulación de aire forzado se obtendría el secado en 15 min. (32)).

Luego se activan las tiras por desecación al vacío durante 30 min.

Se emplea un vacío de 3 mm de Hg y un desecador con H.C.K. Se aconseja romper el vacío con aire seco. Para ello usamos un tubo en U relleno con dehidrita, unido al desecador.

2) Desarrollo del "chromatostrip" :

Las cantidades antes estipuladas permiten obtener una serie de 12 tiras. Se dispone de sendos de tubos de ensayo de 200 x 20 mm. En cada tubo se coloca 1 ml de la solución bencénica de la 2-4 dinitrofenilhidrazona a ensayar. Se colocan las tiras y la solución asciende por capilaridad. Cuando el solvente ha alcanzado una altura de 10 cm., se retiran las tiras y se dejan al aire unos minutos para que se evapore el solvente. Esta operación que denominamos adsorción inicial, dura 30'.

Luego debe efectuarse el desarrollo del cromatograma. Para ello se dispone de otra serie de tubos con 2-2,5 ml de solvente fresco, y se colocan las tiras una vez secas. El desarrollo se interrumpe cuando el solvente ha alcanzado los 18 cm., esto es, a los 90 minutos de comenzado el proceso.

Así queda caracterizado el R_D de cada sustancia o en el caso de mezclas, se verifica si hubo separación, pudiéndose, en caso negativo efectuar un nuevo desarrollo con otro solvente.

Por tratarse de sustancias coloreadas, aparecen las bandas de color neto sobre fondo blanco.

Los resultados obtenidos con los derivados de los aldehidos y cetonas se detallan a continuación.

Experiencia N°1

Dos series = 24 tiras. Solvente para desarrollos : benceno.

Carvona : presenta anillo basal de color naranja de 2 cm. Corresponde a zona de adsorción inicial. Sigue en zona en blanco de 8 cm y banda de color amarillo opaco de 40 mm que alcanza los 14,1 cm. $R_D = 0,78$

Citral : solo se observa un anillo basal de color naranja fuerte, que alcanza los 9 cm. $R_D = 0,50$

Mentona : presenta un anillo basal de 2 cm y una banda de color amarillo brillante, de 4 cm de espesor que alcanza los 15,0 cm. de altura $R_D = 0,83$

Mezcla : carvona - citral

Se observan dos bandas coloreadas : banda inferior de 68 mm y de color naranja. Corresponde a Citral

Banda superior, de color amarillo débil y frente de banda a 14,5 cm. de la base. Corresponde a carvona .

El resto de la tira se presenta incoloro. Se sobreentiende que ello ocurre en todos los casos siguientes.

Mezcla : carvona - mentona

Se observa una única banda coloreada de 30 mm que alcanza los 15,1 cm de desarrollo . No se obtiene separación ni con dos desarrollos.

Mezcla : citral - mentona

Se obtiene muy buena separación.

Banda superior de 0 a 7 cm., anaranjada. Corresponde a citral

" inferior: 9,2 a 14,5 cm. amarillo canario : mentona

Experiencia N°2

Objeto : determinación de los R_D de benzaldehído, alcanfor y fenchona, y resolución de sus mezclas binarias. Paralelamente se efectúa un ensayo con carvona para cotejar la similitud en la preparación de las tiras, con los de la experiencia anterior.

Benzaldehído : no se observa prácticamente el anillo basal de adsorción; solo se aprecia un tono ligeramente más oscuro que en la parte superior de la tira.

Se caracteriza por una banda de 35 mm, de color amarillo canario y $R_D = 0,72$

Alcanfor : presenta una banda de color amarillo de 30 mm.

Alcanfor (cont.) No presenta anillo basal $R_D = 0,82$

Fenchona : semejante al anterior. $R_D = 0,83$

Mezcla : benzaldehído - alcanfor

Con benceno como solvente no se obtuvo separación. Se efectuó un nuevo desarrollo con ligroína más 20% de éter etílico, con buen resultado. Se obtuvieron dos bandas con una separación de 5 mm.

Banda superior de color amarillo : alcanfor

" inferior " " anaranjado : benzaldehído

Mezcla : benzaldehído - fenchona

Se obtuvo un resultado análogo al anterior, es decir que el alcanfor y la fenchona tienen un comportamiento similar. De allí también que en una mezcla de ambos no se obtiene separación.

Carvona (de referencia) : anillo de 33 mm, amarillo débil $R_D = 0,79$

Experiencia N° 3

Objeto : determinación de los R_D de vainillina, aldehídos salicílico y cinámico y resolución de sus mezclas binarias.

Vainillina ; presenta solo una banda basal de 36 mm, de color rojo ladrillo neto $R_D = 0,20$

Aldehído salicílico ; presenta una banda de color amarillo opaco de 40 mm $R_D = 0,44$

Aldehído cinámico ; presenta una banda de color naranja vivo, de 60 mm y un valor de $R_D = 0,68$

Carvona (de referencia) : anillo amarillo débil $R_D = 0,79$

Mezcla : vainillina - salicílico

Se observan cuatro bandas :

- 1) banda inferior rojo ladrillo de 32 mm y $R_D = 0,17$
Corresponde a vainillina
- 2) banda en blanco de 10 mm
- 3) banda de color amarillo opaco, de 38 mm y $R_D = 0,44$
- 4) banda superior en blanco de 100 mm.

Mezcla : vainillina - cinámico

Como en el caso anterior, se obtienen dos bandas coloreadas.

- 1) banda inferior de 30 mm, de color rojo ladrillo $R_D = 0,16$
Corresponde a vainillina
- 2) banda superior de 64 mm, de color rojo anaranjado $R_D = 0,66$
Corresponde a cinámico

Mezcla : cinámico - salicílico

Con un solo desarrollo se obtiene una banda continua, efectuándose entonces un segundo desarrollo, siempre con benzol.

Se obtienen entonces dos bandas :

banda inferior de 28 mm y límite frontal a 11 cm de la base.

Corresponde a salicílico.

banda superior de 31 mm. Corresponde a cinámico.

Zona intermedia en blanco de 12 mm.

Experiencia N° 4

Objeto : caracterización de aldehído laúrico, furfural y heliotropina. Resolución de sus mezclas binarias.

Lauraldehído : se caracteriza por un anillo de color amarillo débil apenas perceptible y valor muy alto de desarrollo.

$R_D = 0,86$

Furfural : presenta una banda rojiza de 20 mm y $R_D = 0,77$

Piperonal : banda basal de color rojizo débil y $R_D = 0,32$

Las mezclas binarias de lauraldehído-piperonal y furfural-piperonal desarrolladas simultaneamente, se resolvieron con

netas separaciones de bandas, dado la gran diferencia en los R_D valores.

En cuanto a la mezcla lauraldehido-furfural, se recurrió a un segundo desarrollo con la mezcla benzol-ligroína (1:1) obteniéndose dos bandas separadas.

Banda superior de 5 mm de color amarillo débil y con frente de banda a 17,2 cm de la base. Corresponde a laúrico.

Banda inferior de 20 mm de color rojizo : furfural

Banda de separación en blanco de 22 mm.

Experiencia N° 5

Objeto : resolución de mezclas binarias de carvona y cada uno de los 2-4 restantes, excepto las mezclas con vainillina, salicílico y heliotropina que se dan por resueltas, dadas las netas diferencias en sus R_D .

Mezcla : carvona - cinámico

Solvente : ligroína +20% de éter etílico.

Se observa :

1) zona basal incolora de 25 mm.

2) banda de 85 mm de color rojizo con borde amarillo. $R_D=0,66$

Corresponde a cinámico

3) zona en blanco de 11 mm.

4) banda amarilla de 24 mm y $R_D = 0,79$: carvona

Mezcla : carvona - benzaldehido

Se efectuaron dos desarrollos , primero con la benzol y luego con ligroína + 20% de éter etílico sin obtenerse separación.

Mezcla : carvona - alcanfor

Solvente : ligroína + 20 % de éter etílico.

Se aprecian dos bandas sin zona de separación :

B. superior de 10 mm y color amarillo canario $R_D = 0,86$

Corresponde a alcanfor

Banda inferior de 20 mm y color amarillo parduzco. $R_D = 0,81$

Corresponde a carvona

Mezcla : carvona - lauraldehido:

Solvente : ligroína + 20 % de éter etílico.

Se obtienen dos bandas bien separadas :

banda superior de 3 mm, de color amarillo débil y $R_D = 0,93$

Corresponde a lauraldehido

banda inferior de 14 mm, de color amarillo opaco $R_D = 0,81$

Corresponde a carvona

Experiencia N° 6

Objeto : resolución de las mezclas de citral y cada uno de los derivados restantes, excepto las mezclas con alcanfor, fenchna y laureldéhido que se consideran resolubles.

Mezcla citral - cinámico

Se observan dos bandas con 10 mm de separación entre ambas.

Banda superior de 40 mm, de color amarillo rojizo y $R_D = 0,63$

Corresponde a cinámico

Banda inferior de 38 mm y color rojo ladrillo. $R_D = 0,36$

Corresponde a citral

Mezcla : citral - benzaldehido

En este caso como en el anterior, se usó como solvente la mezcla de ligroína $\frac{1}{2}$ 20% de éter etílico. Se obtiene:

1) b. superior de color amarillo opaco y $R_D = 0,63$

Corresponde a benzaldehido

2) zona intermedia en blanco de 15 mm

3) b. inferior de color amarillo rojizo y $R_D = 0,33$. Citral

Mezcla : citral - vainillina

Se usó el mismo solvente del caso anterior. Se observan dos bandas juntas.

B. superior de 38 mm y color rojo ladrillo : citral

B. inferior de 23 mm y " " viláceo : vainillina

Mezcla citral - salicílico

Se efectuaron dos desarrollos sin obtenerse separación.

Mezcla citral - furfural

Solvente : benceno . Se observan dos bandas separadas ;

B.superior de color amarillo rojizo y $R_D = 0,77$ furfural

B.inferior " " anaranjado " " = 0,48 Citral

Mezcla citral - piperonal

Solvente : benceno . Se observan dos bandas juntas :

b.superior de color anaranjado y frente de banda en 9 cm.

Corresponde a citral

b.inferior de color rojizo débil y frente de banda en 6 cm.

Corresponde a piperonal.

Experiencia N° 7

Resolución de mezclas binarias en las cuales interviene el derivado de la mentona

Mezcla mentona - cinámico

Solventes : benceno. Se obtienen dos bandas bien separadas :

banda superior amarillo brillante, de 25 mm y $R_D = 0,83$

Corresponde a mentona

Anillo intermedio en blanco de 8 mm.

Banda inferior anaranjada de 50 mm y $R_D = 0,65$: cinámico

Mezcla mentona - benzaldehído

En un primer desarrollo con benzol se obtuvieron dos bandas juntas. Se efectuó entonces un segundo desarrollo con ligroína + 20% de éter etílico, con el siguiente resultado :

1) b.superior de 20 mm, color amarillo vivo y frente de banda en 17 cm. Corresponde a mentona

2) zona intermedia en blanco de 50 mm

3) banda inferior de 30 mm, de color anaranjado y con frente en 14,5 cm. Corresponde a benzaldehído.

Mezclas : mentona - alcanfor y mentona - fenchona

En ambos casos se desarrolló primero con benceno y luego con ligroína + 20% de éter etílico sin obtenerse separación. Se observa una única banda amarilla de 30 mm que alcanza los 15 y 17 cm, luego de cada desarrollo.

Mezcla mentona - furfural

Se recurrió al mismo orden de desarrollos que en el caso anterior. Se obtienen dos bandas juntas :

banda superior de 18 mm, de color amarillo vivo, que alcanza los 17,2 cm de desarrollo. Corresponde a mentona

banda inferior de color rojizo que alcanza los 15,4 cm.

Corresponde a furfural

Mezcla : mentona - laúrico

No se obtiene separación luego de efectuados dos desarrollos con los mismos solventes de los casos anteriores, llegando el frente de la única banda a 17,2 cm de la base.

Experiencia N° 8

Objeto : resolución de diez mezclas binarias, especialmente preparadas.

Mezcla : cinámico - alcanfor

Con solvente N° 1 (benceno) no se obtuvo separación.

Con " N° 2 (ligroína + 20% de éter etílico) se obtienen dos bandas coloreadas, con una zona intermedia, en blanco de 10 mm:

banda inferior rojiza con frente a 14,0 cm. Benzaldehído

" superior amarilla " " " 17,3 cm. Alcanfor

Análogo comportamiento presenta la mezcla :

Cinámico - fenchona

Mezcla : cinámico - furfural

Los desarrollos efectuados con benceno permitieron obtener:

1) banda superior rojiza a 15,0 cm de la base. Furfural

2) " inferior anaranjada a 13,0 cm. Cinámico

No se obtiene zona en blanco de separación.

Mezcla : benzaldehído - cinámico

No se obtiene separación. Una sola banda luego de dos desarrollos con benceno.

Mezcla benzaldehído - furfural

Resultado análogo al anterior.

Mezcla cinámico - piperonal

Solvente : benceno . Se observen dos bandas, anchas, apenas separadas :

banda superior de 50 mm y $R_D = 0,68$. Cinámico

" inferior de 58 mm y $R_D = 0,33$ Piperonal

Mezcla benzaldehído - piperonal.

En este caso la separación es neta. Se obtiene una banda inferior análoga a la anterior : piperonal; una zona intermedia de 40 mm y una banda superior de 30 mm, de color anaranjado y $R_D = 0,72$. Benzaldehído

Mezcla : alcanfor - lauraldehído

No se obtiene separación luego de dos desarrollos con solventes N° 1 y N° 2 respectivamente.

Mezcla : alcanfor - furfural

Se desarrolló con solvente N° 2. Se observa:

1) b. superior de 10 mm, de color amarillo canario : alcanfor

2) zona intermedia en blanco de 6 mm.

3) b. inferior de 18 mm y color rojizo : furfural

Mezcla : fenchona - lauraldehído

Efectuados dos desarrollos con solvente N° 2, no se obtuvo separación.

CUADRO DE SEPARACION DE MEZCLAS BINARIAS DE 2-4 DINITROFENIL-
-HIDRAZONAS DE ALDEHIDOS Y CETONAS

	Carvona	Citral	Mentona	Cinámico	Benzaldehido	Alcanfor	Fenchona	Vainillina	Salicílico	Laúrico	Furfural
Carvona	-										
Citral	A	-									
Mentona	X	A	-								
Cinámico	A	A	A	-							
Benzaldehy.	X	A	A	X	-						
Alcanfor	A	B	X	A	A	++					
Fenchona	B	B	X	B	A	X	-				
Vainillina	B	A	B	A	B	B	B	--			
Salicílico	B	X	B	A	B	B	B	A	--		
Laúrico	A	B	X	B	B	X	X	B	B	--	
Furfural	X	A	A	A	X	A	B	B	B	A	--
Piperonal	B	A	B	A	A	B	B	A	A	A	A

Nota : X indica mezclas no resolubles
 A " " resueltas
 B " " cuya resolución se prevee.

b) Determinación de los valores R_F de 2-4 dinitrofenilhidrazonas.

Para que tenga utilidad el valor R_F como dato analítico de identificación de aldehídos y cetonas, hay que standardizar minuciosamente la forma de proceder, de modo de obtener valores reproducibles.

En la parte teórica nos hemos referido a las condiciones básicas y a las variables a las cuales hay que referir estos valores.

A los efectos comparativos trabajaré con una cantidad fija de derivado: 0,1 mg por tira. Como el R_F es función de la concentración, no conviene trabajar con soluciones como en el caso de los R_D , sino depositar unas gotas en el extremo de la tira, dejar evaporar el solvente y luego desarrollar con solvente fresco .

Las gotas deben depositarse a una distancia del extremo de la tira tal que al colocar esta en el tubo de prueba, el solvente no moje la mancha sino luego de haber ascendido capilarmente un centímetro, al menos.

En todos los casos hemos usado benceno como solvente para los desarrollos.

Las tiras se preparan como se indicó en la primera parte de este capítulo. Una vez listas se les marcan dos trazos a 3 y 18 cm de la base, respectivamente. En la primera se depositan las gotas de la solución bencénica del derivado en estudio (Nº de gotas que corresponda a 0,1 mg. de soluto). Se deja evaporar el solvente y se coloca la tira en el tubo de prueba que contiene 2 ml de solvente fresco. Cuando este ha alcanzado la traza superior, se interrumpe el desarrollo. Se mide la altura alcanzada por la banda y se divide por los 15 cm que ha recorrido el solvente respecto de la substancia adsorbida.

Los valores así determinados junto con los colores de las bandas obtenidas, se dan en el cuadro que sigue.

Se ha estudiado comparativamente una muestra de 2-4 dinitrofenilhidrazina (ensayo en blanco).

c) Resolución de mezclas ternarias

A los efectos de estudiar sus posibilidades prácticas, se han resuelto las siguientes mezclas ternarias, especialmente preparadas.

El modo de proceder es análogo al de las mezclas binarias.

1) Mezcla mentona - cinámico - vainillina

Solvente : ligroína + 20 % de éter etílico.

Se obtienen tres bandas coloreadas, separadas por tres en blanco:

Banda de 25 mm, de color violeta rojizo	$R_D = 0,14$	<u>Vainillina</u>
" " 20 mm en blanco		
" " 65 mm, de color amarillo débil	$R_D = 0,64$	<u>Cinámico</u>
" " 10 mm en blanco		
" " 25 mm de color amarillo neto	$R_D = 0,85$	<u>Mentona</u>
" " 25 mm en blanco.		

2) Mezcla carvona - salicílico - vainillina

Se obtienen tres bandas coloreadas y solo dos en blanco, usando el mismo solvente del caso anterior.

Banda de 25 mm, de color violeta rojizo	$R_D = 0,14$	<u>Vainillina</u>
" " 35 mm, de color amarillo rojizo.	$R_D = 0,33$	<u>Salicílico</u>
" " 60 mm en blanco.		
" " 30 mm, de color amarillo opaco	$R_D = 0,83$	<u>Carvona</u>
" " 30 mm en blanco.		

3) Mezcla alcanfor - cinámico - salicílico

Solvente : benzol. Se observan tres bandas netas, sin separación entre la superior y la media:

banda superior de 10 mm, amarillo canario	$R_D = 0,86$	<u>Alcanfor</u>
" media " 20 mm, anaranjada	$R_D = 0,80$	<u>Cinámico</u>
" inferior " 20 mm, amarillo opaco	$R_D = 0,50$	<u>Salicílico</u>

4) Mezcla fenchona - benzaldehído - citral

Solvente : benzol - ligroína + 20 % de éter etílico (1:1)

Separación neta. Fondo blanco entre las tres bandas coloreadas que corresponden desde la parte superior, a los derivados en el orden arriba indicado.

d) Aplicación al estudio de aceites esenciales

Hemos aplicado el "chromatostrip" como una guía acerca de las posibilidades de separación (o resolución) cromatográfica de mezclas de 2-4 dinitrofenilhidrazonas correspondientes a fracciones carbonílicas de aceites esenciales.

El derivado mencionado se prepara según la técnica de Scholtens descripta en (48). El procedimiento de separación es análogo al ya mencionado.

Muestra N°1 Derivados de los componentes carbonílicos del aceite esencial de cedrón

Adsorción inicial: presenta una banda homogénea de color amarillo débil que alcanza los 7 cm de altura.

Desarrollos : con benzol se obtiene una banda de 5 cm y $R_D = 0,86$
con ligroína + 20 % de éter etílico , dos bandas:

Banda superior, de color amarillo canario y $R_D = 0,80$

" inferior " " marrón claro y $R_D = 0,74$

Conclusión : en el cedrón hay al menos dos compuestos carbonílicos. Se aconseja su identificación por columna clásica, usando solvente N° 2 para los desarrollos.

Muestra N° 2 Menta arvensis

Se prepara solución en benzol conteniendo 0,4 mg/ml.

Adsorción inicial: Banda anaranjada que alcanza los 7 cm.

Desarrollos : con benzol se obtiene una banda de 2 cm y color rojizo fuerte $R_D = 0,76$

con ligroína se obtiene la misma banda, pero más difusa $R_D = 0,88$

Conclusión : no se puede revelar más que un componente. Aumentando la concentración a 1 mg/ml, la banda cubre gran parte de la tira.

Muestra N° 3 Menta pulegium

Se prepara solución conteniendo 0,4 mg/ml en benceno.

Adsorción inicial : banda amarilla con frente en 7,5 cm.

Desarrollos : con benzol se obtiene una banda de 3 cm y de color marrón amarillento $R_D = 0,83$ (1)

con ligroína se obtiene la misma banda pero más desplazada y difusa.

Se efectúa un nuevo desarrollo con ligroína en (1). Se aprecia entonces un ligero anillo amarillo en la parte superior de la banda marrón claro. Es decir que hay un compuesto principal y uno en cantidad mucho menor. Se recurrió entonces a la columna clásica (45), aislándose un compuesto fuertemente adsorbido, de color rojizo y punto de fusión correspondiente al derivado de la pulegona.

Muestra N°4 Aceite esencial de pichana (Heterothalamus Spartioi-
des, Hucker-Arnott)

Las presentes experiencias las hemos efectuado en colaboración con J. Braun, como contribución de la presente técnica al análisis del aceite esencial de pichana (49).

La fracción carbonílica de dicho aceite, obtenida mediante precipitación con 2-4 dinitrofenilhidrazina, se trató con alcohol etílico a 95° en caliente, quedando una fracción insoluble, de aspecto viscoso y tono rojizo, que llamaremos fracción I ; la solución precipita al enfriarse la fracción soluble que llamaremos S.

Ambas fracciones se estudiaron cromatográficamente por separado.

Fracción I Se disuelve en benzol con facilidad en la proporción de 0,3 mg/ ml .

La adsorción inicial revela ya dos bandas : una superior de 35 mm y color amarillo y una inferior de 40 mm y color amarillo naranja, con neta separación.

Desarrollos : con benzol dos bandas netas

Banda superior de 20 mm y $R_D = 0,86$

" inferior de 25 mm y $R_D = 0,53$

Se repitió con solución de concentración doble y usando ligroína + 20% de éter etílico como solvente para los desarrollos.

Se obtuvieron solo dos bandas, como en el caso anterior, pero más separadas y más anchas. Así la banda inferior tiene un $R_D = 0,31$ y la superior un $R_D = 0,33$.

Conclusión : en la fracción carbonílica del aceite esencial de pichana hay dos componentes en proporciones semejantes.

Estos resultados nos condujeron a intentar la separación en bandas cromatográficas, a los efectos de obtener cantidades suficientes para otros ensayos físicos (ver pág 35).

Fracción S Se disolvió en benzol en la proporción de 4mg/ml (solo 0,3 ml de benzol bastan para disolver los 4 mg.)

Adsorción inicial : muy débil, banda amarillo naranja hasta 3 cm.

Desarrollos : con benzol la banda mencionada avanza apenas 2 cm., pero se desarrolla un anillo amarillo débil que alcanza los 10 cm.

Con ligroína ocurre lo mismo, pero la banda superior se presenta más difusa.

Conclusión : en la fracción S hay un componente principal y uno presente como impureza. Se puede purificar fácilmente porque aquel constituye la fracción más adsorbida. Se aconseja recurrir a las bandas cromatográficas. (ver pág 35).

e) Empleo de bandas cromatográficas

Si bien el "chromatostrip" resulta útil en la resolución de algunas mezclas y permite ensayar rápidamente adsorbentes y solventes a seleccionar antes de recurrir a la macro separación, presenta la dificultad de que las cantidades recuperables por elución, no son suficientes para efectuar otros ensayos confirmativos sobre la naturaleza de la sustancia separada.

Ya hemos dicho que una solución consiste en recurrir a la columna clásica o al "Chromatobar", nueva técnica que hemos ensayado y comentado.

Mucho más simple nos pareció recurrir directamente a macro separaciones en macro tiras que trabajan igual que el "chromatostrip", es decir que la solución primero y el solvente después ascienden por capilaridad. De esta manera se puede pasar de la micro a la macro escala, con mejores posibilidades de repetir las condiciones operatorias.

Las desventajas que a priori parecerían presentarse son : 1) un tiempo mayor para efectuar una dada separación al prescindirse de la succión por vacío y 2) una menor relación masa adsorbente a masa adsorbida. Tales desventajas no son significativas, según se demostró experimentalmente. Además presentan la comodidad de poder dejar un desarrollo en marcha de un día para otro.

Las posibilidades de estas macro tiras -a las que denominamos bandas cromatográficas- las hemos estudiado resolviendo mezclas preparadas y desconocidas.

Procedimiento : la mezcla adsorbente se prepara igual que en el caso de las micro tiras, pero para una serie de 4 macrotiras se necesitan: 45,6 gr de mezcla adsorbente ; 2,4 de almidón y 86 ml de agua.

Se usa un distribuidor de solventes, análogo al descrito en la página 17-. El mismo se llena hasta la mitad con la misma pasta que se emplea en las tiras, y luego con ácido salicílico puro, sobre el cual se apoyarán las bandas.

La solución de la sustancia o mezcla a cromatografiar se pulveriza en una angosta zona basal o se adsorbe hasta unos 8 cm. como en el caso

de los "strips". Conviene preparar esta solución con una concentración de 2 mg/ml.

Se dispone de una probeta de 40 cm de altura en cuyo fondo se colocan el solvente fresco a usarse y el distribuidor. Sobre este se disponen las cuatro tiras.

Cuando el solvente alcanzó los 30-35 cm se interrumpe el desarrollo, se sacan las bandas y se dejan unos minutos al aire para permitir la evaporación del solvente. Pueden efectuarse varios desarrollos en esta forma, según las necesidades. En este caso, claro está, la elución de un componente de la columna no se obtiene, pero se puede concentrar el componente menos adsorbido en el borde superior de la tira o banda.

Posteriormente se "cortan" cada una de las zonas coloreadas por separado; se eluye con éter etílico, continuándose con las operaciones corrientes: separación por filtración del material adsorbente; evaporación del eluyente; redisolución y nueva cristalización del adsorbato. Finalmente se efectuó la identificación por algunas constantes físicas (eventualmente se puede completar por composición centesimal). En las operaciones cuantitativas se debe recurrir a una extracción con Soxhlet.

Resultados 1) Mezcla alcanfor - cinámico - vainillina.

Se disuelven 20 mg de la mezcla en 40 ml de benceno.

Se efectúa una adsorción inicial y tres desarrollos con 50 ml de benzol cada uno. Se obtienen entonces tres bandas de color, perfectamente separadas :

banda superior de 30 mm y color amarillo cenario. Por elución y recristalización se obtiene un derivado de punto de fusión correspondiente al alcanfor.

banda media de 50 mm, de color anaranjado . Corresponde a cinámico.
banda inferior de 30 mm y color rojo oscuro. Se aisló una sustancia de Pf correspondiente al derivado de la vainillina

2) Fracción I del aceite esencial de pichana (pág 34)

Se trabaja con 30 mg de la mencionada fracción que se disuelve en 15 ml de benceno.

Se efectúa una adsorción inicial y tres desarrollos con la mezcla de benzol y ligroína + 20% de éter etílico.

Se aprecian las dos bandas que se habían revelado con los "strips"

Al tercer desarrollo la banda superior se encuentra concentrada en el borde superior de la tira. Se la separa por corte del material adsorbente y elución con éter etílico.

Continuando con las operaciones descritas, se obtiene un derivado de punto de fusión = 172-173 °C y de fuerte color rojizo.

La banda inferior se somete a nuevos desarrollos a fin de purificarla de restos eventuales de la banda superior. De ella se obtiene un derivado de color anaranjado y punto de fusión = 136-137 °C.

La dilucidación final de ambos derivados está actualmente en estudio (49).

3) Fracción S del aceite esencial de pichana

Se recurre a las bandas cromatográficas para su purificación (pág 34)

Para ello se disuelven 8 mg del derivado en 4 ml de benzol y se pulveriza la solución en la base de dos bandas.

Se desarrolla con 50 ml de benzol.

Luego de dos desarrollos se aprecia el siguiente cromatograma :
banda inferior de 9,8 cm, de color anaranjado intenso, apenas desplazada 2 cm con respecto a la posición inicial.

zona en blanco de 7 cm.

banda superior de 3 cm y color amarillo débil (impureza).

Después del tercer desarrollo se separan ambas bandas por corte de la capa adsorbente, aislándose ambos derivados por elución con éter etílico. La caracterización final de los mismos está actualmente en estudio, como el caso anterior (49).

Capítulo II Separación de mezclas de semicarbazonas

La literatura química no registra antecedentes relativos a la resolución cromatográfica de mezclas de semicarbazonas.

Sin embargo y a pesar del éxito obtenido con el empleo de las 2-4 dinitrofenilhidrazonas, hemos querido ensayar el comportamiento de las semicarbazonas derivadas de aldehidos y cetonas, por el empleo que tiene el mencionado derivado en el análisis funcional orgánico.

Hemos trabajado con semicarbazonas correspondientes a : benzaldehido ; cinamaldehido ; aldehido salicílico ; vainillina ; citral ; piperonal y acetofenona.

Todas ellas presenta absorción en el ultravioleta y como son incolores, hemos recurrido a tiras fluorescentes de ácido silícico pretratadas con Rodamina G. (ver capítulo siguiente)

Se ha trabajado primero con muestras puras y luego con mezclas binarias. Hemos ensayado también otro tipo de bandas fluorescentes según el método de Sease ya mencionado.

Se han probado distintos solventes y en general no hemos obtenido resultados satisfactorios. Solo cuatro semicarbazonas se pueden revelar bajo luz ultravioleta. Por lo tanto solo estudiamos las mezclas binarias por ellos constituidas.

Como solvente (inicial y para los desarrollos) conviene emplear alcohol etílico de 95 o de 50 grados. El primero tiene el inconveniente de que solubiliza parcialmente la rodamina de la tira, que queda entonces menos fluorescente y con un fuerte anillo en la altura alcanzada por el solvente. Se evita esta dificultad comparando en cada caso con un ensayo en blanco (hemos ensayado sin éxito reemplazar la rodamina por sulfuros fluorescentes de zinc y cadmio, de acuerdo a Sease).

- Procedimiento ; 1) preparación de las soluciones: se preparan soluciones de cada semicarbazona en alcohol etílico a 50° conteniendo cada una 0,25 mg/ml.
- 2) adsorción inicial ; en sendos tubos de ensayo se vierten 1,0 ml. de la solución en estudio.

Se colocan las tiras y se espera a que el solvente haya alcanzado los 10 cm. Tiempo de adsorción : 30-40 minutos. Desarrollos : una vez completada la adsorción inicial se dejan las tiras al aire para que se evapore el solvente. Como hemos empleado un solvente acuoso, conviene llevarlas a estufa. Se efectúa el desarrollo con 2,5 ml del mismo solvente o con EtOH a 95°. Tiempo de desarrollo : 90-100 minutos.

Se repite la operación de secado anterior y se observan las tiras con luz ultravioleta en cuarto oscuro. La banda de adsorción se revela como zona oscura sobre fondo brillante.

A continuación se detallan algunos resultados :

Aldehído salicílico : la zona de adsorción es visible a simple vista. Con luz ultravioleta presenta fuerte fluorescencia celeste, desde la base hasta una altura de 7,5 cm. $R_D = 0,42$ con EtOH a 95°

Benzaldehído : desarrollado con alcohol a 95° presenta un débil anillo oscuro de $R_D = 0,48$

Cinámico : presenta una banda neta de 12 mm y $R_D = 0,83$ con EtOH y $R_D = 0,70$ con EtOH a 50°.

Vainillina : revela una adsorción más débil que las anteriores, pues con EtOH el frente de banda alcanza los 17,0 cm. $R_D = 0,94$ y con alcohol a 50° $R_D = 0,80$

Las restantes semicarbazonas correspondientes a citral, piperonal y acetofenona no revelaron adsorción por ésta técnica.

En un estudio integral al respecto deberían ensayarse nuevos adsorbentes y nuevas técnicas de revelado, pero ello está fuera de los propósitos de este trabajo. Por otra parte nos exime de intentarlo las ventajas obtenidas en la separación de aldehídos y cetonas como 2-4 dinitrofenilhidrazonas.

En cuanto a las mezclas binarias ensayadas se obtuvo separación neta en las mezclas de salicílico con cinámico y vainillina y de benzaldehído con las mismas. Las restantes mezclas presentan sus bandas contiguas.

Capítulo III Separación de mezclas binarias de 3-5 dinitrobenzoatos de alcoholes presentes en aceites esenciales

Muy pocos trabajos se han publicado respecto a la separación cromatográfica de alcoholes (40).

Un primer trabajo sistemático se debe a White y Dryden (50) que separaron alcoholes alifáticos por adsorción cromatográfico de sus 3-5 dinitrobenzoatos sobre columna fluorescente y aplicaron el método al estudio del aceite volátil de manzana (44).

Posteriormente E. Clavet (51) aplicó el mismo método a la separación de alcoholes alifáticos superiores y aromáticos.

Ambos estudios utilizan macrotécnicas. Recientemente se ha publicado un trabajo para dosar cuantitativamente muy pequeñas cantidades, que emplea el mismo tipo de columna y dosa espectrofotométricamente los 3-5 dinitrobenzoatos de alquilo, en las distintas fracciones del eluato.

En el presente capítulo estudiaremos la aplicabilidad del "chromatostrip" a la separación en micro escala de los derivados mencionados, es decir, una técnica rápida que proporciones una idea de la pureza de una dada muestra, de sus posibilidades de resolución variando las condiciones de trabajo, de modo de recurrir luego a la columna como ensayo final para la separación, aislación e identificación de los componentes.

Estando este trabajo en realización llegó a nuestro conocimiento un estudio de Rice, Kirchner y Keller (47) que con igual objeto ensayaron la separación de 3-5 dinitrobenzoatos sobre papel. Los mejores resultados los obtuvieron sobre papel impregnado con ácido silícico que en nada mejora la técnica del "chromatostrip". Por otra parte resolvieron mezclas distintas a las por nosotros estudiadas.

Procedimiento : preparación de las tiras : la pasta a aplicar está constituida por adsorbente y ligante. No emplearemos en este caso "filter aid" porque disminuye el poder adsorbente de las tiras. Como adsorbente se usa, de acuerdo a White y Dryden (50) una mezcla de ácido silícico y Rodamina G. en la proporción de 1 mg para 15 gr

de ácido silícico. La pasta se prepara con 19 gr de silícico-rodami-
na y 1 gr de almidón. Los detalles de la preparación son análogos a
los ya citados.

Preparación de las soluciones : las soluciones a percolar se prepa-
ran en la proporción de 0,3 mg por mililitro. Conviene proceder así:
1 mg del 3-5 dinitrobenzoato de alquilo se disuelve en 1 ml de bence-
no y se agregan 3 ml de n-hexano.

Solventes para desarrollos : se han empleado distintas proporciones
de éter etílico en hexano normal. Así denominaremos :

Solvente N° 1 a la mezcla de n-hexano - éter etílico (19:1)

" N° 2 " " " " " " - " " (5:1)

" N° 3 " " " " " " - " " (3:1)

Los 3-5 dinitrobenzoatos de alquilo nos fueron suministrados por el
Dr. Emilio Clavet, al cual le agradecemos su gentil colaboración.

El hexano normal fué provisto por el Laboratorio de Investigaciones
de Y.P.F.

Desarrollos : se procede en una forma análoga a la descrita en el
capítulo anterior.

Observación final: se efectúa con luz ultravioleta mediante una lám-
para de mercurio, marca Hanau Quarzlampengesellschaft, comunmente de-
nominada lámpara de Wood.

Los resultados obtenidos se detallan a continuación.

Experiencia N°1

Se ensayarán los 3-5 dinitrobenzoatos de los alcoholes feniletílico
cinámico y geraniol. Se determinará su R_D y se resolverán sus mezclas
binarias. Cada ensayo se efectúa al menos por cuadruplicado.

Solvente N° 2	Resultados :	fenil etílico.	$R_D = 0,53$
		cinámico	$R_D = 0,49$
		geraniol	$R_D = 0,76$

Mezcla β fenil etílico - cinámico

No se obtiene separación. Se ensayaron tres desarrollos.

Mezcla β fenil etílico - geraniol

Se observan dos bandas de adsorción :

banda superior de $R_D = 146 \text{ mm}/180 \text{ mm} = 0,77$.Corresponde a geraniol

" inferior " $R_D = 99 \text{ mm}/180 \text{ mm} = 0,55$ β fenil etílico

Mezcla geraniol - cinámico

Se observan dos bandas :

banda superior con frente en 145 mm. Corresponde a geraniol

" inferior " " en 90 mm " a cinámico

Experiencia N° 2

Se ensayarán ,analogamente al caso anterior,los derivados de los alcoholes bencílico, a-terpineol y n-mentol.

Resultados : bencílico $R_D = 0,62$

a-terpineol $R_D = 0,58$

n-mentol $R_D = 0,84$

Mezcla : bencílico - a-terpineol ; no se obtiene separación.

Mezcla : bencílico - n-mentol : se obtienen dos bandas.

banda superior de $R_D = 157 \text{ mm}/180 \text{ mm}$ Corresponde a n-mentol

" inferior " " = $115 \text{ mm}/180 \text{ mm}$ " a bencílico

a-terpineol - n-mentol

Se obtiene una neta separación de bandas,con valores de desarrollos análogos a los ya citados.

Experiencia N°3

Se caracterizaron los derivados de los alcoholes : eugenol; timol y nep-mentol.

Resultados : eugenol $R_D = 0,58$
 timol $R_D = 0,71$
 l-mentol $R_D = 0,82$

Mezclas binaria : eugenol - timol

Se observa una zona difusa, sin separación neta. Se recurre a otro desarrollo con solvente N° 2, apreciándose entonces dos bandas:

banda superior de $R_D = 0,92$ que corresponde a timol
" inferior " " = $0,81$ " " a eugenol

Mezcla eugenol - mentol

Se obtiene una nítida separación con un solo desarrollo.

banda superior de $R_D = 0,83$ l-mentol
" inferior " " = $0,58$ eugenol

Mezcla timol - l-mentol

Presenta una zona difusa no resoluble con dos desarrollos. En realidad las bandas están juntas pero de acuerdo a lo establecido, damos como no separables a aquellas que no presentan zona intermedia en blanco.

Experiencia N° 4

Se resolverán las mezclas binarias constituídas por fenil etílico y cada uno de los restantes derivados.

βfenil etílico - bencílico ; no se observa separación
" " - a-terpineol " " " "
" " - eugenol " " " "

En todos los casos se usó, primero solvente N° 2 y luego solvente N° 3 para los desarrollos, obteniéndose una zona difusa y homogénea de adsorción de 2 cm., excepto en el caso o mezcla con a-terpineol en el cual se observa un borde superior de 5 mm mucho más intenso que el resto de la zona de adsorción.

β fenil etílico - n-mentol : se obtiene separación neta
" " - timol : " " " "
" " - l-mentol : " " " "

En todos estos casos se obtuvieron dos bandas nitidamente separadas, con los valores de R_D correspondientes.

Experiencia N° 5

Se ensayarán a continuación las mezclas formadas por el 3-5 dinitrobenzoato de cinámico y los restantes, no estudiadas aún.

Dada la forma de actuar semejante de los derivados del cinámico y fenil etílico, podrían obviarse estos ensayos que son en un todo análogos a los de la anterior experiencia.

Sim embargo hemos encontrado una diferencia en la mezcla :

cinámico - timol : que requirió dos pasajes de solvente para su resolución.

No se obtuvo separación en las mezclas : cinámico - α -terpineol y cinámico - eugenol que proporcionaron una única zona homogénea.

Tampoco se resolvió la mezcla cinámico - bencílico que presenta una banda inhomogénea de 20 mm, de tono parduzco más intenso en la mitad superior.

Se obtuvo separación neta en las mezclas de cinámico con ambos mentoles.

Experiencia N° 6

Se determinará comparativamente geraniol - eugenol y n-mentol con solventes N° 2 y 3. Se resolverán mezclas binarias de neo mentol con timol y l-mentol.

Resultados : geraniol con solvente N°3 $R_D = 0,81$. Con N°2 $R_D=0,75$
eugenol " " " " = 0,64 " " $R_D=0,58$
n-mentol " " " " = 0,90 " " " =0,82

Mezcla n-mentol - timol : se obtiene separación neta.

" n-mentol - l-mentol : se obtiene una zona única de adsorción, de tono parduzco intenso, que con el segundo desarrollo, alcanza el extremo de la tira. Es decir $R_D = 1$

Experiencia N° 4

Se resolvieron las mezclas binarias que a continuación se citan:

Bencílico - geraniol : se obtuvieron dos bandas, la superior correspondiente a bencílico con $R_D = 0,58$, y la inferior con $R_D = 0,76$ que corresponde a geraniol. Se usó solvente N° 2.

Eugenol - bencílico : a pesar de sus valores próximos de R_D y en contra de lo que era dable esperar, se obtuvo buena separación luego de dos pasajes con solvente N° 2.

Bencílico - timol : se observa una única banda de 40 mm, luego del primer pasaje con solvente N° 2. Se obtiene separación al efectuarse un nuevo desarrollo con solvente N° 3.

Bencílico - n-mentol : se obtiene separación neta con un solo pasaje de solvente N° 2.

Experiencia N° 8

Resolución de mezclas en las cuales uno de los componentes es el derivado del geraniol.

Geraniol - eugenol y geraniol - a-terpineol

Muy buena separación en ambos casos con un solo pasaje de solvente 2.

Banda superior de 8 mm y $R_D = 0,78$. Corresponde a geraniol

Zona intermedia de 24 mm en blanco.

Banda inferior de 10 mm y $R_D = 0,60$ a-terpineol o eugenol.

Geraniol - n-mentol : se observa una zona difusa, que se hace resoluble por segundo desarrollo con solvente 3.

No se obtiene separación en los casos geraniol-timol y

geraniol - l-mentol

Experiencia N° 9

Se han determinado los R_D de los distintos derivados usando como solvente desarrollador hexano normal-éter etílico en la proporción de (19:1), por ser esta la usada por otros autores (50).

Resultados ; los valores numéricos obtenidos son menores que los correspondientes a los solventes N° 2 y 3, pero guardan en general la misma relación entre sí.

Así el geraniol tiene un $R_D = 0,54$; el n-mentol $R_D = 0,63$
el timol " " " = 0,50 ; el α -terpineol" = 0,37

La mayor adsorción se explica por un menor poder eluyente de la mezcla, al decrecer el porcentaje de éter etílico.

Se efectuó además la separación de las siguientes mezclas binarias:

α -terpineol - eugenol ; no se obtiene separación

α -terpineol - timol ; se requiere un segundo pasaje con solvente N° 3, para obtener separación.

α -terpineol - l-mentol ; se obtiene separación neta con un solo pasaje de solvente N° 2.

eugenol - n-mentol ; con solvente N° 2 se obtiene separación neta.

MEZCLAS BINARIAS DE 3-5 DINITROBENZOATOS DE ALQUILIO ESTUDIADAS

	fen.etíl.	benc.	geran.	terp.	eugen.	n-men.	cinam.	tim
1) feniletíl.	--							
2) bencílico	X	++						
3) geraniol	A	A	--					
4) a-terpineol	X	X	A	--				
5) eugenol	X	B	A	X	--			
6) n-mentol	A	A	B	A	A	--		
7) cinámico	X	X	A	X	X	A	--	
8) timol	A	B	X	B	B	A	A	--
9) l-mentol	A	A	X	A	A	X	A	X

X ; indica que no hay separación

A : " separación en dos bandas con un desarrollo.

B : " " " " " con dos desarrollos.

CAPITULO IV

SEPARACION E IDENTIFICACION DE FENOLES

Antecedentes : la separación cromatográfica de fenoles se ha estudiado tanto en columna como en papel.

Según Grassman y Lang (58) cuando se absorben soluciones de fenol, pirocatequina y resorcina y ácido gálico en metanol sobre columna de alúmina o magnesia se obtienen bandas uniformes y homogéneas que presentan fluorescencia azul o violeta. La floroglucina presenta en cambio fluorescencia amarilla. Por otra parte Zechmeister Y Cholnoky (59) resolvieron mezclas de fenol - resorcina - pirocatequina y ácido gálico tratándolas previamente con Cl_3Fe y cromatografiando los compuestos coloreados.

Bielenberg y Fisher (50) tratan mezclas de hidroxibencenos con p-nitroanilina y cromatografiando, distinguen mezclas de timol y carvacrol de otros fenoles.

Bray, Thorpe Y Willims (61) han separado 23 fenoles sobre papel, usando varios solventes pero principalmente mezclas de benceno y ácido acético. Evans, Par y Evans (62) estudiaron el metabolismo bacterial de los compuestos fenólicos, caracterizando 21 compuestos y usando la reacción de Pauli para el revelado, pero con valores muy próximos de R_f en la mayoría de los casos.

Nos proponemos en este capítulo estudiar la aplicabilidad del "chromatostrip" a la resolución de mezclas de fenoles y su posible indentificación en ciertos casos particulares.

a) En el análisis de aceites esenciales, a un aceite desacidificado se lo trata con HCl en solución acuosa para separar los fenoles. Interesa conocer rápidamente si se trata de uno o varios fenoles y tener una guía sobre su naturaleza. En los aceites esenciales se suelen encontrar: timol ; carvacrol ; eugenol ; chavicol y un oxiácido : el salicílico. Corresponde pues desarrollar el cromatograma de cada uno de ellos y estudiar su separación en mezclas binarias. Además se aplicará este método al estudio de las fracciones fenólicas de los aceites esenciales de

tomillo y pichana.

Procedimiento : el "chromatostrip" se prepara según la técnica ya indicada, pero en este caso se usa una mezcla constituida por ácido salicílico y bentonita en la proporción de 6 a 1 .

Para una serie de 12 tiras conviene usar una mezcla de : 15,2 gr. de salicílico-bentonita ; 0,8 gr de almidón y 30 ml de agua.

Se preparan soluciones de la muestra en benceno tal que 1 ml de la solución corresponda a 3-4 mg de fenol. En cada tira y a 3 cm del extremo se depositan por gotas 0,1 ml de la solución (esto es 0,3 mg del fenol en estudio). Una vez evaporado el solvente se colocan las tiras en los tubos de prueba que contienen 2 ml del solvente a usarse. Cuando este alcanzó los 18 cm de altura, se interrumpe el desarrollo.

Como solventes se han ensayado : benceno, butanol y hexano con 15% de acetato de etilo, recomendándose este último por ser más rápido y eficiente (desarrollos en 80 minutos contra 100 min. con benceno)

Como reveladores se han empleado : el reactivo de Pauli (ácido sulfanílico diazotado); Cl_3Fe en solución acuosa ; H_2SO_4 concentrado y p-nitroanilina diazotada. Se resolvió adoptar este último aunque puede usarse indistintamente el reactivo de Pauli. El H_2SO_4 concentrado tiene el inconveniente de que también actúa sobre la bentonita de la tira. Recomendamos su uso en los casos de resultados negativos con las anilinas, efectuando las lecturas en seguida de haberlo aplicado.

Se usó p-nitroanilina Kahlbaum que se diazotó según el siguiente procedimiento, original de Schwalbe (53) : se dispersan 2,07 g de p-nitroanilina empastada con 5 cc de solución de HCl a 22 Bé en 150 cc de agua conteniendo 12 % de HCl, a los cuales se agrega 200 ml de hielo; se agrega entonces de golpe 1,19 gr de NO_2Na en solución acuosa al 15% agitando hasta obtener una solución acuosa.

Ensayos con muestras puras. Timol: se revela como un anillo de color amarillo naranja que expuesto unas horas al aire se toma rojizo.

Usando la mezcla de 15% de acetato de etilo en hexano (que llamaremos solvente 1) se tiene un $R_F = 0,61$ y con benceno (solvente 2) $R_F = 0,50$

Índice

Eugenol : presenta un anillo de 15 mm, de color violáceo neto.

Expuesto al aire el tono pierde intensidad y se hace parduzco.

$R_F = 0,55$ con 15% de acetato de etilo en hexano

$R_F = 0,40$ con benceno.

Carvacrol : (de mezcla con timol)

Presenta un anillo de color amarillo anaranjado.

$R_F = 0,52$

Acido Salicílico

Presenta la particularidad de que actúa sobre la bentonita de la tira, dando una coloración violácea, lo que permite seguir su ascensión.

$R_F = 0,53$ con la mezcla de acetato de etilo-hexano.

$R_F = 0,21$ con benceno.

Separación de mezclas binarias.

Se efectuaron con mezclas especialmente preparadas combinando dos a dos los fenoles ensayados.

Se procedió igual que para las sustancias puras, usando 0,4 mg de mezcla.

No consideramos necesario detallar el cromatograma de cada un de las mezclas. El cuadro que sigue ilustra las separaciones efectuadas, todas con resultados positivos.

Con ++ indico separación neta . Con + bandas próximas.

	Timol	Eugenol	Carvacrol
1) Timol	--		
2) Eugenol	++	--	
3) Carvacrol	+	+	--
4) A. Salicílico	++	++	++

Aplicación a aceites esenciales

1) Aceite esencial de tomillo. Se procede de la siguiente manera:

Se tratan 5 ml de esencia disueltos en 10 ml de éter de petróleo con sucesivas porciones de HO.K al 5% hasta que este pase incoloro. Se separa la capa acuosa, se acidifica con H₂SO₄ al 20% y se toma con éter etílico. El extracto etéreo se pasó a un pesa filtro tarado y se deja evaporar el éter a temperatura ambiente. Se pesa y se disuelve el extracto fenólico en el solvente indicado (benceno) en la proporción de 4 mg de fenol por ml de solvente. La solución está así lista para ser cromatografiada. Se vierten en un extremo de la tira 0,1 ml de la misma. Se deja evaporar el benceno y se colocan las tiras en los tubos de prueba que contienen cada uno 2 ml de la solución de acetato de etilo en hexano, al 15%.

El desarrollo tarda unos 80-90 minutos.

Resultados : (Para el revelado usamos el reactivo ya indicado)

Las tiras se presentan de color blanquecino, sin ninguna banda visible a simple vista ni con luz ultravioleta. Pulverizadas con p-nitro anilina aparecen dos bandas coloreadas:

Banda superior de 13 mm y color amarillo naranja que se toma rojizo al aire y de $R_F = 0,63$

Banda inferior de 8 mm, perceptible luego de 30 minutos, de color amarillo débil y $R_F = 0,52$

Timol de referencia (desarrollado simultaneamente) $R_F = 0,62$

De acuerdo a estas características -color de las bandas y valores R_F - correspondería la banda superior a timol y al carvacrol la inferior; presentándose el timol en proporción predominante.

El "chromatostrip" no puede llegar más lejos. Establece que en la fracción en estudio hay por lo menos dos fenoles y que estos pueden ser los mencionados (se excluye así eugenol y salicílico por ejemplo). Para confirmar estos resultados hay que recurrir a macro tiras o columna clásica o chromatobar, etc., aislar los compuestos e identificarlos por sus constantes físicas.

Por otra parte la literatura especializada indica a ambos fenoles como componentes del aceite esencial de tomillo (54) y recientemente Bulawiesky ha encontrado lo mismo en un aceite argentino (55).

2) Aceite esencial de pichana

Procediéndose como en el caso anterior no aparece ninguna banda en el revelado.

Se repite entonces aumentando la concentración hasta obtener un resultado positivo.

Con 3 mg por tira aparecen en el revelado una serie de anillos: uno superior cóncavo, de color violeta rojizo y a 3 cm de distancia otros tres anillos contiguos de color rojizo parduzco. No interesan los valores de R_f porque se usaron concentraciones muy superiores a la "Standard".

El método revela pues la presencia de cuatro compuestos fenólicos presentes como vestigios en el aceite esencial de pichana.

Esta fuera de los propósitos de este trabajo profundizar el estudio del mismo.

b) Aplicaciones varias

El fenol o ácido fénico comercial suele presentarse impurificado en mayor o menor grado con alguno de los isoméricos fenoles. Interesa pues aplicar el "chromatostrip" al revelado de dichas impurezas.

Por otra parte el ácido cresílico (designación comercial de mezclas en las cuales, unas veces predominan los cresoles y en otras los xilenoles y otros alquil fenoles superiores) mezclado con fenol en ciertas proporciones críticas, se usa como solvente en algunos procesos de la refinería del petróleo. De ahí la cantidad de métodos para determinar fenoles en ácido cresílico, de los cuales uno por partición cromatográfica fué publicado recientemente por Zahner y Swamm (56).

Hemos estudiado muestras puras de fenol; m-cresol ; tricresol y ácido cresílico. El procedimiento ha sido similar al empleado en la la. parte de este capítulo

Fenol : presenta una banda de 14 mm, de color amarillo muy débil que se hace perceptible luego de varios minutos de efectuada la pulverización.

$R_F = 0,55$ con solvente N°1 y $R_F = 0,33$ con solvente N°2

Tricresol : aparecen dos bandas juntas.

Banda superior de 5 mm, de color amarillo naranja $R_F = 0,57$

" inferior de 12 mm " " rojo amarillento " = 0,53

m-cresol : presenta una banda anaranjada de 15 mm y $R_F = 0,53$

con benceno tiene un $R_F = 0,32$

Acido cresílico : presenta un cromatograma igual al del tricresol.

Mezclas binarias fenol - m-cresol y fenol - tricresol

Tal como era de preveer dados los valores de R_F próximos, no se observan separaciones.

Pero lo que si puede determinarse es la presencia de cresoles como impurezas del fenol por la rapidez en la aparición del anillo coloreado. Partiendo de mezclas en las cuales las cantidades de ambos componentes son iguales, hemos disminuído sistemáticamente la proporción de tricresol hasta obtener un cromatograma semejante al del fenol puro, que se desarrolla simultaneamente. Así hemos determinado la mínima cantidad de impureza detectable por éste método que fué de 1 % .

Guayacol Como punto final de este capítulo nos hemos ocupado del guayacol -éter monometílico de la pirocatequina- que se obtiene por destilación del alquitrán de madera de haya en la fracción denominada "aceite de creosota" y que puede estar adulterado por cresoles y xilenoles más baratos.

Cromatograma : efectuado en las condiciones "standard" se caracteriza por presentar un anillo marrón rojizo intenso de $R_F = 0,57$ con solvente N° 1 y $R_F = 0,53$ con benceno.

Mezcla guayacol - m-cresol : con solvente N°1 se obtiene una única banda de 30 mm, de color marrón rojizo con bordes amarillentos.

Con benceno como solvente se obtienen dos bandas netas, con separación entre ambas, correspondiendo la superior al guayacol y la inferior al m-cresol.

Mezcla guayacol - ácido cresílico : con solvente N° 1, se obtienen dos bandas juntas .

Banda superior de 8 mm y color amarillo rojizo $R_F = 0,59$

" inferior de 14 mm y color marrón claro $R_F = 0,54$

Aunque la separación no es neta se revela la presencia de más de un compuesto.

Al igual que en la mezcla anterior se obtiene resolución neta, empleando benceno como solvente.

En este caso la banda superior rojiza de $R_F = 0,54$ corresponde al guayacol.

Conclusión : el "chromatostrip" proporciona un método rápido para revelar si un muestra de guayacol esta impurificada con cresoles.

Tabla V Valores R_F de los fenoles estudiados.

	<u>S 1</u>	<u>S 2</u>	<u>Color de las bandas</u>
1) Fenol	0,55	0,33	amarillo débil
2) m-Cresol	0,53	0,32	anaranjado
3) Timol	0,61	0,50	amarillo rojizo
4) Eugenol	0,55	0,40	violeta débil
5) Carvacrol	0,52	--	amarillo naranja
6) Guayacol	0,57	0,53	marrón rojizo
7) A. salicílico	0,33	0,21	(fluorescente)

CAPITULO V Aplicación a la separación e identificación
de algunos terpenos

En el presente capítulo nos proponemos comentar según los resultados de nuestras experiencias, un estudio al respecto efectuado por Kirchner Miller y Keller (32) mediante el empleo del "chromatostrip".

Los mencionados autores proponen identificar terpenos mediante el valor R_f de los mismos, además de otras características de las bandas de absorción. Para ello en cinco solventes distintos, determinan el R_f de 14 terpenos, de los cuales solo cuatro son hidrocarburos (limoneno canfeno, α -pineno y p-cimeno) siendo los restantes alcoholes, aldehidos cetonas y ácidos. Para éstos últimos compuestos se han propuesto numerosos métodos con éxito (ej: el caso de las 2-4 dinitrofenilhidrazonas y 3-5 dinitrobenzoatos mencionados en capítulos anteriores).

En cambio las pocas publicaciones sobre cromatografía de terpenos se refieren a métodos que emplean cortes arbitrarios de las distintas fracciones del eluyente. Por lo tanto el método que nos ocupa interesa especialmente en lo concerniente a hidrocarburos terpénicos. Sin embargo los valores de R_f determinados así como las características de las bandas de absorción son muy semejantes en estos casos.

Nosotros hemos obtenido valores en general más altos que los publicados, pero no puede efectuarse una comparación exacta porque se ha omitido la concentración empleada en aquellos casos, factor este de especial importancia.

Se han propuesto como métodos de revelado los siguientes: 1) luz ultravioleta empleando tiras fluorescentes según el método de Sease; 2) pulverización con fluoresceína y exposición a los vapores de bromo de modo de revelar compuestos etilénicos y 3) pulverización con H_2SO_4 concentrado.

Es de muy difícil realización práctica la técnica que utiliza fluoresceína y que se basa en la formación de eosina con bromo, salvo en los lugares donde se encuentre absorbido un compuesto etilénico que queda

entonces como mancha amarilla sobre fondo rosado. Un ligero exceso en la exposición a los vapores de Br₂, basta para obtener una absorción total con la consiguiente pérdida del ensayo.

Preferimos aconsejar el método que pulveriza H₂SO₄ concentrado, con el cual hemos obtenido los mejores resultados. Para ello hemos empleado un pulverizador totalmente construido en vidrio. Se debe trabajar bajo campana.

En cuanto al revelado que emplea luz ultravioleta es eficaz para detectar hidrocarburos que absorben en dicha región (p-cimeno).

El método presente se aconseja y recomienda cuando se presenta este problema : determinar si en una fracción o sustancia en estudio hay un dado compuesto terpénico. En este caso se efectúan desarrollo simultáneos de la sustancia en estudio y del terpeno puro. Se pulveriza con H₂SO₄ concentrado y se compara. Así tenemos:

Problema : determinar si en la fracción N° 36 obtenida en la destilación del aceite esencial de pichana (49), de T, de ebullición 115-118°C a 30 mm de Hg. es posible la presencia de α-terpineol.

Un resultado negativo es seguro; el positivo dudoso pues puede haber interferencias.

Procedimiento: se preparan soluciones de α-terpineol purificado de concentración 4mg/ml y de la muestra incógnita en concentración doble, ambas en una mezcla de 15% de acetato de etilo en hexano normal.

Se depositan por gotas 0,3 y 0,6 mg respectivamente en cada tira. Se trabaja por cuadruplicado y con dos solventes.

Resultados: α-terpineol : presenta una banda de 15 mm rojiza.

Rf = 0,54 con la mezcla arriba mencionada

Rf = 0,23 con hexano normal como solvente

fracción N°36 : resultado negativo en ambos casos.

Conclusión: en la mencionada fracción no hay α-terpineol.

En la fracción N° 27 del mismo aceite esencial -P.ebullición 82°C - a 30 mm de Hg.- J. Braun (49) encontró dipenteno.

Como había un antecedente bibliográfico que indicaba que debía tratarse de limoneno, se recurrió al chromatostrip entre otros ensayos confirmativos.

Se procedió como en el caso anterior con estos resultados (se usó como solvente Cl4C) :

Limoneno: banda marrón de Rf = 0,98, de 30 mm

Fracción 27: anillo cóncavo de 15 mm y color violeta intenso Rf=0,84. Además se observa una banda superpuesta, pero muy débil, de tono marrón claro.

Conclusión: en la fracción N° 27, predomina un compuesto que no es limoneno.

El método que nos ocupa es muy útil para revelar adulteraciones e investigar la pureza de una droga.

Así hemos cromatografiado simultáneamente aceite esencial de eneldo y carvona -cetona terpénica presente en el anterior en un 60% -.

Procedimiento : método general con la mezcla de 15% de acetato de etilo en n-hexano como solvente.

Resultados : Eneldo : presente 5 bandas o manchas, de distinto color e saber:

- 1) banda superior marrón amarillento de Rf=0,98
- 2) " contigua rosada Rf=0,82
- 3) mancha rojo fuerte separada de las otras Rf=0,56
- 4) anillo de color marrón oscuro y contiguo a él
- 5) banda violeta rojizo de 15 mm, intensa, de Rf = 0,39

Carvona : presenta una sola banda de color violeta rojizo, de 20 mm y Rf = 0,50.

Como se puede apreciar corresponde a la banda N°5 del eneldo, aunque desplazada por la influencia de los otros componentes del eneldo.

Queda así revelada la pureza de la carvona en estudio.

C.- CONCLUSIONES

Se han ensayado dos nuevas técnicas cromatográficas.

Se recomienda una de ellas : el "chromatostrip" como micro mé todo muy útil cuando se dispone de pequeña cantidad de muestra y cuando se desea efectuar un estudio cromatográfico previo a la se paración en macro escala.

Se lo ha aplicado a la resolución de :

- 1) mezclas binarias y ternarias de 2-4 dinitrofenilhidrazonas de aldenidos y cetonas.
- 2) mezclas carbonílicas presentes en aceites esenciales.
- 3) mezclas de semicarbazonas.
- 4) mezclas binarias de 3-5 dinitrobenzoatos de alquilo.
- 5) distintas mezclas de compuestos fenólicos y caracterización de los mismos al estado puro.

En general se ha obtenido éxito en la resolución de las mezclas mencionadas. Los resultados parciales se exponen en los ca pítulos respectivos.

Se ha ejemplificado además el empleo del "chromatostrip" en la identificación de compuestos terpénicos y en la revelación de adulteraciones y grado de pureza de algunas muestras.

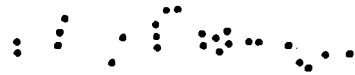
Se ha efectuado un estudio crítico del "chromatobar" y pro- puesto su reemplazo en algunos casos por bandas cromatográficas.

D.-

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

- (1) Strain H.H. "Chromatographic Adsorption Analysis"
New York - Interscience Publishers Inc. 1942
- (2) Zechmeister y Cholnoky L. "Principles and Practice of Chromatography" London-Chapman y Hall - New York 1943.
- (3) Weil H. y Williams T. Nature 167 - 906 - 1951
- (4) Zechmeister L. Ibid 167 - 405 - 1951
- (5) Strain H.H. Analytical Chemistry 24 - 1952
- (6) Lederer E. "Progres Recents de la Chromatographie"
Paris - Herman y Cia - 1949
- (7) Zechmeister L. "Progress in Chromatography" 1938-1947
London - Chapman y Hall - 1950
- (8) Williams T.I. "An Introduction to Chromatography"
Blackie - London - 1946
- (9) Weissberger "Technique of Organic Chemistry" Vol.V
Cassidy H.G. "Adsorption and Chromatography"
New York.- Interscience Publishers Inc.-1951
- (10) Wilson N.J. Journ. Am. Chem. Soc. 65 - 532 - 1943
- (11) Mittelman N. Chemia 102 - 73 - 1949
- (12) Zechmeister y Cholnoky Obra citada pág. 181
- (13) Calvin M. - Benson A. Science 109 - 140 - 1949
- (14) Strain H.H. Analytical Chemistry 21 - 1949
- (15) Bate Smith E.C. Symposia Biochem Soc 3 - 62 - 1949
- (16) Cotello Ana Industria y Quimica XIII - 126 - 1951
- (17) Meyers F.J. Ind, Eng. Chem. 35 - 858 - 1948
- (17') Martin A.J.P. "Annual Review of Biochemistry" 1951 - pág. 518.
- (18) Zechmeister y Cholnoky Obra citada pág. 45
- (19) Robinson J. The Analyst 251 - 1946
- (20) Erlenmeyer y Dahn Helv. Chim. Acta 24 - 878 - 1941
- (21) Bach R.O. An. As. Quim. Arg. 35 - 55 - 1949
- (22) Bach R.O. An. As. Quim. Arg. 37 - 69 - 1949
- (23) Strain H.H. Analytical Chemistry 23 - 28 - 1951
- (24) Karrer R., Schöpp K. Helv. Chim. Acta 17 - 693 - 1934
- (25) Winterstein A., Schön K. Z. physiol Chem. 230 - 169 - 1934
- (26) Breckman y Volpers Chem. Ber. 80 , 77 - 1947

- (27) White J.W y Dryden E.C. Anal. Chem. 20 - 853 - 1948
- (28) Sease J.W. J.Am. Chem. Soc. 70 - 3630 - 1948
- (29) Harvalik Z.V. Anal. Chem. 22 - 1149 - 1950
- (30) Zechmeister, Cnolnoky y Ujnejajy Bull.soc.chim.biol. 18-1885-1936
- (31) Ramsey y Patterson W.I. Journal A.O.A.C. 28 - 644 - 1945
- (32) Kerchner J-Miller J-Keller G. Anal.Cehm. 23 - 420 - 1951
- (33) Strain H.H. Science 83 - 241 - 1936
- (34) Meinhard J.E. y Hall N.F. Anal.Chem. 21 - 185 - 1949
- (35) Flood H.. Z.Anal.Chem. 120 - 327 - 1949
- (36) Hoph P.P. J.Am.Chem.Soc. 785 - 1940
- (37) Rockland L.B. y Dunn M.S. Science 109 - 539 - 1949
- (38) Miller J.M. y Kirchner J.G. anal.Chem. 23 - 428 - 1951
- (39) Strain H.H. Ibid. 22 - 1951
- (40) Strain H.H. J. Am. Chem. Soc. 57 - 758 - 1935
- (41) Lucas,Prater y Morris J.Am.Chem.Soc. 57 - 725 - 1936
- (42) Roberts y Green Anal. Chem. 18 - 335 - 1946
- (43) White J.W. Ibid. 20 - 726 - 1948
- (44) White J.W. Food Research 15 - 68 - 1950
- (45) Montes A.L. "Productos Aromáticos" 1952
- (46) Cavallini, Frontalli y Toschi Nature 163 - 568 - 1951
- (47) Rice R.G.-Keller G.J. y Kerchner J. Anal. Chem. 23 - 194 - 1951
- (48) Montes A.L. Obra citada pág. 22
- (49) Braun J. Tesis doctoral (trabajo aún no presentado)
- (50) White J.W. y Dryden E.C. Anal. Chem. 20 - 283 - 1949
- (51) Clavet E.E. "Tesis doctoral" F.C.E.F.N. N° 679 - 1951
- (53) Grignard V. "Traité de Chimie Organique" Tomo V - pág. 102
- (54) Guenther "Essential Oils" Tomo III
- (55) Bulajewsky "Tesis doctoral" F.C.E.F.N. 1951
- (56) Zahner y Swamm W. Anal. Chem. 23 - 1093 - 1951
- (57) Zappi E. "Tratado de Química Orgánica" Tomo II pág. 35b



- (58) Strain H.H. Obra citada pág. 92
- (59) Zechmeister L. y Cholnoky L. Obra citada-pág. 202
- (60) Guenter "Essentials Oils" Tomo II pág. 501
- (61) "Annual Review of Biochemistry" Vlo XIX - 1950 - pág. 532
- (62) Evans R.A.-Parr W.H.-Evans W.C. Nature 164 - 674 - 1949

Nota: Las citas bibliográficas subrayadas, corresponden a la contribución de la bibliografía argentina a esta materia.

Delolfo Guenter

Shabat