

## Tesis de Posgrado

# Cromatografía de componentes fenólicos de aceites esenciales

Vázquez, Aída Teresa

1962

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias  
Químicas 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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Vázquez, Aída Teresa. (1962). Cromatografía de componentes fenólicos de aceites esenciales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1118\\_Vazquez.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1118_Vazquez.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Vázquez, Aída Teresa. "Cromatografía de componentes fenólicos de aceites esenciales". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1962.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1118\\_Vazquez.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1118_Vazquez.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Cromatografía de Componentes Fenólicos de  
Aceites Esenciales

Aída Teresa Vázquez

1118

Resumen presentado para optar el  
Título de Doctor en Química

1962

## RESUMEN DE TESIS

Los motivos especiales ha involucrado este trabajo:

- 1- El estudio experimental comparativo de técnicas cromatográficas a fin de ser aplicadas a la resolución de mezclas fenólicas de productos aromáticos.
- 2- La posibilidad de resolver el problema de la identificación de los fenoles de distinta estructura química presentes en una mezcla. Las técnicas ensayadas fueron:
  - I -Cromatografía de adsorción sobre placas recubiertas con ácido silícico.
  - II.-Cromatografía de partición en columna de ácido silícico.
  - III.-Cromatografía de partición en fase gaseosa.

El estudio consta de dos partes:

Una parte teórica, en la que se exponen generalidades, teorías, terminología, consideraciones experimentales y ventajas que presenta cada técnica.

Una parte experimental, en la que se considera la puesta a punto de cada técnica, con un número de componentes fenólicos puros y con mezclas de algunos o todos ellos, a fin de observar la posibilidad de analizar las fracciones fenólicas en los aceites esenciales.

### I- Cromatografía de adsorción.

Esta técnica se ensayó con los fenoles puros, y se obtuvieron los datos que se dan a continuación:

<u>Compuestos</u> <u>fenólicos</u>	$R_{fC} \cdot 100$	$R_{fS} \cdot 100$	$R_{fR}$	<u>Color</u>
fenol	47	54	1,00	amarillo pálido
floroglucina	---	---	---	amarillo anaranjado
resorcina	10	---	0,21	anaranjado
vainillina	15	17	0,32	pardo
guayacol	42	49	0,90	anaranjado parduzco
eugenol	47	53	0,99	pardo violado
isoeugenol	48	55	1,01	pardo pálido
m-cresol	50	57	1,06	amarillo anaranjado
3,4 xilenol	50	57	1,06	pardo
3,5 xilenol	50	57	1,06	pardo pálido

<u>Compuestos</u>	$R_{fc} \cdot 100$	$R_{fs} \cdot 100$	$R_{fr}$	<u>Color</u>
<u>fenólicos</u>				
p-n-amil fenol	52	59	1,10	anaranjado parduzco
o-cresol	53	61	1,13	anaranjado
p-etil fenol	55	63	1,17	amarillo parduzco
2,4 xilenol	56	64	1,19	pardo rojizo
o-etil fenol	58	66	1,23	amarillo verdoso
2,6 xilenol	58	67	1,24	amarillo
ald. salicílico	58	67	1,24	pardo pálido
timol	64	73	1,36	amarillo
carvacrol	70	80	1,48	amarillo

( $R_{fc}$  y  $R_{fs}$  son las relaciones de frente con respecto al punto medio de la mancha y a su parte superior, respectivamente).

luego se pasó a la resolución de mezclas de dos, cuatro y diez componentes, siendo estas : resorcina-floroglucina; carvacrol-o-cresol; carv.-timol; eugenol-m-cresol; eug.-guayacol; eug.-isoeugenol; iso-eug.-guayacol; fenol-eugenol; fenol-timol; fenol-o-cresol; o-cresol-guayacol; o-cresol-timol; m-cresol-timol; m-cresol-o-cresol; timol-o-cresol-eugenol-fenol; fenol-eugenol-m-cresol-3,4 xil.-3,5 xil.-p-n-amil.fenol-p-etil fenol-2,4 xil.-o-etil fenol-2,6 xil.

Los resultados obtenidos en este caso, variaron de los dados en la tabla anterior, en  $\pm 3$  unidades.

La cromatografía de las fracciones fenólicas de los aceites esenciales, se llevó a cabo con las siguientes esencias: esencia de jarilla; Schinus Molle, yerba mate, Maplopappus, Bracteolatus, Senecio leaci, Paramela.

## II- Cromatografía de partición sobre columna de ácido silícico.

Se realizó con los siguientes componentes fenólicos: fenol, o-cresol, m-cresol, carvacrol, eugenol, isoeugenol; y sus mezclas: o-cresol-m-cresol; o-cresol-carvacrol; o-cresol-m-cresol-fenol.

Esta técnica no es rápida y presenta inconvenientes en la resolución de mezclas.

No fue aplicada a fracciones fenólicas de aceites esenciales.

## III- Cromatografía en fase gas-líquido.

Se la dividió en dos partes, según se consideraran:

- a- Columnas simples (contienen un solo tipo de fase estacionaria).  
 b- Combinación de columnas (cada columna contiene fases estacionarias distintas)

En el primer caso se trabajó con columnas polares, como la de succinato poliéster de di etilén glicol (col. "P"), polipropilén glicol (col. "R") y diacetato hexa isobutirato de sacarosa (col. "SAIB"); y con columnas no polares como la de grasa de silicona (col. "O") y Apieznón "L" (col. "Q"). Las fases estacionarias se hallaban recubriendo soportes pulverulentos inertes, en una proporción de 10 % en peso .

Los resultados tabulados a continuación se obtuvieron en condiciones operatorias previamente determinadas y los parámetros de retención relativos, estaban referidos en todos los casos al fenol.

<u>Compuestos</u>	Col."P"	Col.SAIB	Col."R"	Col."O"	Col."Q"
<u>fenólicos</u>	200°C	200°C	200°C	175°C	170°C
fenol					
o-cresol	0,96	1,17	1,13	1,40	1,50
ácido salicílico	0,55	0,76	0,65	1,55	2,00
m-cresol	1,25	1,42	1,41	1,50	1,73
guayacol	0,84	1,02	0,91	1,71	2,22
o-etil fenol	1,11	1,38	1,50	1,98	2,35
2,4 xilenol	1,26	1,39	1,54	2,18	2,70
2,6 xilenol	0,84	1,09	1,03	1,89	2,54
3,5 xilenol	1,67	1,95	2,04	2,41	2,95
p-etil fenol	1,58	1,94	2,02	2,29	2,74
3,4 xilenol	2,00	2,20	2,34	2,72	3,40
timol	1,50	2,40	2,66	3,54	4,97
carvacrol	1,67	2,55	2,82	4,63	5,35
eugenol	1,98	2,75	2,67	5,55	7,77
p-n-amil fenol	3,55	6,00	6,50	8,60	10,90
isoeugenol	3,40	4,30	4,35	8,15	14,40

Los datos presentados son los volúmenes de retención relativos de la cromatografía de cada compuesto puro. También se cromatografió la mezcla total de los fenoles mencionados.

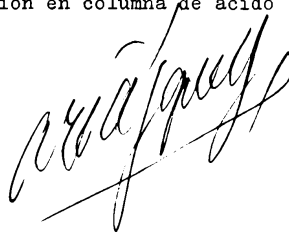
En el segundo caso, se hicieron combinaciones binarias, con las columnas R,P y Q; y se estudiaron los resultados.

Aquí es interesante destacar la posibilidad de predecir los resultados de volúmenes de retención relativos, aún cuando las condiciones operatorias de ambas columnas no coincidan, pues si bien los resultados experimentales no concuerdan con los calculados, el orden de salida de los fenómenos no altera.

De la comparación de los métodos utilizados en este estudio, se llega a las siguientes conclusiones:

- 1- Tanto la cromatografía de adsorción como la de fase gas-líquido proporcionan datos reproducibles y exactos, dentro de ciertos  $\pm$  límites de error.
- 2- Ambos métodos son rápidos de llevar a cabo y su poder de resolución es evidente.
- 3- Los métodos pueden proporcionar una idea bastante acertada de la complejidad de las muestras y en algunos casos los datos pueden ser decisivos, para una confirmación.

En resumen, tanto la cromatografía en fase gas-líquido como por adsorción sobre placas de ácido silícico pueden ser aplicadas en el análisis de los compuestos fenólicos de los aceites esenciales; en cambio, resulta poco recomendable la partición en columna de ácido silícico hidratado.



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Cromatografía de Componentes Fenólicos de  
Aceites Esenciales

Aída Teresa Vázquez

*T. 7. 111*

Tesis presentada para optar el  
Título de Doctor en química

1962

Padrino de Tesis:

Profesor Dr. Adolfo L. Montes



Expreso mi agradecimiento al Dr. Adolfo L. Montes, Profesor de la Cátedra de bromatología, por haber tomado bajo su dirección el presente trabajo; así como también al Dr. Jorge A. Brieux, quien me orientó con sus valiosas indicaciones.

Mi reconocimiento al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por haberme honrado con una beca de Iniciación a la Investigación, que posibilitó la realización de este estudio

A mis padres, hermanos y Blanca.

## INDICE

<u>I- Parte Teórica.</u>	
Teoría del Análisis cromatográfico .....	1
Definición y utilización.	
Cromatografía de adsorción.....	1
"Chromatostrips"- Factores que influyen en la separación - "chromatoplates"- Aplicación del método - Adsorbentes generalmente usados - Solventes - Ventajas del método.	
Cromatografía sobre columna.....	5
Generalidades - Cromatografía de adsorción - Cromatografía de partición - Fase fija - Disolventes y eluyentes - Consideraciones sobre el empleo de cromatografía de ad- sorción y partición.	
Cromatografía en fase gaseosa.....	9
Consideraciones generales - Teorías de la cromatografía gaseosa - Terminología - Parámetros de retención - Deta- lles experimentales - Errores - Consideraciones experi- mentales.	
<u>II- Parte Experimental.</u>	
Cromatografía de Adsorción.....	16
Tipo de placa utilizada - Preparación de mezcla adsorben- te - Recubrimiento de las placas - Precauciones - Seca- do de las placas - Activación - Preparación de los cro- matogramas - Marcado de las placas - Desarrollo + Disol- ventes para el desarrollo - Revelado - Resultados - Ta- bla I - Discusión.- Resolución de mezclas:Tabla II - <del>III</del> cromatografía de <del>adsorción</del> bidimensional - Resolución de aceites esenciales - Conclusiones.	
Cromatografía de Partición sobre columna de ácido silí- cico .....	29
Método y procedimiento - Resultados y discusión - Tabla- VI-VII - Conclusiones.	
Partición cromatográfica en fase gaseosa.....	35
Resultados - Tabla VIII-IX - Discusión - Conclusiones.	
Combinación de columnas en cromatografía gaseosa.....	43
Resultados - Tabla XI - Conclusiones.	
Conclusión Final.....	47

PARTE TEORICA

## TEORIA DEL ANALISIS CROMATOGRAFICO

### Definición y utilización.

Cromatografía o análisis cromatográfico (1) es una técnica diferencial de migración en la que el flujo del solvente o de gas hace que los componentes de una mezcla migren diferencialmente a partir de una angosta zona inicial en medio poroso y adsorbente. Esta técnica (2) se comporta como una adsorción fraccionada, que permite una separación completa de sustancias muy semejantes entre sí en solución, operando con cantidades muy pequeñas. Se utiliza en lugar de la destilación fraccionada para aquellas sustancias que son difícilmente volátiles y que se descomponen al destilar.

### CROMATOGRAFIA DE ADSORCION

La cromatografía de adsorción tuvo sus orígenes en la columna de adsorción de Tswett y fue progresando hasta la adsorción de una fina capa adherida a una placa. Este procedimiento fue aplicado primeramente por N. A. Shrailer y M.S. Izmailev en 1.938; este trabajo está en ruso pero su resumen es el siguiente: un método para el análisis cromatográfico es elaborado, basándose en la observación de que una gota de sustancia sobre una fina capa de adsorbente, se divide en zonas. Los resultados obtenidos por el método propuesto son cualitativamente los mismos que aquellos obtenidos por el método de análisis cromatográfico de adsorción usual.

Después de superarse los problemas técnicos del procedimiento y habiéndose extendido su aplicación, el método ha ganado importancia bajo la designación de "chromatostrips", "chromatoplate" y más recientemente "Analytical Chromatography".

I- Chromatostrips: (3,4,5) en general se preparan recubriendo una placa de vidrio con una pasta formada por:

- a-adsorbente.
- b-ligante.
- c-agua.

Esta pasta se extiende sobre la placa en forma de capa de 0,5 mm. de espesor (o menor, según convenga) y se las endurece secándolas. Luego se colocan cerca del borde de la placa unos pocos microgramos de sustancia a investigar y se deja correr con un solvente.

Para su desarrollo ascendente, se las introduce en forma vertical dentro de una cubeta convenientemente preparada y saturada con

con el disolvente de modo que la parte inferior quede sumergida en el líquido hasta aproximadamente 5 mm. de la sustancia. La rápida capilaridad hace que la cromatografía dure muy poco tiempo (30-60 minutos).

Después del desarrollo se señala el límite del disolvente y se determina la posición de los componentes por medio de un reactivo que produzca complejos coloreados.

II- Factores que influyen en la separación:

- 1- Grado de activación del adsorbente.
- 2- Espesor de la capa del adsorbente.
- 3- Solo se puede desarrollar un cromatograma.

Los dos primeros factores pueden ser mantenidos constantes mediante el uso de aparatos que producen capas de espesor conocido (6,7) y hacen que el secado de las mismas se efectúe en condiciones standard.

III- Chromatoplates: El tercer inconveniente de los "chromatostrips" fue obviado por Reitsem, quien usó "amplios chromatostrips" o "chromatoplates", sobre los cuales se puede desarrollar varios cromatogramas en forma simultánea.

Las diferentes separaciones obtenidas sobre la misma placa son estrictamente comparables y el adsorbente es distribuido en forma más regular.

IV- Aplicación del método: (1,8,9,10,6,5,11)

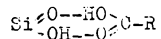
Se aplica este método en el examen e identificación de varios compuestos en aceites esenciales:

- 1- Determinación de alcoholes, cetonas y fenoles en aceites esenciales. (12).
- 2- Separación de dinitro fenil hidrazonas de aldehidos alifáticos.
- 3- Separación de fenoles. (14) (13)
- 4- Separación de azulenos. (6,15)
- 5- Estudios de peroxidos orgánicos y cumarinas. (16)

V- Adsorbentes generalmente usados:

El adsorbente más usado en el campo de los aceites esenciales es el ácido silícico. Este posee además de sus propiedades físicas conocidas (dureza, inatacabilidad) una gran selectividad de los componentes oxigenados. Esa selectividad puede ser explicada

por un mecanismo de adsorción que implica formación de puentes H entre el ácido silícico y el compuesto adsorbido. Por ejemplo, Elder y Springer (17), consideran la estructura de la silica-gel con el grupo  $\text{Si}^{\text{O}}\text{H}$  y suponen que la adsorción de los ácidos grasos se llevaría a cabo de la siguiente manera:



Lo mismo ocurriría en el caso de que el compuesto adsorbido esté formado por moléculas que contengan átomos con doblete electrónico libre (O, N), y serían más o menos retenidas según su polaridad y su efecto estérico.

En general el ácido silícico es muy conveniente para el manejo de sustancias sensibles, pero en ciertos casos debe preferirse ácido silícico parcialmente activado. (18).

#### VI- Solventes en cromatografía de adsorción: (19).

Como en todos los trabajos de cromatografía de adsorción deben ser considerados:

- a- Propiedades del solvente.
- b- Afinidad entre la sustancia y el adsorbente

Estos dos factores deben ser establecidos por medio de pruebas preliminares.

Moseley, Le Rosen y Carlton (19) hicieron un estudio sobre los solventes usados en cromatografía de adsorción y en él consideraron sus estructuras y polaridades, relacionándolas con la de la sustancia a cromatografiar .

En el caso de los aceites esenciales, las mezclas de solventes más frecuentemente usadas y que han dado excelentes resultados, son las de acetato de etilo al 10-20 % en benceno o hexano.

#### VII- Ventajas del método:

La aceptación de la cromatografía de adsorción se basa en lo siguiente:

- 1- Opera en corto tiempo. (50-60 minutos)
- 2- Se obtienen mejores separaciones que con cromatografía en columna.
- 3- Facilita la detección de las sustancias, pues se pueden emplear agentes revelantes más agresivos y temperaturas por sobre el

nivel normal.

- 4- La reproducibilidad de los valores de Rf son del orden de  $\pm 0,05$
- 5- La cantidad de muestra oscila aproximadamente en 50  $\mu$ l.

A pesar de estas conveniencias y considerando la excelente precisión, este método no permite la formal identificación de los componentes de los aceites esenciales sobre una base de los valores de Rf solamente, aún cuando estos sean determinados utilizando varios solventes.

Esta es una razón por la que Miller y Kirchner (8) han preparado los derivados de algunas sustancias antes de cromatografiar. Estos nuevos productos permiten una determinación más cierta en la caracterización de las sustancias iniciales.



CROMATOGRAFIA SOBRE COLUMNA

I- Generalidades.

Este método cromatográfico es utilizado para el análisis cualitativo, cuantitativo y aún para separaciones de muy pequeñas cantidades de material.

Esta cromatografía puede ser:

- a- de adsorción (fases sólido-líquido).
- b- de partición (entre dos líquidos).
- c- de intercambio iónico.

Consideraremos solamente a- y b-.

En general el procedimiento involucra las siguientes operaciones principales:

- 1- Preparación en un solvente conveniente, de una solución de la muestra a investigarse .
- 2- Pasaje de esta solución a través de la columna que contiene un adsorbente en polvo. (éste puede estar impregnado por otro líquido: cromatografía de partición, o puede estar solo: cromatografía de adsorción).
- 3- Desarrollo del cromatograma mediante un solvente que puede o no ser el mismo que el que se usó para la preparación de la solución de la muestra.
- 4- Separación de los distintos componentes de la muestra, por medio de un método apropiado.

La separación se llevará a cabo, si los constituyentes de la mezcla tienen distinta adsorción o coeficiente de distribución y, por consiguiente poca movilidad,

II- Cromatografía de adsorción.

Este método consiste en la adsorción de un soluto sobre el sólido activo (fase fija), empaquetado previamente en un tubo.

La isomería estructural o esteroisomería no da origen a una gran diferencia entre los poderes de separación tanto en la cromatografía de adsorción como en la de partición; pero no se ha podido dejar de observar que existen ciertas reglas generales que relacionan a la adsorbabilidad de los compuestos orgánicos con la estructura de sus moléculas y asimismo, que la presencia de grupos polares favorece la adsorción. Sin embargo se ha com-

probado que no es posible separar todos los compuestos orgánicos según sus categorías estructurales por medio de métodos cromatográficos, porque la adsorbabilidad varía con el tamaño de la molécula: las moléculas grandes son usualmente menos adsorbidas que las pequeñas de la misma clase. También ocurren variaciones en la adsorbabilidad con la alteración de la polaridad de los grupos sustituyentes y de sus posiciones en la molécula .

Una excepción es la doble ligadura aislada, cuya influencia es mayor en la adsorción que en la partición. Se ha observado que las series homólogas de compuestos orgánicos no saturados revelan una mayor adsorbabilidad con el aumento del número de dobles ligaduras.

### III- Cromatografía de partición:

El método de partición cromatográfica consiste en la partición de un soluto entre dos solventes inmiscibles, uno de los cuales es inmovilizado al adsorberse en el sólido inerte. El sólido inerte y el disolvente móvil (fase fija) se empaquetan en forma conveniente en un tubo; la muestra a investigarse se coloca sobre la columna y se hace pasar el disolvente móvil (fase móvil) a través de la misma. En la columna el soluto es partido entre los dos disolventes de acuerdo al coeficiente de partición, y pasará (ocupando una pequeña zona) a través de ella hasta emerger por el fondo.

En la gran mayoría de los casos, la cromatografía de partición involucra la adsorción.

### IV- Fase fija:

En orgánica las separaciones cromatográficas se hacen sobre carbono, óxido de aluminio, hidróxido de calcio, carbonato de calcio, magnesia, sílica-gel, etc. como también sobre charcoal en medio acuoso.

Es necesario distinguir entre los adsorbentes polares (charcoal) donde la molécula no disociada es adsorbida y los adsorbentes tales como óxidos y sales cuyas fuerzas polares actúan entre soluto y solventes.

Idealmente, un adsorbente debería reunir las siguientes con-

diciones:

- 1- Retener cantidades relativamente grandes de las sustancias a ser resueltas que serían llevadas a través de la columna con nuevas porciones de disolvente, para permitir el desarrollo del cromatograma .
- 2- Las sustancias adsorbidas deberían ser eluidas completamente por solventes polares.
- 3- No deben descomponer a los compuestos adsorbidos ni a cualquiera de los disolventes usados.
- 4- No deben disolverse en ninguno de esos disolventes.
- 5- Debe ser preferiblemente blanco.
- 6- El tamaño de sus partículas debe permitir una filtración relativamente rápida y uniforme.

En general la capacidad de adsorción de cualquier (adsorbente) adsorbente depende del método de su preparación, y en algunos casos puede variar completamente su comportamiento de acuerdo al tratamiento preliminar que le ha sido aplicado.

La eficiencia del adsorbente también varía con los distintos disolventes.

V- Disolventes y eluyentes:

No hay una distinción neta entre un disolvente y un eluyente pues hay muchos casos que el mismo líquido sirve tan satisfactoriamente para disolvente como para eluyente en otras. Sin embargo se pueden considerar las siguientes características para su diferenciación:

Disolventes: son líquidos no polares que disuelven más fácilmente.

Eluyentes: son líquidos polares que eliminan las sustancias adsorbidas.

Por lo general se emplean mezclas, pero para trabajos experimentales es mejor utilizar disolventes puros a fin de lograr más alto grado de precisión

VI- Consideraciones sobre el empleo de la cromatografía de adsorción y partición:

Los siguientes puntos deben ser considerados para decidir

sobre el empleo de adsorción o partición.

- 1- Las sustancias fuertemente polares con grupos -COOH, -OH, etc. son convenientes para la cromatografía de adsorción solamente si se forman sus ésteres o cuando es usado un adsorbente débil.
- 2- Considerar si las sustancias cuando están adsorbidas, son más sensibles a la oxidación o a la luz.

Estas limitaciones no se aplican a la cromatografía de partición, pero sin embargo, la cromatografía de adsorción tiene la ventaja de ser más fácil de llevar a cabo, así como también más rápida que la de partición, ésta última requiere por lo general de 10 a 30 veces el volumen de una columna de adsorción para un mismo peso de material.

Para hacer una diferencia entre los dos métodos se deben considerar:

- 1- Polaridad y labilidad de las sustancias.
  - 2- Poder de separación.
  - 3- Considerar el tiempo y material requerido.
-

CRÓMATOGRAFIA EN FASE GASEOSA

I- Conceptos Fundamentales: (24,25,26).

La cromatografía gaseosa comprende todos los métodos cromatográficos en los cuales la fase móvil es un gas.

Se deben distinguir:

1- Cromatografía líquido-gaseosa: que comprende todos los métodos en los que la fase estacionaria es un líquido distribuido sobre un soporte sólido.

La separación se lleva a cabo por partición de los componentes de la muestra entre las fases líquida (fija) y gaseosa (móvil).

2- Cromatografía sólido-gaseosa: que comprende todos los métodos cromatográficos gaseosos en los cuales la fase estacionaria es un sólido activo (charcoal, molecular sieves).

La separación se lleva a cabo por adsorción de los componentes de la muestra sobre la fase fija.

II- Teorías de la cromatografía gaseosa: (20)

Teorías Difusionales

Estas teorías se basan en la transmisión de masa de los compuestos a separar y consideran que la velocidad neta del proceso es determinado por los siguientes mecanismos:

a- difusión.

b- flujo.

c- reacción o sorción química en la fase fija.

Vermuelen y Heister resolvieron las ecuaciones para los tres casos, pero más tarde Wilson y De Vault estudiaron nuevamente el tercer punto, considerando que la sorción y reacción son infinitamente rápidas y el equilibrio se establece instantáneamente.

Teoría de la sección de equilibrio

En 1.941 Martin y Synge consideraron limitada la teoría de Wilson y desarrollaron otra para partición cromatográfica en fase líquida, usando el concepto de destilación.

Ellos supusieron que el equilibrio no es obtenido en ningún punto particular de la columna, pero ocurre en una sección finita de la misma. A esta sección la llamaron "altura equivalente a un plato teórico" (HETP) y la definieron como "el segmento de la

columna tal que la solución que lo abandona está en equilibrio con la concentración promedio del soluto en la fase fija, en dicho segmento".

Luego de una serie de consideraciones y análisis de la teoría para partición cromatográfica en fase gaseosa, siempre considerando el concepto de sección de equilibrio se establecieron las siguientes suposiciones de la teoría:

- 1- El equilibrio entre las fases móvil y fija es obtenido en cada tramo o sección de la columna, aunque no existe en ningún punto particular de la misma .
- 2- La altura equivalente a un plato teórico (definida anteriormente ) es constante a lo largo de la columna.
- 3- El coeficiente de distribución o coeficiente de partición definido como "la relación de pesos de soluto distribuidos en la unidad de volumen de fase fija y móvil respectivamente" es constante en toda la columna.
- 4- La difusión en una sola fase es despreciable a lo largo de la columna .
- 5- La muestra inicial es cargada en forma tal, que la carga inicial es contenida en el primer plato de la columna.

Esta teoría y su desarrollo matemático solo pueden ser aplicados en aquellos casos en que la separación no está dominada por una falta de equilibrio entre fases.

### III- Terminología para cromatografía gaseosa: (21,22,23)

#### 1ro- Aparato.

inyector de la muestra: es el aparato por medio del cual una muestra líquida o gaseosa es introducida dentro de la columna.

#### 2do- Columna.

Volumen sólido: es el volumen de columna ocupado por el soporte sólido o líquido activo.

Volumen líquido: es el volumen de la columna ocupado por la fase líquida.

$$V_1 = \frac{w_1}{d_1}$$

$w_1$ : peso del líquido en la columna.

$d_1$ : densidad del líquido a la temperatura de la columna.

Volumen intersticial: volumen de la columna no ocupado por la fase líquida y su soporte sólido, o por el sólido activo.

3ro- Detector: es el aparato que mide el cambio de la composición del efluente.

Puede ser:

a- diferencial: mide instantáneamente la concentración

b- integral: mide continuamente la muestra acumulada desde que comienza el análisis.

4to- Reactivos.

Gas portador o eluyente: es un gas que se utiliza para eluir la muestra cuando pasa a través de la columna (fase móvil).

Fase líquida: es un líquido, relativamente no volátil a la temperatura de la columna, que está adsorbido por el soporte sólido y actúa como disolvente para los componentes de la muestra.

Soporte sólido: es normalmente un sólido poroso inerte que está cubierto por la fase líquida.

El tamaño de la partícula afecta:

a- la eficiencia de la columna.

b- la presión diferencial necesaria para lograr una dada velocidad de flujo.

Sólido activo: es un sólido poroso con propiedades adsorbentes por medio de las que lleva a cabo las separaciones cromatográficas.

Fase estacionaria: en cromatografía líquido-gaseosa la fase estacionaria comprende solamente al líquido; y en cromatografía sólido-gaseosa es el sólido activo.

5to- Registrador del cromatograma.

Cromatograma: es una propiedad física del gas que sale por la columna, medida y registrada, que da como resultado una gráfica.

Por lo general, es la proyección del detector que determina un gráfico en función del tiempo o del volumen del gas portador.

Ejemplos de cromatogramas ideales:

Cromatogramas obtenidos por:

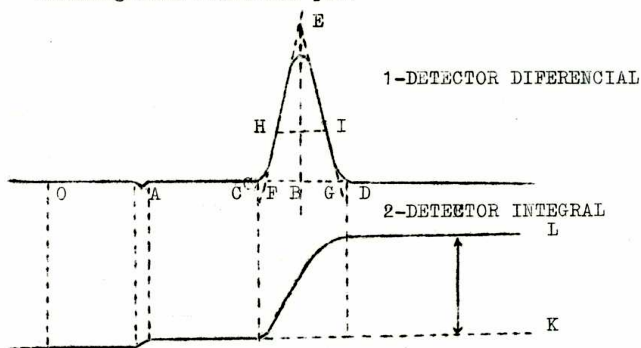


Figura 1

Línea base: porción de cromatograma registrado cuando solamente el gas portador emerge de la columna.

Pico: porción de cromatograma registrado por el detector en el momento que emerge un componente de la muestra en la parte terminal de la columna.

Si la separación es incompleta, pueden aparecer dos o más componentes en un mismo pico.

CD: base del pico.

Area del pico: es el área encerrada entre el pico y la línea base del mismo.

BE: altura del pico.

FG: ancho del pico.

HI: ancho del pico a la altura media.

Cuando el componente de la muestra pasa a través del detector se obtiene una curva sigmoidea y la línea base es desplazada a la nueva posición. Este cambio es conocido como "escalón" y la diferencia en la altura de las dos líneas bases (IK) se denomina "altura del escalón".

#### VI - Parámetros de Retención.

Volumen de retención: (no corregido)  $V_R$ : es el volumen de gas requerido para eluir el componente estudiado.

$$V_R = t_R \cdot F_c$$



$t_R$ : tiempo de retención: tiempo que tarda en emerger el máximo del pico después de la inyección de la muestra.

$F_c$ : velocidad del flujo volumétrico de gas carrier medido a la presión de salida y a la temperatura de la columna.

$V_P$ ,  $t_R$  corresponden a OB en la figura 1.

Volumen muerto:  $V_M$ : es el volumen de retención no corregido de una muestra no adsorbida y representa el volumen de gas portador requerido para transportar tal muestra desde el punto de inyección hasta el punta de detección a la presión de salida de la columna.

Esto incluye contribuciones debidas al volumen intersticial de la columna y al volumen efectivo del inyector de la muestra y el detector.

Volumen de retención ajustado: AB:  $V'_R$

$$V'_R = V_R - V_M = AB$$

Volumen de retención corregido:  $V_R^O$

$$V_R^O = j \cdot V'_R = j \cdot AB$$

está afectada por:

a- volumen de la muestra.

b- detector.

c- volumen intersticial.

j: factor de corrección del gradiente de presión para una columna llena homogéneamente y de diámetro constante.

$$j = \frac{3}{2} \cdot \frac{(P_i/P_o)^2 - 1}{(P_i/P_o)^3 - 1}$$

$P_i$  y  $P_o$ : presiones de entrada y salida de la columna.

Se usa j cuando la fase gaseosa móvil es compresible.

Volumen de retención neto:  $V_N$

$$V_N = j \cdot V'_R = j \cdot AB$$

Volumen de retención específico:  $V_g$ : es el volumen de retención neto a 0°C por gramo de fase líquida.

$$V_g = \frac{V_N}{w_l} \cdot \frac{273}{T}$$

Retención relativa: r: está dado considerando un componente estándar.

$$r_{1,s} = \frac{V_{g1}}{V_{g_s}} = \frac{V_{N1}}{V_{N_s}} = \frac{V'_{R1}}{V'_{R_s}} = \frac{V_{R1}}{V_{R_s}}$$

Las medidas de retención relativa a partir del punto de inyección pueden ser consideradas independientes de las dimensiones de la columna, solo si:

$$V_m \ll V_{R1}, V_{R_s}$$

Si las condiciones operatorias son constantes e idénticas para los componentes considerados y el standart, la determinación de  $r$  se simplifica quedando reducida a la relación de las distancias correspondientes a los volúmenes de retención ajustados. Efectos de la temperatura: Si para una dada sustancia, se tienen datos de  $V_g$  en condiciones operatorias tales que solo varíe la temperatura de operación, se ha encontrado experimentalmente que la representación de  $\log V_g = f(1/T_c)$  es aproximadamente lineal.

La variación de  $V_g$  puede ser expresada por medio de la ecuación de Antoine:

$$\log V_g = A + \frac{B}{t + C}$$

$t$ : temperatura de la columna en °C.

A,B,C: son constantes.

Se utiliza esta relación para interpolaciones .

Detalles experimentales:

Las siguientes variables experimentales que deben ser publicadas en cualquier serie de resultados, son:

- 1- Naturaleza y rango del tamaño de las partículas del soropos sólido.
- 2- Naturaleza, concentración y cantidad de fase líquida en la columna.
- 3- Tamaño de la muestra.
- 4- Dimensiones de la columna (longitud y diámetro interno)
- 5- Presiones de entrada y salida de la columna.
- 6- Velocidad del flujo del gas portador y método de medición.
- 7- Temperatura de la columna.
- 8- Detector:

- a- tipo de elemento sensible.
- b- geometría de la celda.
- c- volumen de la celda.
- d- tiempo registrado.

Errores.

Los siguientes hechos pueden afectar los parámetros de retención y aún la forma del pico causando errores, a menos que estén corregidos para:

- a- tamaño de la muestra.
- b- método de inyección.
- c- volumen muerto del detector.

Consideraciones experimentales.

La velocidad de flujo  $F_c$  debe ser dada a la temperatura y presión de salida de la columna, pues generalmente son medidas a temperatura ambiente.

Deben ser hechas por consiguiente, las correcciones convenientes:

- 1- Si se usa un medidor de flujo capilar, se debe considerar el gradiente de presión a través del medidor.
- 2- Si se usa un medidor de flujo húmedo, se debe tener en cuenta la presión de vapor del agua. O sea si:

$F$ : es la velocidad de flujo de gas saturado, determinado a la presión  $p$  del medidor de flujo .

$p_w$ : presión del vapor de agua a la temperatura del medidor del flujo.

$p_m$ : presión parcial del gas portador.

Por consiguiente

$$p_m = p - p_w$$

$$y \quad F_c = F \cdot \frac{p - p_w}{p}$$

El gas portador entraría a la columna a la temperatura de ésta; la muestra sería vaporizada muy rápidamente sobre la inyección para evitar inconvenientes de eficiencia y resolución.

En mediciones absolutas debe ser tomada en cuenta la temperatura de operación de la columna, determinando la "vida" de la misma antes que ocurra un cambio significativo en el peso del líquido en la columna,  $w_1$ .

PARTS EXPERIMENTAL

CROMATOGRAFIA DE ADSORCIÓN

Preparación de la placa adsorbente

- A- Tipa de placa utilizada: La placa es de vidrio de aproximadamente 3 mm. de espesor, por 20 cm. de largo y por 10 cm. de ancho. Debe tener un espesor uniforme tanto en el centro como en los bordes, a fin de que la capa adsorbente también lo sea.
- B- Preparación de la mezcla adsorbente: (27)
- Drogas utilizadas:
- 30 gr. de ácido silícico de 200 mallas (marca INKHEM)
  - 3 gr. de almidón de arroz (el tipo de almidón es importante)
  - 54 ml. de agua destilada.
- Técnica:
- A una mezcla de 30 gr. de ácido silícico con 3 gr. de almidón se agregan 54 ml. de agua. Se mezcla cuidadosamente y luego se calienta aproximadamente a 85°C por dos o tres minutos, a baño María hasta que se observa un espesamiento gelatinoso. Es importante observar esos detalles para evitar el posible "cracking" de las capas al secarse. Como al secarse la pasta se espesa aún más, se agregan algunos mililitros más de agua (3 a 10 ml.) y se homogeneiza bien la masa.
- C- Recubrimiento de las placas.  
La placa limpia y seca se coloca entre dos bandas de vidrio, de espesor mayor de 0,5 mm. respecto a la utilizada como placa, y se extiende la mezcla adsorbente sobre ésta mediante una espátula. Usando las bandas como soporte, se pasa una regla metálica o de vidrio esmerilado bien liso. La placa queda recubierta queda recubierta con una capa de 0,5 mm. de espesor de mezcla adsorbente.
- D- Precauciones.
- 1- No demorar en la operación de extensión de la mezcla adsorbente para evitar que se espese irregularmente en distintos lugares.
  - 2- Antes de extender la mezcla, verterla en otro vaso de ppdos. limpio para evitar que los pequeños grumos endurecidos adheridos a las paredes del primer vaso sean arrastrados por la mezcla e inutilicen la placa.
  - 3- Agitar la placa hacia los lados para distribuir el film líquido en forma regular.

Teniendo en cuenta estos pequeños detalles, se obtiene una capa perfectamente uniforme y de espesor constante.

E- Secado de la placa.

Después de secar parcialmente la placa sobre un plano horizontal se la introduce en una estufa cuya temperatura se mantiene constante a  $105-110^{\circ}\text{C}$ , durante 30 minutos.

En esas condiciones, la capa de adsorbente se obtiene blanca, sin rajaduras y suficientemente dura como para poder marcar con un lápiz.

F- Activación:

La placa, aún caliente y sobre  $\text{H}_2\text{O}$ , se la somete al vacío de 0,5 a 1 mm. de mercurio, durante dos horas. Luego se rompe el vacío con aire seco y sin pérdida de tiempo se depositan las sustancias a cromatografiar.

Para no desactivar el adsorbente es conveniente que no transcurran más de 10 minutos entre sacarla del vacío e introducirla a la cubeta.,

G- Preparación de los cromatogramas

Cada placa tiene capacidad para tres cromatografías independientes, separadas entre sí por 2 cm.

Solamente la zona central de las placas dan resultados rigurosamente comparables, pues la capa de sílice se hace progresivamente más fina en los bordes. Este defecto es debido a la formación del menisco de la mezcla almidonada, y sería una pequeña desventaja para un trabajo más general con chromatoplates. Sobre las zonas marginales se ha observado solamente un pequeño aumento en los valores de  $R_f$ .

Para la distribución más uniforme de las capas de adsorbente, se utiliza un aparato especial que normalmente se lo destina para la producción de finas capas de pintura.

Este instrumento consiste en un cuchillo de acero ajustado previamente a una altura conveniente por sobre la placa de vidrio. Se coloca la mezcla almidonada sobre la placa y el cuchillo se mueve entonces a lo largo de ésta, eliminando el exceso de pasta y formando una capa de espesor constante. De esta forma el efecto de borde desaparece, excepto en sus bordes extremos.

H- Marcado de las placas.

Las marcas se hacen sobre el chromatoplate bien seco sobre una línea situada a unos 30 mm. de la base y a unos 25 mm. de los bordes laterales, antes de ser sometidas al vacío.

I- Desarrollo.

El desarrollo completo del chromatoplate llevó aproximadamente de 1 a 2 horas en nuestro caso. El flujo del solvente es muy rápido inicialmente haciéndose más lento después que han sido cubiertos los primeros 8 cm.

Cuando el frente del solvente ha corrido unos 15 cm., se retira la placa de la cubeta marcando de inmediato dicho frente y se deja secar el chromatoplate al aire.

J- Disolventes para desarrollo.

Como disolvente en la cromatografía se usó una mezcla binaria de 3% acetato de etilo en "Solvente 7, Shell" (fracción de petróleo destilada entre 61- 69°C con aproximadamente 3% de hidrocarburos aromáticos).

K- Revelado.

La placa ya cromatografiada, se somete a la pulverización con p-nitroanilina diazotada, preparada según el método de Grignard: (28).

Se dispersa 0,15 moles de amina empastada con 50 cm<sup>3</sup> de solución de HCl 22°Bé, en 150 cm<sup>3</sup> de solución acuosa de HCl 12% a los que se agregan 200 gr. de hielo; entonces se agrega de una sola vez 0,15 moles de NO<sub>2</sub>Na en solución acuosa 15% , agitando hasta obtener una solución clara.

Cantidades utilizadas:

2,07 gr. p-nitroanilina diazotada.

5,00 cm<sup>3</sup> ácido clorhídrico 22°Bé.

15,00 cm<sup>3</sup> ácido clorhídrico 12%.

20,00 gr. hielo.

1,10 gr. nitrito de sodio.

Preparado el reactivo, es necesario neutralizarlo y diluirlo para su utilización, pues de lo contrario mancha la placa, haciendo imposible la distinción de las manchas.

Para obtener la neutralización y dilución correctas, se probaron soluciones que contenían distintas concentraciones de reactivo.

Se llegó al siguiente procedimiento, que dió los resultados más satisfactorios:

A 2 cm.<sup>3</sup> de p-nitroanilina diazotada, se agregan 4 cm.<sup>3</sup> de solución acuosa 25% de acetato de sodio como buffer, y a la mezcla se la diluye con 90 cm.<sup>3</sup> de agua destilada, cuya temperatura oscile entre 2 y 3 °C.

Esta solución se agita y luego se neutraliza con solución acuosa 5% de CO<sub>3</sub>Na<sub>2</sub> (solo se requieren algunas gotas) controlando el pH con "papel universal", hasta la obtención de un pH aproximadamente igual a 7.

La solución neutralizada se puede conservar perfectamente, por algunas semanas, si se la mantiene a una temperatura cercana al 0°C.

#### L- resultados.

A continuación, se detalla la tabla de los valores de Rf obtenidos de los fenoles puros estudiados.

Las condiciones de operación son las siguientes:

Solvente: acetato de etilo al 30%, en "Solvente 7, Shell"

Tiempo de desarrollo: aproximadamente 2 horas.

Frente del solvente: en todos los casos corrió aproximadamente 15 cm. a partir de la base marcada.

Reactivo: p-nitroanilina diazotada.

Concentración de fenoles en solución etérea: 1% en peso; se aplicaron 5 gotas en cada caso.

Los datos fueron seleccionados obteniéndose variaciones de  $\pm 0,03$  en los valores de Rf o sea, dichos datos son perfectamente comparables.

#### Referencias correspondientes a la TABLA I

- (1)  $R_{fc}$ : relación de frente central. El valor está definido como la relación de la distancia al punto medio de la mancha y la distancia recorrida por el frente del solvente.
- (2)  $R_{fs}$ : relación de frente superior. Es la distancia recorrida por la parte superior de la mancha y el frente del solvente.
- (3)  $R_{rr}$ : relación de frente relativa. Son los valores obtenidos dividiendo el  $R_{fc}$  (o  $R_{fs}$ ) del compuesto fenólico por el  $R_{fc}$  (o  $R_{fs}$ ) del fenol respectivamente.



TABLA I

COMPUESTOS FENOLICOS	R <sub>fc</sub> · 100	R <sub>fs</sub> · 100	R <sub>fr</sub>	COLOR
fenol	47	54	1,00	amarillo pálido
floroglucina	----	----	----	amarillo anaranjado
resorcina	10	----	0,21	anaranjado
vainillina (3-metoxi 4-hidroxi benzaldehido)	15	17	0,32	pardo
guayacol (2-metoxi fenol)	42	49	0,90	anaranjado parduzco
eugenol (2-metoxi 4-alil fenol)	47	53	0,99	pardo violado
isoeugenol (2-metoxi 4-propenil fenol)	48	55	1,01	pardo pálido (aureola rosada)
m-cresol (3-metil fenol)	50	57	1,06	amarillo anaranjado
3,4 xilenol (3,4 di metil fenol)	50	57	1,06	pardo
3,5 xilenol (3,5 di metil fenol)	50	57	1,06	pardo pálido
p-n-amil fenol	52	59	1,10	anaranjado parduzco
o-cresol (2-metil fenol)	53	61	1,13	anaranjado
p-etil fenol	55	63	1,17	amarillo parduzco
2,4 xilenol (2,4 di metil fenol)	56	64	1,19	pardo-rojizo
o-etil fenol	58	66	1,23	amarillo verdoso

COMPUESTOS FENOLICOS	$R_{fc} \cdot 100$ $R_{fc} (1)$	$R_{fs} \cdot 100$ $R_{fs} (2)$	$R_{ff} (3)$	COLOR
2,6 xilenol (2,6 di metil fenol)	58	67	1,24	amarillo
aldehido salicílico (2-hidroxi benzaldehido)	58	67	1,24	pardo pálido
timol (2-isopropil 5-metil fenol)	64	73	1,36	amarillo (aureola parda)
carvacrol (2-metil 5-isopropil fenol)	70	80	1,48	amarillo

M- Discusión.

Comparando los valores de Rf indicados en la tabla anterior, se puede observar.

- 1- Los polifenoles se alejan poco del lugar de aplicación. (La floroglucina permanece sobre la base).
- 2- La vainillina se aleja poco de la base, posiblemente debido al grupo -CHO que permitiría, de acuerdo a la teoría, una mayor retención.
- 3- Los compuestos fenólicos sustituidos en orto por un metoxilo (guayacol, eugenol, isoeugenol) presentan valores de Rf muy cercanos al del fenol.
- 4- Los fenoles meta alquil sustituidos (m-cresol; 3,4 y 3,5 xilenoles) tienen un mismo valor de Rf.
- 5- Los para alquil sustituidos (p-n-amil fenol y p-etil fenol) presentan valores de Rf un poco mayores que los anteriormente mencionados. Una excepción es el o-cresol, cuyo valor se encuentra entre ambos para sustituidos.
- 6- Los valores más elevados de Rf han sido obtenidos por los orto alquil sustituidos.
- 7- Los valores de Rf correspondientes al timol y carvacrol son justamente los opuestos a los que podían esperarse según el impedimento estérico que presentan.
- 8- Los fenoles con sustituyentes alquílicos de mayor punto de ebullición (no los orto metoxilados) presentan Rf mayor que el fenol

Resolución de mezclas

A continuación se considerarán las mezclas de componentes puros que fueron resueltas en las condiciones operatorias ya mencionadas. Los Rf en las mezclas son los de cada sustancia al estado puro con variaciones de 4 unidades en general.

La proporción de las sustancias en cada mezcla es por partes iguales

TABLA II

Clase de mezclas:	Mezclas	Separación:
Binaria	resorcina - floroglucina	total
	carvacrol - o-cresol	total
	carvacrol - timol	no separan
	carvacrol - eugenol	total
	eugenol - m-cresol	total
	eugenol - guayacol	parcial
	eugenol - isoeugenol	no separan
	isoeugenol - guayacol	parcial
	fenol - eugenol	superpuestas
	fenol - timol	total
	fenol - o-cresol	total
	o-cresol - guayacol	total
	o-cresol - timol	total
	m-cresol - timol	total
	m-cresol - o-cresol	parcial
Cuaternaria	timol - o-cresol - eugenol - fenol	total
		eug.- fenol)superp.

También se cromatografió la mezcla siguiente, de 10 componentes puros: fenol, eugenol, m-cresol, 3,4 xilenol, 3,5 xilenol, p-n-amil fenol, p-etil fenol, 2,4 xilenol, o-etil fenol y 2,6 xilenol.

El resultado de esta experiencia fue negativo, ya que solo aparecieron tres manchas confusas superpuestas, haciendo imposible la identificación de cualquier componente con exactitud.

Valores obtenidos:

TABLA III

TABLA III

Mancha número:	R <sub>fc</sub> .100	Color
1	53	amarillo
2	47	pardo
3	40	amarillo

Cromatografía de adsorción bidimensional  
sobre placa de ácido silícico

Se utilizó esta técnica para probar la separación de los isómeros: eugenol - isoeugenol.

Las placas que se usaron eran cuadrados de unos 5 mm de espesor y 18 cm. de lado.

La preparación de la mezcla adsorbente como el recubrimiento de las placas se llevó a cabo de la misma forma que en la cromatografía monodimensional; pero las condiciones de operación variaron, pues se probaron distintas mezclas de disolventes de corrimiento.

En este caso las sustancias fenólicas se colocaron en la intersección de dos líneas paralelas a dos bordes consecutivos, trazadas a 25 mm. de cada uno de los mismos.

El primer corrimiento se hizo siguiendo la dirección de una de esas rectas, y el segundo en su dirección perpendicular.

Los Rf fueron calculados proyectando la parte superior y punto medio de la mancha sobre cada una de las líneas trazadas, y dividiendo estas distancias por el frente del solvente utilizado en el primero o segundo corrimientos respectivamente.

Los resultados fueron los siguientes:

Cromatografía de la mezcla: eugenol - isoeugenol

Disolventes de corrimiento:	R <sub>fc</sub> . .100	R <sub>fs</sub> . .100	resultados
A- 1: 30% acetato de etilo en éter de petróleo. 60-70°.	65	70	no separan
2: 20% éter etílico en éter de petróleo 60-70°.	30	39	
B- 1: 30% acetato de etilo en éter de petróleo 60-70°.	65	70	no separan
2: 30% acetato de etilo en éter de petróleo 60-70°.	47	53	

Estos valores de Rf coincidían con los valores del isoeugenol puro, obtenidos por cromatografía monodimensional en las mismas condiciones operativas y superaban en 4 unidades a los Rf del eugenol obtenidos en iguales condiciones.

Resolución de aceites esenciales

La tabla IV, dada a continuación presenta los resultados de la cromatografía de los aceites esenciales.

En cada ensayo se detalla el R<sub>f</sub> de la mancha, su color e intensidad. Estos resultados dan una idea general acerca del número de fenoles que contiene la fracción fenólica de la esencia.

Las condiciones de operación en este caso fueron las siguientes:

§- Solvente: 30% acetato de etilo en éter de petróleo 60-70°.

Frente del solvente: aproximadamente 15 cm.

Reactivo: p-nitro anilina diazotada.

Fracción fenólica: solución etérea concentrada.

TABLA IV

ESENCIA:	R <sub>fs</sub>	COLOR	INTENSIDAD
Esencia de Jarilla	0,69	amarillo parduzco	tenué
	0,51	rojo (aureola amarilla)	nítida
	0,39	anaranjado amarillento	tenué
	0,98	rosada	muy tenué
	0,11	pardo pálido (banda)	
Schinus Molle	0,59	pardo	nítida
	0,35	amarillo rojizo	nítida
Yerba mate	0,90	amarillo rosado	nítida
	0,81	rojo	nítida
	0,73	anaranjado amarillo	nítida
	0,66	anaranjado rojizo	nítida
	0,42	rojo	nítida
	0,37	amarillo rojizo	Frente de banda
	base	pardo oscura.	da.
Haplopappus (hojas)	0,60	anaranjado	Manchas difusas
	0,38	amarillo	
	0,23	anaranjado	
	base	pardo anaranjado	

ESENCIA:	R <sub>fs</sub>	COLOR	INTENSIDAD
Bracteolatus	0,79	pardo	nítida
	0,65	amarillo rosado	nítida
	0,52	amarillo rosado	nítida, comien-
	0,27	anaranjado	za la banda
	base	pardo	con manchas confusas.
Senecio Neach	0,76	amarillo parduzco	nítida
	0,73	rosado pálido	nítida
	0,65	amarillo oscuro	nítida
	0,51	amarillo parduzco	comienza banda;
	0,43	amarillo pálido	muy ténue.
	0,42	rosado	
	0,34	rojo	
	0,28	amarillo difuso	manchas
	0,26	amarillo anaranjado	difusas
	0,17	rosado	
base	pardo pálido		
Paramela	0,75	violado (aureola amarilla)	posible superposición
	0,56	amarillo parduzco	nítida
	0,15	amarillo	nítida
	0,08	anaranjado	nítida

2- Solvente: 20% éter etílico -40% benceno - 40% éter de petróleo  
60-70°.

Frente del solvente: aproximadamente 15 cm.

Reactivo: p-nitro anilina diazotada.

Fracción fenólica: solución etérea concentrada.

Referencias de la TABLA V:

- (a)- Las manchas de color blanco aparecieron cuando se pulverizó la placa con alumbre férrico, después que ya habían sido reveladas las demás manchas con p-nitro anilina diazotada.
- (b)- La mancha apareció a los 20 minutos de haber sido revelada la placa con el reactivo utilizado y el alumbre férrico.

TABLA V

ESENCIA:	R <sub>F</sub>	COLOR	INTENSIDAD
Yerba Mate	0,68	rosado	banda con variación de tonalidades.
	0,63	rosado anaranjado	
	0,57	anaranjado amarillo	
	0,53	amarillo anaranjado	
	base	pardo oscuro	
Senecio Neaci	0,64	pardo pálido	muy tenue
	(a) 0,57	blanco	muy tenue
	0,50	amarillo	nítida
	0,18	rosado	nítida
	0,13	amarillo	nítida
	base	pardo muy oscuro	
Schinus Molle	0,74	amarillo parduzco	nítida
	(a) 0,67	blanco	tenue
	(a) 0,57	blanco	tenue
	0,53'	amarillo	nítida
	(b) 0,46	pardo pálido	nítida
	0,14	amarillo	nítida
	0,08	rosado	- banda hasta
	base	pardo	- la base.

N- Conclusiones.

En la primera parte de este trabajo se ha procurado establecer una técnica que permita la resolución cromatográfica de los aceites esenciales.

Debido a las características tan complejas de la constitución de los aceites esenciales, es difícil hacer una cromatografía directa de la esencia, pero sí es posible separar las distintas fracciones: carbonílica, terpénica, ácida, fenólica, etc. y cromatografiarlas por separado.

En este caso se ha adoptado la técnica del "chromatoplate", ya empleada para resolver los componentes de las esencias, y se la ha adaptado a la cromatografía de la fracción fenólica de los aceites



esenciales,

La técnica, en primer lugar puso a punto con componentes puros pasando luego a la resolución exitosa en casi todos los casos, de mezclas de dos, cuatro y diez componentes. La resolución se vió impedida, en algunas ocasiones por la coincidencia de Rf de los compuestos fenólicos, que por lo general presentaban una estructura semejante; pero en el caso de los aceites esenciales da una valiosa idea de la complejidad de la fracción considerada.

Asimismo se deben destacar las ventajas que proporcionan su rapidez y su alto poder de resolución, evidenciado en los numerosos componentes revelados.

Si bien no se puede considerar que sea una técnica definitiva para una mezcla complicada, su uso puede ser de gran utilidad en el caso de una confirmación y una guía de considerable valor en el análisis de los aceites esenciales.

CROMATOGRAFIA DE PARTICION  
SOBRE COLUMNA DE ACIDO SILICICO

Método y procedimiento.

1- Aparato.

El aparato cromatográfico usado, estaba formado por una columna de vidrio de 2 cm. de diámetro interno y 25 cm. de longitud.

En la parte superior tenía ajustada una placa porosa cuyo fin era sostener al soporte sólido y en su parte superior, por medio de una unión esmerilada, estaba conectado a un tubo en Y.

Uno de los brazos de este tubo (derecho) se hallaba en conexión (unión esmerilada) con el depósito del solvente; y el otro (izquierdo) mediante una unión similar, a un tubo en T (compensador de presión).

El tubo en T, a su vez, estaba conectado por un lado al tope del solvente; y por el otro al compresor de aire, cuya presión se regulaba convenientemente.

En esta cromatografía se utilizaron los siguientes materiales:

- 1- Soporte: ácido silícico (INHELM 90 mallas)
- 2- Fase fija: agua.
- 3- fase móvil: "solvente 7, Shell".

El "solvente 7 Shell" fue tratado para su purificación de la siguiente forma:

500 ml. de solvente fueron agitados en una ampolla de decantación de 1 litro con 100 ml. de oleum. El oleum fue entonces extraído y repetido el procedimiento hasta que la fracción del mismo no se coloreaba. El solvente se lavó 2 veces con 100 ml. de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  concentrado, dos veces con 100 ml. de agua destilada, dos veces con 100 ml. de  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  al 5 % y nuevamente con agua destilada. Luego se secó el solvente sobre  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  anhidro y se destiló en un aparato de vidrio (fracción recogida entre 65 y 67°C) conservándose en una botella bien cerrada.

El solvente tratado de esta forma (para eliminar aromáticos y olefinas) no absorbió a 230 mU. en el espectro U.V. ZEISS, y por consiguiente, puede ser utilizado para la cromatografía.

Fenoles: La solución simple de cada compuesto utilizado, contenía un micromol de soluto por mililitro de solvente y las soluciones de mezclas contenían un micromol de cada uno por ml. de solvente.

Fenoles cromatografiados.

fenol, o-cresol, m-cresol, carvacrol, eugenol, isoeugenol.

Las mediciones espectrofotométricas fueron hechas en celdas de cuarzo de 1 cm<sup>2</sup>, en la región del U.V., utilizando el espectrofotómetro Carl Zeiss, modelo P.K.M. II

Sólido inerte.

Dos métodos se utilizaron en la preparación del ácido silícico para la cromatografía:

Método A.

Una cantidad previamente pesada de ácido silícico se lleva a estufa a 130°C hasta obtener peso constante. En esas condiciones el sólido retiene alrededor de 8 % de agua, según el trabajo de Curtmann (29) El adsorbente es enfriado a temperatura ambiente y luego se pesa la fracción que se ha de utilizar, conservando el resto en un recipiente cerrado libre de humedad. A la fracción pesada, se la coloca en un mortero y se agrega gota a gota, por medio de una bureta, la cantidad de agua necesaria para la cromatografía (teniendo en cuenta la humedad retenida por el sólido) y mezclando después del agregado de varias gotas.

Terminada la operación se perfecciona la molienda y se pasa la mezcla, en forma cuantitativa, a la columna cromatográfica.

Método B. (30)

A una cantidad pesada de ácido silícico se le agregan dos veces su volumen de agua destilada y se deja en reposo durante 1 hora. Luego se filtra sobre papel de filtro Whatman n°1, bajo vacío moderado durante 20 minutos.

El ácido silícico así tratado se coloca durante dos horas en una estufa regulada a temperatura constante, eligiendo la temperatura según el grado de actividad que quiera obtenerse para la cromatografía La temperatura a la que se trabajó en este caso particular fue de 60±1 °C para obtener %de humedad según el trabajo realizado por R. Hernandez, R. Hernandez Jr. y Axelrod. (30)

Preparación de la columna.

Colocado el sólido dentro de la columna se prosigue la operación de la siguiente forma:

1- Se agrega el solvente y se deja el tiempo necesario para que humedezca enteramente la columna de ácido silícico (sin aplicar presión)

liberándolo de las burbujas de aire por medio de una varilla de vidrio aplanada en su terminación, cuyo diámetro es tal que ajusta fácilmente al tubo.

- 2- Durante el procedimiento, se agrega el solvente de tiempo en tiempo, a fin de mantener constantemente una capa sobrenadante.
- 3- La varilla se lava con el solvente y se extrae con cuidado.
- 4- Luego de ajustar las uniones del aparato se aplica una presión de 6 pulgadas de mercurio y entonces el sólido se empaqueta homogéneamente durante la recolección de 30 a 40 ml. de solvente.
- 5- Se lleva el nivel del solvente al tope de la columna a fin de colocar la muestra, no permitiendo, en ningún caso, que este caiga por debajo del nivel del empaquetado.
- 6- Durante la preparación del empaquetado se recogen por lo general de 60 a 75 ml. de solvente.
- 7- Al agregar la muestra fenólica, (3 ml. de solución) se debe ajustar al mismo tiempo el primer tubo ya calibrado para recoger fracciones de 5 ml. cada una.
- 8- Se aplica presión y cuando la solución muestra desaparece en el tope del empaquetado se agregan 2 ml. de solvente puro, repitiendo esta operación a medida que el solvente desaparece para poder fijar la muestra. Después de esta operación la presión y el flujo del depósito se regulan hasta obtener una velocidad de salida constante.
- 9- Sobre cada fracción recogida se determina la absorbancia, a una determinada longitud de onda, de acuerdo a su naturaleza.
- 10- Si las condiciones operantes no varían, la posición de los picos se mantiene constante.
- 11- La variación de temperatura computaría pequeñas variaciones en la posición de los picos.

#### Resultados y discusión.

En el presente trabajo se ha tratado de aplicar la cromatografía de partición a los fenoles, con el fin de aplicarla luego en la resolución de las fracciones fenólicas de los aceites esenciales.

Para ello se estudió el efecto producido sobre los compuestos cromatografiados, por variaciones de la cantidad de ácido silícico, manteniendo constante el porcentaje de agua fija sobre el mismo.

En primer término se partió de las cantidades de ácido silícico y agua que indican Sweeney y Bultman (31) para el fenol:

58,3 % agua (gramos de agua en 100 gr. de ácido silícico)

12 gr. ácido silícico Mallinckrodt de 100 mallas

En esas condiciones la mayor absorbancia se obtenía en el tubo n<sup>o</sup>33 .  
Las condiciones operatorias en este trabajo difieren en principio del estudio anteriormente mencionado, porque se utilizó ácido silícico marca Inkhem, 90 mallas.

Los datos obtenidos son los siguientes:

1- Contenido en agua: 58,3 %

Fracciones recogidas : 5 ml. en cada tubo.

Compuestos Cromatografiados	Acido silícico 12 g.			Acido silícico 15 g.			Observ.
	Tubos recog.	Peak Tube (Tubo n <sup>o</sup> )	Ancho del Pico	Tubos recog.	Peak Tube (tubo n <sup>o</sup> )	Ancho del Pico	
fenol	33	21	17-29	---	---	--	---
Mezcla: o-cresol m-cresol	---	---	--	20	3	1-11	no se separan

Si observamos los resultados es fácil predecir que en ninguna de esas dos condiciones se pueden obtener buenas separaciones de mezclas más complejas.

En el primer caso, el fenol sale mucho más rápidamente que lo que se espera según su estructura molecular, y por consiguiente, es muy probable que otros fenoles menos solubles en agua, no puedan ser suficientemente retenidos como para permitir cierta resolución de una mezcla.

En el segundo caso, no se separan dos compuestos como el o-cresol y m-cresol, cuyas estructuras son tales que deben admitir resolución, pues se sabe que los orto-isómeros se mueven a través de la columna con mayor velocidad que los meta y para isómeros, debido a que los primeros tienen menor solubilidad en agua por el bloqueo de la función -OH.

Ambos casos señalan que sería más conveniente trabajar con menos porcentaje de agua y mayor cantidad de ácido silícico, a fin de retardar la salida de los compuestos fenólicos.

Los datos tabulados a continuación se han logrado en las siguientes condiciones:

2- Contenido en agua: 41,6 %.

Fracciones recogidas: 5 ml. en cada tubo.

TABLA VII							
Compuestos Cromatografiados	Ácido silícico 20,5 g			Ácido silícico 24,7 g,			Observ.
	Tubos recog.	Peak Tube (tubo n <sup>o</sup> )	Ancho del Pico	Tubos recog.	Peak Tube (tubo n <sup>o</sup> )	Ancho del Pico	
fenol	43	28	24-39	---	----	--	----
m-cresol	31	8	9-22	---	----	--	----
o-cresol	16	7	5-12	40	15	12-14	----
carvacrol	12	3-4	3-8	---	----	--	----
isoeugenol	12	4	2-6	24	19	18-20	
Mezclas:							
A-							
o-cresol		7	5-10	---	----	--	separa-
m-cresol	43	12	10-18	---	----	--	ción
fenol		29	25-39	---	----	--	parcial
							----
B-							
carvacrol		3-4	3-6	---	----	--	separac.
o-cresol	16	7	8-13	---	----	--	parcial

Los resultados más satisfactorios se consiguieron utilizando 20,5 g. de ácido silícico y 41,6 % de agua, pero sin embargo, estas condiciones no serían adecuadas para una buena separación de compuestos sustituidos en posición orto.

En el caso de utilizar mayor cantidad de ácido silícico (24,7 g.) se presenta el inconveniente que el desarrollo de la cromatografía llevaría un tiempo excesivo, aunque podría ser utilizada para separaciones de mezclas simples de algunos fenoles sustituidos en orto.

Podrá ser interesante verificar la resolución mediante una rápida cromatografía de adsorción sobre placa de ácido silícico.

Conclusiones.

En este estudio se ha tratado de aplicar la cromatografía de partición sobre ácido silícico a la resolución de las fracciones fenólicas de los aceites esenciales, que como ya se dijo, son de naturaleza bastante compleja.

Es evidente que las mezclas no se pueden resolver mediante una sola cromatografía, pues un primer corrimiento proporcionaría fracciones más o menos complejas que a la vez podrían resolverse por medio de corrimientos sucesivos, en condiciones operatorias que dependerían de las características de cada fracción.

Los resultados tabulados solo se refieren a la cromatografía de algunos fenoles o mezclas de dos o tres de ellos, pero en ninguna forma se pueden considerar satisfactorios

En casos de fracciones fenólicas, que están generalmente constituidas por varios componentes desconocidos, el problema se complica, pero podría ser simplificado si se combina esta técnica de partición con la de adsorción o la cromatografía gaseosa de tal forma que las fracciones recogidas que contienen fenoles se cromatografien rápidamente por medio de cualquiera de las técnicas anteriormente señaladas, y de esta forma se determine, aproximadamente, el número de compuestos de dicha fracción.

La cromatografía de partición sobre ácido silícico no es un método de fácil y rápida aplicación, y por sí misma no aportaría una información mejor que la que pudiesen brindar otros métodos más rápidos y menos complicados.

En este trabajo no se llegó a cromatografiar ninguna fracción fenólica de aceites esenciales debido a que esta técnica presentaba suficientes dificultades como para que su aplicación no fuese preferida ni aún como guía en el análisis de aceites esenciales.

PARTICION CROMATOGRAFICA EN FASE GASEOSA

Se ha estudiado en la tercera parte del trabajo, el comportamiento de los compuestos ienólicos, cromatografiados en distintas columnas. y condiciones operatorias, a fin de encontrar una columna o combinación de columnas que haga factible la separación del mayor número de componentes de una mezcla.

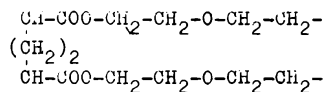
Este estudio se realizó en un aparato Perkin Elmer, Modelo 154, adquirido por la Cátedra de Cromatología y Análisis Industriales mediante un subsidio del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas; utilizándose como gas portador al nitrógeno, y temperaturas entre 170 y 220°C, según el punto de ebullición y volatilidad de las sustancias usadas como fase estacionaria.

Los experimentos abarcaron solamente la cromatografía líquido-gaseosa, siendo utilizadas las siguientes columnas:

1- Columna P.

Longitud: 1 m.

Fase estacionaria: succinato poliéster de dietilen glicol



Soporte: Chromosorb R.

Peso molecular: 4000 (aproximadamente)

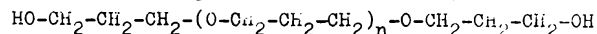
Presión de vapor: menos que un mm. de Hg a 200°C.

Temperatura máxima recomendada: 225°C.

2- Columna R.

Longitud: 1 m.

Fase estacionaria: polipropilén glicol (UCON LB-550-X)



Soporte: tierras diatomáceas.

Peso molecular: 550 (promedio).

Presión de vapor: menos de 0,01 mm. de Hg a 20 °C

Temperatura máxima recomendada: 200°C

3- Columna SAIB.

Longitud : 2 m.

Fase estacionaria: diacetato hexa-isobutirato de sacarosa

Soporte: tierra de infusorios.

Peso molecular: 847 (aproximadamente)



temperatura máxima recomendable: 200°C.

4- Columna Q.

Longitud: 1 m.

Fase estacionaria: APIEZON "L" (grasa)

Soporte: tierras diatomáceas.

Peso molecular: indefinido.

Presión de vapor: 1 micrón a 300°C.

Temperatura máxima recomendada: 325°C.

5- Columna Q.

Longitud: 2 m.

Fase estacionaria: grasa de silicona.

Soporte: tierras diatomáceas.

Peso molecular : indefinido.

Presión de vapor:  $10^{-6}$  mm. de Hg a 20 °C

Temperatura máxima recomendada: 325°C.

Las sustancias cromatografiadas fueron:

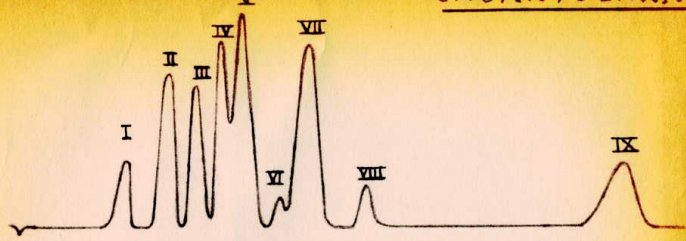
	Peso Molecular	Punto de Ebullición (°C)
1- fenol	94,00	183
2- o-cresol	108,00	190
3- aldehído salicílico	122,12	197
4- m-cresol	108,00	202
5- guayacol	124,13	205
6- o-etil fenol	122,17	207
7- 2,4 xilenol	122,16	211
8- 2,6 xilenol	122,16	212
9- 3,5 xilenol	122,16	219
10-p-etil fenol	122,17	219
11-3,4 xilenol	122,16	225
12-timol	150,00	233
13-carvacrol	150,00	237
14-eugenol	164,00	253
15-p-n-amil fenol	164,24	262
16-isoegenol	164,00	267

Resultados.

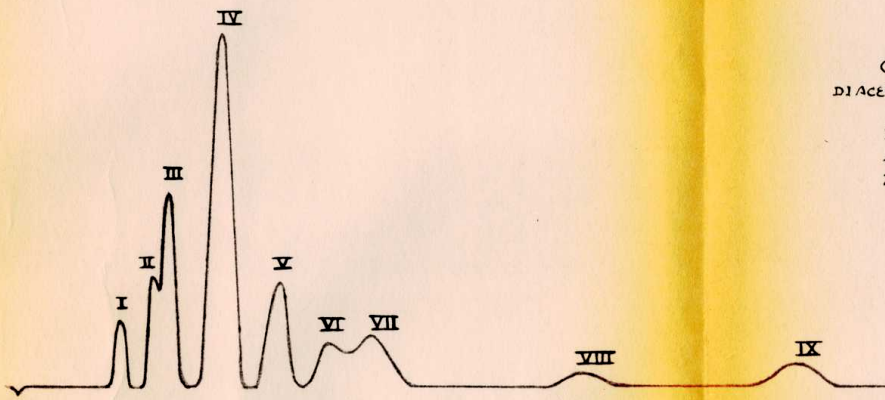
Cada uno de estos fenoles se cromatografió separadamente en las columnas mencionadas obteniéndose los datos de la tabla VIII.

La mezcla total de los fenoles se cromatografió luego, y los datos

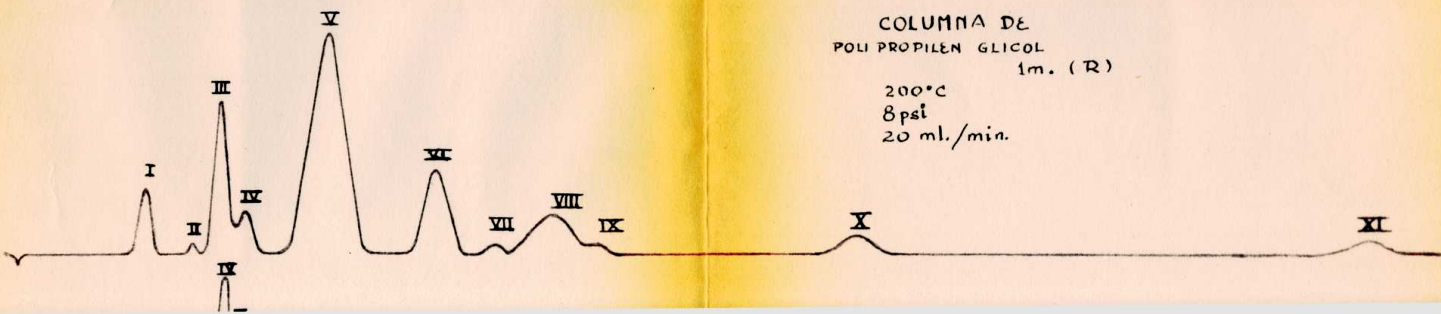
CROMATOGRAMAS DE LA MEZCLA TOTAL



COLUMNA DE  
SUCCINATO POLIESTER DE DIETILEN GLICOL  
1m. (P)  
200°C  
4psi  
20,1 ml./min.



COLUMNA DE  
DIACETATO HEXA ISOBUTIRATO DE SACAROSA  
2m. (SAIB)  
200°C  
4psi  
20 ml./min.



COLUMNA DE  
POLI PROPILEN GLICOL  
1m. (R)  
200°C  
8psi  
20 ml./min.

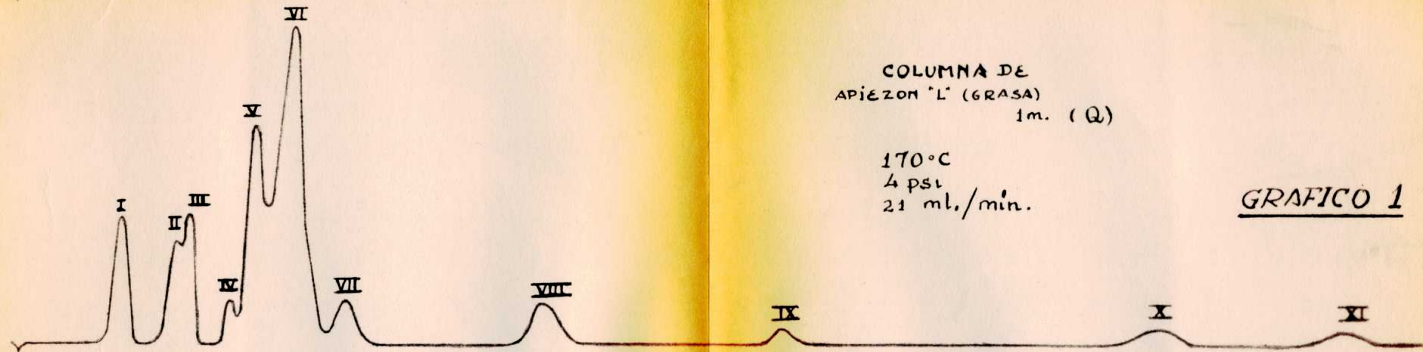
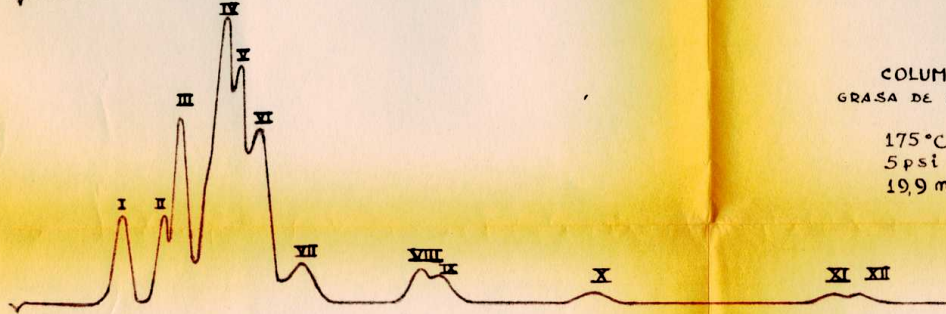
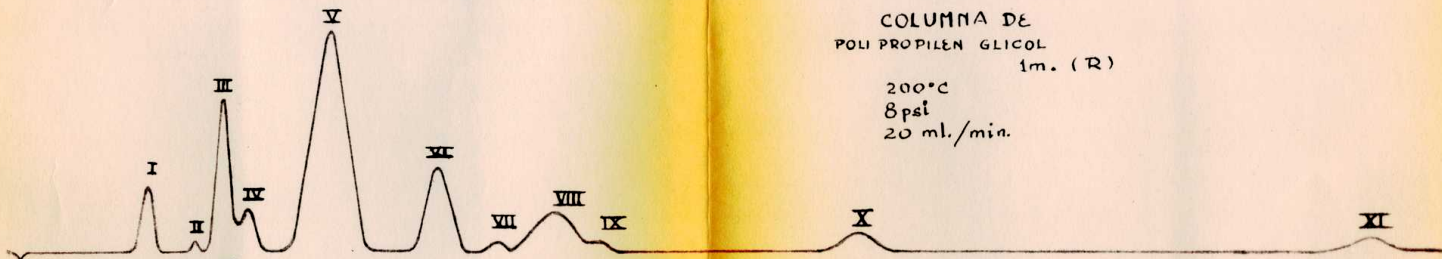


GRAFICO 1

obtenidos de los cromatogramas correspondientes a cada columna (gráfico 1) están tabulados en la tabla IX.

A estos datos se agrega el gráfico 2 donde se proyecta para cada columna los logaritmos de los valores de retención relativos, correspondientes a cada compuesto puro y a la mezcla total de los fenoles estudiados.

TABLA VIII

Volúmenes de retención relativos

Cromatografía de cada compuesto puro.

Gas portador : nitrógeno.

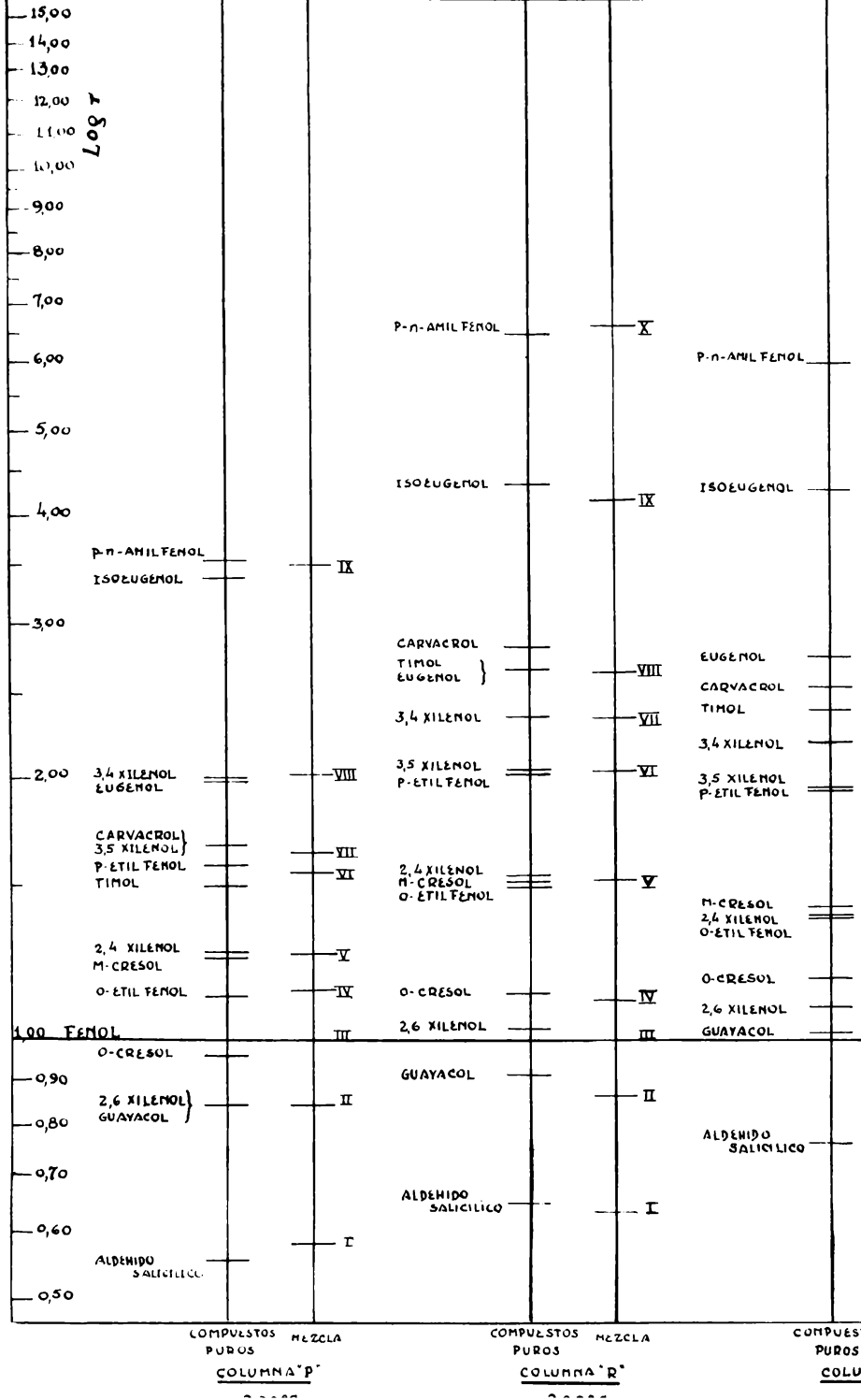
Compuesto de referencia: fenol.

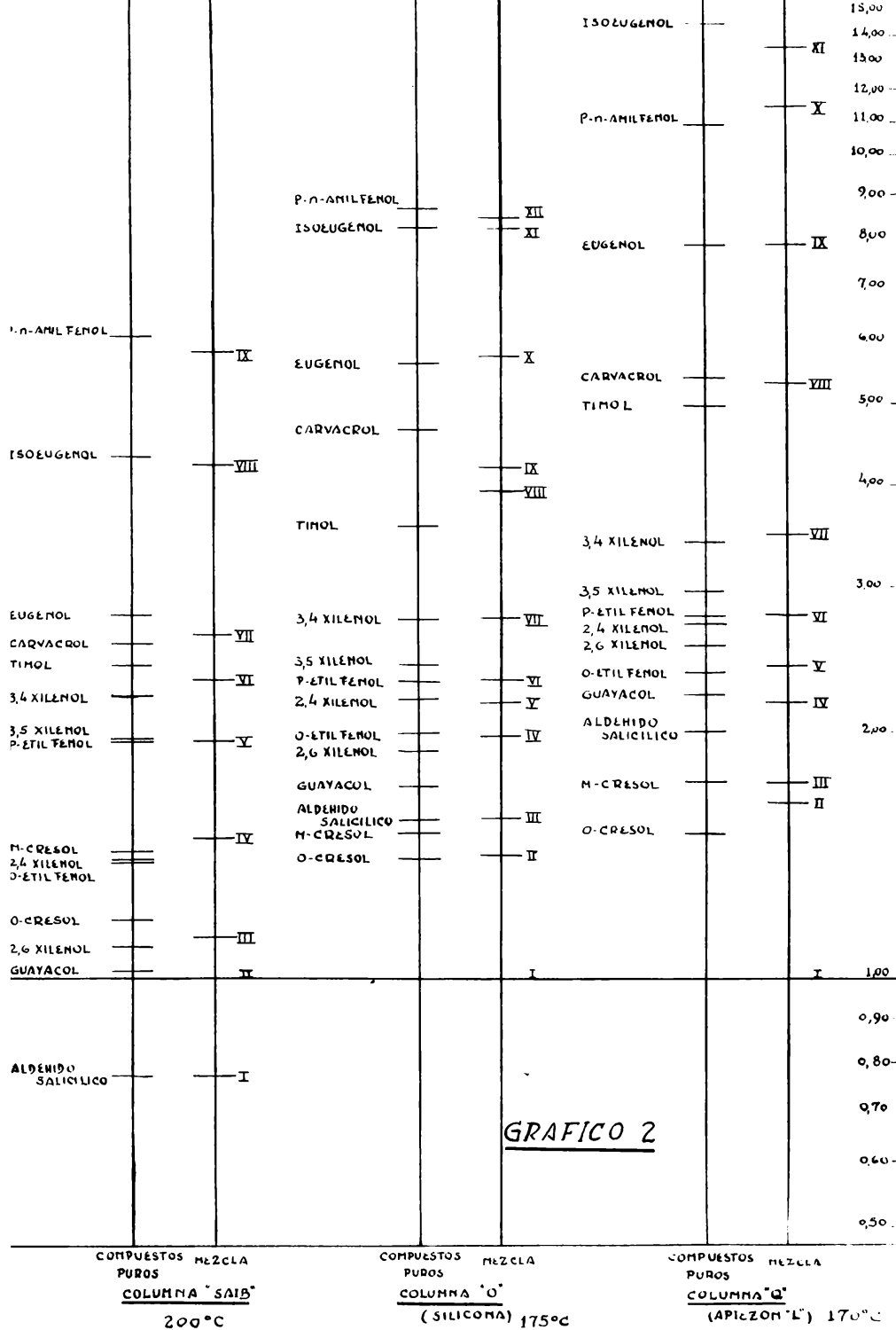
Columna:	"P"		"SAIB"	"R"	"Q"		"O"
Longitud:	1 m.		2 m.	1 m.	1 m.		2 m.
Temperatura: en °C	175	200	200	200	200	170	200
Fenol	1,00	1,00	100	1,00	1,00	1,00	1,00
o-cresol	---	0,96	1,17	1,13	---	1,50	1,40
ald. salicílico	---	0,55	0,76	0,65	---	2,60	1,55
m-cresol	1,35	1,25	1,42	1,51	---	1,73	1,50
guayacol	---	0,84	1,02	0,91	---	2,22	1,71
o-etil fenol	---	1,12	1,38	1,50	---	2,35	1,98
2,4 xilenol	---	1,26	1,39	1,54	---	2,70	2,18
2,6 xilenol	---	0,84	1,09	1,03	---	2,54	1,89
3,5 xilenol	---	1,67	1,95	2,04	---	2,95	2,41
p-etil fenol	---	1,58	1,94	2,02	---	2,74	2,29
3,4 xilenol	---	2,00	2,20	2,34	---	3,40	2,72
timol	1,67	1,50	2,40	2,66	4,70	4,97	3,54
carvacrol	---	1,67	2,55	2,82	4,80	5,35	4,63
eugenol	---	1,98	2,75	2,67	6,94	7,77	5,55
p-n-amil fenol	---	3,55	6,00	6,50	---	10,90	8,60
isoeugenol	---	3,40	4,30	4,35	---	14,40	8,15

TABLA IX

CROMATOGRAFIA DE LA MEZCLA TOTAL DE FENOLES

Col. "P" 1 m. 200°C			Col. "SAIB" 2 m. 200°C			Col. "R" 1 m. 200°C			Col. "O" 2 m. 175°C			Col. "Q" 1 m. 170°C		
pico	fenoles	r	pico	fenoles	r	pico	fenoles	r	pico	fenoles	r	pico	fenoles	r
I	ald. salic.	0,58	I	ald. salic.	0,76	I	ald. salic.	0,63	I	fenol	1,00	I	fenol	1,00
II	2,6 xil.	0,84	II	fenol	1,00	II	guayacol	0,86	II	o-cresol	1,41	II	o-cresol	1,64
	guayacol			fenol		1,00	III	m-cresol	1,57	III	m-cresol	1,73		
III	fenol	1,00	III	2,6 xil.	1,12	IV	2,6 xil	1,11		IV	ald. salic.	1,98	IV	ald. salic.
	o-cresol			o-cresol		o-cresol	guayacol ?	guayacol						
IV	o-etil fenol	1,14	IV	o-etil fenol	1,48	V	m-cresol	1,52	V	2,6 xil.	2,16	V	o-etil fenol	2,40
V	m-cresol	1,24		2,4 xil.		o-etil fenol	2,4 xil.		2,4 xil.	2,4 xil.				
VI	timol	1,55	V	3,5 xil.	1,94	VI	p-etil fenol	2,04	VI	p-etil fenol	2,30	VI	p-etil fenol	2,77
	p-etil fenol			p-etil fenol		3,5 xil.	3,5 xil.		3,5 xil.					
VII	3,5 xil.	1,64	VI	3,4 xil.	2,30	VII	3,4 xil.	2,34	VII	3,4 xil	2,74	VII	3,4 xil	3,46
	carvacrol			timol		timol	timol		timol					
VIII	eugenol	2,90	VII	carvacrol	2,59	VIII	eugenol	2,64	VIII	timol	3,90	VIII	carvacrol	5,32
	3,4 xil			eugenol		carvacrol	carvacrol							
IX	isoeugenol	3,52	VIII	isoeugenol	4,20	IX	carvacrol	2,85	IX	eugenol	5,67	IX	eugenol	7,80
	p-n-amil fend			p-n-amil fend		p-n-amil fend	p-n-amil fend							
						X	isoeugenol	4,14	X	isoeugenol	8,14	X	p-n-amil fend	11,45
						XI	p-n-amil fend	6,64	XI	p-n-amil fend	8,40	XI	isoeugenol	12,25





Discusión.

De las cinco columnas usadas en la cromatografía, se puede observar a simple vista en gráfico 2, que las dos columnas no polares (columnas "Q": Apiezoñ "L" y columna "O": silicona) presentan una gran semejanza en su comportamiento.

Columnas no polares.

Reñnen las siguientes características:

- 1- El orden de salida de los fenoles en ambas columnas coincide, excepto en el caso del o-etil fenol, 2,6 xilenol y p-n-amil fenol -isoeugenol, que se presentan en ese orden en la columna "Q" y en el inverso en la columna "O".
- 2- En la columna "Q" los compuestos fenólicos están más espaciados que en la columna "O", pero en la cromatografía de la mezcla total aparecen un menor número de picos que en el caso de la col. "O".
- 3- El orden de salida de los compuestos cromatografiados en columnas no polares, se produce por lo general, de acuerdo a los puntos de ebullición de dichos compuestos.

En el siguiente cuadro de valores se compara el orden de los fenoles cromatografiados según su punto de ebullición, con el orden de salida en cada una de las columnas.

TABLA X

Punto de ebullición en °C	Compuestos fenólicos	Orden de salida en :	
		Col. "Q" ,170°C	Col. "O" 175°C
183	fenol	fenol	fenol
190	o-cresol	o-cresol	o-cresol
197	ald. salicílico	<u>m-cresol</u>	<u>m-cresol</u>
202	m-cresol	<u>ald. salicílico</u>	<u>ald. salic.</u>
205	guayacol	guayacol	guayacol
207	o-etil fenol	o-etil fenol	<u>2,6 xilenol</u>
211	2,4 xilenol	<u>2,6 xilenol</u>	<u>o-etil fenol</u>
212	2,6 xilenol	<u>2,4 xilenol</u>	<u>2,4 xilenol</u>
	p-etil fenol	p-etil fenol	p-etil fenol
219	3,5 xilenol	3,5 xilenol	3,5 xilenol
225	3,4 xilenol	3,4 xilenol	3,4 xilenol
233	timol	timol	timol
237	carvacrol	carvacrol	carvacrol



Punto de ebullición	Compuestos fenólicos	Orden de salida en:	
		Col. "Q" 170°C	Col. "O" 175°C
253	eugenol	eugenol	eugenol
262	p-n-amil fenol	p-n-amil fenol	isoeugenol
267	isoeugenol	isoeugenol	p-n-amil fenol

Comparación del comportamiento de las columnas no polares utilizadas.

Columna "Q" (Apiezn "L")

Columna "O" (Silicona)

I- Los isómeros cresólicos se aproximan entre sí cuando se cromatografía su mezcla, separándose parcialmente.

Los isómeros cresólicos se separan parcialmente.

II- No se separan:

a- ald. salicílico-guayacol  
b- o-etil fenol-2,6 xilenol  
c- 2,4 xilenol-p-etil fenol-3,5 xilenol.  
d- timol-carvacrol

a- m-cresol-ald. salicílico.  
b- guayacol (puede corresponder al pico III o IV).  
c- p-etil fenol-3,5 xilenol.

III- Separan:

a- fenol  
b- o-cresol-m-cresol (parcialmente).  
c- 3,4 xilenol.  
d- eugenol.  
e- p-n-amil fenol.  
f- isoeugenol.

a- fenol .  
b- o-cresol.  
c- 2,4 xilenol.  
d- 3,4 xilenol.  
e- timol-carvacrol (parcialment  
f- eugenol  
g- isoeugenol-p-n-amil fenol (parcialmente).

Columnas polares .

Las columnas polares reúnen las siguientes características.

- 1- En las tres columnas polares el primer pico corresponde al aldehído salicílico.
- 2- En el caso de estas columnas los orto sustituidos de punto de ebullición más bajo aparecen primero, mientras que los de punto de ebullición más elevado y los sustituidos en meta y para, son los últimos en el orden de salida.
- 3- Tanto el isoeugenol como el p-n-amil fenol aparecen últimos, en ese orden de salida, no obteniéndose separación de ambos en el caso de la columna "K".

- 4- Solo unos pocos fenoles se pueden separar totalmente en este tipo de columna.
- 5- Durante la resolución de la mezcla total de fenoles, se observa en todos los casos que el pico correspondiente al fenol, es en realidad una mezcla que varía de acuerdo con la columna.
- En el siguiente cuadro se hará una reseña comparativa del comportamiento de la mezcla fenólica total en cada columna polar.

<u>Columna "P"</u>	<u>Columna "R"</u>	<u>Columna "SAIB"</u>
I- Separan:		
1-ald. salicílico	1-ald. salicílico	1-ald. salicílico
2-o-etil fenol (solo parcialmente del pico correspondiente a la mezcla: m-cresol,2,4 xil.)	2-guayacol 3-o-cresol 4- 3,4 xilenol 5- isoeugenol 6- p-n-amil fenol	2- isoeugenol 3- p-n-amil fenol

II- Datos de r obtenidos de la cromatografía de cada compuesto puro:

1- guayacol-2,6 xil.	1- timol-eugenol	1- o-etil fenol-2,4 xil.
2- carvacrol-3,5 xil.		2- p-etil fenol-3,5 xil.

III- No se separan:

1- fenol-o-cresol	1- fenol-2,6 xil.	1- fenol-guayacol
2- guayacol-2,6 xil.	2- m-cresol-2,4 xil.	2- o-cresol-2,6 xil.
3- m-cresol-2,4 xil.	-o-etil fenol	3- m-cresol-2,4 xil.-o-etil fenol
4- timol-p-etil fenol	3- p-etil fenol-	
5- carvacrol-3,5 xil.	4- timol3,5 xilenol	4- timol-3,4 xilenol
6- eugenol-3,4 xil.	1-eugenol-	5- carvacrol-eugenol
7- isoeugenol-p-n-amil fenol	-carvacrol	

Conclusiones.

De la representación gráfica dada, se puede observar:

- 1- Tanto las columnas polares como las no polares no resuelven en forma óptima a la mezcla total de fenoles; aunque para la separación de los compuestos de fracciones fenólicas no muy complejas, pueda servir cualquiera de estas columnas para resolverlas, dependiendo su elección de las características de dicha fracción.
- 2- Es imposible separar todos los fenoles isómeros C<sub>6</sub>-C<sub>9</sub> por medio de un único cromatograma gaseoso.

- 3- Además, comparando en el cuadro de valores la variación de los volúmenes de retención relativos en función de la temperatura, se observa que dichos valores disminuyen cuando la temperatura de operación aumenta.
- 4- Si comparamos los resultados obtenidos experimentalmente con la columna "Q" (Apiezón "L") y los publicados en el libro de Bayer (32), se observa que el orden de salida de dichos fenoles no altera, pero existe cierta diferencia entre ambos valores.

Comparación de volúmenes de retención relativa  
experimentales y publicados por Bayer

(a)

Componentes fenólicos puros	Columna "Q" (Apiezón "L")- 170°C		
	r publicados	r experimentales	diferencia
fenol	1,00	1,00	---
o-cresol	1,65	1,50	0,15
m-cresol	1,79	1,75	0,04
o-etil fenol	2,54	2,35	0,19
p-etil fenol	2,83	2,74	0,09
2,4 xilenol	2,90	2,70	0,20
2,6 xilenol	2,75	2,54	0,21
3,4 xilenol	3,64	3,40	0,24
3,5 xilenol	3,16	2,95	0,21

Referencias:

(a): Soporte : kieselguhr impregnado con 20% de Apiezón "L"

Los datos experimentales obtenidos son menores que los publicados por Bayer. Las diferencias oscilan entre 0,15 y 0,21 en todos los casos, excepto para el m-cresol y p-etil fenol, cuyos valores varían en 0,04 y 0,09 respectivamente, y finalmente el caso de 3,4 xilenol que presenta una mayor diferencia de 0,24.

Aunque en este estudio no se ha probado otro tipo de columnas que las anteriormente señaladas, es de interés mencionar el trabajo de Janák y Komers (33) que utilizaron como fase estacionaria algunos azúcares. Según estos investigadores, azúcares con grupos -OH 3-6 dan una buena separación de isómeros fenólicos de acuerdo a la naturaleza del impedimento estérico de sus grupos -OH fenólicos, y los

azúcares simples resultan convenientes y suficientemente estables para la separación de di-hidroxi fenoles.

En nuestro caso no dió resultado la cromatografía de los di-hidroxi fenoles, ya que estos no aparecieron en las condiciones operatorias aplicadas a las columnas utilizadas.

Janák y Komers aconsejan como fases estacionarias para el análisis de mezclas de di-hidroxi fenoles, el uso del manitol y dulcitol a 190°C, o inositol a 240-250 °C.

Para un análisis detallado de mono-hidroxi fenoles, se requiere necesariamente la combinación de dos fases, una conteniendo grupos  $\text{-CH}_2$  y la otra con grupos  $\text{-OH}$ .

En cuanto al tipo de azúcar que puede ser utilizado, debe contener al menos tres funciones  $\text{-OH}$  libres y deben ser estables y líquidos a la temperatura de operación.

De las columnas usadas por estos investigadores, merecen mencionarse las que tienen como fase estacionaria:  $\gamma$ -lactona del ácido galactónico, que trabajando a la temperatura de 190°C resuelve una mezcla de para y meta cresoles y también mezclas de xilenoles sustituidos en 3,4 ; 3,5 y 4,5, difíciles de separar.

De la misma forma se comporta una columna de manitol a 190°C y por último la de inositol a 230°C permitiría la salida más rápida de di-hidroxi fenoles tales como hidroquinol y resorcinol.

### COMBINACION DE COLUMNAS EN CROMATOGRAFIA GASEOSA

Esta técnica consiste en hacer pasar una mezcla a través de una sucesión de dos o tres columnas empaquetadas con fases líquidas distintas.

En el presente trabajo, la muestra cromatografiada se refiere a la mezcla total de fenoles, ya estudiada para cada columna en especial.]

Las columnas utilizadas para combinar fueron:

Columna "Q" (no polar), columna "P" y columna "R" (polares).

Las combinaciones elegidas dan el orden de colocación de las columnas; sea la mezcla pasaría primero a través de la columna mencionada en primer término, y luego a través de la segunda.

Las combinaciones son las siguientes:

- 1- Columna "Q" + Columna "P" = Columna (Q+P)
- 2- Columna "Q" + Columna "R" = Columna (Q+R)
- 3- Columna "R" + Columna "P" = Columna (R+P)

Las columnas utilizadas, cuya descripción se hizo anteriormente, fueron colocadas en serie, de tal forma que la longitud total era de 2 m.

Las condiciones operatorias, en todos los casos, fueron las siguientes:

Temperatura de la columna: 200 °C.

Velocidad de flujo: aproximadamente 20 ml. / min.

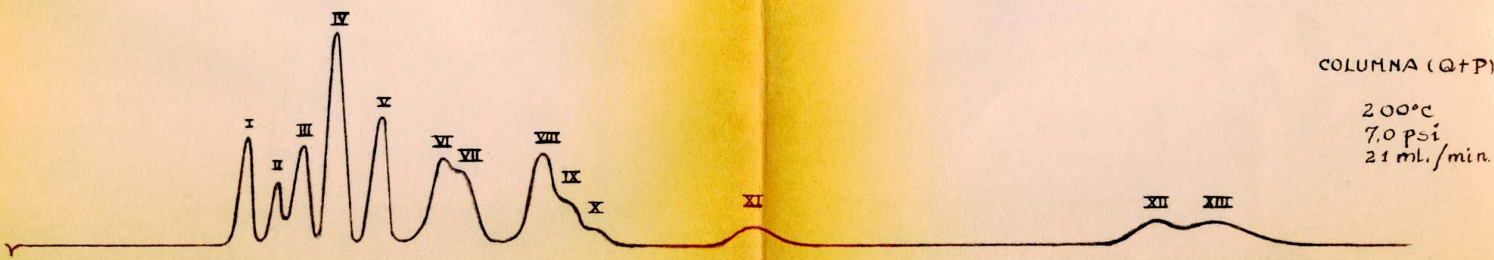
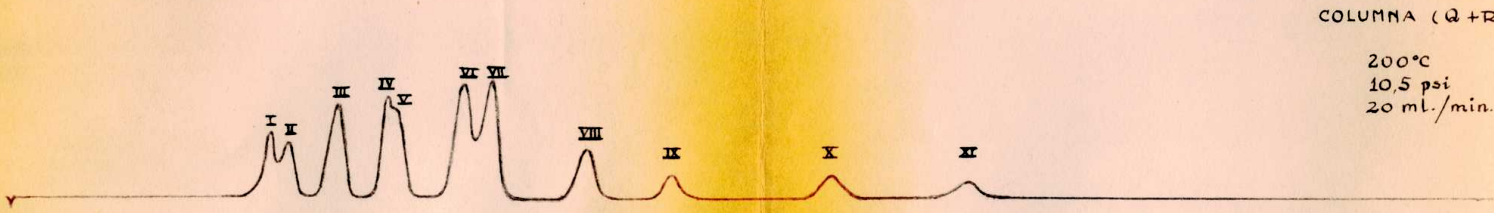
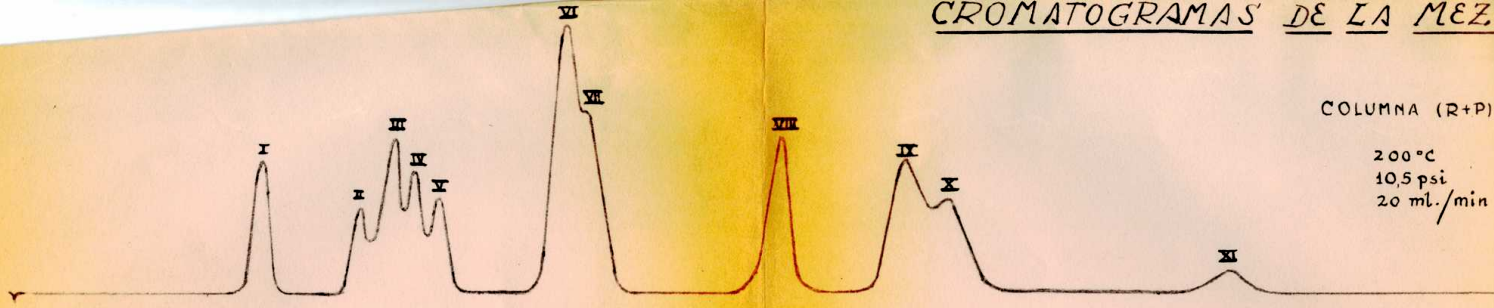
#### Resultados.

Si comparamos en el gráfico 3 los cromatogramas de la mezcla total obtenidos de las combinaciones de columnas, se ve claramente que el poder resolutivo es más efectivo en los casos en que la columna resultante es una combinación de una columna polar y otra no polar (columnas (Q+P) y (Q+R) ); en tanto que la combinación de dos columnas polares (R+P) no resuelve la mezcla y además, la realización de la cromatografía lleva más tiempo que en los otros dos casos mencionados.

También, observando la tabla XI y el gráfico 4 se pueden ver una serie de datos calculados para cada combinación

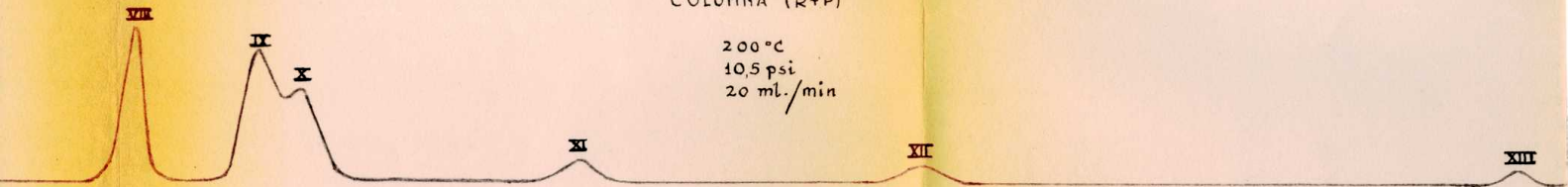
En el cálculo de datos se procede de la siguiente forma:

CROMATOGRAMAS DE LA MEZCLA



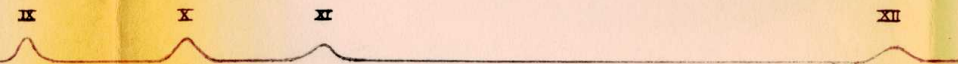
COLUMNA (R+P)

200°C  
10,5 psi  
20 ml./min



COLUMNA (Q+R)

200°C  
10,5 psi  
20 ml./min.



COLUMNA (Q+P)

200°C  
7,0 psi  
21 ml./min.

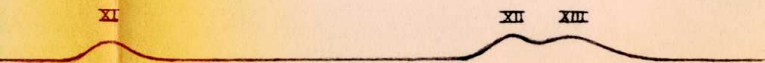


GRAFICO 3

TABLA XI

Columna (R+P)				Columna (Q+P)				Columna (Q+R)				
Orden de salida	r cal.	r exp. M.	pico n°	Orden de salida	r cal.	r exp. M.	pico n°	Orden de salida	r cal.	r exp. c/p	r exp. M.	pico n°
al.sal	0,61	0,62	I	fenol	1,00	1,00	I	fenol	1,00	1,00	1,00	I
guayac	0,85	0,87	II	al.sal	1,14	1,13	II	al.sal	1,12	1,07	1,06	II
2,6xil	0,93	0,95	III	o-cres	1,23	1,24	III	o-cres	1,26	1,26	1,25	III
fenol	1,00	1,00	IV	guayac	1,27			guayac	1,28	1,26		
o-cres	1,06	1,07	V	m-cres	1,41	1,40	IV	2,6xil	1,58	1,47	1,44	IV
o-et.f.	1,35	1,39	VI	2,6xil	1,53	1,56	V	m-cres	1,59	1,52	1,48	V
m-cres	1,39			o-et.f.	1,59			o-et.f.	1,81	1,69	1,72	VI
2,4xil	1,43	1,44	VII	2,4xil	1,73	1,83	VI	2,4xil	1,93	1,87	1,85	VII
p-et.f.	1,81	1,86	VIII	p-et.f.	1,99	1,91	VII	p-et.f.	2,28	2,14	2,20	VIII
3,5xil	1,85			3,5xil	2,04			3,5xil	2,28	2,24		
timol	2,13			3,4xil	2,52	2,24	VIII	3,4xil	2,71	2,60	2,53	IX
carvac	2,17	2,21	IX	timol	2,90	2,36	IX	timol	3,51	3,12	3,16	X
3,4xil	2,18			carvac	2,95	2,48	X	carvac	3,51	3,40	3,67	XI
eugen.	2,34	2,33	X	eugen.	3,41	3,14	XI	eugen.	4,33	3,72		
isoeug.	3,86	3,84	XI	p-n-am fenol	6,35	4,90	XII	isoeug.	7,20	6,00	5,88	XII
p-n-am fenol	5,20	5,45	XII	isoeug.	7,05	5,20	XIII	p-n-am fenol	8,20	7,25	7,24	XIII

Referencias:

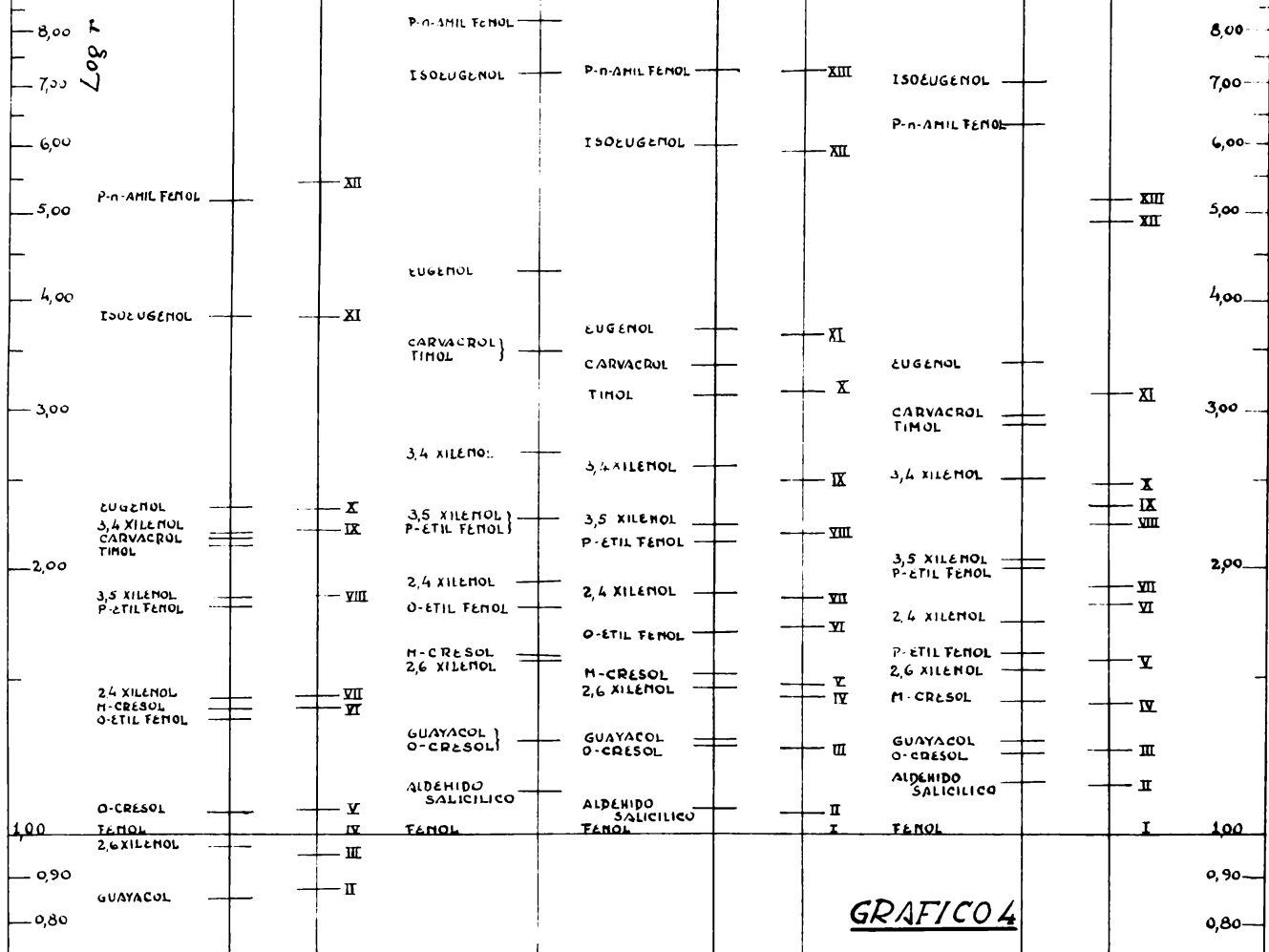
r cal. : vol. de retención relativos calculados.

r exp. : vol. de retención relativos experimentales.

M. : mezcla total de fenoles.

c/p. : compuestos puros





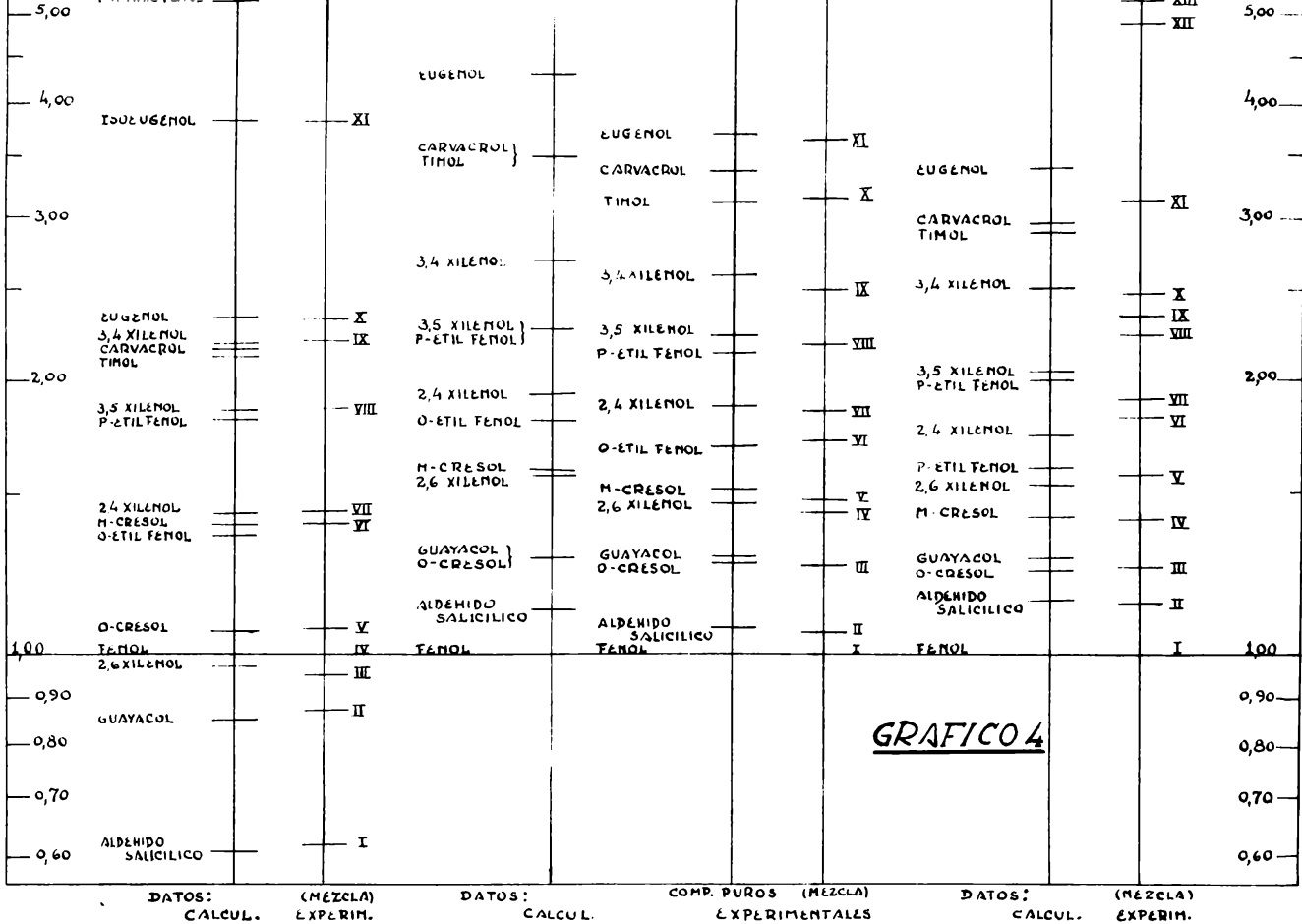


GRAFICO 4

DATOS:  
CALCUL.

(MEZCLA)  
EXPERIM.

DATOS:  
CALCUL.

COMP. PUROS (MEZCLA)  
EXPERIMENTALES

DATOS:  
CALCUL.

(MEZCLA)  
EXPERIM.

COLUMNA (R+P) - 200°C

COLUMNA (Q+R) - 200°C

COLUMNA (Q+P) - 200°C

- 1- Se suman los tiempos de retención correspondientes a cada componente de la mezcla total, cromatografiada sobre cada columna que interviene en la combinación.
- 2- La suma de dichos tiempos de retención, correspondientes a cada compuesto en particular, se lo divide por el obtenido para el fenol. Esta relación proporciona los volúmenes de retención relativos al fenol.

El resultado de la comparación de los datos experimentales y los calculados, que se puede observar en el gráfico 4 correspondiente a la proyección de logaritmos de  $r$ , es el siguiente:

Columna (R+P).

Los datos de  $r$  calculados y experimentales, concuerdan casi exactamente.

Se debe hacer notar que para asegurar la fidelidad de dichos datos, se cromatografiaron algunos fenoles puros a través de la combinación de columnas, obteniéndose volúmenes de retención relativos comparable a los predichos,

Esta concordancia es explicable, ya que ambas columnas R y P, trabajaron en iguales condiciones operatorias que la columna (R+P).

Además se puede añadir que en este caso la contribución de cada columna a la columna (R+P) es equitativa, ya que el  $r$  resultante puede ser obtenido también haciendo la media aritmética de los volúmenes de retención de cada columna en particular.

Columnas (Q+R) y (Q+P).

En estos casos los  $r$  no coinciden en forma tan categórica como en el caso anterior, pero los datos experimentales correspondientes a cada uno de los compuestos fenólicos en particular afirman que el orden de salida y la secuencia de los mismos no altera.

Por consiguiente, es fácil de identificar cada pico de la mezcla total cromatografiada en las columnas, con los datos calculados y proyectados en el gráfico 4.

Para estos casos no dió buenos resultados el procedimiento de la media aritmética de los  $r$  de cada columna particular, posiblemente porque la contribución de las columnas a la resultante no es igual. Además las condiciones operatorias de la columna Q fueron distintas a las de R y P respectivamente y también a las de las columnas (Q+R)

y (Q+P) ; luego es probable que esto contribuya a la no concordancia entre los datos calculados y experimentales.

Conclusiones.

De la observación de los cromatogramas y de los gráficos correspondientes a logaritmo de r, se pueden destacar las conclusiones numeradas a continuación:

- 1- Aumentó el número de picos como resultado de la combinación de dos columnas.
- 2- La resolución es más efectiva cuando se combina una columna polar con otra no polar (columnas (Q+R) y (Q+P) ).
- 3- La combinación de dos columnas polares origina otra columna polar.
- 4- La combinación de una columna polar y otra no polar origina una columna de comportamiento general no polar.
- 5- El orden de salida de los fenoles según su punto de ebullición, se cumple a partir del p-etil fenol en las columnas (Q+P) y (Q+R) pero en esta última hay una alteración, pues sale primero el iso-eugenol y luego el p-n-amil fenol.
- 6- Los fenoles de punto de ebullición menor no salen de acuerdo a sus puntos de ebullición en las columnas (Q+P) y (Q+R).
- 7- Como en el caso de las columnas simples, los primeros picos son agudos mientras que los últimos siempre aparecen achatados y ensanchados.
- 8- En general esta técnica presenta un evidente interés práctico, al que se puede agregar el hecho que se pueda predecir, conociendo los r de las dos columnas que se desean combinar, la secuencia de salida de los compuestos a cromatografiar y aún con bastante aproximación (siempre que la columna resultante trabaje en las condiciones operatorias que cada columna en particular) los volúmenes de retención relativos de dichos compuestos.

### Conclusión Final

Dos motivos especiales ha involucrado este trabajo:

- 1- El estudio experimental comparativo de técnicas cromatográficas a fin de ser aplicadas a la resolución de mezclas fenólicas de productos aromáticos.
- 2- La posibilidad de resolver el problema de la identificación de los fenoles de distinta estructura química presentes en una mezcla.

Las técnicas ensayadas fueron las siguientes:

- I- Cromatografía de adsorción sobre placas recubiertas con ácido silícico.
- II- Cromatografía de partición en columna de ácido silícico.
- III- Cromatografía de partición en fase gaseosa.

Cada técnica fue puesta a punto con un número de componentes fenólicos puros y con mezclas de algunos o todos ellos, para luego observar la posibilidad de analizar las fracciones fenólicas en los aceites esenciales.

En primer término se consideró la cromatografía de adsorción sobre placas de ácido silícico.

La técnica se ensayó con los componentes puros y luego se pasó a la resolución de mezclas de dos, cuatro y diez componentes. Aquellos fenoles de estructura semejante presentan valores de  $R_f$  muy próximos y por consiguiente dificultan su identificación.

En el caso de los aceites esenciales se debe destacar que si bien esta técnica no es definitiva, resulta de gran utilidad pues ofrece dos ventajas: rapidez y poder de resolución. Estas ventajas hacen que el método sea utilizado en el caso de una confirmación o bien para dar una idea de la complejidad de la fracción analizada.

La segunda técnica considerada fue la cromatografía de partición sobre columna de ácido silícico.

Este método, como ya fue comentado, no es rápido y presenta inconvenientes en la resolución de mezclas.

Aplicado a fracciones fenólicas de aceites esenciales, solo serviría para separar la fracción inicial en otras de menor número de componentes, pudiéndose verificar la complejidad de cada fracción recogida con ayuda de una rápida cromatografía de adsorción o mediante la cromatografía gaseosa. Por medio de esta última técnica se podría

intentar la separación de los componentes, o mezclas de componentes, recogiendo las fracciones correspondientes a cada pico; o bien aplicar la cromatografía de partición en columna y tratar de separar fracciones más simples haciendo nuevos corrimientos y probando distintas condiciones.

En resumen, esta técnica no es valiosa por sí misma, pero su aplicación puede ser de interés si se las combina con otras técnicas más útiles para el análisis.

El tercer punto de este trabajo fue la cromatografía de partición en fase gaseosa.

Se puede dividir en dos partes, según se utilicen :

- 1- Columnas simples (aquellas que contienen un solo tipo de fase estacionaria).
- 2- Combinación de columnas (cada columna contiene fases estacionarias distintas)

En el primer caso se trabajó con columnas polares (aquellas que tienen como fase estacionaria, sustancias de naturaleza polar) como la de succinato poliester de di-etilen glicol (columna "P"), polipropilén glicol (columna "K") y di acetato hexa isobutirato de sacarosa (columna "SAIB") ; o bien columnas no polares (tienen fase estacionaria de naturaleza no polar) como la de grasa de silicona (columna "O") y Apiezón "L" (columna "Q").

Las fases estacionarias se hallaban recubriendo soportes pulverulentos inertes, en una proporción de 10 % en peso.

Los resultados tabulados se obtuvieron en condiciones operativas previamente determinadas, y los parámetros de retención relativos estaban referidos en todos los casos al fencl. En primer término se cromatografiaron los compuestos fenólicos puros y luego la mezcla total de ellos.

Si observamos el gráfico correspondiente al logaritmo de volúmenes de retención relativos se ve que hay una concordancia singular respecto al comportamiento de columnas polares por un lado, y columnas no polares por otro. Estas últimas siguen un orden de salida análogo, salvo algunas excepciones, al orden en que se presentan los fenoles cromatografiados según sus puntos de ebullición; pero las columnas polares siguen otra secuencia, y aunque en este trabajo no se realizó, sería interesante relacionar el orden de salida de los fenoles

cromatografiados, con la polaridad de sus moléculas, si es que dicha relación existe.

En el segundo caso se hicieron combinaciones binarias de las columnas "K", "P" (polares) y "Q" (no polar) y se estudiaron los resultados.

Aquí es interesante destacar la posibilidad de predecir los resultados de volúmenes de retención relativos, antes de hacer cualquier experimento, observándose que, aún cuando las condiciones operatorias de ambas columnas no coincidan, la predicción de la secuencia del orden de salida de los fenoles no altera, si bien los valores calculados no concuerdan con los experimentales.

Este hecho interesa desde el punto de vista práctico, pues teniendo los datos correspondientes a cada columna, se puede hacer un estudio previo a la elección de las que se utilizarán para combinar, a fin de separar los componentes de la mezcla.

De la comparación de los métodos usados en este estudio, y considerando la reproducibilidad y exactitud de datos, y la rapidez del trabajo, se llega a las siguientes conclusiones:

- 1- Tanto la cromatografía de adsorción como la de partición en fase gaseosa proporcionan datos reproducibles y exactos, dentro de ciertos límites de error.
- 2- Ambos métodos son rápidos de llevar a cabo.
- 3- Si la cromatografía gaseosa es aplicada a fracciones fenólicas, se pueden aislar las fracciones correspondientes a cada pico y a su vez estas pueden ser analizadas para controlar si se trata de sustancias puras o mezclas de las mismas, aplicando cromatografía de adsorción, o bien cromatografía gaseosa pero con otra columna u otras condiciones operatorias de acuerdo a la naturaleza de la fracción.
- 4- Estos métodos pueden ser tomados como decisivos en algunos casos determinados de confirmación, pero no siendo así al menos proporcionarán una idea bastante acertada de la complejidad de las muestras.

En resumen, tanto la cromatografía en fase gas-líquido como por adsorción sobre placas de ácido silícico pueden ser aplicadas en el análisis de los componentes fenólicos de los aceites esenciales resulta, en cambio, poco recomendable la partición en columnas de ácido silícico hidratado.

.Bibliografía.

- 1- Harold H. Strain y Takyua K. Sabe  
An. Chem. Vol. 28, n<sup>o</sup> 4 (1956) 687-94.
- 2- G. Hesse Berl, Lunge, D'Ams  
Anal. Quim. Ind. Apéndice I (1950).
- 3- J. G. Kirchner, J. M. Miller y G.J. Keller.  
Anal. Chem. 23, (1951) 420.
- 4- Mehinard y Hall  
Anal. Chem. 21, (1949), 185.
- 5- J. Labat y A. L. Montes.  
Anales de la Asoc. Quím. Arg. 41 (1953), 166-76.
- 6- Stahl, Schöter, Kraft y Kenz.  
Die Pharmazie 11, (1956), 633.
- 7- Miller, Kirchner.  
Anal. Chem. 26, (1954), 2002.
- 8- Miller, Kirchner.  
Anal. Chem. 25, (1953), 1107,
- 9- Miller, Kirchner,  
Anal. Chem. 24, (1952), 1480.
- 10- Miller, Kirchner.  
Anal. Chem. 23, (1951), 428.
- 11- Spicket  
Chem. & Ind. (1957), 561.
- 12- B. Frydman, A. L. Montes y A. Trojarsky.  
Anales de la Asoc. Quím. Arg. 45, (1957), 248-64.
- 13- Onoe  
Chem. Zeutrabl 127, (1956), 3958.
- 14- Wagner.  
Die Pharmazie 10, (1955) 302.
- 15- Fukuyi, Okata  
J. Agro. Chem. Soc. Japan 27, (1953) 353. C. A. 50, (1956), 15027
- 16- Stanley, Vannier  
J. Am. Chem. Soc. 79, (1957), 3488.
- 17- Elder & Springer  
J. Phys. Chem. 44, (1940), 943.
- 18- Linford.  
J. Biochem. and Physiol. 34, (1956), 1155.



- 19- F. B. Moseley, A. L. Le Rosen y J. E. Carlton.  
An. Chem. Vol 26, n<sup>o</sup> 10 (1954)
- 20- E. K. Treviño.  
Rev. de la Soc. Quím. de México Vol. II, n<sup>o</sup> 12, (1950)145-60
- 21- H. W. Johnson y F. H. Stross.  
Anal. Chem. 30, 10, (1958), 1586.
- 22- W. Jones y K. Kieselbach.  
Anal. Chem. 30,10, (1958), 1590.
- 23- Ambrose, Keulemans: y Furnell.  
Anal. Chem. 30, 10, (1958)1582.
- 24- Vapour Phase Chromatography 1956 (ed. D.H. Desty) p.XI,  
Butterworths, London 1957.
- 25- Gas Chromatography 1958 (ed. D.H. Desty) P. XI, Butterworths,  
London 1958
- 26- Gas chromatography (ed. V.J. Coates, H.J. Hoebels and J.S.  
Ferguson), pag. 315, Academic Press, New York, 1958.
- 27- T. K. Sweeney y J. D. Bultman.  
Anal. Chem. Vol. 25, (1953), 1358.
- 28- Grignard.  
"Traité de Chimie Organique" Vol. XV, (1937).
- 29- I. Hernandez, R. Hernandez Jr. y L. R. Axelrod.  
Anal. Chem. Vol. 33, n<sup>o</sup> 3, (1961), 370-3.
- 30- Leitzema.  
Anal. Chem. 26,(1954), 960.
- 32- Gas Chromatography, E. Bayer, Tabla 26, pag. 213.
- 33- J. Jának y K. Komers  
(ed. D.H. Desty) Gas Chromatography, Butterworths, Sci. Publ.,  
London 1958, p. 343.

*delgado fronte*

*A. R. Aguirre*