

# EL METODO CROMATOGRAFICO

Por el

Dr. D. FRANCISCO SIERRA

Catedrático de la Facultad de Ciencias

Entre las aplicaciones más interesantes de la adsorción se cuentan, sin duda alguna, las que derivan del uso de la cromatografía, que ha alcanzado en la actualidad gran importancia, tanto desde el punto de vista analítico como por sus aplicaciones industriales.

## **Fundamentos de la adsorción cromatográfica**

La adsorción por un material determinado de sustancias diversas es, como es sabido, un fenómeno selectivo. Pero con carácter casi universal podemos afirmar que la acción específica de un adsorbente determinado es más cuantitativa que cualitativa. Es casi imposible que una fase adsorbente, excelente para retener algunas especies, aunque incluso hayan sido activadas para la adsorción de las mismas, sea incapaz en absoluto de adsorber a otras. Por ello una mezcla de cuerpos disueltos en un disolvente tendrá especial actividad separadora para algunos de ellos. Pero, por pequeño que sea, habrá siempre un porcentaje de retención de todos los demás; porcentaje tanto más grande cuanto mayor sea el valor que tenga la concentración de estos últimos en la disolución y menor la que corresponda a la o las especies para las que presente el adsorbente mayor afinidad de adsorción.

Por ello, cuando se agita un adsorbente determinado en polvo (car-



bón, gel de sílice, alúmina, etc.) con una disolución de varias especies, tiene lugar una separación parcial más o menos grande de todos los cuerpos de la disolución. Pero existe a modo de un impedimento estérico que se opone a la adsorción de los menos adsorbibles, al menos en cantidad prácticamente respetable.

Pero, además, incluso aunque sólo existieran el disolvente y únicamente un soluto, las diversas ecuaciones isoternas de adsorción nos enseñan que en estas condiciones se llegaría a un estado de equilibrio repartiéndose el soluto entre el adsorbente y el disolvente; y por favorable que resultara el equilibrio en el sentido de la mayor adsorción, la concentración de la disolución en la especie separable no sería nunca cero. No se realiza, en estas condiciones, una verdadera separación total. Distinto será el comportamiento del adsorbente si en lugar de ser agitado con la mezcla se hace filtrar a través de una columna del adsorbente.

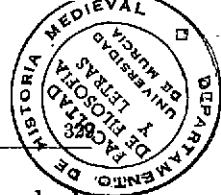
En efecto, la disolución natural o artificial en un determinado disolvente de las diversas especies (disolución de principios inmediatos de procedencia animal o vegetal o un problema analítico) se hace filtrar lentamente vertiéndola desde la parte superior a través de una columna de vidrio puesta verticalmente y llena sin apelmazar demasiado con el adsorbente que convenga (alúmina, talco, carbonato cálcico, etc.). Supongamos que en estas condiciones filtramos una disolución que contenga un solo soluto. Se comprende que la columna se comportará como si estuviera constituida por la superposición de infinitas capas infenitesimales, a cada una de las cuales le corresponderá una cantidad adsorbida distinta; pues la disolución que atravesó la primera capa se empobreció por adsorción a su paso por ella. La segunda capa tendrá nueva cantidad de soluto en cantidad inferior a la primera. Pero el valor de lo adsorbido en dicha capa no será cero. Y después de atravesar un cierto número de capas, a una distancia más o menos grande del nivel superior de la primera capa, la adsorción resultará prácticamente total.

Si la sustancia fuera coloreada podría percibirse perfectamente en la columna una banda coloreada, aunque de mayor tonalidad en la parte superior que en la inferior.

Si se hubiera filtrado una disolución con varios solutos, ocurrirá el fenómeno anterior en primer término con la especie más adsorbible; y lo que llamábamos antes impedimento estérico determinará la imposibilidad, al menos en cantidad prácticamente interesante, de que se retengan los otros solutos.

Mas a medida que la disolución atraviesa las sucesivas capas y se empobrece en el primer soluto, la adsorción, que es función de la concentra-





ción, se desplazará hacia la retención del segundo de los cuerpos de la mezcla. Llamando segundo de los cuerpos de la mezcla al que sigue específicamente en un orden preferente de adsorbilidad respecto al adsorbente empleado.

Es indudable que las últimas capas que aún adsorbieron el primer soluto superpondrán también las primeras porciones del segundo.

Se originan de esta manera en la columna diversos niveles o bandas y zonas de tránsito.

Si las sustancias que lleva el disolvente son coloreadas, se aprecia su diversidad por el color de las capas. Mas si la banda de tránsito resultara muy ancha, estrechando la observación de las vecinas, se procede a lo que se llama el *desarrollo del cromatograma*. Esto se consigue lavando la columna varias veces con el disolvente puro.

Al pasar el disolvente puro por la primera capa, como su concentración en el cuerpo adsorbido por ésta es cero, arranca (adsorción reversible) parte de la especie que tiene adsorbida. Al pasar el disolvente por la segunda capa, como lleva ya un solvato, será menor el arranque de sustancia retenida, aunque también hay descomposición parcial del adsorbato (1). De esta forma, por sucesivas eluciones y readsorciones, se logra el aumento de las bandas y la disminución, e incluso en ocasiones supresión, de las zonas de tránsito.

Si las sustancias que se han de separar por cromatografía no son coloreadas, puede desarrollarse el cromatograma empleando un *revelador*. Es decir, filtrando después a través de la columna una disolución reactiva que, al reaccionar con los compuestos retenidos en las diferentes capas de la columna, origina combinaciones diversamente coloreadas e igualmente retenidas y que diferencia las bandas.

### Origen de la denominación del método

A esta diferenciación y separación de los diferentes cuerpos disueltos —y en mezcla— en bandas observables por su color propio o de revelado, y debido a que este interesante método fué introducido por el botánico ruso Tswett en 1906 (2), precisamente separando pigmentos coloreados de plantas, se debe la denominación del método: *método de análisis cromatográfico*. Pero empleando la denominación de *análisis* en su sentido químico más amplio; es decir, *de separación de especies*. Ya que no sólo se ponen de manifiesto, por este método, las diversas especies que cons-

(1) Adsorbato es el producto resultante de la unión del adsorbente con la sustancia adsorbida.

(2) Ber. deut. bot. Ges., 1906, 24, 316.



tituyen una mezcla, sino que puede procederse incluso a la separación mecánica separando los diversos trozos que encierran las distintas sustancias y por elusión con diferentes disolventes.

Son muchísimas las aplicaciones que se han derivado de este método desde que Tswett en 1906 desdobló así el extracto en éter de petróleo de las hojas verdes, usando carbonato cálcico como material adsorbente.

### Importancia de la cromatografía

Más aún, la técnica cromatográfica constituye en estos últimos años el método más eficaz para la separación, purificación e identificación de pequeñas cantidades de complejos orgánicos.

Y en ocasiones constituye incluso el único método conocido.

Para la elección del disolvente más apropiado y la descripción detallada de las operaciones, en general, pueden consultarse los trabajos de H. G. Cassidy (3 y 4) y la excelente obra de Zechmeister (5). Vamos a dar ahora un resumen general sobre las diversas clases de disolventes, eluyentes, adsorbentes, etc.

### Disolventes y eluyentes

Puede emplearse como disolvente de la mezcla, según los casos: agua, cloroformo, éter, benceno, petróleo, éter de petróleo y sulfuro de carbono.

Y para la elución es corriente el empleo del mismo disolvente que se utilizó para el extracto con mezcla de pequeña cantidad de otros cuerpos o disolventes.

Así algunos cromatogramas realizados a partir de disoluciones benecénicas o en petróleo pueden separarse de una manera rápida por elusión, empleando para ello el mismo disolvente con un poco de alcohol. Otras separaciones de especies disueltas en medio acuoso requieren para la elución disoluciones salinas apropiadas de pH definido.

No es posible dar reglas generales sobre el disolvente que deba emplearse, pues depende de cada caso particular. En ocasiones, aunque no siempre, el alcohol de los extractos que han de separarse entorpece la adsorción. Y el agua, a ser posible, se evitará (cuando no se trate de cromatografía mineral), eligiéndose un disolvente orgánico. Pues el medio acuoso tiene el inconveniente de que la filtración es lenta. Es de interés en ocasiones el valor más conveniente para el pH.

(3) Chem. Educ., 1939, 16, 88.

(4) J. Biol. Chem., 1933, 99, 417.

(5) Zechmeister y Chohnoky, Die chromatographische Adsorptionsmethode, Springer.— Viena, 1938.



## Materiales adsorbentes

Son muy variados los cuerpos que se emplean como adsorbentes para el llenado de las columnas cromatográficas.

Uno de los más empleados ha sido la alúmina activada por procedimientos que dependen de la clase de mezcla para cuya separación haya de ser empleada. Se emplean también el caolín, las permutitas de ácidos sulfónicos. El azúcar para la clorófila; el hidróxido cálcico para los carotinoides y vitamina A; el carbonato cálcico para xantofilas; el óxido de magnesio para carotenos y otros pigmentos de plantas. Es ya corriente el empleo de columnas con capas de distintos adsorbentes. Y se han empleado además mezclas adsorbentes homogenizadas de varios productos. E industrializado la fabricación de las mismas para ciertas separaciones técnicas, presentándose en el mercado distintos productos patentados como el Aluminiun oxigol según Brockman y la alúmina para cromatografía de Prolabo.

El grosor de los trozos del adsorbente conviene que sea homogéneo y entre 1,5 a 10 milimicras.

Cuanto más fino es el grosor del grano más intensa es la adsorción. Sin embargo, los polvos muy finos dificultan la filtración.

Respecto a la activación, depende, desde luego, de la naturaleza del adsorbente y ofrece un amplio campo de estudios.

Así Launie activa la alúmina por tratamiento con HCl. Phiprs disminuye la actividad de la misma por lavado con metanol y desecación al aire.

Wislicenus (6) hace una exposición general sobre la analogía de la alúmina fibrosa y las materias fibrosas orgánicas bajo el punto de vista de sus propiedades físicas y mecánicas con miras a la preparación de diversas variedades para fines de adsorción.

## Las columnas cromatográficas

Las columnas para la carga del adsorbente suelen ser cilíndricas, aunque también se emplean tubos prismáticos de cuarzo para la adsorción de cuerpos fluorescentes, cuya observación ha de hacerse con luz ultravioleta.

Los tubos pueden ser largos y cortos. Para la adsorción en medio acuoso, en cuyo caso la filtración es a menudo lenta, se emplea un tubo largo. Y cuando las cantidades a adsorber son importantes, se ponen en acción varios tubos a la vez.

(6) Kolloid-Z, 1942, 100, 66-82.



Los tubos cortos llevan en la parte inferior cerrando la columna un tapón de algodón; los más largos, una placa porosa.

A veces se emplean tubos capilares y otros tubos de diámetro mayor (3 mm. de sección). El uso de un tubo estrecho (1-2 mm.) aumenta mucho, a veces, la sensibilidad de la reacción cromatográfica. Son muy usados pequeños tubos de 3-5 cm. de longitud y 3 mm. de sección.

Para llenar el tubo se coloca primero en el extremo inferior un fragmento de algodón o una placa porosa, según el tubo sea corto o largo. Se introduce el adsorbente en pequeñas cantidades en el tubo y se le comprime bien con un taco de madera, efectuando al mismo tiempo una ligera succión. Para cargarlos bien, conviene a veces hacer una suspensión previa del adsorbente en una disolución adecuada.

### Momento dipolar y adsorción

R. T. Arnold (7), por un cuidadoso examen de numerosos experimentos e investigaciones, ha revelado la importancia de los dipolos en la determinación del orden de adsorción por un medio adsorbente polar (por ejemplo, óxido alumínico). Establece que entre las moléculas isoméricas conteniendo el mismo número y clase de grupos funcionales, aquellas que posean mayor momento dipolar son más fuertemente adsorbidas por aquél. Así Karrer ha demostrado que el orden de colocarse en el tubo los monitrofenoles es, primero, el *para*; seguidamente, el *meta*; y, finalmente, el otro compuesto. Otros autores obtienen resultados análogos con las correspondientes nitroanilinas.

Desde luego no están influenciados estos procesos por la basicidad o la acidez.

En los casos en que no existe un dipolo permanente, serán más fuertemente adsorbidos y, por consiguiente, se tendrán en la primera banda de la columna aquellas sustancias de alto peso molecular con fácil tendencia a la formación de dipolos inducidos. Este es el caso de los polienos de Kuhn.

Además, el número de dipolos aislados en una molécula es de importancia; por ello el ácido pícrico con tres grupos nitro es más fuertemente adsorbido por el óxido alumínico.

### La cromatografía en Química Orgánica y Biológica

Hasta el presente el método que nos ocupa ha encontrado su máxima aplicación en el reconocimiento analítico y separación de los productos complejos de animales y plantas.

(7) J. Amer. Chem. Soc., 1939, 61, 1.611.



Cualitativamente considerado proporciona un procedimiento sensible de análisis de vitamina A y otros carotinoides en el suero sanguíneo.

Después de la hidrólisis del suero con hidróxido potásico se hace pasar el extracto de petróleo a través de una columna de alúmina y en forma de anillos definidos se descubre hasta 0'5  $\eta$  g de caroteno  $\alpha$  ó B, o de criptoxanteno en el cromatograma resultante. Pueden además separarse con mezclas convenientes de petróleo ligero y benceno. Del mismo modo pueden determinarse los carotinoides en la leche empleando alúmina en la columna y, aunque con menos efectividad, empleando como adsorbente el hidróxido cálcico. La elución se realiza en este caso o con la mezcla benceno-petróleo o con la de benceno y alcohol metílico.

También se han obtenido resultados interesantísimos por este método (8) en la separación de las aminas alifáticas y los productos de hidrólisis de las proteínas.

También se ha logrado la separación cromatográfica por una tierra decolorante especial de los alcaloides del opio, morfina, codeína, narcotina y papaverina extraídos en disolución bencénica (9).

Son de importancia los excelentes resultados logrados por el método en la extracción de diversas vitaminas y últimamente para la extracción de la penicilina de los medios donde se forma.

### La cromatografía inorgánica

En la Química Inorgánica, al igual que en la Biología, presta también el método valiosa ayuda en la separación de complejos minerales, principalmente de la serie del cobalto.

Así se ha logrado la separación de los isómeros *cis* y *trans* de las sales de cloruro de Co III-dicloro tetramina. Las sales de dicloro tetramina se distinguen por una gran inestabilidad en las disoluciones. M. M. Aumeras e I. Soned han preparado la forma *cis*, siguiendo el método propuesto por Werner, que consiste en hacer actuar el ácido clorhídrico en disolución en el alcohol puro sobre el cloruro de cobalto tetramina. El resultado de la reacción va impurificado siempre de cloruro de la sal *trans*; presentándose en disolución alcohólica en forma de un líquido azul. Es sabido que, según la observación de Werner, las disoluciones de la sal violeta preparadas recientemente son azules; y pasan rápidamente a una coloración violeta.

La muestra que contiene las dos formas se somete a la separación cro-

(8) A. Lottermoser y K. Edelmann, *Kolloid-Z.*, 1938, 83, 262.

(9) G. R. Levi y F. Castelli, «Gazzetta», 1938, 68, 495.

(10) Bull. Soc. chim., 1942, 203.

matográfica empleándose alúmina como adsorbente. Se observaron claramente las dos zonas, verde y azul, de los dos isómeros.

Cortadas las porciones de la columna, se someten separadamente a la acción del alcohol absoluto, que se emplea para la elución. Y se recogen en cristalizadores aparte, evaporando al baño de María. Desde luego, en cromatografía se procede muchas veces a separaciones cromatográficas sucesivas en nuevas columnas.

Las disoluciones de cabeza dan disoluciones verdes; las de cola son azules, que pasan a verdes después de un cierto tiempo.

Pero lo más espectacular del método cromatográfico lo ha constituido su aplicación para la separación de isótopos. Y se ha logrado recientemente por este procedimiento la separación de los isótopos del litio.

### Análisis mineral cromatográfico

No menor importancia tiene el método cromatográfico en el análisis inorgánico, sobre todo para la investigación de impurezas en los reactivos (11). Los distintos *cationes* se adsorben por la alúmina a partir de disoluciones acuosas neutras en el siguiente orden:

$Sb^{+++}$ ,  $Bi^{+++}$ ,  $Cr^{+++}$ ,  $Fe^{+++}$ ,  $UO_2^{++}$ ,  $Pb^{++}$ ,  $Hg^{++}$ ,  $Cu^{++}$ ,  $Ag^+$ ,  $Zn^{++}$ ,  $Co^{++}$ ,  $Cd^{++}$ ,  $Ni^{++}$  y  $Mn^{++}$ .

Este orden no se altera por la naturaleza del anión que forma la sal con el catión. Entre algunos términos de la serie anterior es muy poco marcada la separación cromatográfica. Pero pueden diferenciarse mejor las bandas correspondientes por adición previa de un elemento que presente una afinidad de adsorción intermedia. El hidrógeno ión ( $H^+$ ) es adsorbido como cualquier otro metal. El orden de adsorbilidad de una serie, además de la naturaleza del adsorbente empleado, varía con el estado simple o complejo en que se encuentran los cationes en el medio. Así es distinto el orden en la serie anterior si la solución es amoniacal o en un medio alcalino con tartrato.

De igual modo pueden ser separados y descubiertos los aniones (12) por adsorción con columna de alúmina previamente tratada con ácido nítrico diluido. El orden es:

$OH^-$ ,  $PO_4^{---}$ ,  $F^-$ ,  $CrO_4^{--}$ ; y  $Fe(CN)_6^{---}$ ,  $SO_4^{--}$ ,  $Cr_2O_7^{--}$ ; y  $Fe(CN)_6^{---}$ ,  $Cl^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $MnO_4^-$ ,  $ClO_4^-$  y  $S^{--}$ .

Veamos algunas aplicaciones. Supongamos una disolución de nitrato férrico, nitrato cúprico y nitrato cobaltoso. Después de filtrada vertiéndola por la parte superior de la columna cromatográfica, se lava con agua

(11) G. M. Schwab y K. Jockers, *Naturwiss.*, 1937, 25, 44.

(12) G. M. Schwab y B. Dattler, *Angew. Chem.*, 1937, 50, 691.



para extender las bandas; se ve entonces a simple vista de arriba a abajo las siguientes bandas de color: parda ( $\text{Fe}^{+++}$ ), azul ( $\text{Cu}^{++}$ ) y rosa ( $\text{Co}^{++}$ ). Para que la observación sea más clara y aunque los iones sean todos coloreados, se le añade ahora un revelador. Empleando como tal una disolución de ferrocianuro potásico, se apreciará ahora perfectamente las bandas azul (ferrocianuro férrico), parda (ferrocianuro cúprico) y verdosa (ferrocianuro de cobalto).

He aquí otros cromatogramas de algunos otros grupos.

A) *Cationes del grupo del clorhídrico.*—Se parte de una disolución acuosa de nitrato de plomo, nitrato de talio y nitrato de plata.

Adsorbente, alúmina. Revelador, cromato potásico.

Cromatograma:

- |    |                        |                                 |
|----|------------------------|---------------------------------|
| a) | Zona amarilla. . . . . | $\text{Pb}^{++}$                |
| b) | Zona roja . . . . .    | $\text{Ag}^+$ ( $\text{Tl}^+$ ) |
| c) | Zona amarilla. . . . . | $\text{Tl}^+$                   |

La segunda zona es más bien una zona de tránsito.

Para deshacer dudas, se hace un segundo cromatograma con los mismos elementos y constituyentes del cromatograma anterior; pero empleando como revelador el sulfuro amónico.

Cromatograma:

- |    |                             |                  |
|----|-----------------------------|------------------|
| a) | Zona negra intensa. . . . . | $\text{Pb}^{++}$ |
| b) | Zona negro-roja. . . . .    | $\text{Ag}^+$    |
| c) | Zona negra. . . . .         | $\text{Tl}^+$    |

B) *Cationes del grupo del sulfhídrico.*—Se parte de una disolución acuosa en presencia de ácido tartárico de  $\text{Sb Cl}_3$ ,  $\text{As Cl}_3$  y  $\text{Bi} (\text{NO}_3)_3$ .

Adsorbente, alúmina acidificada con tartárico. Como líquido de lavado se utiliza agua con un poco de ácido tartárico. Revelador, agua sulfhídrica.

Cromatograma:

- |    |                              |                   |
|----|------------------------------|-------------------|
| a) | Zona negro-castaña . . . . . | $\text{Bi}^{+++}$ |
| b) | Zona anaranjada . . . . .    | $\text{Sb}^{+++}$ |
| c) | Zona amarilla . . . . .      | $\text{As}^{+++}$ |

Para comprobar el bismuto, cuyo sulfuro negro se superpone ya en la primera capa al anaranjado del sulfuro de antimonio, se vierte por la parte superior de la columna un nuevo reactivo, que se comporta como un eluyente de las bandas *b*) y *c*); y, por consiguiente, será también eluyente de la parte de banda *b*) que se superpuso a la *a*), dejándola ahora de su verdadero color negro.

Es decir, la banda *a*) toma así un color negro intenso (su sulfuro es insoluble en sulfuro amónico). Y las bandas *b*) y *c*) se disuelven formando sulfosales con el sulfuro amónico y se separan dichas sulfosales de As y Sb por la parte inferior de la columna.

Del grupo del sulfhídrico son también los cationes del siguiente problema: disolución acuosa de Sb Cl<sub>3</sub>, As Cl<sub>3</sub> y Cd Cl<sub>2</sub> en presencia de tartárico.

Líquido de lavado, agua con tartárico. Revelador, agua sulfhídrica.

Cromatograma:

a)	Zona de color rojo . . . . .	Sb+++
b)	Zona de color amarillo . . . . .	As+++
c)	Zona de color blanca . . . . .	H+
d)	Zona de color amarilla . . . . .	Cd+

Empleando como eluyente posteriormente al sulfuro amónico, quedan decoloradas las zonas *a*), *b*) y *c*), y persiste en su color amarillo la *d*).

Otro problema del grupo sulfhídrico: disolución acuosa en presencia de gran cantidad de tartárico de Sb Cl<sub>3</sub>, As Cl<sub>3</sub>, Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (en pequeña cantidad, pues si no precipitaría cloruro de plomo por la presencia de los iones Cl de las sales de antimonio y arsénico), Cu (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> y Cd (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

Como adsorbente, la alúmina con algo de tartárico. Líquido de lavado, agua con tartárico. Revelador, agua sulfhídrica.

Cromatograma:

a)	Zona anaranjada . . . . .	Sb+++
b)	Zona amarilla . . . . .	As+++
c)	Zona negra intensa . . . . .	Pb++
d)	Zona negro-castaña . . . . .	Cu++
e)	Zona amarilla . . . . .	Cd++

La separación que aquí se realiza es buena con la condición de que los cationes tengan una concentración aproximadamente igual.

Sin embargo, aún queda mucho por perfeccionar en este método, cuya aplicación al análisis mineral data sólo de 1937 (13).

Así una buena parte del Cu<sup>++</sup> es conjuntamente adsorbida con el Pb<sup>++</sup>. Y lo mismo le ocurre al Cd<sup>++</sup> con los cationes próximos en la escala de afinidad de adsorción.

Puede por este medio investigarse la presencia del cadmio con gran cantidad de cinc; problema interesante, pues es, precisamente, el orden de magnitud de las concentraciones a que se encuentra el cadmio en los

(13) Schwab y Jorkers, *angew. Chem.*, 50, 546, 1937; *Z. anal. Ch.*, 126, 105, 1943.

minerales de cinc. Pero la separación cuantitativa, que tan gran interés tiene, es problema que no está resuelto hasta el presente (14).

Para dos elementos del grupo del sulfhídrico fueron poco eficaces las columnas cromatográficas con alúmina: el catión mercúrico y el estánnico.

C) *Cationes del grupo del sulfuro amónico.*—Se parte de una disolución de nitrato, cloruro o sulfato de  $\text{Fe}^{+++}$ ,  $\text{Cr}^{+++}$ ,  $\text{UO}_2^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Co}^{++}$ ,  $\text{Ni}^{++}$  y  $\text{Mn}^{++}$ .

Como adsorbente, la alúmina. Disolvente y líquido de lavado, el agua. Revelador, amoníaco primero y después paso de una corriente de aire a través de la columna.

Cromatograma:

a)	Zona parda . . . . .	$\text{Fe}^{+++}$
b)	Zona verde . . . . .	$\text{Cr}^{+++}$
c)	Zona amarilla . . . . .	$\text{UO}_2^{++}$
d)	Zona blanca . . . . .	$\text{Zn}^{++}$
e)	Zona rosa o amarillo . . . . .	$\text{Co}^{++}$
f)	Zona verde azulada rosada . . . . .	$\text{Ni}^{++}$
g)	Zona color tabaco . . . . .	$\text{Mn}^{++}$

Además de la observación del color de las bandas, se ha estudiado también el espectro de adsorción de la luz reflejada en las zonas de los iones inorgánicos coloreados.

#### Cromatografía con varios adsorbentes y revelado de una sola especie absorbida

En el método cromatográfico podríamos incluir, sin duda, la comprobación y diferenciación de precipitados análogos (precipitados obtenidos con reactivos de grupo), no por la naturaleza química de los mismos, sino por sus distintas propiedades adsorbentes (15).

Si precipitamos con sulfato sódico una disolución de cloruro bórico, en presencia de una pequeña cantidad de permanganato potásico, el precipitado de sulfato bórico obtenido retiene permanganato potásico. Por filtración, utilizando la trompa para realizar el lavado con la menor cantidad posible de agua, se separa el sulfato bórico. Se le pone en un tubo de ensayo añadiéndole un reactivo del ión  $\text{MnO}_4^-$  que lleva adsorbido.

Así, por ejemplo, con la disolución acuosa de acetato de bencidina, que es un reactivo de oxidantes, inmediatamente el precipitado se colorea de violeta.

(14) Schwab y Ghosh, *angew. Chem.*, 52, 666, 1939.

(15) Trabajos que se llevan en el Laboratorio de Q. Analítica de esta Facultad con el profesor F. Cárceles.

Si se realiza la misma operación precipitando sulfato de estroncio de una sal de estroncio en presencia de ión  $\text{MnO}_4^-$  el adsorbato obtenido acusa con el revelador acetato de bencidina la presencia de dicho ión, aunque en inferior escala al caso del sulfato bórico. Y el color es verde azulado.

El sulfato de plomo precipitado en análogas condiciones muestra después del revelado una coloración parda.

Los colores varían según sea el pH del medio después de la adición del revelador; y también con los demás cuerpos en cuyo seno se realiza la precipitación de los sulfatos de los iones  $\text{Ba}^{++}$ ,  $\text{Sr}^{++}$  y  $\text{Pb}^{++}$ .

Puede preverse la posibilidad de diferenciación de una mezcla de los tres sulfatos, precipitada conjuntamente, por revelado posterior en condiciones adecuadas por un revelador conveniente.

En pocas palabras; en la cromatografía estudiada antes se emplea una columna adsorbente que retiene varias especies puestas posteriormente de manifiesto por el revelado.

En la diferenciación anterior son varias las especies adsorbentes ( $\text{SO}_4\text{Ba}$ ,  $\text{SO}_4\text{Sr}$  y  $\text{SO}_4\text{Pb}$ ), y uno solo el soluto adsorbido (el ión  $\text{MnO}_4^-$ ), que se pone de manifiesto con el revelador (acetato de bencidina).

De esta forma podríamos quizás lograr la confirmación de la naturaleza de muchos precipitados, no por las reacciones correspondientes a su molécula, sino por las de las especies adsorbidas.

### La cromatografía capilar

El método cromatográfico ha sido también desarrollado según la técnica que se puede denominar cromatografía capilar. Se ha empleado un trozo de papel secante o incluso de filtro colocado entre dos vidrios planos (lo mejor, discos); el superior provisto de un orificio en el centro. La disolución objeto de investigación y, a continuación el líquido de lavado, se dejan caer suavemente por este orificio; y los componentes de la disolución pasan a través del papel y se manifiestan posteriormente por métodos físicos o químicos de revelado en forma de anillos concéntricos (16). Este procedimiento constituye el micrométodo usado por W. G. Brown para la separación de los pigmentos verdes de las hojas a partir de su disolución en sulfuro de carbono. Del mismo tipo es la cromatografía capilar, que emplea como columna cromatográfica una tira de papel de filtro colocada verticalmente e introducida un centímetro o menos en la disolución ensayada. Por capilaridad (y en este caso, como es natural, de abajo a arriba), ascienden a distintos niveles los diferentes componentes

(16) W. G. Brown, *Nature*, 1939, 143, 377.

de la disolución. Después del revelado de las tiras se acusan manifiestamente las distintas bandas.

### La cromatografía eléctrica

Y, finalmente, para terminar este artículo, describiremos la cromatografía eléctrica, según la técnica de H. H. Strain (17) y Ederna, como todo lo inherente a este método, resultante de la combinación de los métodos electroforético y cromatográfico, que extiende y aumenta la actividad de ambos métodos de separación de las sustancias puras a partir de mezclas.

La columna cromatográfica se prepara así: se coloca un electrodo en espiral (que actuará de ánodo) recubierto toscamente con algodón en la parte inferior del tubo, y después se le llena con el adsorbente. Como tal ha sido muy empleado el talco. Se llena de agua y se realiza una succión suave con la trompa. Un segundo electrodo (el cátodo) se coloca en la parte superior de la columna, y su contacto con el adsorbente de la misma se establece por el medio líquido conductor. Se deja caer la mezcla, cuyos componentes han de separarse, como siempre, por la parte superior, y se aplica el potencial a los dos electrodos. Se utilizan potenciales de 175 a 200 voltios y corrientes de 0,5 a 2 miliamperios con columnas adsorbentes de 2 por 13 cms. a 3 por 23 cms.

Se han separado así (en el orden de cátodo a ánodo) mezclas de aminoazobenceno y carmín de indigo; 3 nitro, 4 aminoanisol y carmín de indigo; anaranjado de metilo y rojo de metilo; anaranjado de metilo y 2,6 diclorofenol indofenol; anaranjado de metilo, rojo de metilo y carmín de indigo; ácido pícrico y anaranjado de metilo.

Naturalmente, por electroforesis emigran los pigmentos hacia los electrodos de carga opuesta y dan lugar a una serie de bandas o zonas coloreadas, cada una de las cuales contiene un solo pigmento.

La anchura de las bandas de las sustancias adsorbidas, formada en las columnas por electroforesis, depende de la cantidad de pigmento presente y de la capacidad de adsorción del adsorbente.

Se produce en la cromatografía eléctrica un efecto electroosmótico bastante pronunciado.

Se regula la presión del agua en combinación con la presión electroosmótica. Y, como es corriente, en cualquier variante del método de Tswett, se aplica una succión conveniente en la base de la columna o una presión en la parte superior.

Una de las aplicaciones más interesantes del método eléctrico cro-

(17) H. H. Strain, J. Amer. Chem. Soc., 1939, 61, 1.292.

matográfico lo ha constituido la separación a partir de disoluciones débilmente ácidas de las dos formas de un indicador.

Las formas existentes en disolución ácida fueron adsorbidas mucho más fuertemente que las que se presentan en disoluciones débilmente alcalinas. Lo que nos proporciona otro medio de investigar la tautomería de los indicadores.

Desde luego no se han encontrado, hasta ahora, compuestos separables por electroforesis e inseparables por adsorción cromatográfica. Aunque, indudablemente, la electroforesis produce, por lo general, mejor separación que la filtración adsorbente por sí sola.

*S*